

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

**FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS ENVOLVIDOS NA
ANGIOGÊNESE DE MELANOMA EM ANIMAIS
SELECIONADOS PELA INTENSIDADE DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Graziela Gorete Romagnoli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia

**BOTUCATU – SP
2007**

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

**FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS ENVOLVIDOS NA
ANGIOGÊNESE DE MELANOMA EM ANIMAIS
SELECIONADOS PELA INTENSIDADE DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Mestrando: Graziela Gorete Romagnoli

Orientador : Prof. Dr. Ramon Kaneno

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia

**BOTUCATU - SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Romagnoli, Graziela Gorete.

Fatores de crescimento e citocinas envolvidos na angiogênese de melanoma em animais selecionados pela intensidade da resposta inflamatória aguda / Graziela Gorete Romagnoli. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Ramon Kaneno

Co-orientador: Luis Fernando Barbisan

Assunto CAPES: 40101045

1. Câncer - Aspectos imunológicos 2. Inflamação 3 Resposta inflamatória

CDD 616.994

Palavras chave: Angiogênese; Citocinas; Fatores de crescimento; Inflamação; Melanoma

ABREVIATURA

AIR - Resposta inflamatória aguda
B16F10 - Células de melanoma murino B16F10
CTL ou CD8⁺ - Células T citolíticas
EGF - Fator de crescimento epidermal
FGF-2 ou bFGF - Fator básico de crescimento de fibroblasto
HIF-1 - Fator 1 indutível pela hipóxia
ICAM-1 - Moléculas de aderência intercelular 1
IL-1 - Interleucina 1
IL-2 - Interleucina 2
IL-2R - Receptor para interleucina 2
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
INF- γ - Interferon gama
LAK - Linfócitos com atividade *killer*
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP - Metaloproteinases
mRNA - RNA mensageiro
NK - Células *natural killer*
NO - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico-sintase
NSAID - Droga antiinflamatória não esteróide
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
S91 - Células de melanoma murino S91
TAM - Macrófagos associados ao tumor
TGF- β - Fator de crescimento e transformação beta
TIL - Linfócitos infiltrantes de tumor
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1 - Molécula de aderência à células vasculares 1
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR - Receptor para fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. Revisão Bibliográfica	01
2. Referências	17
3. Objetivo Geral	27
2.1. Objetivos Específicos	27
4. Manuscrito	28
Resumo	30
1. Introdução	31
2. Material e Métodos	33
2.1. Animais	33
2.2. Delineamento Experimental	34
2.3. Cultura de células dos melanomas murino B16F10 e S91	34
2.4. Análise Histopatológica	35
2.5. Avaliação da vasculatura intratumoral	35
2.6. Extração de RNA do baço e obtenção de cDNA	35
2.7. <i>Primers</i> utilizados para a reação em tempo real da polimerase	36
2.8. Quantificação relativa de mRNA dos fatores de crescimento pela PCR em tempo real	36
2.9. Determinação do número de células produtoras de citocinas pela Técnica de ELISpot	37
2.10. Análise Estatística	38
3. Resultados	39
3.1. Avaliação Histopatológica	39
3.2. Avaliação da vasculatura intratumoral	39
3.3. Detecção de mRNA de fatores angiogênicos no baço	40
3.4. Determinação do número de células produtoras de citocinas	41
4. Discussão	52
Agradecimentos	56
Referências	57
5. Anexo	61

1. Revisão Bibliográfica

O câncer constitui o segundo maior problema de saúde pública da atualidade, superado apenas pelas doenças cardiovasculares. No ano de 2006 foram estimados 472.050 novos casos de câncer no Brasil, sendo o de maior incidência o câncer de pele não melanoma (116 mil casos novos). O melanoma, por sua vez, apresenta baixa incidência, correspondendo a 2% do total de tumores diagnosticados em homens e mulheres, entretanto, sua letalidade é elevada e essa característica tem íntima relação com a ocorrência de metástases ^(1,2).

O desenvolvimento tumoral é causado pela expressão de oncogenes e/ou pela inativação de genes supressores tumorais, que levam a um fenótipo de múltiplas propriedades malignas, tais como proliferação descontrolada, capacidade de invasão e potencial metastático. Essas características fenotípicas estão presentes em células de melanomas malignos, as quais expressam diferentes metaloproteinases (MMPs) ^(3,4), citocinas ^(5,6,7) e fatores de crescimentos ⁽⁸⁾ em determinados estágios do desenvolvimento tumoral.

Melanomas cutâneos podem se desenvolver a partir de melanócitos normais ou de lesões precursoras como nevos congênitos ou nevos displásicos ⁽⁹⁾. Histologicamente podem ser diferenciadas duas fases de crescimento do melanoma, a fase de crescimento radial ou horizontal e a fase de crescimento vertical. Na fase de crescimento radial observa-se a tendência das células de crescerem nas camadas epidérmicas e derme superficial por um tempo prolongado ⁽¹⁰⁾. Nessa fase, há baixo infiltrado linfocitário e as células microinvasivas do melanoma depositam ao redor de si estroma fibrovascular ^(11,12). Na fase de crescimento vertical, as células crescem em direção às camadas mais profundas da derme como uma massa expansiva e com perda de

maturidade celular ⁽¹⁰⁾. Essa fase é caracterizada pelo alto risco de disseminação, estando também associada a altas taxas mitóticas, neovascularização, bem como pela presença de infiltrado inflamatório ^(9,13,14).

A possível associação entre inflamação e o desenvolvimento tumoral foi hipotetizada por Virchow, em 1863, que observou a presença de infiltrado inflamatório no sítio tumoral. Para esse pesquisador, os leucócitos ali presentes liberavam fatores irritantes que, juntamente com o tecido injuriado, criavam um microambiente favorável à proliferação celular ^(15,16). Corroborando a hipótese de Virchow, vários estudos demonstraram uma relação bem estabelecida de diferentes tumores com processos de inflamação crônica, decorrentes de infecções por vírus, bactérias e parasitas, doenças autoimunes ou da presença de agentes químicos e físicos ^(15,17). Assim, foi observado, por exemplo, que pacientes com colite ulcerativa com períodos de ulceração e regeneração da mucosa colorretal, apresentaram maior frequência de carcinomas colorretais e que o tratamento desses indivíduos com drogas antiinflamatórias não esteróide (NSAIDs) é capaz de reduzir este risco ⁽¹⁸⁾.

Atualmente se sabe que os fatores irritantes, antes mencionados por Virchow, constituem uma série de mediadores inflamatórios, como radicais livres e citocinas, produzidos por células infiltradas no sítio tumoral ^(19,20). Dentre esses mediadores, as espécies reativas do oxigênio e o óxido nítrico (NO) podem ser gerados em altos níveis e danificar o DNA das células em proliferação, proporcionando acúmulo de alterações genéticas. Além disso, o NO pode causar dano às proteínas envolvidas no reparo do DNA, bem como levar à mutação do gene supressor tumoral *p53* ⁽²¹⁾. O *p53* tem a função de manter a integridade do genoma celular, controlando a ação de fatores transcricionais, a proliferação celular e a apoptose. O *p53* também é responsável pela degradação do fator alfa-1 indutível pela hipóxia (HIF-1 α) ⁽²²⁾. Assim, a perda da função

do *p53* pode acarretar no acúmulo de HIF-1 α , que aumenta a atividade glicolítica das células tumorais e induz a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator esse chave no processo de angiogênese ⁽²³⁾.

Assim, a angiogênese ou a neovascularização é um processo existente tanto na resposta inflamatória crônica, quanto no desenvolvimento tumoral. Esse evento se caracteriza pela formação de novos vasos, ao redor e/ou dentro do tumor, a partir de um vaso pré-existente ou de células progenitoras da medula óssea ^(24,25) e se desencadeia através de um desequilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos produzidos principalmente por células inflamatórias, mas também pelas próprias células tumorais ^(15,26,27). A formação desses novos vasos é um processo de múltiplas etapas, iniciando com a degradação da membrana basal, que circunda os capilares, por ação de proteases e collagenases, seguida da proliferação e invasão de células endoteliais no estroma tumoral ⁽²⁸⁾.

Folkman, em sua revisão ⁽²⁹⁾, foi um dos primeiros a propor que o crescimento tumoral e a metástase eram dependentes da neovascularização, relatando que tumores implantados em órgãos não perfundidos tinham falha no seu crescimento, enquanto tumores implantados próximos à íris, área ricamente irrigada, induziam a angiogênese e rápido crescimento tumoral. Vários experimentos que se seguiram evidenciaram que o crescimento tumoral era dependente da neovascularização, sendo que tumores sem vasculatura ficavam restritos a tamanhos microscópicos, tendo seu crescimento controlado pelo balanço entre proliferação celular e apoptose ^(30,31). Entretanto, esses tumores não vascularizados podem sofrer mudanças e se tornar angiogênicos, evento esse conhecido como *switch* angiogênico.

O *switch* pode ser direcionado por oncogenes angiogênicos, como o *ras*, que regula positivamente a expressão de VEGF e/ou pela regulação negativa da expressão de inibidores da angiogênese, como as trombospondinas ^(32,33). Uma segunda maneira seria

a condição de hipóxia associada ao tumor, a qual ativa HIF-1, que regula proteínas angiogênicas, como já mencionado acima ^(23,34). Além disso, fibroblastos residentes no sítio tumoral podem induzir o *switch*, levando células tumorais a produzirem proteínas pró-angiogênicas ⁽³⁵⁾. Fibroblastos ou células tumorais também podem produzir algumas MMPs, que atuam como enzimas proteolíticas sobre a matriz extracelular e membrana basal, favorecendo a migração das células endoteliais. Além disso, algumas MMPs podem induzir ou ativar fatores pró-angiogênicos, que estavam na forma latente seqüestrados pela matriz extracelular ^(36,37).

Após o *switch*, observa-se aumento da sobrevivência das células tumorais e diminuição da apoptose, em decorrência da entrega de oxigênio e nutrientes e remoção dos metabólitos celulares pelos novos vasos sanguíneos ^(28,31). Observa-se também liberação tanto autócrina, quanto parácrina de fatores de crescimento e citocinas no microambiente tumoral por células do sistema imune, células inflamatórias, células do estroma e mesmo por células tumorais ⁽³¹⁾.

Dentre os fatores que regulam positivamente a angiogênese, o VEGF tem papel crucial na indução da neovascularização de tumores como o melanoma ⁽³⁸⁾, sendo por isso, um fator que merece destaque. Este fator de crescimento pertence à superfamília PDGF-VEGF, constituída de cinco membros, sendo o mais expresso o VEGF-A ⁽³⁹⁾. O VEGF pode ser produzido por inúmeros tipos celulares como macrófagos, células T, células da musculatura lisa, esplenócitos, queratinócitos, astrócitos, osteoclastos e também por células tumorais ^(40,41). Sua ação é principalmente mediada através de ligação com 2 tipos de receptores tirosina quinase, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1) ⁽⁴²⁾.

O VEGF pode induzir tanto a angiogênese fisiológica, como a patológica, atuando como potente mitógeno de células endoteliais ⁽⁴¹⁾. É essencial para a mobilização de células endoteliais precursoras derivadas da medula óssea ⁽⁴³⁾ e pode

também modular a migração das células endoteliais ⁽⁴⁴⁾. Além disso, aumenta a permeabilidade vascular ⁽⁴⁵⁾, estimula a expressão endotelial do ativador do plasminogênio ⁽⁴⁶⁾ e metaloproteinases da matriz ⁽⁴⁷⁾, as quais estão envolvidas na degradação da matriz extracelular, ação essa necessária para a migração das células endoteliais. O VEGF pode ter ações inibitórias sobre a apoptose de células endoteliais, através da indução da expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 ⁽⁴⁸⁾. Esse fator pode inibir a maturação de células dendríticas no sítio tumoral em adenocarcinoma gástrico ⁽⁴⁹⁾, sugerindo, assim, redução na imunovigilância contra tumores.

A expressão de VEGF também está relacionada com potencial metastático, pois vários trabalhos demonstraram que tanto a angiogênese tumoral, quanto expressão de VEGF no melanoma são características de metástase e recidivas ^(38,50,51,52). Nesse sentido, Salven et al. ⁽⁵³⁾, observaram que 32% das células de melanomas primários e 91% das de melanomas metastáticos expressavam VEGF. Esses autores demonstraram ainda que todos os tipos de melanomas apresentaram um alto número de células inflamatórias infiltrantes que expressavam VEGF, sugerindo que esse fator é regulado positivamente durante a progressão e disseminação do tumor. Outros autores encontraram níveis significativos de VEGF, fator básico de crescimento de fibroblasto (FGF-2) e interleucina 8 (IL-8) no soro de pacientes com melanoma em comparação com o indivíduo controle e esses valores mostraram uma forte correlação com a elevada probabilidade de progressão ⁽²⁷⁾.

As células inflamatórias infiltrantes podem contribuir para a progressão do melanoma, através da produção de citocinas que induzem a expressão de VEGF. Torisu et al. ⁽⁵⁴⁾ observaram a produção de VEGF e IL-8 por células de melanoma, em resposta à produção de fator de crescimento e transformação β (TGF- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 e metabólitos do ácido aracdônico produzidos por macrófagos. Leek et al.

⁽⁵⁵⁾ observaram também que células de carcinoma de mama passam a expressar VEGF em resposta a citocinas como TNF, IL-1 e IL-6 produzida por macrófagos associados ao tumor (TAM). Além disso, os TAM podem produzir TGF- β 1, que, por si só, pode induzir a angiogênese, bem como induzir a produção de VEGF.

Além da hipóxia, vários fatores regulam a expressão de VEGF, entre eles, os fatores de crescimento como o PDGF ⁽⁵⁶⁾ e o fator de crescimento epidermal (EGF) ⁽⁵⁷⁾, citocinas como TGF- β ⁽⁵⁸⁾, IL-6 ⁽⁵⁹⁾, IL-1 ⁽⁶⁰⁾ e também prostaglandina E ⁽⁶⁰⁾ e éster de forbol ^(56,61).

O FGF-2 ou FGF-básico (bFGF) é outro fator de crescimento com importante papel angiogênico e pode ser produzido por macrófagos e mastócitos e também por células tumorais. O FGF-2 pode ser liberado da matriz extracelular e torna-se ativo através da ligação com heparina ou heparan sulfato das glicosaminoglicanas ⁽⁶²⁾. Essa ligação é pré-requisito para uma interação de alta afinidade com seu receptor na superfície celular ⁽⁶³⁾.

Diferentemente do VEGF, o FGF-2 tem ação pleiotrópica, estimulando o crescimento tanto de células endoteliais, como de células da musculatura lisa, fibroblastos e células tumorais ⁽⁶⁴⁾. Além de estimular o crescimento, esse fator pode degradar a membrana basal pela ativação de collagenases, gelatinases e proteases ^(65,66). Essa ação sobre a matriz é extremamente importante para que as células tumorais consigam invadir o tecido subjacente.

