

**ESTUDO DA PROGRESSÃO TUMORAL E
PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM
MODELOS TUMORAIS ASSOCIADOS AO HPV-
16 EM CAMUNDONGOS**

ALINE DO NASCIMENTO BOLPETTI

**Tese de doutorado apresentada a Fundação
Antônio Prudente para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Ana Paula Lepique

Co-orientadora: Dra. Luisa Lina Villa

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Bolpetti, Aline do Nascimento

Estudo da progressão tumoral e perfil de expressão de citocinas em modelos tumorais associados ao HPV-16 em camundongos /

Aline do Nascimento Bolpetti – São Paulo, 2009.

162p.

Tese (doutorado) Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Ana Paula Lepique

Descritores: 1. NEOPLASIAS/imunologia. 2. CITOCINAS. 3. RECEPTORES DE CITOCINAS. 4. EXPRESSÃO GÊNICA. 5. CAMUNDONGOS. 6. PAPILOMAVIRUS HUMANO 16.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho **Felipe**, que veio me trazer muito mais felicidade em um momento tão especial da minha vida. Que veio para me mostrar o que é o AMOR incondicional.

Ao meu querido **Francisco**, o meu “muito obrigado” por transformar a *minha vida* na *nossa vida*. Obrigada pelo amor e apoio fundamentais para conclusão de mais esta etapa.

A minha querida família, meus pais **Loide** e **José Carlos**, e ao meu irmão **André**. Obrigada pela força, amizade e amor dedicados durante toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Dra **Ana Paula Lepique** pelos valiosos ensinamentos, dedicação e pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação. Obrigada por permitir que este trabalho se conclua com sucesso.

À Dra **Luisa Lina Villa** pela oportunidade de trabalhar sob sua supervisão, e pelos incentivos essenciais para mais esta conquista.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe de Pós-graduação da Fundação Antônio Prudente.

Aos amigos da Virologia: Laura, Tatiana, João, José, Laura Cardeal, Enrique, Lara, Stella, Raquel, Antonieta, Maria Cecília, Neide, Iza e Lenice
Obrigada pelo apoio e amizade.

As amigas queridas Elen e Mariana. Obrigada pela incrível amizade, carinho e companherismo.

A minha querida família, Clélia, José Maria e Beatriz, pelo apoio e carinho dedicados durante todos estes anos.

A todos os meus amigos e familiares que torceram por mim,

Muito obrigada!

RESUMO

Bolpetti AN. **Estudo da progressão tumoral e perfil de expressão de citocinas em modelos tumorais associados ao HPV-16 em camundongos**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente etiológico do carcinoma de colo uterino. Citocinas e quimiocinas produzidas pelas células neoplásicas, assim como pelas células do sistema imunológico, podem direcionar à tolerância ou à uma resposta imune efetiva. A presença do HPV16 pode influenciar o perfil de citocinas e quimiocinas expressas durante o desenvolvimento dos tumores, sendo o objetivo geral deste trabalho avaliar o perfil de expressão de citocinas na resposta imune contra tumores TC-1 em camundongos C57Bl/6. Mais especificamente pretendemos caracterizar o perfil de expressão *in situ* de citocinas e quimiocinas nestes tumores, nas células tumorais e no infiltrado leucocitário, e comprovar a atividade de algumas destas moléculas com relação ao recrutamento de células e resposta imunológica contra os tumores TC-1. Estudo prévio do nosso laboratório identificou células mielóides CD45+/CD11b+/F480+ como componente majoritário do infiltrado leucocitário. Estas células foram classificadas como macrófagos associados a tumores (TAMs) de acordo com as características fenotípicas identificadas. No trabalho aqui descrito, alguns achados de expressão de mRNA, como IL-10 e MMP-9 expressos pelos leucócitos infiltrantes contribuem para a caracterização do fenótipo destes macrófagos. Pela análise de expressão de citocinas e quimiocinas, identificamos moléculas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF α , e moléculas regulatórias, como IL-10 e TGF β . Um achado interessante foi a expressão exclusiva de IL-10 pelo infiltrado leucocitário, que nos levou a investigar o papel desta citocina em nosso modelo. IL-10 tem papel supressor da resposta celular mediada por linfócitos TCD8+, uma vez que

observamos maior quantidade de infiltrado de linfócitos TCD8+ específicos para um peptídeo de E7 de HPV16 nos animais deficientes para IL-10. Além disso, na ausência de IL-10 os tumores TC-1 crescem mais lentamente, e apresentam quantidade reduzida de linfócitos T regulatórios nos linfonodos dos animais. A presença de CCL2 e MCSF foi identificada após análise de mRNA e proteína. A elevada expressão de CCL2 pelas células tumorais nos levaram a investigar o papel desta quimiocina no recrutamento de células mielóides em resposta às células HPV-16 positivas. Em ensaio de migração *in vitro* observamos que CCL2 possui papel importante no recrutamento de monócitos CD11b+, sendo este efeito específico de células que expressam as proteínas oncogênicas E6 e E7 de HPV-16. Os resultados apresentados neste trabalho ilustram o complexo painel de citocinas e quimiocinas que estão envolvidos na inibição da resposta imune anti-tumoral e podendo influenciar o fenótipo de células do sistema imune recrutadas para o local da lesão.