Tsunoda et al ⁽⁶⁷⁾ demonstraram que a inoculação de FGF-2 exógeno no sítio tumoral em camundongos induziu a neovascularização nos estágios iniciais da tumorigênese, com subsequente crescimento e metástase de células de melanoma maligno B16-BL6. Também observou sua ação sobre as células do estroma tumoral, induzindo a

expressão de VEGF-A. Além disso, a injeção local de FGF-2 induziu inicialmente o recrutamento de neutrófilos, células T e monócitos, também produtoras de VEGF-A, que contribuem indiretamente para a neovascularização. O FGF-2 é expresso pelas células do melanoma, mas não por melanócitos normais ⁽⁶⁸⁾, porém ambas expressam receptores de alta afinidade para esse fator ⁽⁶⁹⁾.

Fazendo uma interface entre a resposta imune e os processos envolvidos na angiogênese, observa-se a atuação do TGF- β . Definido originalmente pela habilidade de induzir transformação em células não neoplásicas em cultura ⁽⁷⁰⁾, o TGF- β pode tanto suprimir quanto aumentar a carcinogênese ⁽⁷¹⁾. Plaquetas e linfócitos são fontes dessa citocina multifuncional, que regula os processos de proliferação e diferenciação celulares ^(72,73). Além disso, o TGF- β é um potente quimioatrativo para monócitos do sangue periférico ⁽⁷⁴⁾, bem como para linfócitos e neutrófilos ⁽⁷⁵⁾.

TGF- β tem o potencial de inibir o crescimento da maioria das células normais e malignas de origem epitelial, endotelial e linfóide ⁽⁷⁶⁾, entretanto em estágios avançados da tumorigênese, as células tumorais tornam-se resistentes, devido à perda ou mutações que levam a inativação de genes de um ou mais componentes envolvidos na sinalização do TGF- β ⁽⁷³⁾. Assim, nessas células a sensibilidade ao TGF- β diminui ou desaparece, fazendo com que essa citocina deixe de atuar como inibidor parácrino em estágios avançados de metástase de melanoma ^(77,78).

Esse fator também pode induzir a angiogênese tumoral, através da potencialização da ação angiogênica do FGF-2 ⁽⁷⁹⁾ e também por atuar nas células do estroma tumoral, promovendo a formação da matriz extracelular, regulando positivamente a expressão de moléculas de adesão como as β -integrinas ^(80,81). O TGF- β pode ainda favorecer a angiogênese pela indução da expressão de VEGF por células tumorais ⁽⁸²⁾.

Wojtowicz-Pagra ⁽⁸³⁾ relatou que a maioria dos tumores malignos expressa TGF- β , atuando como imunossupressor por diminuir a imunovigilância e, assim, favorecendo o crescimento tumoral e metástase. Nesse sentido, estudos têm demonstrado a habilidade desse fator de crescimento em inativar células natural *killer* (NK) e linfócitos com atividade *killer* (LAK), provavelmente pela inibição da secreção de TNF- α e β ^(84,85).

Dentre as citocinas envolvidas na relação tumor:hospedeiro, o TNF- α possui papel chave na associação inflamação/câncer. O TNF- α é um polipeptídeo multifuncional, que atua como mediador pleiotrópico das inflamações aguda e crônica e também da resposta imune ⁽⁸⁶⁾. Durante o processo inflamatório, essa citocina é produzida primariamente por neutrófilos e depois por macrófagos, na tentativa de reparar o tecido injuriado ⁽¹⁶⁾.

Quando produzida localmente em altas doses, essa citocina pode ter ação citotóxica direta sobre o endotélio vascular tumoral, induzindo também apoptose e necrose das células tumorais ^(87,88). Outra característica antitumoral importante, é que o TNF- α pode mediar a morte de células tumorais através da atividade *killer* das células TCD8⁺ e NK ⁽⁸⁸⁾. Pode também inibir a proliferação endotelial, bloqueando a angiogênese ⁽⁸⁹⁾ e também atuar como fator angiostático, sozinho ou em sinergismo com IL-12 ⁽⁹⁰⁾. O TNF- α pode ter sua ação potencializada pelo interferon gama (IFN- γ) e, quando atua em sinergismo com essa citocina, regula negativamente a angiogênese, através da diminuição da expressão de α V β 3 integrina nas células endoteliais, resultando no desprendimento e apoptose destas células ⁽⁹¹⁾.

Entretanto, quando a produção de TNF- α passa a ser crônica e em baixos níveis, essa citocina pode causar dano ao DNA da célula tumoral, por induzir a produção de espécies reativas do oxigênio, as quais, além de agirem diretamente no DNA, podem inibir enzimas de reparo ^(86,92). O TNF- α possui atividade antiapoptótica por ativar o fator

nuclear NFκB ⁽⁹³⁾ e também pode mediar a interação entre células tumorais e estroma pela indução de quimiocinas, como IL-8 ⁽⁹²⁾, MMP9 ⁽⁹⁴⁾ e fatores de crescimento, tais como VEGF e FGF-2 ⁽⁹²⁾, sendo essas moléculas importantes no desenvolvimento vascular tumoral.

Quando atua sozinho ou em sinergismo com IL-1, o TNF-α pode induzir a expressão de moléculas de adesão, tais como VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio ^(95,96), aumentando o risco metastático por facilitar a adesão ao tecido vascular e migração das células tumorais do tecido para a corrente circulatória ⁽⁹⁷⁾.

A IL-6 é outra citocina que induz a expressão de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em células de melanoma ⁽⁹⁸⁾. Essa interleucina pode ser produzida por TAM e induzir a angiogênese tumoral por regular positivamente a expressão de VEGF ^(88,99). Nesse sentido, Cools-Lartigue et al. ⁽⁷⁾ demonstraram que monócitos estimulados *in vitro* com sobrenadante de cultura de melanoma uveal expressavam níveis significativos de IL-6. Os autores sugerem que, *in vivo*, a produção dessa citocina por TAM pode agir como um fator pró-angiogênico e também desativar macrófagos com atividade citotóxica, favorecendo, assim, o crescimento, sobrevivência, proliferação tumoral e metástase.

Embora no estágio inicial do desenvolvimento de melanoma a IL-6 possua um papel protetor, inibindo o crescimento das células malignas, provavelmente por aumentar a função das células T citolíticas (CTLs) ^(98,100,101), sua expressão em estágios mais avançados da tumorigênese, está associada a progressão tumoral e diminuição da sobrevida de pacientes com melanomas malignos cutâneo ^(101,102). Sua expressão em células de melanoma uveal humano também está associada à progressão tumoral, fato que poderia justificar os altos índices de metástase nos pacientes acometidos com esse tumor ⁽⁷⁾.

Também foi observado por Ângelo et al. ⁽¹⁰³⁾ que a mutação do *p53* em células de carcinoma renal regulou positivamente a expressão da IL-6, uma vez que, em condições normais, o *p53* suprime o promotor da IL-6, por interferir em vários fatores transcricionais que regulam o gene que codifica essa interleucina.

A IL-10 é outra citocina com ação pleiotrópica e sua atividade antitumoral na resposta imune é ainda controversa. Em modelo murino de células de melanoma transfectadas com IL-10, essa citocina foi capaz de inibir o crescimento tumoral por estimulação do sistema imunológico, principalmente pela ativação das células NK e de CTLs ⁽¹⁰⁴⁾. Huang et al. ⁽¹⁰⁵⁾, utilizando células de melanoma humano que expressavam IL-10, demonstraram que essa citocina inibiu o crescimento tumoral e teve efeito antimetastático. Esses resultados foram correlacionados com a inibição da angiogênese in vivo, uma vez que a IL-10 foi capaz de regular negativamente a expressão de VEGF, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MMP-9 em TAMs.

Entretanto, García-Hernández et al. ⁽¹⁰⁶⁾, utilizando também células de melanoma transfectadas, demonstraram que a IL-10 promoveu o crescimento das células tumorais, o que se correlacionou com a ocorrência de angiogênese, visto que células endoteliais expressavam receptor para essa citocina. Esses autores também observaram aumento do número de linfócitos T CD4⁺, sugerindo serem do padrão Th2, favorecendo o crescimento e modelando a angiogênese tumoral, sendo esses efeitos prevenidos quando utilizaram anticorpo monoclonal anti-IL-10.

Howell et al ⁽¹⁰⁷⁾, utilizando material de biopsia de pacientes com melanoma maligno cutâneo, estudaram se o polimorfismo genético associado à produção de IL-10 influenciava no prognóstico da doença. Os autores observaram que o genótipo de alta expressão de IL-10 se correlaciona com crescimento menos invasivo do melanoma

(crescimento radial), enquanto as células com expressão média ou baixa estavam associadas à maior frequência de casos com crescimento vertical importante.

A interação do tumor com o sistema imune do hospedeiro desencadeia a geração de uma variedade de citocinas com importante papel antitumoral. Uma das mais importantes citocinas envolvidas na resistência aos tumores é o IFN- γ . Essa citocina é um potente indutor de moléculas de histocompatibilidade de classe I (HLA-I) em células de melanoma humano *in vitro*. A expressão do antígeno HLA-DR (MHC classe II) em cultura de melanomas, que normalmente não expressam esse antígeno, é também induzida após administração de IFN- γ ⁽¹⁰⁸⁾. O aumento da expressão de HLA-I por IFN- γ pode diminuir a suscetibilidade das células tumorais à lise por células NK, mas por outro lado, o potencial de lise dos linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) é aumentado após incubação com essa citocina ⁽¹⁰⁹⁾.

Além de induzir a expressão de HLA, o IFN- γ também aumenta a expressão de ICAM-1 em células de melanoma e melanócitos ^(110,111,112), entretanto, diferentemente do que ocorre com a IL6, essa expressão foi associada com o aumento da vulnerabilidade das células tumorais a morte mediada por monócitos ⁽¹¹²⁾. Gusella et al. ⁽¹¹³⁾ observaram que monócitos humanos, quando tratados com IL-2, induziram aumento tanto na expressão de mRNA de IL-8, quanto da proteína. Entretanto, quando essas células foram tratadas com IFN- γ , falharam na indução da expressão de IL-8 e também inibiram o estímulo proporcionado pela IL-2. A inibição da IL-8 é importante, pois a expressão dessa quimiocina está fortemente associada à angiogênese tumoral ^(15,114).

Outro grupo a sugerir o papel do IFN- γ na inibição da angiogênese foi de Coughlin et al. ⁽¹¹⁵⁾, que demonstraram que células de carcinoma mamário transfectadas com genes de IL-12 e IL-18 induzem aumento da expressão de IFN- γ , que por sua vez tem ação angiostática pela inibição da expressão de quimiocinas ELR-CXC.

A IL-2 é outra citocina que está envolvida na indução de uma resposta imune eficiente. Essa citocina é produzida principalmente por linfócitos T auxiliares (Th), induzindo sua maturação, diferenciação e ativação ⁽¹¹⁶⁾. Além disso, pode induzir a atividade de células LAK, macrófagos e monócitos ativados, além de aumentar a função das células NK ⁽¹¹⁷⁾. Todas essas células são importantes na resposta imune celular contra tumores, razão pela qual o uso terapêutico da IL-2 em pacientes com melanoma é defendido por alguns autores ^(118,119).

Wagner et al. ⁽¹²⁰⁾ demonstraram que melanoma cutâneo humano em estágio de regressão expressam tanto o receptor para IL-2, quanto altos níveis dessa citocina, sugerindo assim sua contribuição no combate ao melanoma. Niu et al. ⁽¹²¹⁾ também demonstraram que células de melanoma murino transfectadas com gene da IL-2 *in vivo* tiveram seu crescimento reduzido. Entretanto, Garcia-Vázquez et al. ⁽¹²²⁾ demonstraram que células de melanoma derivado do tumor primário expressavam tanto IL-2R, quanto IL-2 e que essa citocina teve função autócrina, aumentando a proliferação das células tumorais, contribuindo assim para a progressão tumoral.

Finalmente, outra citocina do tipo 1, que induz resposta antitumoral, é a IL-12. Essa citocina tem a capacidade de aumentar a resposta de CTL ⁽¹²³⁾, estimular células NK ⁽¹²⁴⁾ e induzir a produção de citocinas como IFN- γ por células NK e linfócitos T ⁽¹²⁵⁾.

Dabrowasha et al. ⁽¹²⁶⁾ demonstraram o efeito antiangiogênico da IL-12 em células de melanoma B16F10, quando usaram essa citocina com um inibidor de metaloproteinases (BB-94). A IL-12 estimulou a produção de INF- γ que, em combinação com BB-94, proporcionou maior efeito antitumoral. Lasek et al. ⁽⁹⁰⁾ e Coughlin et al. ⁽¹¹⁵⁾ também demonstraram que células tumorais que expressam IL-12 tiveram ação antiangiogênica pela indução de INF- γ . Lasek et al. ⁽⁹⁰⁾ também demonstraram a ação

antiangiogênica da IL-12, sobre a formação de novos vasos no modelo murino de angiogênese induzida por células tumorais B16F10.

A IL-12 também tem sido relacionada com as células T reguladoras (CD4+CD25+). Nagai et al. ⁽¹²⁷⁾ mostraram que células de melanoma B16F10 não foram afetadas pela administração, *in vivo*, do anticorpo monoclonal anti-CD25; entretanto, quando essa administração foi combinada com células tumorais transfectadas com gene para IL-12, resultou em rejeição tumoral. Assim, esses autores indicaram que a depleção *in vivo* de células T reguladoras é um potente adjuvante para imunoterapia de melanoma, principalmente se associado com a presença de IL-12.

Assim, a inflamação pode providenciar localmente citocinas pró e antiinflamatórias, sendo que a progressão tumoral dependerá da influencia do número de células, tipo, tempo e estado de ativação de todas as células presentes no infiltrado. Esse balanço de efeitos opostos no infiltrado reflete o paradoxo da resposta imune observado freqüentemente em pacientes com tumor ⁽¹⁷⁾.

Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos genéticos envolvidos no controle da resposta inflamatória e sua relação com infecções e tumores, o Instituto Curie da França, em colaboração com o Instituto Butantan do Brasil, desenvolveu um modelo murino de resposta inflamatória aguda (AIR). Esse modelo foi obtido por uma seleção fenotípica bidirecional a partir de uma população polimórfica (F0), resultante do cruzamento de oito linhagens isogênicas (A, DBA2, P, SWR, CBA, SJL, BALB/c, C57BL/6). Partindo da população F0, duas linhagens de camundongos foram desenvolvidas com um perfil de resposta inflamatória aguda forte (AIRmax) ou fraca (AIRmin), após inóculo s.c. de partículas de poliacrilamida, um agente quimicamente inerte e não imunogênico ⁽¹²⁸⁾. A seleção desses camundongos foi baseada no influxo de leucócitos e proteínas encontradas no exsudato, 24 e 48 horas, após a injeção das

partículas. O limite da seleção (homozigose) foi alcançado na população F17, em que os animais AIRmax apresentaram 10 vezes mais leucócitos infiltrantes, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e 2,5 vezes mais concentração protéica que os animais AIRmin ⁽¹²⁹⁾. A análise da herdabilidade do caráter inflamação, durante as várias gerações, revelou o envolvimento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) com efeito aditivo, sendo que 11 QTL estão envolvidos com a concentração de células e 7 com a concentração de proteínas ⁽¹²⁹⁾.

Contribuindo para a diferença fenotípica entre as duas linhagens, AIRmax apresenta maior número de PMN na medula óssea, decorrente da maior atração por citocinas granulopoiéticas que AIRmin. Os autores também observaram que os animais AIRmax produzem mais fatores quimiotáticos para PMN no exsudato inflamatório, sendo essas células mais resistentes a apoptose ⁽¹³⁰⁾. Além disso, diferenças no perfil da população de células NK também foram observadas nesses animais, sendo que a linhagem AIRmax apresenta maior número de células NK e CD8⁺ esplênicas que os AIRmin, havendo também diferença entre as linhagens quanto à atividade citotóxica contra células-alvo Yac-1 radiomarcadas e produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12p40 ⁽¹³¹⁾.

Essas diferenças entre as linhagens refletem as mudanças de suscetibilidade/resistência a várias doenças. Di Pace et al. ⁽¹³²⁾ demonstraram que os animais AIRmax são mais suscetíveis que os animais AIRmin à indução de colite por dextran sulfato de sódio e também no desenvolvimento de focos de criptas aberrantes e câncer de cólon induzido por 1,2 dimetil-hidrazina (DMH), indicando a correlação direta entre suscetibilidade ao câncer de cólon e a resposta inflamatória aguda. Entretanto, nesse mesmo trabalho, camundongos AIRmax foram mais resistentes à carcinogênese pulmonar induzida por DMH, visto que animais da linhagem AIRmin desenvolveram múltiplos

ademonas e adenocarcinomas. Assim, a resistência ou suscetibilidade desses animais parece ser dependente das características do órgão acometido.

Maria et al. ⁽¹³³⁾ também demonstraram, em modelo de carcinogênese pulmonar induzido por uretana, que as divergências existentes parecem estar relacionadas com a segregação de alelos suscetíveis (AIRmin) e resistentes (AIRmax) para a região de suscetibilidade para adenoma pulmonar (*Pas-1*) e evidenciando o envolvimento deste *locus* na resposta inflamatória. Nesse trabalho, foi demonstrado que os animais AIRmin apresentaram resposta inflamatória subaguda persistente, com 40 vezes mais focos tumorais que o grupo AIRmax.

Em modelo de carcinogênese química de pele induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzeno (DMBA) e 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), Biozzi et al. ⁽¹²⁹⁾ demonstraram também que os animais AIRmin foram mais suscetíveis que AIRmax, com incidência tumoral 5,8 vezes maior e com múltiplos focos tumorais. Esses autores observaram histologicamente que os tumores que progrediram para malignidade com aspecto macroscópico de carcinoma de pele nos animais AIRmax apresentaram maior infiltração de leucócitos com intensa formação de pus peritumoral. Além disso, esses camundongos apresentaram menor diâmetro tumoral que AIRmin. Todos esses resultados podem sugerir que a contenção local do tumor nos animais AIRmax seja devida à presença de fatores antiangiogênicos, como citocinas, produzidas por células do infiltrado, contendo assim o crescimento tumoral. Castoldi et al. ⁽¹³¹⁾ observaram que animais AIRmax, em condições normais, expressaram mais TNF- α , IFN- γ e IL-12p40, as quais podem atuar como fatores angiostáticos e antiangiogênicos, inibindo a síntese de fatores de crescimento.

Esses animais também foram avaliados quanto à resistência e suscetibilidade a metástases de melanomas implantados ⁽¹³⁴⁾. Esses autores verificaram que camundongos AIRmax, implantados s.c. com melanoma murino B16F10, apresentaram

intenso infiltrado inflamatório no local de inoculação, com massa tumoral pigmentada no dorso, apresentando áreas de ulceração e necrose, mas sem detecção de metástases nos órgãos internos. No entanto, 80% dos camundongos AIRmin apresentaram metástases no pulmão e fígado 15 e 30 dias após inóculo. Quando esses animais foram tratados com drogas antiinflamatórias, nesse mesmo trabalho, ficou demonstrado que os mecanismos inflamatórios estão diretamente relacionados com a imunidade inata, visto que camundongos AIRmax tiveram uma incidência de até 80% de metástase quando tratados com nimesulide.

Assim, dada a complexidade dos processos envolvidos na tumorigênese, deve ser considerada a possibilidade de que a segregação dos genes envolvidos na regulação da resposta inflamatória aguda interfira também em outros mecanismos de controle do crescimento tumoral. **Com isso, o presente projeto foi formulado para testar a hipótese de que a resistência/suscetibilidade dos animais AIRmax e AIRmin ao desenvolvimento de tumores pode ser decorrente de diferenças em sua capacidade de promover a angiogênese tumoral.**

2. Referências*

1. Site do Instituto Nacional do Câncer. <http://www.inca.gov.br>
2. Greenlee R, Murray T, Bolden S, Wingo P. Cancer statistics 2000. *CA Cancer J Clin.* 2000; 50:7-33.
3. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 2000;115:337-44.
4. Kawasaki K, Kawakami T, Watabe H, Itoh F, Mizoguchi M, Soma Y. Expression of matrilysin (matrix metalloproteinase-7) in primary cutaneous and metastatic melanoma. *Br J Dermatol.* 2007;156:613-9.
5. Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer.* 1994;56:755-60.
6. Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer.* 1994;56:853-7.
7. Cools-Lartigue J, Marshall JC, Caissie AL, Saraiva VS, Burnier Jr, MN. Secretion of interleukin-6 and prostaglandin E₂ during uveal melanoma-monocyte *in vitro* interactions. *Exp Eye Res.* 2004;79:451-4.
8. Shih I, Herlyn M. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol.* 1993;100:196-203.
9. Labrousse A-L, Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 269-75.
10. Murphy GF, Sellheyer K, Mihm MC. A Pele. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. editors. *Robbins & Cotran Patologia.* Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2005. 1283-329.
11. Clark WH, Hood AF, Tucker MA. Parenchymal-stromal interactions in neoplasia. Theoretical considerations and observations in melanocytic neoplasia. *Acta Oncol.* 1995;34:749-57.
12. Elder D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncol.* 1999;38:535-47.
13. Hofmann-Wellenhof R, Wotsche-Kahr I, Smolle J, Kerl H. Clinical and histological features of poor prognosis in cutaneous metastatic melanomas. *J Cutan Pathol.* 1996; 23:199-204.

* Referências bibliográficas segundo estilo dos Requisitos Uniformes para Originais submetidos a Revistas Biomédicas (estilo Vancouver), elaborado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE). *Annu Inter Med* 1997; 126: 36-47.

14. Smolle J, Hofmann-Wellenhof R, Fink-Puches R. Melanoma and stroma: an interaction of biological and prognostic importance. *Semin Cutan Med Surg.* 1996;15:326-35.
15. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357:539-45.
16. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-7.
17. Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis.* 2002;19:247-58.
18. Rodriguez LAG, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology.* 2001;11:376-81.
19. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:854-65.
20. Lin EY, Pollard JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth spread. *Br J Cancer.* 2004;90:2053-8.
21. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 2006;4:221-33.
22. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 2000;14:34-44.
23. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol.* 2002;29:3-9.
24. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-4.
25. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001;49:507-21.
26. Ono M, Torisu H, Fukushi J, Nishie A, Kuwano M. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43:69-71.
27. Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol.* 2001;19:577-83.
28. Seung LP, Rowley DA, Schreiber H. Cytokines in cancer. In: Thèze J. The cytokine network and immune functions. Oxford University Press; 1999. p. 335-45.
29. Folkman J. Anti-angiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972;175:409-16.

30. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1:149-53.
31. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:159-67.
32. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14:263-77.
33. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000;5:24-33.
34. Carmeliet P, Dor Y, Herbert J-M, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394:485-90.
35. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* 1998;94:715-25.
36. Stetler-Steverson WG; Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Cancer Biol.* 2001;11:143-52.
37. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 2004;48:411-24.
38. Malafa MP, Fokum FD, Smith L, Louis A. Inhibition of angiogenesis and promotion of melanoma dormancy by vitamin E succinate. *Ann Surg Oncol.* 2002;10:23-32.
39. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist.* 2004;9:2-10.
40. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:259-70.
41. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endoc Rev.* 1997;18:4-25.
42. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol.* 2004;128:303-9.
43. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18:3964-72.
44. Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10:321-7.

45. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-5.
46. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181:902-6.
47. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1992;153:557-62.
48. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*. 1995;1:1024-8.
49. Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer*. 1998;78:1573-7.
50. Neitzel LT, Neitzel CD, Magee KL, Malafa MP. Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Ann Surg Oncol*. 1999;6:70-4.
51. Vlaykova T, Laurila P, Muhonen T, Hahka-Kemppinen M, Jekunem A, Alitalo K, et al. Prognostic value of tumour vascularity in metastatic melanoma and association of blood vessel density with vascular endothelial growth factor expression. *Melanoma Res*. 1999;9:59-68.
52. Mowlavi A, Malafa MP. Angiogenesis in primary tumor cells of metastatic and nonmetastatic malignant melanoma. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:514.
53. Salven P, Heikkila P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 1997;76:930-4.
54. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer*. 2000;85:182-8.
55. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999;79:991-5.
56. Finkenzeller G, Marme D, Weich H, Hug H. Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C¹. *Cancer Res*. 1992; 52:4821-3.
57. Goldman CK, Kim J, Wong W-L, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell*. 1993; 4:121-33.

58. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994;4:6271-4.
59. Cohen T, Nahari D, Cerem L, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271:736-41.
60. Bem-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995;372:83-7.
61. Garrido G, Saule S, Gospodarowicz D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors.* 1993;8:109-17.
62. Fidler IJ. Regulation of neoplastic angiogenesis. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2000;28:10-4.
63. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991;64:841-8.
64. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:10931-4.
65. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induces proteinases. *J Cell Biol.* 1989;108:671-82.
66. Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9:203-26.
67. Tsunoda S, Nakamura T, Sakurai H, Saiki I. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. *Cancer Sci.* 2007;98:541-8.
68. Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cnono C, Baird A., Scott G, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol.* 1988;107:1611-9.
69. Yayon A, Ma γ -S, Safran M, Klagsbrun M, Halahan R. Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase deficient FGF receptor 1: evidence for involvement of Src-family kinases. *Oncogene.* 1997;14: 2999-3009.
70. De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75: 4001-5.

71. Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:22-9.
72. Blode GC, Schiellmann WP, William P, Lodish HF. Mechanism of disease: role of transforming growth factor (beta) in human disease. *New Engl J Med.* 2000; 342:1350-58.
73. Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001;186:153-68.
74. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, et al. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:5788-92.
75. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24:111-9.
76. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;89:119-23.
77. Krasagakis K, Garbe C, Orfanos CE. Cytokines in human melanoma cells: synthesis, autocrine stimulation and regulatory functions-an overview. *Melanoma Res.* 1993;3:425-33.
78. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000; 12:547-54.
79. Moretti S, Pinzi C, Berti E, Sapllanzani A, Chiarugi A, Boddt V, et al. *In situ* expression of transforming growth factor β is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and β 3 integrin expression. *Melanoma Res.* 1997;7:313-21.
80. Rizzino A. Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev Biol.* 1988;130:411-22.
81. Ignatz RA, Heino J, Massague J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. *J Biol Chem.* 1989;264:389-92.
82. Loureiro RMB, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:77-89.
83. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Invest New Drugs.* 2003;21:21-32.

84. Naganuma H, Sasaki A, Satoh E, Nagasaka M, Nakano S, Isoe S, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α and - β secretion by lymphokine activated killer cells by transforming growth factor- β . *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:952-7.
85. Chao CC, Hu S, Sheng WS, Tsang M, Peterson PK. Tumor necrosis factor- α mediates the release of bioactive transforming growth factor- β in murine microglial cell cultures. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;77:358-65.
86. Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev;* 2006;25:409-16.
87. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, et al. Synergistic cytotoxic and antitumoral effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res.* 1988;48:650-3.
88. Wilson J., Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Cancer Biol.* 2002;12:113-20.
89. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of Angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:217-39.
90. Lasek W, Feleszko W, Jakub G, Stoklosa T, Marczak M, Dabrowska A, et al. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor α in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 1997;45:100-8.
91. Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P Evidence for the involvement of endothelial cell integrin $\alpha V\beta 3$ in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- γ . *Nat Med.* 1998;4:408-14.
92. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:135-41.
93. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:433-9.
94. Leber TM, Balkwill FR. Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF- α and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br J Cancer.* 1998;78:724-32.
95. Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza, Fuentes Am, Anasagasti MJ, Martin J, et al. IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:734-9.
96. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med.* 2006;12:171-2.
97. Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2005;18:150-9.

98. Sun WH, Kreisle RA, Phillips AW, Ershler WB. *In vivo* and *in vitro* characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 1992;52:5412-5.
99. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol.* 1998; 64:275-90.
100. Silvani A, Ferrari G, Paonessa G, Toniatti C, Parmiani G, Colombo MP. Down-regulation of interleukin-6 receptor α chain in interleukin-6 transduced melanoma cells causes selective resistance to interleukin-6 but not to oncostatin M¹. 1995;55:2200-5.
101. Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A, Berti E, Chiarugi A, Mazzoli S, et al. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int J Cancer.* 1999;84:160-8.
102. Moretti S, Chiarugi A, Semplici F, Salvi A, De Giorgi V, Fabbri P, et al. Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. *Melanoma Res.* 2001;11:395-9.
103. Angelo LS, Talpaz M, Kurzrock R. Autocrine interleukin-6 production in renal cell carcinoma: evidence for the involvement of *p53*. *Cancer Res.* 2002;62:932-40.
104. Gérard CM, Bruyns C, Delvaux A, Baudson N, Dargent JL, Goldman M, et al. Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells. *Hum Gene Ther.* 1996;7:23-31.
105. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19:697-703.
106. García-Hernández ML, Hernández-Pando R, Gariglio P, Berumen J. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology.* 2002;105:231-43.
107. Howell WM, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun.* 2001;2:31.
108. Giacomini P, Gambari R, Barbieri R, Nistico P, Tecce R, Pestka S, et al. Regulation of the antigenic phenotype of human melanoma cells by recombinant interferons. *Anticancer Res.* 1986;6:877-84.
109. Wiebke EA, Custer MC, Rosenberg SA, Lotze MT. Cytokines alter target cell susceptibility to lysis: I. Evaluation of non-major histocompatibility complex-restricted effectors reveals differential effects on natural and lymphokine-activated killing. *J Biol Response Mod.* 1990;9:113-26.