SUMMARY

Bolpetti AN. **[Cytokine expression profile in HPV16 associated tumors in C57Bl/6 mice]**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Infection with Human Papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer. Cytokines and chemokines are key molecules in the local immune response owing to their immunomodulators activities. Great varieties of these molecules are produced by tumor cells as well as by the tumor infiltrate that lead to the recruitment of leukocytes associated to tumor progression. Due to the importance of local immune response against tumor establishment we proposed to evaluate the expression of cytokines, chemokines and their receptors involved in the inflammatory response in HPV associated tumors. Previous data showed us that TC-1 tumors were infiltrated mainly by CD45+/CD11b+F4/80+ macrophages with M2-like phenotype, and virtually no lymphocytes. In this study, our results showed high levels of MCSF-R and MMP-9 expression by the infiltrate. We also observed TGF β , IL-1 β , IL-6, VEGF, CCL2 and CCL5 expression by tumor cells as well as by the infiltrating leukocytes. Our in vitro studies showed that CCL2 is responsible for myeloid cell recruitment by HPV16 E6/E7 expressing cells. Interestingly, we observed high expression of IL-10 and TNF α by the infiltrate. Moreover, we tested the hypothesis that IL-10 produced by the tumor inflammatory infiltrate has a role in suppression of T cell anti-tumor response. In IL-10 deficient mice or wild type mice treated with neutralizing antibodies against IL-10 and IL-10R, tumor growth was inhibited in parallel with an increase in tumor infiltration by HPV16 E7 specific TCD8+ lymphocytes. At the same time, we observed that upon antigen stimulation less regulatory T cells were observed in lymph node cultures which IL-10 effect was neutralized. Our data indicate that IL-10 produced by infiltrating leukocytes inhibits anti-tumor T cell responses in this model. In summary, we observed expression of

inflammatory cytokines like $\text{TNF}\alpha$ and IL-1 in TC-1 tumors, which are usually associated to chronic inflammation leading to tissue damage and transformation. We also detected suppressor cytokines like IL-10 and $\text{TGF}\beta$, which, as demonstrated have a role in suppression of anti-tumor T cell responses. Our data describes a tumor environment where tumor growth is facilitated by the absence of cellular responses and possibly by the inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema que ilustra a infecção pelo HPV no epitélio e a presença de células do sistema imune no local da infecção....	8
Figura 2	Representação da qualidade dos RNA extraídos dos linfonodos e tumores coletados.....	33
Figura 3	Genotipagem dos camundongos deficientes para IL-10 e camundongos do tipo selvagem.....	40
Figura 4	Esquema do processo de isolamento de células CD11b+ a partir de células mielóides isoladas de medula óssea de camundongo C57Bl/6 através de gradiente de Percoll.....	43
Figura 5	Expressão relativa de CCL2/MCP1 e CCL5/Rantes por Real-time PCR.....	49
Figura 6	Expressão relativa de quimiocinas e receptores associados ao recrutamento de leucócitos avaliados através da plataforma RT ² Profiler PCR Array System.....	52
Figura 7	Expressão relativa de citocinas e receptores associados a inflamação avaliados através da plataforma RT ² Profiler PCR Array System.....	53
Figura 8	Expressão relativa de citocinas, quimiocinas e receptores relacionados aos macrófagos associados a tumores (TAMs), avaliados através da plataforma RT ² Profiler PCR Array System.....	54

Figura 9	Expressão de quimiocinas e receptores associados a angiogênese e avaliados através da plataforma RT ² Profiler PCR System Array.....	57
Figura 10	Vascularização de tumor TC-1. Imunofluorescência com anticorpo anti-CD31.....	57
Figura 11	Imunohistoquímica de cortes histológicos de tumores coletados três semanas após injeção subcutânea de 10 ⁵ células TC-1.....	59
Figura 12	Ensaio de migração <i>in vitro</i>	62
Figura 13	Esquema ilustrativo que propõe um modelo de microambiente tumoral formado em resposta ao tumor TC-1..	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação das quimiocinas, citocinas e seus receptores.....	14
Tabela 2	Seqüências de iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.....	34
Tabela 3	Condições de reação e perfil de ciclagem das reações Real-time PCR.....	36
Tabela 4	Seqüência dos iniciadores empregados na reação Real-time PCR.....	36
Tabela 5	Seqüência de iniciadores e condições da reação de PCR empregada para genotipagem dos camundongos C57Bl/6 <i>IL-10^{tm1Cgn}</i>	39
Tabela 6	Anticorpos empregados nas reações de imunohistoquímica....	41
Tabela 7	Perfil de expressão de citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas, por RT-PCR, em amostras coletadas de animais submetidos à injeção de células TC-1.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