110. Mortarini R, Belli F, Parmiani G, Anichini A. Cytokine-mediated modulation of HLA-class II, ICAM-1, LFA-3 and tumor-associated antigen profile of melanoma cells. Comparison with anti-proliferative activity by rIL1-beta, rTNF-alpha, rINF-gamma, rIL4 and their combinations. *Int J Cancer*. 1990;45:334-41.
111. Yohn JJ, Cristelli M, Lyons MB, Norris DA. Modulation of melanocyte intercellular adhesion molecule-1 by immune cytokines. *J Invest Dermatol*. 1990;90:233-37.
112. Webb DS, Mostowski HS, Gerrard TL. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol*. 1991;146:3682-6.
113. Gusella GL, Musso T, Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Matsushima K, Varesio L. IL-2 up-regulates but IFN-gamma suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol*. 1993;151:2725-32.
114. Koch AE, Ploverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258:1798-800.
115. Coughlin C, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE et al. Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest*. 1998;101: 441-52.
116. Smith KA. Interleukin-2 inception, impact, and implications. *Science*. 1988;240:1169-76.
117. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
118. Villikka K, Pyrhonen S. Cytokine therapy of malignant melanoma. *Ann Med*. 1996;28:227-33.
119. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg*. 1998;228:307-19.
120. Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C, Briedigkeit L, Becker JC, Kwasnicka HM, et al. Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest*. 1998;78:541-50.
121. Niu G, Gong Y, Dong J. [The effect of IL2 gene transfection on the growth and metastatic characteristics of muous B16 melanoma cells]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 1996;25:280-3 (Abstract).
122. Garcia-Vázquez MD, Boyano MD, Cañavate ML, Gardeazabal J, García De Galdeano A, Lopes-Michelena T, et al. Interleukin-2 enhances the growth of human melanoma cells derived from primary but not from metastatic tumours. *Eur Cytokine Netw*. 2000;4:654-61.

123. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* 1992;143:127- 42.
124. Perussia B, Chan SH, D'Andres A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol.* 1992;149:3495-502.
125. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil HA, Young SF, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med.* 1991;173:869-79.
126. Dabrowska A, Giermasz A, Marczak M, Golab J, Jakobisiak M. Potentiated antitumoral effects of interleukin 12 and matrix metalloproteinase inhibitor batimastat against B16F10 melanoma in mice. *Anticancer Res.* 2000;20:391-4.
127. Nagai H, Horikawa T, Hara I, Fukunaga A, Oniki S, Oka M. *In vivo* elimination of CD25⁺ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol.* 2004;13:613-20.
128. Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol.* 1992;22:2555-63.
129. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araújo LM, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 1998;19:337-46.
130. 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.
131. Castoldi L, Golim MA, Ribeiro 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). *Immunology.* 2007;120:372-9.
132. 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.
133. Maria AM, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WHK, Barrera RG, et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (*Pas1*) locus affects inflammatory response. *Oncogene.* 2003;22:426-32.
134. Maria DA, Ribeiro OG, Pizzocaro KF, De Franco M, Cabrera WK, Starobinas N, et al. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. *Carcinogenesis.* 2001;22:337-42.

3. Objetivo Geral

Para testar a hipótese apresentada, este projeto teve por objetivo, avaliar a expressão de fatores de crescimento e o número de células produtoras de citocinas envolvidas na angiogênese, no modelo de melanoma em camundongos AIRmax e AIRmin.

3.1. Objetivos Específicos

- a) avaliar a expressão no baço de mRNA dos fatores de crescimento, VEGF, FGF-2 e TGF- β ;
- b) avaliar o perfil de citocinas, TNF- α , IL6, IL10, IFN γ , IL2 e IL12, produzidas por esplenócitos.

4. Manuscrito

running title: **Angiogênese de melanoma em camundongos AIRmax e AIRmin**

Fatores de crescimento e citocinas envolvidos na angiogênese de melanoma em animais selecionados pela intensidade da resposta inflamatória aguda

Graziela G. Romagnoli^{1,2}, Lindsey Castoldi^{1,2}, Luis Fernando Barbisan³, João Pessoa Araújo Júnior¹, Orlando Garcia Ribeiro⁴, Andréa Vanessa Ferreira Pinto^{1,2}, Priscila Raquel Martins^{1,2}, Maria Carolina Gameiro¹, Olga M. Ibañez⁴, 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, Instituto de Biociências de Botucatu, Depto. de Morfologia – Brasil
4. Instituto Butantan, Laboratório de Imunogenética – São Paulo – Brasil

Palavras chaves: angiogênese, inflamação, fatores de crescimento, citocinas e melanoma

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: 18618-000

FONE: 55 14 3811 6058

FAX: 55 14 3815 3744

rskaneno@yahoo.com.br

Abreviações: **VEGF**: fator de crescimento do endotélio vascular; **TGF- β** : fator de crescimento e transformação beta; **FGF-2**: fator básico de crescimento de fibroblasto; **AIRmax**: camundongos com resposta inflamatória máxima; **AIRmin**: camundongos com resposta inflamatória mínima.

Resumo:

Camundongos AIRmax e AIRmin selecionados de acordo com a intensidade da resposta inflamatória aguda apresentam variações na suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento de tumores. Considerando a importância da resposta inflamatória no desenvolvimento tumoral e que mediadores desta resposta influenciam a angiogênese, o presente trabalho avaliou os perfis de expressão no baço de mRNA de VEGF, FGF-2 e TGF- β pela técnica da PCR em tempo real e o número de células produtoras das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2, IL-12 e IFN- γ pela técnica de ELISpot envolvidas na neovascularização nos animais AIRmax e AIRmin. Para tanto, estes animais foram implantados com células de melanomas murino B16F10 e S91 e avaliados quanto ao crescimento tumoral, presença de metástases e expressão dos mediadores citados aos 7, 14 e 30 dias após inóculo subcutâneo. Nossos resultados demonstraram que os animais AIRmin tiveram maior capacidade de conter o crescimento de melanoma B16F10 do que os animais AIRmax, embora diferenças significativas em relação aos fatores envolvidos na angiogênese não tenham sido encontradas. Os animais AIRmin implantados com melanoma S91 também apresentaram menor frequência de crescimento tumoral, ainda que esses animais tenham apresentado mais fatores envolvidos na angiogênese, como maior expressão de mRNA de VEGF e maior número de células produtoras de IL-6 e TNF- α . Assim, é possível que o melhor controle do crescimento tumoral em animais AIRmin seja decorrente de sua capacidade de gerar maior número de células produtoras de IFN- γ e menor número daquelas produtoras de IL-10.

1. Introdução

A angiogênese ou neovascularização é um processo que ocorre tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas como nas doenças inflamatórias crônicas [1] e no desenvolvimento de tumores sólidos [2]. A angiogênese tumoral é caracterizada pela formação de novos vasos, dentro ou ao redor do tumor, a partir de um vaso pré-existente ou de células progenitoras da medula óssea [3,4]. Esse processo é iniciado pelo desequilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos, produzidos por células inflamatórias presentes no sítio tumoral e pelas próprias células tumorais [5,6].

Dentre os fatores de crescimento, o VEGF tem um papel chave na indução da angiogênese, atuando como potente mitógeno de células endoteliais [7]. Além disso, sua expressão pode ser aumentada em resposta a citocinas como IL-6, TNF- α e TGF- β , produzidas por macrófagos associados ao tumor (TAM) [8,9], fato associado ao potencial metastático de melanoma [10,11]. O TGF- β pode induzir diretamente a angiogênese [6], ou através da indução de moléculas envolvidas nesse processo como o VEGF [12], FGF-2 [13] e β -integrinas [14]. O FGF-2 induz tanto o crescimento de células endoteliais, quanto tumorais [15], além de degradar a membrana basal pela ativação de proteases e collagenases, favorecendo a quebra de barreiras e migração das células endoteliais e tumorais [16,17].

As citocinas também podem ter efeito bloqueador ou facilitador da angiogênese. Citocinas, como IL-6, TNF- α , IL-10 em determinados estágios do desenvolvimento tumoral e concentrações apropriadas, induzem indiretamente a angiogênese tumoral [18,19,20,21]. Por outro lado, IFN- γ , IL-12 e IL-2, cujos efeitos biológicos estão associados a uma resposta antitumoral, podem inibir a angiogênese tumoral [22,23,24,25]. Assim, esse conjunto de fatores antagônicos produzidos por células do sistema imune,

células inflamatórias, ou pelas células tumorais podem contribuir para o combate ou a progressão tumoral, refletindo o paradoxo observado em pacientes com tumor.

Na tentativa de melhor compreender os mecanismos inflamatórios envolvidos no câncer, foram desenvolvidas linhagens de camundongos com perfil para resposta inflamatória intensa (AIRmax) ou fraca (AIRmin), através da seleção bidirecional, partindo da população F0, resultante do cruzamento de 8 linhagens isogênicas, contra partículas de poliacrilamida [26,27]. A seleção desses camundongos foi baseada no influxo de leucócitos e proteínas encontradas no exsudato, 24 e 48 horas após a injeção das partículas [26,27]. Contribuindo para as diferenças entre as linhagens, os animais AIRmax apresentaram 20 vezes mais leucócitos infiltrantes, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e concentração protéica 2,5 vezes maior que os animais AIRmin [28]. Resultados do nosso grupo demonstraram que linhagem AIRmax apresenta maior número de células NK e CD8⁺ esplênicas que a linhagem AIRmin, bem como maior produção *in vitro* de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12p40 [29].

Essas diferenças entre as linhagens refletem os fenótipos de suscetibilidade ou resistência a vários tumores. Assim, os animais da linhagem AIRmax são mais resistentes à carcinogênese química de pele induzida por 9,10-dimetil-1,2-benzeno (DMBA) e 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) que os animais AIRmin [27]. A linhagem AIRmax mostra-se também mais resistente ao desenvolvimento de adenomas tanto na carcinogênese pulmonar induzida por uretana, como por 1,2 dimetil-hidrazina (DMH) [28,30]. Maria et al. [31] demonstraram que 80% dos animais AIRmin apresentavam metástases de melanoma, enquanto os animais AIRmax foram mais resistentes. Contrariamente, a linhagem AIRmin é mais resistente ao câncer de cólon induzido por DMH [28].

Assim, dada a complexidade dos processos envolvidos na tumorigênese, deve ser considerada a possibilidade de que a segregação dos genes envolvidos na regulação da

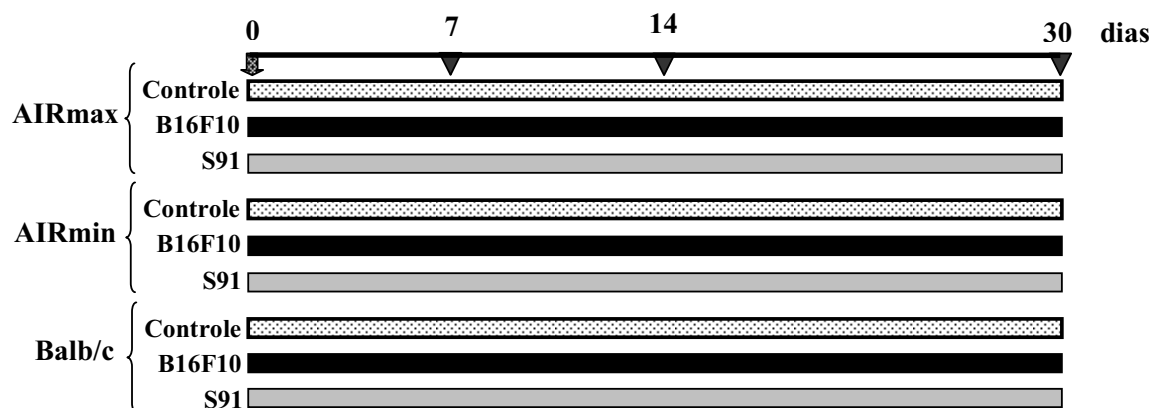
resposta inflamatória aguda interfira também em outros mecanismos de controle do crescimento tumoral. Com isso, o presente projeto foi formulado para testar a hipótese de que a resistência ou suscetibilidade dos animais AIRmax e AIRmin ao desenvolvimento de tumores pode ser decorrente de diferenças em sua capacidade de promover a angiogênese tumoral.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Os animais AIRmax e AIRmin, criados no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan – São Paulo, foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMB/UNESP em caixas de polipropileno, com ração (Nuvital-Nuvilab CR1) e água *ad libitum* em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade relativa de 50 ± 20 . Os grupos foram constituídos por 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 remoção do baço, pele, fígado, pulmão e rins. Os animais da linhagem Balb/c utilizados como controle do perfil de resposta 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 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo nº 444).

2.2. Delineamento Experimental



Controle: animais normais tratados com solução salina s.c. (0,1mL)

B16F10: animais inoculados s.c. com 5×10^4 células da linhagem de melanoma B16F10

S91: animais inoculados s.c. com 5×10^4 células da linhagem de melanoma S91

↓ : inóculo de 5×10^4 células tumorais (B16F10 ou S91) ou de solução salina

▼ : sacrifício e análises

2.3. Cultura de células dos melanomas murino B16F10 e S91

As células de melanoma murino B16F10 foram obtidas 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 a 37°C. Rapidamente, as células foram transferidas para tubo estéril com 10mL de meio DMEM com HEPES 50% SBF 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 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), lavada por centrifugação, ressuspensa em DMEM e

sua concentração ajustada para 5×10^5 células/mL. Posteriormente, os animais foram inoculados subcutaneamente com 0,1mL da suspensão de células B16F10 ou S91.

2.4. Análise Histopatológica

Após o sacrifício dos animais a área da pele com lesão, linfonodo regional, pulmão, fígado e rins foram retirados e acondicionados em frascos devidamente identificados, contendo formalina tamponada 10%. Após 24 horas, a formalina foi substituída e mantida pelo mesmo período. Em seguida, as amostras foram mantidas em álcool 70% até o momento da inclusão em parafina. Os cortes histológicos com 4µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica e avaliação da ocorrência de metástases nos linfonodos regionais, pulmão, fígado e rins. O processamento do material histológico foi realizado no Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

2.5. Avaliação da vasculatura intratumoral

Cortes com 4µm de espessura foram realizados em fragmentos de pele da região do inóculo tumoral ou de solução salina, incluindo o tecido adjacente. Estes cortes foram corados com HE para avaliação quantitativa de vasos sanguíneos intratumorais ou na pele sem neoplasia. Devido a grande variabilidade em relação ao tamanho das neoplasias, foram contados de 3 a 5 campos microscópicos em área de $0,19 \text{ mm}^2$, com magnitude de 400x.