HPV	Papilomavírus humano
IL-10	Interleucina-10
TAM	Macrófagos asociados a tumores
MDSC	Células supresoras derivadas mielóides

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O carcinoma do colo uterino e Papilomavírus humano.....	1
1.2	Biologia do vírus.....	2
1.3	Resposta imune contra HPV.....	5
1.4	Evasão do sistema imune por HPV.....	9
1.5	Papel das citocinas e quimiocinas.....	12
1.6	Citocinas e macrófagos.....	18
1.7	Inflamação e câncer.....	21
2	OBJETIVOS.....	25
3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Células e animais.....	29
4.2	Preparação das amostras e reagentes.....	30
4.3	Isolamento dos leucócitos tumorais.....	31
4.4	Caracterização do perfil de expressão de citocinas.....	32
4.4.1	Quantificação da expressão de citocinas e quimiocinas.....	34
4.4.2	RT ² Profiler PCR Array System (SuperArray).....	37
4.5	Tipagem dos camundongos C57Bl/6 IL-10 ^{tm1Cgn}	38
4.6	Análise do infiltrado tumoral.....	40
4.6.1	Imunohistoquímica.....	40
4.7	Ensaio de migração <i>in vitro</i>	42
4.7.1	Gradiente de Percoll.....	42
4.8	Imunofluorescência.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Caracterização do perfil de expressão de citocinas por RT-PCR.....	45

5.2	Quantificação da expressão de citocinas e quimiocinas nos tumores.....	47
5.2.1	Análise da plataforma RT ² <i>Profiler PCR Array System</i>	51
5.3	Angiogênese nos tumores TC-1.....	55
5.4	Caracterização do infiltrado leucocitário nos tumores TC-1.....	58
5.5	Papel de quimiocinas na migração de células mielóides em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV16.....	61
5.6	Manuscrito 1: <i>Characterization of cytokines and chemokines expression in HPV16 tumor model in C57Bl/6 mice</i>	63
5.7	Manuscrito 2: <i>IL-10 production by tumor infiltrating myeloid cells plays a role in HPV16 tumor growth</i>	89
6	DISCUSSÃO.....	124
7	CONCLUSÕES.....	136
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE COLO UTERINO E PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Evidências epidemiológicas baseadas em estudos moleculares comprovaram a associação causal entre determinados tipos de Papilomavírus Humano (HPV) e o câncer de colo do útero (BOSCH et al. 2002). Entretanto, a maior parte das infecções não leva ao desenvolvimento de sintomas e ao aparecimento de lesões visíveis, sendo a maioria eliminada em um curto período de tempo pelo sistema imune. Apenas uma pequena proporção de mulheres apresenta infecções persistentes por um mesmo tipo de HPV. A infecção persistente por um tipo de HPV de alto risco oncogênico é principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de colo do útero (SCHLECHT et al. 2001).

O carcinoma do colo uterino é o segundo tipo de câncer mais freqüente em mulheres no mundo, com aproximadamente 500.000 novos casos diagnosticados responsáveis por 230.000 mortes registradas a cada ano (PARKIN et al. 2001; PISANI et al. 2002). A incidência desta neoplasia em países menos desenvolvidos é duas vezes maior se comparada aos países desenvolvidos. No Brasil, as estimativas para 2008, segundo o Instituto Nacional de Câncer-INCA, previram o aparecimento de 18.600 novos casos (Ministério da Saúde 2007).

Atualmente existem mais de 120 tipos diferentes de papilomavírus humano, dentre os quais, mais de 40 infectam o trato anogenital (ZUR HAUSEN 1996). A infecção por HPV genitais é considerada a doença sexualmente transmissível mais comumente diagnosticada (TROTTIER e FRANCO 2006). Estes vírus são divididos de acordo com o potencial oncogênico e risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas. Os de baixo risco oncogênico estão associados ao desenvolvimento de lesões benignas do colo uterino e verrugas genitais. E os de alto risco estão associados às lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos de colo do útero (MUNOZ et al. 2003).

Os principais tipos de HPV genitais são:

- 1) *De baixo risco oncogênico*: HPV 6, 11, 42, 43 e 44
- 2) *De alto risco oncogênico*: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 58

O HPV-16 é um dos mais prevalentes em mulheres sexualmente ativas e com citologia cervical normal (VILLA 1997), sendo o responsável por 50 a 60% dos casos de câncer de colo uterino (BOSCH et al. 2002).