2.6. Extração de RNA do baço e obtenção de cDNA

De cada grupo experimental foram utilizados 4 animais para remoção do baço. O RNA total presente em 30mg do baço, preservado em nitrogênio líquido, foi extraído

com o Kit de extração RNAspin (GE Healthcare, Reino Unido). Com o objetivo de eliminar o DNA residual genômico extraído junto com o RNA, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima DNase (DNase I), que acompanhava o Kit. Ao final, o RNA foi eluído em 100µL de água livre de RNase. Imediatamente após a extração foi obtido o cDNA com a enzima Improm RT II (Promega®), partindo-se de 4µg de RNA total para um final de 80µL, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Como iniciador da reação de transcrição reversa foi utilizado o *Random Primer* (hexâmeros ao acaso) na concentração de 12,5 ng/µl.

2.7. Primers utilizados para a reação em tempo real da polimerase

A sequência de *primers* empregada foi obtida na literatura com exceção para FGF-2. Para VEGF-A foram utilizados os *primers forward* 5'-AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AA-3' e *reverse* 5'-TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA-3' [32]; para TGF-β1 os *primers forward* 5'- AAC AAT TCC TGG CGT TAC CTT-3' e *reverse* 5'- AAG AGC AGT GAG CGC TGA ATC G- 3' [33] e como controle endógeno foram utilizados os *primers* para β-actina, *forward* 5'-AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AA- 3' e *reverse* 5'-TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA-3' [34]. Para FGF-2 foram desenhados os *primers forward* 5'-AAG AGC GAC CCA CAC GTC AAA CTA-3' e *reverse* 5'- AGC CGT CCA TCT TCC TTC ATA GCA-3' utilizando-se o *software* IDTSciTools (<http://www.idtdna.com>) a partir da sequência publicada no *Genebank* (acesso: NM_008006).

2.8. Quantificação relativa de mRNA dos fatores de crescimento pela PCR em tempo real

A PCR em tempo real para a quantificação relativa de mRNA dos fatores de crescimento, VEGF-A, FGF-2 e TGF- β , foi desenvolvida no aparelho de PCR em tempo real modelo 7300 (Applied Biosystems, EUA) com o uso do Kit Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) conforme as instruções do fabricante, em um volume final de 20 μ L, com a adição de 4 μ L da amostra de cDNA por reação e 300nM de cada *primer*. As condições da reação foram: 95° C/10 minutos, 40 ciclos de 95°C/15 segundos, 60°C/1 minuto e o estágio de dissociação foi de 95°C/15 segundos, 60°C/15 segundos e 95°C/15 segundos. Em todos os ensaios as amostras foram processadas em duplicata.

Em todas as placas foi utilizado o cDNA de uma amostra padrão para todos os fatores de crescimento, bem como para β -actina. Essa amostra foi diluída de 1:2 até 1:128 para a construção da curva padrão. Os valores de expressão relativa foram obtidos com o auxílio do programa SDS versão 1.2.3 (*Sequence Detection Systems 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System* – Applied Biosystems, EUA) e posteriormente normalizados pelos valores de expressão relativa da β -actina.

2.9. 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., França) 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 bloqueio (RPMI contendo 10% de

soro bovino fetal - RPMI10%SBF), os sítios livres foram bloqueados com RPMI 10%SBF e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período, a solução bloqueio foi descartada e adicionado à placa 2×10^6 células esplênicas, em duplicata. As células foram incubadas por 21 horas à 37° C em estufa de 5% CO₂. Posteriormente, as placas foram lavadas 2 vezes com água deionizada e 3 vezes com PBS 10% SBF. Em seguida foi aplicado o anticorpo monoclonal biotinilado correspondente, com incubação por 2 horas à 37° C. Após as lavagens, foi adicionado streptavidina-peroxidase diluída em PBS 10% SBF, seguida de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS Tween 20 a 0,05% e 2 vezes com PBS e, em seguida, 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), com a colaboração do Prof. Dr. Célio Lopes Silva do Laboratório de Imunologia do Centro de Pesquisas em Tuberculose, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

2.10. Análise Estatística

Os dados obtidos quanto a expressão de mRNA dos fatores de crescimento foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo Balb/c Controle. Os dados de células produtoras de citocinas foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises microscópicas foram avaliadas estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher. Todos os testes neste trabalho foram realizados considerando o nível de significância de $\alpha=0,05$.

3. Resultados

3.1. Análise Histopatológica

A análise histopatológica da pele demonstrou que os animais da linhagem AIRmin, implantados com melanoma B16F10, apresentaram tendência a menor incidência de tumor primário que os animais AIRmax inoculados com a mesma célula tumoral. O grupo AIRmin apresentou crescimento significativamente menor do melanoma B16F10 que o grupo Balb/c aos 30 dias. O crescimento do melanoma S91, também só foi evidente após 14 dias de implantação, sendo que os animais das linhagens AIRmax e Balb/c apresentaram os melhores índices de aceitação do implante (Tabela 1).

A análise microscópica não evidenciou a presença de metástase no linfonodo regional (Figura 1B), no pulmão, no fígado e nos rins de nenhum dos animais avaliados (dados não mostrados). De modo geral, para as duas linhagens tumorais, a invasão local do tumor foi acompanhada de infiltrado mononuclear e necrose (Tabela 2 e 3) (Figuras 2 e 3). Os animais AIRmin implantados com melanoma S91 apresentaram menor frequência de invasão local, de necrose e de infiltrado mononuclear, que a linhagem AIRmax. A incidência de células polimorfonucleares foi muito baixa nos dois períodos para as duas linhagens tumorais (Tabela 2 e 3).

3.2. Avaliação da vasculatura intratumoral

A análise de vasos sanguíneos foi realizada somente no período de 30 dias, pois aos 14 dias, o tamanho dos tumores era pequeno, dificultando a análise. Devido à baixa frequência (<40%) de ambos os tumores primários na linhagem AIRmin, não foi possível a aplicação de um teste estatístico, assim a análise aqui apresentada será apenas descritiva. Os resultados com melanoma B16F10 demonstraram que a linhagem Balb/c apresentou

maior número de vasos por área que os animais das linhagens AIR. Entretanto, os animais da linhagem AIRmin, inoculados com células S91, apresentaram maior número de vasos por área que as linhagens AIRmax e Balb/c. Observamos também que o grupo AIRmin S91 apresentou numerosos vasos entre as células mononucleares na região peritumoral. Animais da linhagem Balb/c Controle apresentaram maior número de vasos que animais das linhagens AIR. A análise microscópica revelou maior frequência de células viáveis ao redor dos vasos sangüíneos, com grande número de células necróticas nas regiões mais distantes (Figura 4).

3.3. Detecção de mRNA de fatores angiogênicos no baço.

A análise de mRNA do VEGF-A, FGF-2 e TGF- β através da técnica de PCR em tempo real revelou que todos os animais, com ou sem tumor, expressaram mRNA no baço para esses fatores de crescimento. Visto que os animais controle de cada uma das linhagens expressam os mRNA investigados, os resultados foram expressos como a concentração relativa dos fatores de crescimento (%) em relação ao grupo controle da linhagem Balb/c.

Dentre os fatores analisados, observamos que, aos 14 dias, os animais AIRmin inoculados com células S91 apresentaram maior nível de expressão de mRNA para o VEGF-A (aproximadamente 250% maior) (Figura 5B). Essa diferença foi também observada quando comparamos os grupos AIRmax e AIRmin sem o tumor (Figura 5B). Entretanto, não se observou diferença significativa entre o grupo AIRmin S91 e seu controle. Apesar das análises de 7 e 30 dias não serem significativas, observa-se um perfil de expressão aumentada de VEGF na linhagem AIRmin em comparação com AIRmax (Figuras 5A e 5C).

Para os fatores FGF-2 e TGF- β não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens e também não se observou efeito do tipo celular implantado.

3.4. Determinação do número de células produtoras de citocinas

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-12, 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 que seus respectivos grupos controle. A implantação de células B16F10 promoveu ligeiro aumento no número de células IL6⁺ nos animais AIRmax e AIRmin ($0,05 < p < 0,1$), ao passo que entre os animais Balb/c esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,003$) (Figura 6A).

Nos períodos seguintes de análises, apenas o grupo AIRmin S91 manteve a diferença em relação ao seu grupo controle (Figura 6B e 6C). Tanto a linhagem AIRmax, quanto AIRmin inoculados com melanoma 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.

A análise das células secretoras de TNF- α demonstrou que não houve diferença entre AIRmax e AIRmin no período de 7 dias (Figura 6D). Aos 14 dias houve queda no número de células produtoras na linhagem AIR implantados com melanoma S91 (Figura 6E). No entanto, aos 30 dias esse aumento foi observado apenas nos animais AIRmin S91 (Figura 6F).

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 AIRmax, quanto AIRmin. Nesse período, observamos que animais AIRmax responderam com aumento do número de células IFN- γ ⁺ tanto à implantação de

células B16F10, 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 7A). Aos 14 dias chamou a atenção a drástica redução no número de células IFN- γ^+ dos animais AIRmax e AIRmin implantados com S91 (Figura 7B). A análise dos dados obtidos aos 30 dias, demonstrou que os animais AIRmin implantados com melanoma S91 tiveram um grande aumento no número de células IFN- γ^+ e esse aumento foi significativo em relação aos animais AIRmax e Balb/c com mesmo implante tumoral (Figura 7C).

Com relação ao número de células produtoras 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 e S91) em relação aos seus controles. Assim, aos 7 dias, a linhagem Balb/c implantada com qualquer das duas linhagens tumorais, apresentaram um aumento significativo de células IL-2 $^+$ em relação ao controle sem tumor. Comportamento semelhante foi observado entre os esplenócitos dos animais AIRmax implantados com tumor em comparação ao seu controle (Figura 7D). 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 aos valores observados tanto nos animais AIRmax quanto nos animais AIRmin (Figura 7D).

Diferenças significativas entre animais implantados com tumor e seus respectivos controles foram observadas também aos 14 dias (Figura 7E). Aos 30 dias, somente a linhagem AIRmax não apresentou diferença entre os grupos com tumor e o grupo controle. (Figura 7F).

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 8 e 9).

Tabela 1: Incidência de crescimento do tumor primário das linhagens B16F10 e S91 nos animais AIRmax, AIRmin 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% ^{*a}	62,5% ^b	50%	0% [*]	61,53% [#]	58,3% [#]
AIRmin	0% [*]	12,5%	25% ^a	0% [*]	50%	36,3%
Balb/c	0% ^{*a}	37,5% ^a	100% ^b	0% [*]	50%	61,5% [#]

*diâmetro tumoral < 1 mm

a<b (p≤ 0,006)

a'<b' (p= 0,02)

p≤ 0,01 (em comparação ao período de 7 dias de implantação na mesma linhagem de animais)

Tabela 2: Frequência de achados histológicos na pele dos animais AIRmax, AIRmin e Balb/c implantados com células de melanoma B16F10.

Linhagem Animal	Linhagem Tumoral Melanoma B16F10							
	14 dias				30 dias			
	Invasão local	necrose	Infiltrado PMN	Infiltrado Mononuclear	Invasão local	necrose	Infiltrado PMN	Infiltrado Mononuclear
	AIRmax	37,5%	37,5%	0%	50%	50%	50%	12,5%
AIRmin	0%	0%	0%	0%	25% ^a	25% ^a	25%	25% ^a
Balb/c	0%	25%	0%	37,5%	100% ^{b*}	100% ^{b*}	0%	100% ^b , ^c , ^{**}

a<b (p= 0,006)

a`<b` (p= 0,006)

a``<b`` (p= 0,006)

* 14dias < 30 dias (p≤ 0,02)

Tabela 3: Frequência de achados histológicos na pele dos animais AIRmax, AIRmin e Balb/c implantados com células de melanoma S91.

Linhagem Animal	Linhagem Tumoral Melanoma S91							
	14 dias				30 dias			
	Invasão local	necrose	Infiltrado PMN	Infiltrado Mononuclear	Invasão local	necrose	Infiltrado PMN	Infiltrado Mononuclear
AIRmax	38,46%	53,8%	0%	46,15%	58,3% ^b	58,3% ^b	0%	58,3% ^b
AIRmin	12,5%	37,5%	0%	12,5%	0% ^a	9% ^a	0%	9% ^a
Balb/c	0%	12,5%	0%	12,5%	53,8% ^{b*}	53,8% ^b	0%	46% ^b

a<b (p= 0,004)

a`<b` (p≤ 0,003)

a``<b`` (p≤ 0,003)

* 14dias < 30 dias (p= 0,01)

Tabela 4. Média do número de vasos sanguíneos/mm² presentes nos melanomas B16F10 e S91, implantados em animais AIRmax, AIRmin e Balb/c (n=5, exceto AIRminB16F10 e AIRminB16F10 com 40% de crescimento tumoral).

Linhagem animal	Número de vasos/mm ²		
	Melanoma		Controle
	B16F10	S91	
AIRmax	24,4	26,8	17,4
AIRmin	18,4	35,2	17,0
Balb/c	30,0	23,5	22,1

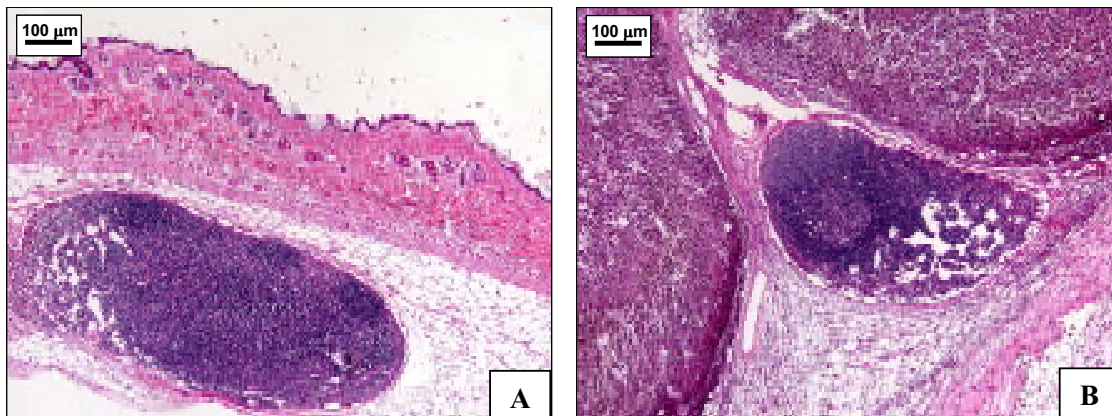


Figura 1: Corte histológico da pele (100x) de animais AIRmax. (A) Linfonodo regional de um animal do grupo controle. (B) Linfonodo regional, entre duas massas tumorais, de um animal implantado com células de melanoma S91 aos 30 dias.

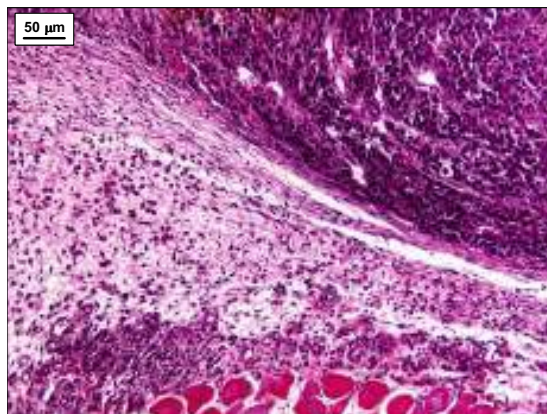


Figura 2: Corte histológico da pele (200x) de animal AIRmax, implantado com células de melanoma B16F10 aos 30 dias. A fotomicrografia mostra a invasão do tumor sobre o tecido adjacente, alcançando a camada muscular do peritônio.

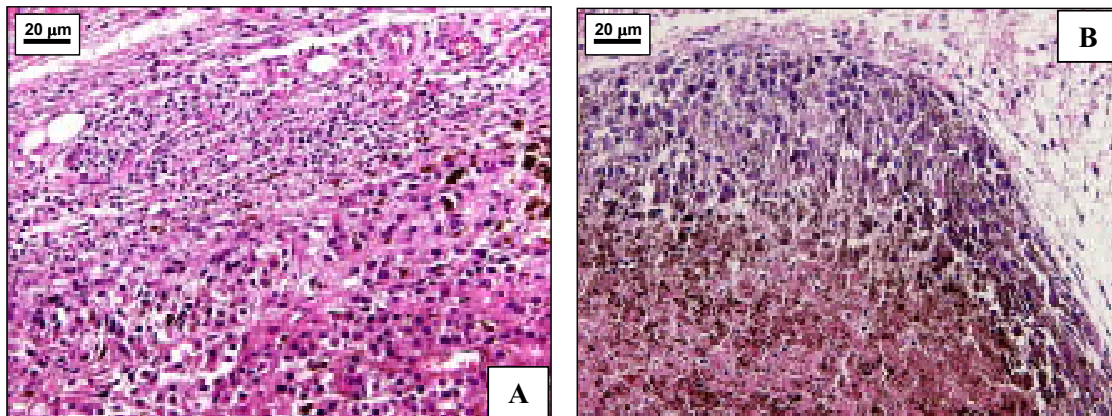


Figura 3: Corte histológico da pele (400x) de animal AIRmax implantado aos 14 dias com células de melanoma S91. (A) Presença de vasos sangüíneos entre células do infiltrado mononuclear na região peritumoral. (B) Presença de necrose na região central do tumor.

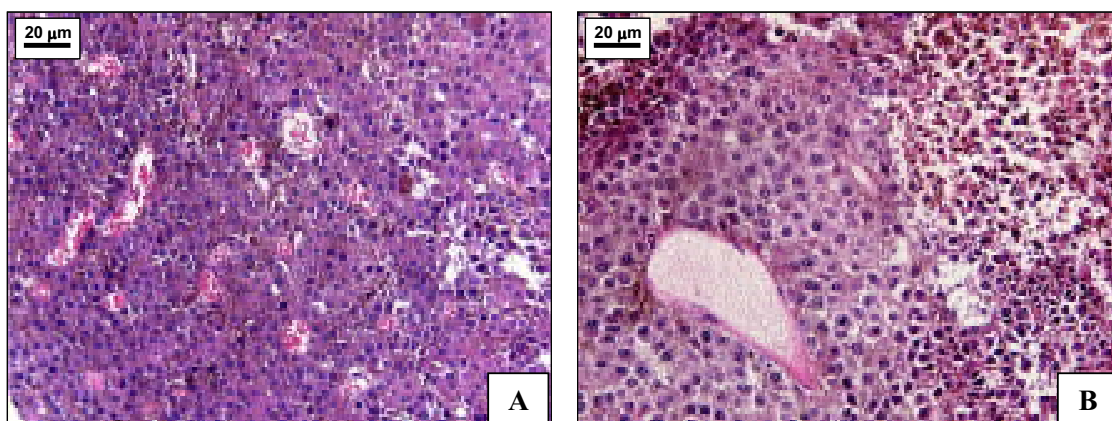


Figura 4: Corte histológico da pele (400x) de animal AIRmax implantado aos 14 dias com células de melanoma S91. (A) Presença de vasos sangüíneos intratumorais. (B) Presença de células tumorais viáveis ao redor do vaso sanguíneo, contrastando com o tecido necrótico na região mais afastada do vaso.

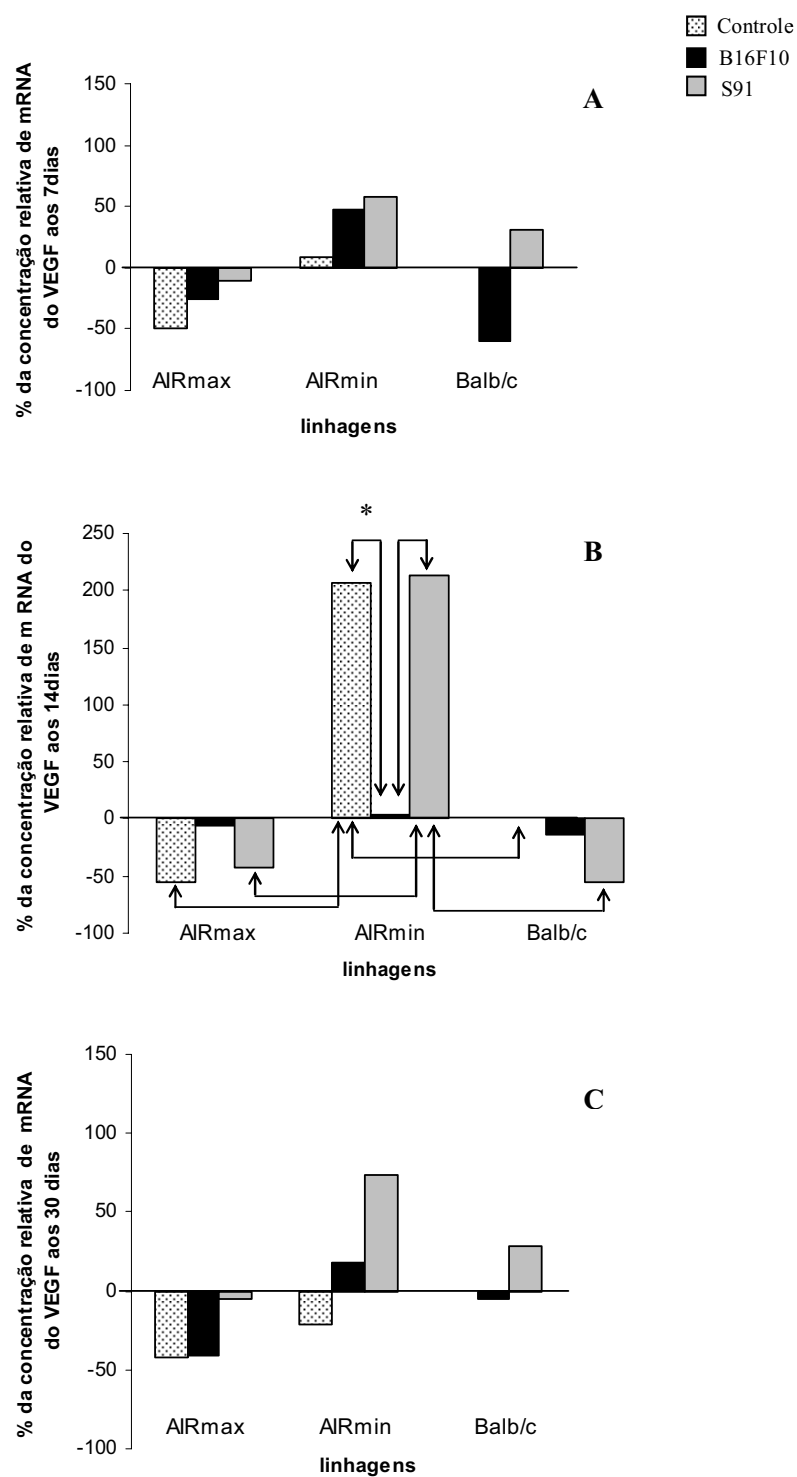


Figura 5: Concentração relativa de mRNA do VEGF-A expresso no baço dos animais AIRmax, AIRmin e Balb/c, inoculados ou não com células tumorais B16F10 ou S91, no período de 7 (A), 14 (B) e 30 (C) dias. A linha de referência (zero) corresponde ao valor observado em animais controle Balb/c. *Todas as setas representam diferenças significativa com $p < 0,05$.

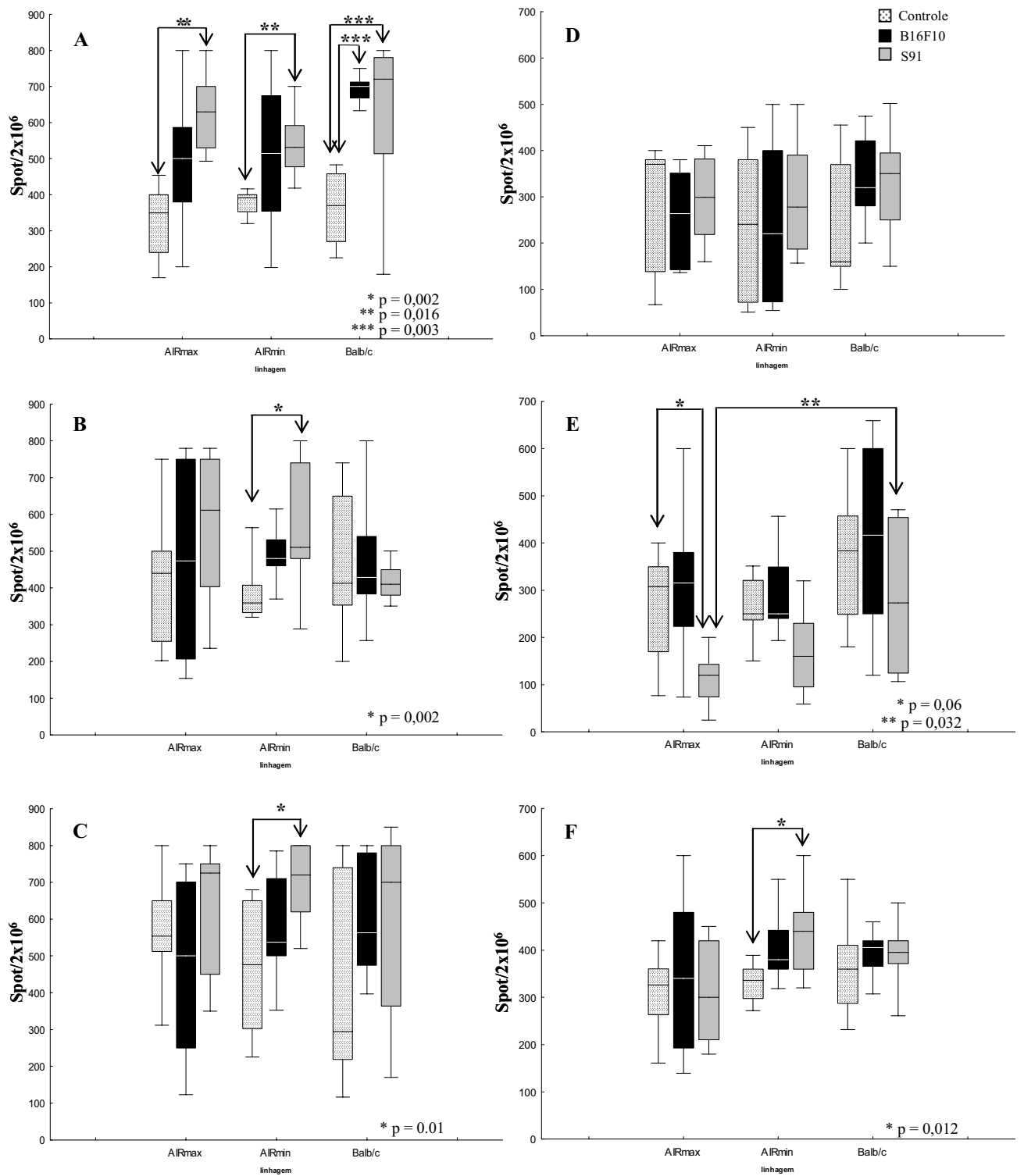


Figura 6: Determinação do número de células esplênicas secretoras de IL-6 e TNF- α dos camundongos AIRmax, AIRmin e Balb/c normais e implantados s.c. com células de melanomas B16F10 e S91 aos 7 (A, D), 14 (B, E) e 30 (C, F) dias. No Box-plot, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores e o traço horizontal a mediana.

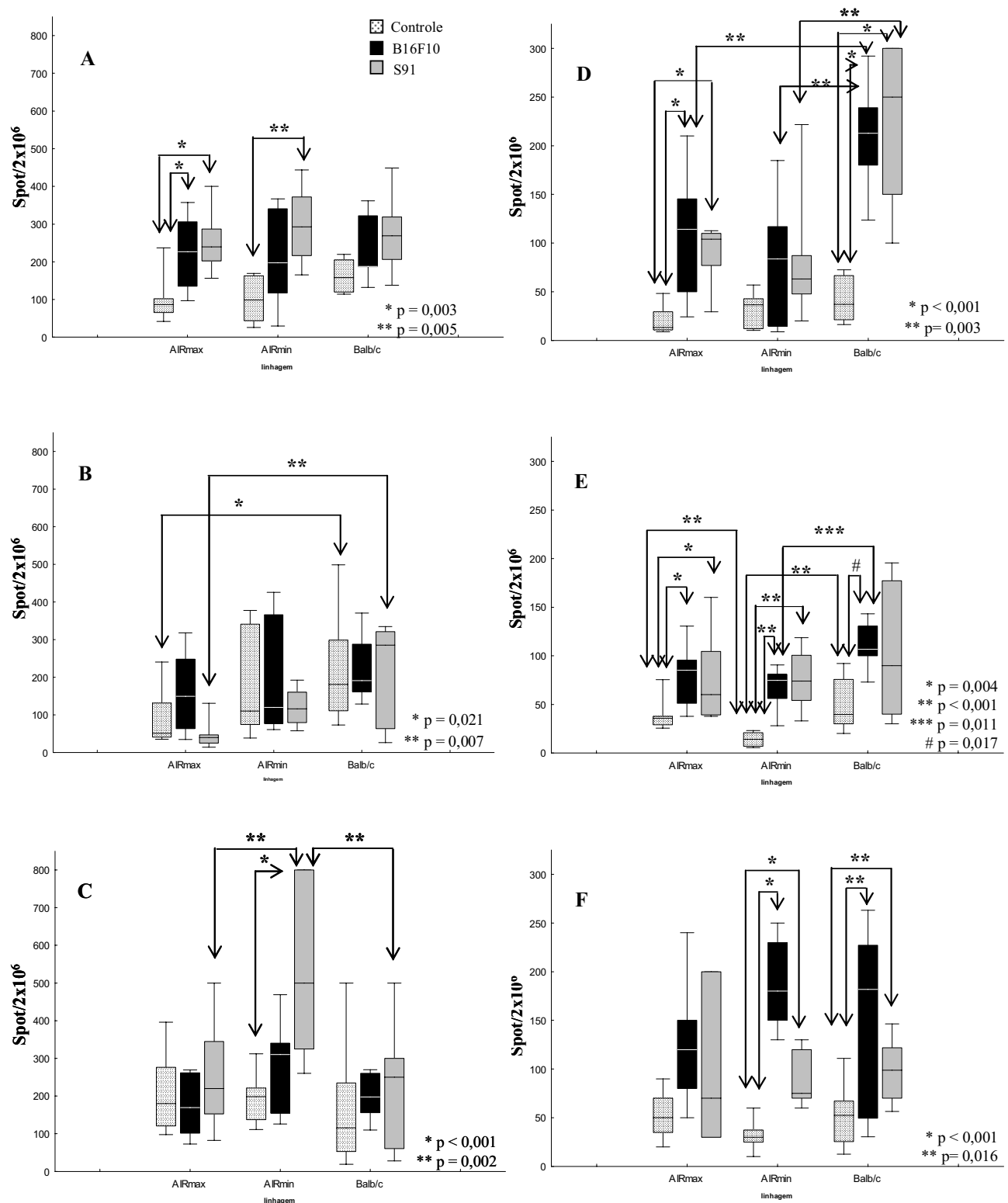


Figura 7: Determinação do número de células esplênicas secretoras de IFN- γ e IL-2 dos camundongos AIRmax, AIRmin e Balb/c normais e implantados s.c. com células de melanomas B16F10 e S91 aos 7 (A, D), 14 (B, E) e 30 (C, F) dias. No Box-plot, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores e o traço horizontal a mediana.