1.2 BIOLOGIA DO VÍRUS

Os HPV pertencem à família Papillomaviridae, e são constituídos por um capsídeo não envelopado com diâmetro em torno de 55nm que engloba uma molécula de DNA circular dupla fita de aproximadamente 8000pb (ZUR HAUSEN 1996). Os diferentes tipos de HPV possuem uma organização genômica bem conservada. O genoma do vírus está dividido em três

regiões: a região regulatória (LCR, *long control region*), região precoce (*early*) e região tardia (*late*). A região LCR está localizada entre L1 e E6, e contém a origem de replicação do DNA, além de ser o local onde se ligam diversos fatores de transcrição que regulam a expressão gênica. Os genes L1 e L2, localizados na região tardia, codificam as proteínas do capsídeo viral. Os genes da região precoce, E1 e E2, codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e no controle da transcrição. Os genes E6 e E7 codificam proteínas com atividade de imortalização e transformação celular. Juntamente com a proteína codificada pelo gene E5, E6 e E7 são responsáveis pelos principais mecanismos de evasão do sistema imune (revisado por O'BRIEN e SAVERIA CAMPO 2002). Além disso, E5 também aumenta a sinalização iniciada pelo receptor de EGF, Fator de Crescimento Epidermal, mantendo-o mais tempo na superfície celular através da alteração do pH de endossomos (STRAIGHT et al. 1995).

A infecção produtiva pelo HPV está relacionada com o grau de diferenciação do epitélio. A infecção ocorre nas células epiteliais da camada basal, através de microlesões. O vírus se utiliza da alta capacidade destas células de se reproduzirem para a replicação do DNA viral e depende da expressão dos genes precoces que estimulam o ciclo celular (MCMURRAY et al. 2001). Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídeos e a progênie viral é liberada da célula (HEBNER e LAIMINS 2006).

O potencial oncogênico dos HPV de alto risco pode ser atribuído principalmente a duas proteínas virais precoces E6 e E7 (MUNGER e

HOWLEY 2002). Estas proteínas são as únicas consistentemente expressas em células de tumor (ZUR HAUSEN 1996) e a manutenção da sua expressão é essencial para a sustentação do fenótipo transformado. A proteína E6 de HPV de alto risco é capaz de interagir com e inativar a proteína supressora de tumor p53. E6, através da interação com a proteína E6AP, uma subunidade do sistema de proteasomo, leva a ubiquitinação e degradação de p53 (SCHEFFNER et al. 1990). A interação da proteína E7 com pRb induz a inativação da proteína supressora de tumor; E7 liga-se preferencialmente à forma hipofosforilada de pRb (MUNGER et al. 1989), promovendo sua degradação via proteasomo (BOYER et al. 1996). Dessa forma, as atividades de E6 e E7 de HPV de alto risco, sobre as proteínas p53 e pRb, respectivamente, contribuem para a imortalização das células infectadas pelo vírus (MUNGER e HOWLEY 2002). Com o aumento da proliferação e escape de um mecanismo de apoptose importante como p53, a probabilidade de ocorrer acúmulo de alterações genéticas que levem à transformação aumenta com o tempo. Além disso, mecanismos de defesa celular podem intensificar estes processos como será discutido adiante.

A proteína E5 é sabidamente a principal proteína transformante em papilomavírus bovinos (BPV) (SCHILLER et al. 1986), entretanto, em células infectadas por HPV ela apresenta baixo poder de transformação. E5 de HPV-16 exerce papel no ciclo produtivo do vírus, atuando em cooperação com EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), e conseqüentemente estimulando a proliferação celular e replicação viral (STRAIGHT et al. 1993). Adicionalmente, E5 de HPV de alto risco é capaz

de induzir tumores em animais transgênicos, sendo este fenótipo dependente de EGFR (GENTHER et al. 2005). E5 aparece expresso nos estágios iniciais da infecção pelo HPV, porém, deixa de ser expresso conforme a lesão progride para malignidade (revisado por O'BRIEN e SAVERIA CAMPO 2002).

A forma epissomal do HPV é normalmente encontrada em lesões intra-epiteliais de baixo grau no colo uterino. Contudo, em lesões de alto grau e no carcinoma da cérvix uterina o genoma viral encontra-se predominantemente integrado ao genoma do hospedeiro (STOLER et al. 1992). A forma de integração mais comumente encontrada nas lesões malignas é aquela na qual o gene E2 encontra-se interrompido, eliminando seu controle sobre o promotor que regula a transcrição de E6 e E7. Dessa forma, a expressão destes oncogenes passa a ser constitutiva e se torna um dos eventos centrais na promoção da carcinogênese induzida por HPV (SMOTKIN e WETTSTEIN 1986).

1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA HPV

A resposta imunológica deficiente é capaz de gerar um ambiente favorável para o desenvolvimento de uma infecção persistente pelo HPV, principal fator para o desenvolvimento de câncer. Naturalmente, o primeiro mecanismo de defesa contra qualquer patógeno envolve a resposta inata inespecífica, que ocorre na superfície da pele e mucosas e está associada à presença de células como neutrófilos e macrófagos e com a produção de

citocinas. O segundo mecanismo de defesa é específico, e envolve as imunidades humoral e celular, mediadas respectivamente pela produção de anticorpos e pelos linfócitos T citotóxicos (Figura 1).

O HPV apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imune. Algumas proteínas virais são expressas em baixos níveis nas camadas basais do epitélio, um ambiente pouco acessível às células do sistema imune. O HPV infecta células epiteliais e não induz morte celular, um os principais fatores que ativam as imunidades inata e adaptativa (revisado por STANLEY 2006; FRAZER 2007). Entretanto, apesar dos fatores que conferem vantagens ao HPV para estabelecer uma infecção persistente, a resposta imune é efetiva na maioria das mulheres infectadas.

A presença de linfócitos T infiltrantes e responsivos a peptídeos do HPV foi detectada em tumores associados a este vírus (EVANS et al. 1997). Outros estudos encontraram células circulantes específicas contra HPV em pacientes com câncer de colo uterino (DE JONG et al. 2002; WELTERS et al. 2006). Em amostras de lesões precursoras do carcinoma de colo do útero associadas ao HPV (neoplasia intraepitelial cervical, NIC) foram observadas quantidades significativas de células tanto da resposta inata quanto da adaptativa, entre elas macrófagos, células NK e linfócitos T CD4+ (KOBAYASHI et al. 2004). Estas células, em conjunto com células tumorais são responsáveis pela produção de citocinas regulatórias, como TGF- β e IL-10 (revisado por BEN-BARUCH 2006), e pró-inflamatórias, como TNF- α (revisado por BALKWILL 2002).

Em animais, estudos evidenciam a importância da resposta celular em contrapartida a resposta humoral no controle da infecção por papilomavírus e regressão de lesões, uma vez que infiltrados de células T CD8+ e T CD4+ foram encontrados em tecidos infectados pelo vírus (revisado por NICHOLLS e STANLEY 2000). Em coelhos, infiltrado significativo de células T CD8+ foi observado em lesões associadas a papilomavírus (SELVAKUMAR et al. 1997). Entretanto, em bovinos o infiltrado predominante parece ser de linfócitos T CD4+ em lesões que regredem (KNOWLES et al. 1996). Apesar da presença de linfócitos T em lesões associadas ao papilomavírus, a especificidade desta resposta ainda é pouco conhecida. Em 2003, estudo publicado por DANIEL et al. demonstrou uma resposta T CD4+ contra patógenos oportunistas que recrutam neutrófilos para o local do tumor facilitando a invasão tumoral.

Em humanos, a caracterização dos infiltrados leucocitários em lesões associadas ao HPV ainda é controversa. A presença de linfócitos T CD8+ infiltrando os tumores tem sido associada a um melhor prognóstico, enquanto os linfócitos T CD4+ podem ter papéis distintos na resposta anti-tumoral. Linfócitos T CD4+/Foxp3+, os chamados linfócitos T regulatórios, foram detectados em carcinomas de colo uterino e associados a um pior prognóstico (PIERSMA et al. 2007). Com base nestes dados, em algumas pacientes a resposta imune não é efetiva na eliminação do vírus e regressão de doença, tornando essenciais os estudos de resposta imunológica em lesões associadas ao HPV.