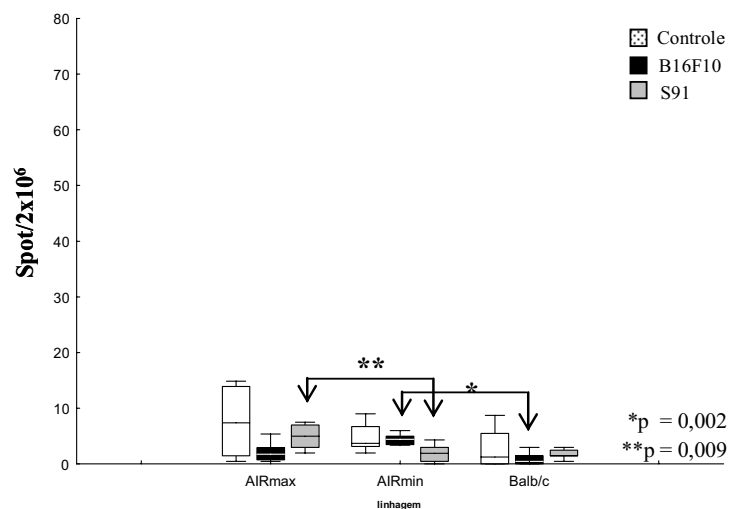


Figura 8: Determinação do número de células esplênicas secretoras de IL-10 dos camundongos AIRmax, AIRmin e Balb/c normais e implantados s.c. com células de melanomas B16F10 e S91 aos 30 dias. No Box-plot, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores e o traço horizontal a mediana.

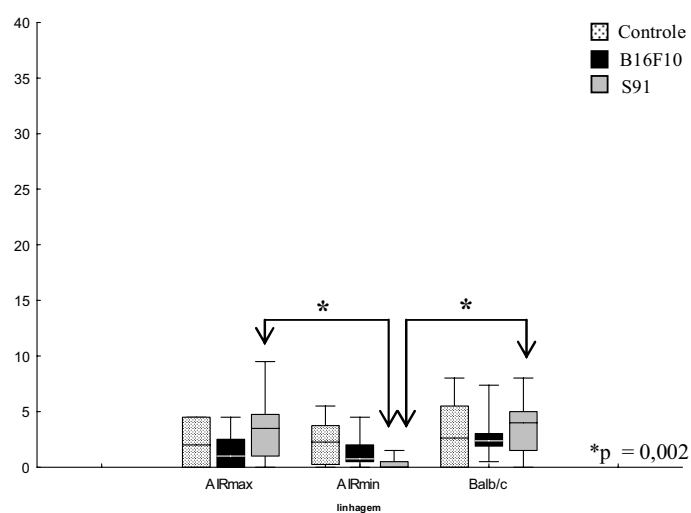


Figura 9: Determinação do número de células esplênicas secretoras de IL-12 dos camundongos AIRmax, AIRmin e Balb/c normais e implantados s.c. com células de melanomas B16F10 e S91 aos 30 dias. No Box-plot, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores e o traço horizontal a mediana.

Estudos prévios demonstraram que os animais que desenvolvem inflamação aguda intensa (AIRmax) apresentam maior resistência ao desenvolvimento de vários tipos de tumor, que aqueles com baixa resposta inflamatória aguda (AIRmin) [27,28,29,30]. Um dos fatores que determinam o crescimento tumoral é a neovascularização que pode ser induzida pelo próprio tumor, bem como pode ser desencadeada por processos inflamatórios crônicos. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se os perfis de fatores de crescimento e citocinas envolvidos na angiogênese tumoral estão relacionados com a resistência ou suscetibilidade dos animais AIRmax e AIRmin, ao crescimento de melanomas murinos B16F10 e S91.

Entre os fatores de crescimento avaliados, observamos diferença estatística apenas em relação ao VEGF, enquanto os níveis de expressão do mRNA para FGF-2 e TGF- β foram semelhantes nas 2 linhagens em todos os períodos de investigação. Visto que animais da linhagem AIRmin implantados com melanoma S91 apresentaram maior número de vasos entre células mononucleares ao redor do tumor, é possível pensar que a expressão de mRNA para FGF-2 e TGF- β seja mais elevada no sítio tumoral, sem reflexo nos seus níveis sistêmicos. De fato, o FGF-2 pode ser liberado localmente através da ação de proteases sobre a matriz extracelular [35]. Além disso, o FGF-2 pode ser produzido por macrófagos e mastócitos presentes no infiltrado inflamatório tumoral [36,37] e pelas próprias células de melanoma, uma vez que estas expressam constitutivamente este fator, induzindo crescimento tumoral [38]. De modo similar, o TGF- β pode também ser expresso por células tumorais [39,40], exercendo ação localizada quimiotática para monócitos e indutora de angiogênese [41]. Soufla et al. [42] observaram que embora células neoplásicas de mama humanas liberem altos níveis de TGF- β , a expressão de mRNA desta citocina foi menor. Assim, visto que não houve correlação entre a produção da proteína e os níveis de

mRNA, os autores sugerem que a expressão do TGF- β é regulada por mecanismos pós-transcricionais, favorecendo o crescimento tumoral.

O VEGF é um fator de crescimento que tem um papel fundamental na indução da angiogênese e nossas análises, demonstraram que a expressão de mRNA do VEGF nos três períodos de análises, foi diferente apenas aos 14 dias, sendo maior nos animais AIRmin que nos animais AIRmax, inoculados com células S91 (AIRmin S91 vs AIRmax S91, $p < 0,05$). A elevação dos níveis de expressão deste fator, aos 14 dias, pode ser decorrente do maior número de células esplênicas produtoras de IL-6 observado nesse mesmo período nos animais AIRmin portadores de tumor S91. De fato, a geração de IL-6 está diretamente relacionada à progressão de melanomas [43,44], uma vez que esta citocina pode ser produzida por TAM e induzir a expressão de VEGF [6,45].

Observamos também que apesar das análises de 7 e 30 dias não mostrarem diferenças significativas entre os grupos analisados, os animais do grupo AIRmin S91 mostram intensidade maior de mRNA do VEGF que seu controle sem tumor (AIRmin Controle). O perfil de células IL-6⁺ no grupo AIRmin S91 também mostrou elevação significativa nesses períodos. Compatível com esse raciocínio, observamos que os animais das linhagens AIR inoculados com células B16F10, não apresentaram alterações na expressão de VEGF, nem no número de células IL-6⁺ em comparação com seus controle.

Aos 30 dias, o grupo AIRmin S91 apresentou também maior número de células produtoras de TNF- α que seu controle. O TNF- α quando produzido cronicamente e a IL-6 em estágios mais tardios da progressão, favorecem a angiogênese tumoral, por induzir direta ou indiretamente a produção de quimiocinas, moléculas de adesão e fatores angiogênicos [20,46,47]. Assim, estas duas citocinas podem estar influenciando o perfil de resposta apresentado pelos animais AIRmin inoculados com melanoma S91. De fato,

nossos resultados demonstraram que aos 30 dias, o grupo AIRmin S91 apresentou maior número de vasos intratumorais em comparação com seu grupo controle e com o grupo AIRmax S91 (Tabela 4). Portanto, os dados sugerem que a linhagem de tumor S91 é mais hábil em induzir angiogênese nos animais AIRmin, que as células B16F10.

Nosso resultados também demonstraram que, aos 30 dias, animais AIRmin implantados com células S91 apresentaram maior número de células secretoras de IFN- γ que o grupo AIRmax S91, bem como o grupo Balb/c S91. Esses resultados não eram esperados, visto que, estudos prévios do nosso grupo demonstram que animais AIRmax têm maior produção *in vitro* de IFN- γ que os animais AIRmin [29]. Entretanto, Vigar et al. [48] observaram no modelo de artrite induzida por pristane, que os animais AIRmin apresentam maior número de células produtoras de IFN- γ que os animais AIRmax e essa produção foi associada com resistência ao desenvolvimento da doença.

Este aumento do número de células IFN- γ^+ , talvez esteja relacionado ao aumento de células secretoras de IL-2, observado nos períodos de 14 e 30 dias nos animais AIRmin implantados com melanoma S91, frente ao controle. Apesar da linhagem AIRmin implantada com melanoma S91 ter apresentado mais fatores envolvidos na angiogênese, o maior número de células IFN- γ^+ pode ter contribuído para o estabelecimento de uma resposta imune específica contra essas células tumorais. Apesar de haver uma aparente relação no baço entre células produtoras de IL-6 e a expressão de mRNA de VEGF, a interleucina 6, no sítio, pode estar agindo como fator antitumoral, uma vez que *in vitro* esta citocina inibe a proliferação de células de melanoma [49], contribuindo assim com a ação do IFN- γ .

Camundongos AIRmax inoculados com células S91 apresentaram maior número de células produtoras de IL-10 que os animais do grupo AIRmin S91. A IL-10 pode contribuir para a resistência antitumoral, inclusive pela capacidade de inibir a

angiogênese [50], entretanto, sua produção é mais associada ao desenvolvimento tumoral, visto que, interfere negativamente na geração de uma resposta celular específica. Assim, o menor número de células IL-10⁺ nos animais AIRmin implantados com células S91 pode ter contribuído para a menor frequência do tumor primário observado nesses animais, bem como para o maior número de células produtoras de IFN- γ .

Animais do grupo AIRmax S91, apesar do baixo índice, apresentaram também maior número de células produtoras de IL-12 aos 30 dias de implantação, fato contraditório com as observações de que esses animais apresentaram menor número de células IFN- γ ⁺ e maior número de células IL-10⁺.

Os resultados com células de melanoma B16F10, não mostraram diferenças significativa, entre as linhagens AIRmax e AIRmin para qualquer dos fatores e citocinas envolvidas na angiogênese. Esses resultados não eram esperados, visto que Maria et al. [31] observaram que animais AIRmax implantados com melanoma B16F10 apresentaram massa tumoral necrosada e ulcerada. Estes resultados poderiam ser decorrentes da falta de vascularização local, diminuindo assim a entrega de oxigênio e a retirada de metabólitos celulares. Além disso, neste mesmo trabalho, os animais AIRmin implantados com B16F10, apresentaram uma incidência metastática de 80%. Este aumento de incidência poderia ser decorrente da angiogênese, visto que outros trabalhos demonstram a correlação existente entre crescimento de células de melanoma maligno, angiogênese e metástases [10,51,52].

Propusemo-nos a analisar estas duas linhagens de melanomas devido às diferenças no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), uma vez que os animais AIRmax apresentavam maior frequência do haplótipo H2b compatível com o das células B16F10 e os animais AIRmin apresentavam maior frequências dos haplótipos H2d ou H2k/d compatíveis com das células S91 (H2d) [31]. Entretanto, análises mais recentes

das linhagens AIRmax e AIRmin, com gerações posteriores, demonstraram que os animais AIRmax passaram também a expressar haplótipo H2d (comunicação pessoal). Assim, as diferenças no crescimento do tumor B16F10 entre AIRmax e AIRmin se deve provavelmente à incompatibilidade tecidual, não estando relacionadas ao processo de angiogênese, uma vez que não houve diferenças significativas dos fatores indutores desse processo.

Assim, em vista dos resultados obtidos, sugerimos que o desafio de animais AIRmax e AIRmin com o melanoma S91 provoca, nesses últimos, uma resposta imunológica mais intensa que nos animais AIRmax, devido ao maior número de células IFN- γ ⁺. Ainda que parte dos fatores produzidos tenham íntima relação com a angiogênese, a resposta imune desenvolvida pelos animais AIRmin parece ser fundamental para controlar o crescimento do tumor no período final da implantação.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria por ceder gentilmente as células de melanoma S91. Ao Hélio Rubens de Carvalho Nunes, consultor estatístico do Grupo de Apoio à Pesquisa da FMB – UNESP, pela assistência na escolha das análises estatísticas adequadas. À FAPESP pelo apoio financeiro (05/56204-7) e ao CNPq tanto pelo apoio financeiro (401266/2005-2), quanto pela concessão da bolsa de estudo através do programa de pós-graduação em Patologia.

Referências:

1. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2825-30.
2. Folkman J. Anti-angiogenesis: New concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175:409-16.
3. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4.
4. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49:507-21.
5. Ono M, Torisu H, Fukushima J et al. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43:69-71.
6. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357:539-45.
7. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endoc Rev* 1997; 18:4-25.
8. Leek RD, Landers RJ, Harris AL et al. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1999; 79:991-5.
9. Torisu H, Ono M, Kiryu H et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer* 2000; 85:182-8.
10. Neitzel LT, Neitzel CD, Magee KL et al. Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Ann Surg Oncol* 1999; 6:70-4.
11. Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 1997; 76:930-4.
12. Loureiro RMB, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:77-89.
13. Story MT, Hopp KA, Meier DA. Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor β in cultured human prostate stromal cells. *Prostate* 1996; 28:219-26.
14. Rizzino A. Transforming growth factor- β : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev Biol* 1988; 130:411-22.
15. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-4.

16. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E et al. *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induces proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108:671-82.
17. Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R et al. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9:203-26.
18. Sun WH, Kreisle RA, Phillips AW et al. *In vivo* and *in vitro* characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 1992;52:5412-5.
19. Haass NK, Smalley KSM, Li L et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2005;18:150-9.
20. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med* 2006; 12:171-2.
21. García-Hernández ML, Hernández-Pando R, Gariglio P et al. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* 2002; 105:231-43.
22. Gusella GL, Musso T, Bosco MC et al. IL-2 up-regulates but IFN-gamma suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol* 1993; 151:2725-32.
23. Coughlin C, Salhany KE, Wysocka M et al. Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 1998; 101: 441-52.
24. Lasek W, Feleszko W, Jakub G et al. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrose factor α in mice. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 45:100-8.
25. Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C et al. Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest* 1998; 78:541-50.
26. Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG et al. 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.
27. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 1998; 19:337-46.
28. Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG et al. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 2006; 27:1517-25
29. Castoldi L, Golim MA, Ribeiro OG et al. Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). *Immunology* 2007; 120:372-9.

30. Maria AM, Manenti G, Galbiati F et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (*Pas1*) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 2003; 22:426-32.
31. Maria DA, Ribeiro OG, Pizzocaro KF et al. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. *Carcinogenesis* 2001; 22:337-42.
32. Almeida A, Thiery JP, Magdelénat H et al. Gene expression analysis by real-time reverse transcriptions polymerase chain reaction: influence of tissue handling. *Anal Biochem* 2004; 328:101-8.
33. Mathy JA, Lenton K, Nacamuli RP et al. FGF-2 stimulation affects calvarial osteoblast biology: quantitative analysis of nine genes important for cranial suture biology by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Plast Reconstr Surg* 2003; 112:528-39.
34. Yang H, Xu Z, Iuvone PM et al. Angiostatin decreases cell migration and vascular endothelium growth factor (VEGF) to pigment epithelium derived factor (PEDF) RNA ratio in vitro and in a murine ocular melanoma model. *Mol Vis* 2006; 12:511-7.
35. Fidler IJ. Regulation of neoplastic angiogenesis. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2000; 28:10-4.
36. Seung LP, Rowley DA, Schreiber H. Cytokines in cancer. In: Thèze J eds. *The cytokine network and immune functions*. New York:Oxford University Press; 1999:335-45
37. Ch'ng S, Wallis RA, Yuan L et al. Mast cells cutaneous malignancies. *Mod Pathol* 2006; 19:149-59.
38. Shih IM, Herlyn M. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 1993; 100:196-203.
39. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Invest New Drugs* 2003; 21:21-32.
40. Reed JA, McNutt NS, Prieto VG et al. Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression. *Am J Pathol* 1994; 145:97-104.
41. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM et al. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5788-92.
42. Soufla G, Porichis F, Sourvinos G et al. Transcriptional deregulation of VEGF, FGF2, TGF- β 1, 2, 3 and cognate receptors in breast tumorigenesis. *Cancer Lett* 2006; 235:100-13.
43. Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A et al. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int J Cancer* 1999; 84:160-8.

44. Moretti S, Chiarugi A, Semplici F et al. Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. *Melanoma Res* 2001; 11:395-9.
45. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H et al. Synergistic cytotoxic and antitumoral effects of recombinant human tumor necrose factor and hyperthermia. *Cancer Res* 1988; 48:650-3.
46. Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Cancer Biol* 2002; 12:113-20.
47. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:135-41.
48. Vigar ND, Cabrera WHK, Araujo LMM et al. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol* 2000; 30:431-7.
49. Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 1993; 120:1281-8.
50. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:697-703.
51. Vlaykova T, Laurila P, Muhonen T et al. Prognostic value of tumour vascularity in metastatic melanoma and association of blood vessel density with vascular endothelial growth factor expression. *Melanoma Res* 1999; 9:59-68.
57. Mowlavi A, Malafa MP. Angiogenesis in primary tumor cells of metastatic and nonmetastatic malignant melanoma. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106:514.

5. Anexo

Clinical & Experimental Immunology

Author Guidelines

New Manuscript Central website address!

Manuscripts

All manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/cei>. All that is required is a single Word/RTF/PDF file containing the complete manuscript (text, tables and figures). If your manuscript is found to be acceptable for publication, separate figure files will be required for production purposes. The required file formats are detailed in the 'Illustrations' section below. If you are unable to submit online, please contact the editorial office (Tel.: +44 (0) 20 8875 2408; Fax: +44 (0)20 8875 2422; Email: cei@immunology.org). Full submission instructions are provided below.

The following forms must be completed and returned to the editorial office (CEI Editorial Office, British Society for Immunology, Triangle House, Broomhill Road, London, SW18 4HX, UK): author's declaration, Publication Charge, Colour Work Agreement (only applicable if colour is used in the manuscript).

Submissions should be accompanied by a completed Exclusive Licence Form. Authors of all manuscripts are required to license copyright in their paper to Blackwell Publishing. Copyright licensing is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been licensed.

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Blackwell Synergy website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1300 (equivalent to \$2600) to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Blackwell Synergy service. If you wish your paper to be OnlineOpen you are required to complete the combined payment and copyright licence form: Online Open Form.

Appeals. Appeals regarding decisions made by the Editors regarding the suitability of manuscripts for publication should be directed to the Editors.

Manuscript preparation

It is essential that authors retain a copy of their original manuscript as the Editor cannot accept responsibility for corruption/loss of files submitted. Papers are accepted on the understanding that all of the material submitted is the property of the authors (except where due acknowledgement is given), and that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. Papers involving human subjects should receive local Ethical approval and the

informed consent of all subjects should be obtained. Experiments involving animals should be conducted in accordance with the relevant local legislation.

Long articles which would exceed six printed pages (i.e. approximately 3000 words, with three tables and three figures or the equivalent thereof) are not encouraged.

Manuscripts should be formatted in **double spacing**. The manuscript should contain a covering (title) page bearing the title of the paper, a short title, name and postal and e-mail address of the author, together with the name of the Institution where the work was done. For indexing purposes **up to 5 keywords** should be supplied.

Generally, papers should be divided into the following parts and in the order indicated:

(1) Summary: about 3% of the length of the paper but **not exceeding 250 words**; (2) Introduction: containing the reasons for doing the work; (3) Materials and Methods: sufficient information must be included to permit repetition of experimental work; (4) Results: these should be given concisely; the use of tables and figures to illustrate the same results will only rarely be allowed; (5) Discussion: the presentation of results should be separated from a discussion of their significance; this section should not repeat results; (6) Acknowledgements (which must include details of financial support); (7) References: references in the manuscript text should appear as numbers in square brackets, following the authors names in text if necessary. The reference list should show the references in numerical and not in alphabetical order. The full title of the paper should be given with the first and last page numbers. The journal name should be abbreviated according to the system adopted by Index Medicus. For example:

1. Shingu M, Hurd ER. Sera from patients with systemic lupus, erythematosus reactive with human endothelial cells. *J Rheumatol* 1981; 8:581-6.
2. Zavazava M, Halene M, Westphal E et al. Expression of MHC class I and II molecules by cadaver retinal; pigment cells: optimization of post-mortem HLA typing. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 163-6

When the quotation is from a book, the following form should be used:

3. Kearsle KP, Kaplan AM, Cohen DA. Role of cell surface glycoproteins in the formation of TCell: APC conjugates In: Schook LB, Tew JG, eds. *Antigen presenting cells: diversity, differentiation, and regulation*. New York: Alan R. Liss, 1988:221-34.
4. Virella G, Goust JM, Fudenberg HH. *Introduction to medical immunology*, 2nd Edn. New York: Marcel Dekker, 1990

Work which has not been accepted for publication and personal communications should not appear in the reference list. Work which has been accepted for publication should be included in the reference list stating the journal in which it is to appear.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

Pre-submission English-language editing. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. English language editing will a) improve grammar, spelling, and punctuation; b) improve clarity and resolve any ambiguity caused by poor phrasing; and c) improve word choice and ensure that the tone of the language is appropriate for an academic journal.

A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/English_Language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Word 2007 Will authors please note that Word 2007 is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Please use Word's 'Save As' option therefore to save your document as an older (.doc) file type.

Nomenclature

CD nomenclature is to be used for all cell differentiation antigens, with or without alternative names which give information about the molecules function. Complement receptors should be named CR1 etc., followed by the correct CD terminology in parentheses: CR1 (CD35); CR2 (CD21); CR3 (CD11b, CD18); CR4 (CD11c, CD18).

Units and Abbreviations

The Journal recognizes the adoption of the *Système International d'Unités* (SI Units) proposed in *Units, Symbols and Abbreviations* (1972) published by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK.

Other abbreviations should be used only for unwieldy names and only when they occur frequently. Where such non-standard abbreviations are used, a glossary should be provided.

Online Submission

- Manuscripts for online submission should be prepared as a SINGLE file containing the text, tables and figures. Word and RTF files with the figures and tables inserted can be uploaded, as can PDF files containing the complete manuscript. Word/RTF files will be converted to a PDF upon upload to the system and it is the PDF version that will be used for review. Please ensure that the figures inserted into the Word/RTF file or included in the PDF are of suitable quality for review and that each figure is labelled with a figure number (Figure 1, Figure 2 etc).
- Users of Macintosh computers should ensure that the file extension name (e.g. DOC or RTF) is present to ensure conversion to PDF files.
- Figures should be prepared in accordance with the instructions below (section entitled 'Illustrations') and manuscripts formatted in accordance with the instructions given above ('Manuscript preparation').
- You should use a general font such as Times Roman/New Roman, Arial or Helvetica throughout when preparing your manuscript. You should not use Far Eastern/Asian fonts as these may create problems during PDF conversion. When

adding symbols, e.g. Greek characters, the degree symbol etc., you should use the Symbol font. Alternatively, you may wish to write out any unusual characters/symbols out in full.

- Once your manuscript has been prepared and you are ready to submit it online, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/cei> and follow the step-by-step instructions provided. Please note that it is the corresponding author's Manuscript Central Account that should be used for submission. If you require any help during the submission process you can either use the online help facility, contact the support team (support@ScholarOne.com) or contact the editorial office (cei@immunology.org).
- During submission, you can suggest potential reviewers for your manuscript. You should not propose people that are working in your institution or close collaborators elsewhere.
- If you refer to unpublished papers, you should upload these as additional files that are available for review.

Submission of revised manuscripts

Revised manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/cei> in two formats:

(i) A file for re-review

This should be a single file containing the text, all figures and all tables even if these were not altered during revision. All alterations made to the manuscript should be **UNDERLINED/HIGHLIGHTED** as this makes it easier for the referees and editors to assess the changes made. Single Word or RTF files with the figures and tables inserted can be uploaded during re-submission, as can single PDF files containing the complete manuscript as for submission of the original manuscript.

(ii) Files for production

In order to speed publication, you should also upload separate text and figure files for production. The text file should be a single file that contains: the text of the manuscript with all the highlighting/underlining removed; the references; tables; and figure legends. It should be in a word-processed, not PDF, format because PDF files cannot be used for production. The figures should NOT be included in this file as this can lead to errors during production. For instructions regarding the figure formats/file quality that should be uploaded please see the following section entitled 'Illustrations'.

It is recommended that you also send **HIGH-QUALITY PRINTED VERSIONS** of the figures to the editorial office at the same time as submitting the revised manuscript online. Manuscripts will **NOT BE ACCEPTED AND SENT TO THE PUBLISHERS** until suitable quality production files/good quality hard copies of the figures have been received by the editorial office. Colour figures, particularly photographs, **MUST** be sent as hard copies, in addition to the electronic files, because the colour viewed on-screen can vary widely from the colour in the original photographs.

Illustrations

For production purposes, it is best if you can supply figures in TIFF format; however, it is also possible to use Illustrator or Photoshop software saved in the format '.eps' or '.tif'. If

you are unable to provide these specified formats, please provide the figures in as many different file formats as possible. The figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, should be as follows:

Line art - Minimum 600 dpi

Halftone (i.e. both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi

Line and tone (line art and halftone combined) - Minimum 600 dpi

As a guide, if the electronic files are viewed at 400% on the computer screen and they look pixellated in any way then they will NOT be of sufficient quality for printing. For further information on file formats, please see the instructions on our website at site <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

In addition to any electronic files, always send high-quality printed versions of the figures to the editorial office especially when submitting revised manuscripts online. If a figure is an actual photograph then it should be provided as a sharp image on photographic paper, suitable for reproduction. For line figures, paper printouts are acceptable provided that the quality is good: the lines should be solid, the text in a standard font and not blurred, and the overall image should be sharp and clear. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. Figures should be labelled with the figure number, manuscript ID and author's name in soft pencil on the back and the top edge identified. Masking instructions or lettering, arrows, etc., can, if necessary, be indicated on an overlay.

Figures should be numbered (Arabic numerals) *seriatim*. Legends should be separate from the figures and included in the main text of the manuscript, after the references. Please note that authors will be expected to bear the cost of colour prints. Please submit the completed Colour Work Agreement Form with your manuscript. Any article received with colour work will not be accepted until a completed form has been returned.

Tables

Tables should be provided in the format of one table per page and should be given Arabic numerals. Units should appear in parentheses in the column headings but not in the body of the table. Words or numerals should be repeated on successive lines: ditto should not be used.

Reviews

The Journal welcomes reviews covering basic or clinical immunology that are likely to be of interest to the broad readership of the Journal. Reviews should be between 2500 and 3500 words long and include up to 100 references. The inclusion of Figures and Tables is encouraged, with an upper limit of four of each. Charges for colour reproduction must be met by the authors. A brief outline of the scope of the review should be e-mailed to CEI@immunology.org for consideration before submission.

Fast track

Brief papers covering topics of immediate interest can be submitted as Fast track papers. A letter to the Editors should accompany the manuscript stating why rapid publication is requested. Such papers have a maximum 2000 word limit, should contain no more than three figures and tables in total, and no more than 30 references should be cited. A decision

on rapid communications will usually be given within three weeks of submission and accepted manuscripts will be fast-tracked during production.

Publication Charge

A publication charge of £86 or \$147 will be levied on the corresponding author of each paper accepted for publication, irrespective of its length. When payment has been received, the corresponding author will receive a years personal subscription to *Clinical and Experimental Immunology*. The charge will be waived if the corresponding author already takes a personal subscription to the Journal, or resides in a country with exchange control problems, or in cases of personal hardship.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

OnlineEarly

Clinical and Experimental Immunology is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service. *OnlineEarly* articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>

Author services

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and

for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Offprints

Authors will be provided with electronic offprints of their paper. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form, which accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is more if the order form arrives too late for the main print run. Offprints are normally dispatched within three weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the following if offprints do not arrive: C.O.S. Printers Pte Ltd., 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; Email: offprint@cosprinters.com. However, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to six weeks to arrive. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted, *two months* after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.