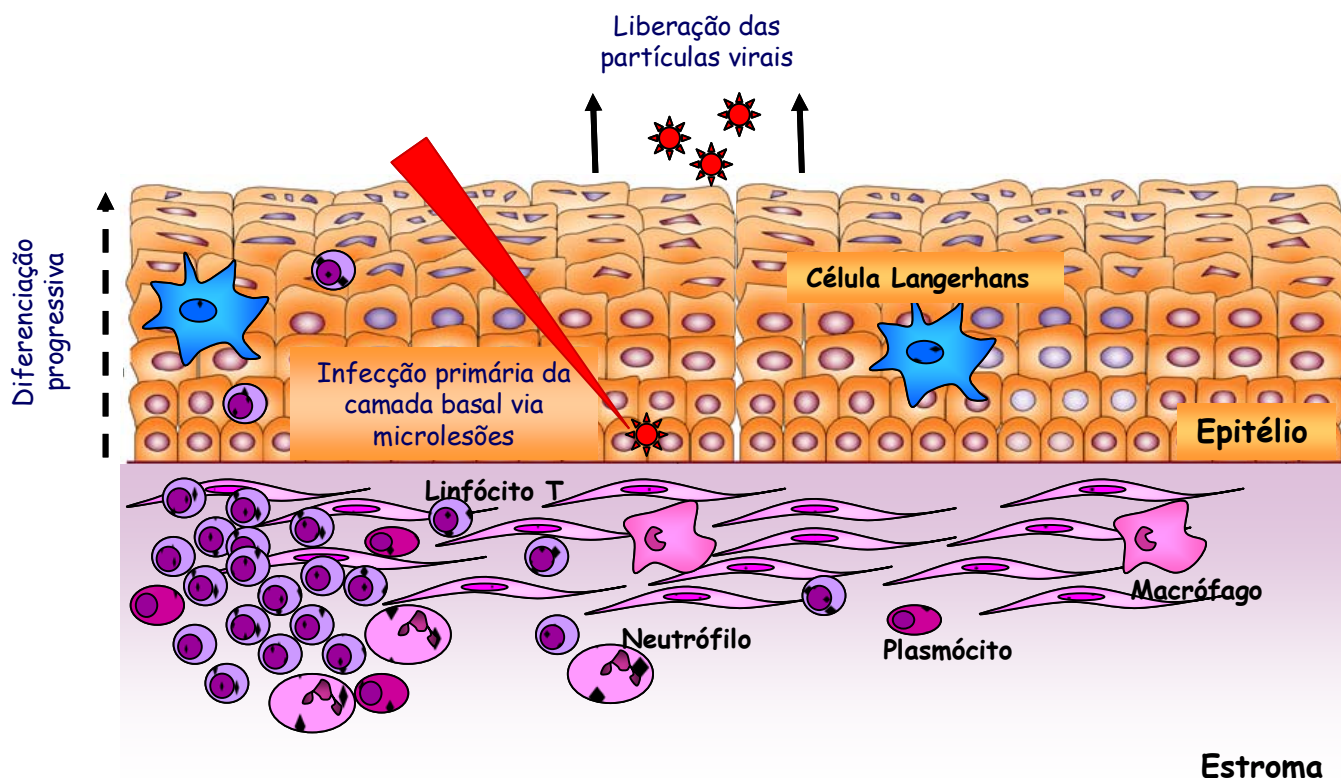


Figura 1 - Esquema que ilustra a infecção pelo HPV no epitélio e a presença de células do sistema imune no local da infecção.

O vírus infecta a camada basal do epitélio através de lesões microscópicas. No núcleo da célula, genes virais precoces são expressos e o genoma viral é replicado pela maquinaria celular. Cópias do genoma viral são distribuídas entre as células filhas que eventualmente desligam-se da membrana basal, iniciando seu processo de diferenciação. Devido à atividade de proteínas virais como E6 e E7, as células das camadas supra-basais do epitélio continuam proliferando e replicando o genoma viral. À medida que as células infectadas diferenciam-se, o promotor que ativa a transcrição dos genes tardios é ativado. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídeos e ocorre a liberação de partículas virais para a luz do tecido. As células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) presentes nos tecidos epiteliais são chamadas células de Langerhans. As células de Langerhans são capazes de apresentar peptídeos derivados de proteínas virais e migrar para os linfonodos, onde acontece a ativação de linfócitos. Estes, por sua vez, sofrem expansão clonal e migram para o sítio da lesão, ou seja, o local onde ocorreu a infecção. Ao serem ativados, estes linfócitos tornam-se específicos no reconhecimento de peptídeos virais. Em geral, encontramos num epitélio infectado por HPV, uma diversidade de células do sistema imune que são recrutadas na tentativa de eliminar esta infecção.

1.4 EVASÃO DO SISTEMA IMUNE POR HPV

O processo de evasão do sistema imune por agentes infecciosos contribui substancialmente para a seleção natural destes agentes. A progressão de tumores associados a vírus ocorre principalmente através da atuação de produtos virais capazes de desenvolver mecanismos que facilitam a evasão do sistema imune durante a replicação do vírus.

A infecção pelo HPV é exclusivamente intraepitelial, e teoricamente esta infecção deve ser detectada por células apresentadoras de antígenos presentes no epitélio, as chamadas células de Langerhans (Figura 1). Estas células apresentadoras ativadas devem migrar para os linfonodos e apresentar os antígenos virais para os linfócitos T. Estes linfócitos T, por sua vez, diferenciam-se, sofrem expansão clonal e tornam-se efetores capazes de eliminar as células epiteliais infectadas pelo vírus. No entanto, uma série de fatores pode impedir a resposta imunológica efetiva, caracterizando os mecanismos de evasão desenvolvidos pelo HPV.

Devido ao queratinócito estar naturalmente programado para morrer no fim do processo de diferenciação celular, que ocorre ao longo do epitélio, a replicação do HPV e a produção de novas partículas virais não causa morte celular (Figura 1). Desta forma, a descamação das células das camadas mais superficiais do epitélio não representa um sinal de alerta para o sistema imune, além de liberar os novos vírions para o ambiente. Além disso, na maioria dos casos de infecção pelo HPV, há redução na produção

de algumas citocinas importantes para os processos de apresentação de antígenos e recrutamento de células do sistema imune no local da lesão.

Durante o ciclo produtivo do HPV, as proteínas precoces localizam-se no núcleo das células infectadas e geram pequena resposta devido a sua baixa expressão. A concentração de E7, resultado de uma estratégia denominada “codon usage”, reduz a apresentação desta proteína, dificultando o reconhecimento das células HPV-positivas pelo sistema imune (CID-ARREGUI et al. 2003). Este mesmo mecanismo já havia sido descrito para as proteínas tardias L1 e L2 (ZHOU et al. 1999).

Outro mecanismo que possivelmente diminui a exposição do vírus ao sistema imune consiste na alteração da resposta mediada por interferons (IFN). Os interferons do tipo 1 (IFN- α e IFN- β) são importantes agentes antivirais e estão envolvidos nas imunidades inata e adaptativa (THEOFILOPOULOS et al. 2005). A proteína E7 impede a ativação do promotor de IFN- β através do recrutamento de complexos de Histona Deacetilase para os sítios de ligação de IRF-1 (fator regulador de IFN) no genoma (PARK et al. 2000). Além disso, E7 inibe a atividade de IFN- α através da ligação a IRF-9 impedindo a translocação deste fator de transcrição para o núcleo da célula (BARNARD et al. 1999). A proteína E6 promove a inativação do IRF-3, reduzindo a expressão de IFN- β (KOROMILAS et al. 2001). E6 também inibe a expressão de IL-18 que possui papel na ativação de células T (CHO et al. 2001).

O genoma de HPV apresenta diversos sítios potenciais para a ativação do receptor do tipo Toll (TLR) 9. Este receptor ativado induz a

ativação de células dendríticas, que por sua vez estimulam a resposta T CD8 citotóxica contra o antígeno em questão. E6 e E7 inibem a transcrição de TLR9, conseqüentemente inibindo a ativação de células T por células apresentadoras de antígenos (HASAN et al. 2007).

A proteína E5 codificada por papilomavírus de bovinos (BPV) é capaz de regular negativamente a expressão das moléculas MHC de classe I na superfície das células (ASHRAFI et al. 2002), mantendo-as retidas no Complexo de Golgi (MARCHETTI et al. 2002). Mecanismo semelhante foi demonstrado com a proteína E5 de HPV-16 em estudo realizado por ASHRAFI et al. (2005).

Todos os mecanismos citados acima contribuem para o escape do sistema imune, não apenas da resposta inata, mas também da resposta adaptativa. A ausência, de estímulos inflamatórios, por exemplo, não induz maturação completa de células dendríticas, que por sua vez podem promover anergia ou tolerância de células T. Além disso, as infecções por HPV podem durar muito tempo, tornando crônica a exposição aos antígenos virais, e induzindo moléculas regulatórias como CTLA-4 (VISSER et al. 2007). Estas respostas regulatórias podem fazer parte dos mecanismos que levam à tolerância aos antígenos virais. Porém estas são especulações, há ainda a necessidade de se compreender os sinais bioquímicos que controlam a resposta efetora e a tolerância a antígenos de HPV. Somente assim, será possível gerar protocolos mais eficientes de imunoterapia contra tumores estabelecidos. Dessa forma, os estudos de modelos tumorais que

expressam as proteínas virais são de extrema importância para a investigação destes mecanismos de evasão.

1.5 PAPEL DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Citocinas e quimiocinas são pequenas moléculas solúveis secretadas por diferentes tipos celulares, principalmente pelas células das repostas inata e adaptativa. Porém, as próprias células neoplásicas podem secretar e responder a estas moléculas. Citocinas são produzidas em resposta a antígenos ou micróbios, em situações em que diferentes citocinas estimulam diferentes respostas. Estas moléculas estão envolvidas na modulação de respostas adaptativas, na proliferação e diferenciação das várias linhagens hematopoiéticas, e em processos inflamatórios, que podem frequentemente acompanhar o crescimento tumoral. As quimiocinas estão envolvidas no recrutamento de uma diversidade de células hemaopoiéticas e endoteliais. Os fatores que determinam a atuação de citocinas e quimiocinas em um determinado ambiente são o perfil funcional destas moléculas, suas respectivas concentrações, e a presença dos seus receptores. A produção de citocinas e quimiocinas é processo extremamente controlado, uma vez que a falha na regulação da expressão destas moléculas pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes e/ou neoplasias.

As citocinas ligam-se a receptores de membrana específicos presentes nas células alvo, ativando vias de transdução de sinais que alteram a expressão gênica nestas células. Em geral, as ligações das

citocinas aos seus receptores são de alta afinidade. A constante de dissociação da ligação de citocinas a seus receptores específicos é de 10^{-10} a 10^{-12} M, de forma que concentrações muito pequenas de citocina são suficientes para ativar vias celulares disparadas pelo respectivo receptor. Citocinas podem ter efeito local, autócrino ou parácrino, assim como efeito sistêmico.

Os receptores de citocinas dividem-se em 5 famílias de acordo com a estrutura do domínio extracelular que contém o sítio de ligação à citocina: receptores tipo I contém 2 pares de resíduos de cisteína conservados e o motivo triptofano-serina-X-triptofano-serina (onde X é qualquer aminoácido); receptores tipo II também contém pares de cisteína conservados mas não o motivo WSXWS; superfamília imunoglobulina contém domínios de imunoglobulina; receptores para TNF com uma região conservada rica em cisteína; receptores de 7 hélices transmembranares acoplados a proteína G.

As quimiocinas se ligam a receptores acoplados a proteína G, e são divididas em 4 grupos principais denominadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteínas em sua seqüência primária. Em geral, as quimiocinas CC, que apresentam as duas primeiras cisteínas adjacentes, têm como alvo células dendríticas, linfócitos, macrófagos e células NK. As quimiocinas CXC apresentam um aminoácido entre os 2 resíduos de cisteína, e atuam sobre neutrófilos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais. Os membros das famílias CX₃C, que possuem 3 resíduos de aminoácidos entre as cisteínas, e quimiocinas C, que apresentam um único resíduo de cisteína, são mais raros. A nomenclatura dos receptores de quimiocinas foi dada de acordo

com o tipo de ligante, podendo ser CXCR, que se liga a quimiocinas CXC, CCR, cujos ligantes são quimiocinas CC, e CX₃CR, receptores de quimiocinas CX₃C.

Com relação a atividade biológica das citocinas e quimiocinas, elas podem ser pleiotrópicas, exercendo diferentes efeitos sobre diferentes tipos celulares, redundantes, quando duas ou mais citocinas promovem o mesmo efeito biológico, sinérgicas, quando o efeito destas moléculas se combinam, ou antagônicas, quando uma citocina inibe ou compensa o efeito de outra. Estas atividades contribuem para a complexidade do perfil funcional destas moléculas.

As citocinas e quimiocinas avaliadas neste trabalho são importantes no controle das respostas imune celular e humoral, no recrutamento de leucócitos, e podem estar associadas ao crescimento tumoral, aumento da angiogênese, aumento do potencial de invasão e geração de metástases. Na tabela 1 estão ilustradas citocinas, quimiocinas e seus receptores, que foram avaliados neste estudo.

Tabela 1 - Relação das quimiocinas, citocinas e seus receptores.

Quimiocina / Citocina	Outro nome	Receptor
CCL1	<i>I-309/TCA3/P500</i>	CCR3, CCR8
CCL11	<i>Eotaxina</i>	CCR3
CCL12	<i>MCP-5</i>	CCR3
CCL17	<i>TARC</i>	CCR4
CCL19	<i>MIP3β/ELC</i>	CCR7
CCL2	<i>MCP-1</i>	CCR2
CCL20	<i>MIP3α</i>	CCR6
CCL22	<i>MDC</i>	CCR4
CCL24	<i>Eotaxina-2</i>	CCR3
CCL25	<i>TECK</i>	CCR9
CCL3	<i>MIP1α</i>	CCR1, CCR4, CCR5
CCL4	<i>MIP1β</i>	CCR1, CCR5
CCL5	<i>RANTES</i>	CCR1, CCR3, CCR5, CCR4
CCL6	<i>C10/MRP1</i>	<i>Não conhecido</i>
CCL7	<i>MCP-3</i>	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	<i>MCP-2</i>	CCR3, CCR5, CCR2
CCL9	<i>MIP1γ</i>	CCR1
CXCL1	<i>MIP2/GRO</i>	CXCR2, CXCR1
CXCL4	<i>PF4</i>	<i>Não conhecido</i>
CXCL5	<i>ENA-78</i>	CXCR2
CXCL9	<i>Mig</i>	CXCR3
CXCL10	<i>IP-10</i>	CXCR3
CXCL11	<i>I-TAC</i>	CXCR3
CXCL12	<i>SDF-1</i>	CXCR4, CXCR7
CXCL13	<i>BCA1</i>	CXCR5
CX3CL1	<i>Fractalkine</i>	CXCR1
<i>IL-1α e IL-1β</i>		<i>IL-1R1, IL-1R2</i>
<i>IL-2</i>		<i>IL-2Rα, IL-2Rβ, γc</i>
<i>IL-4</i>		<i>IL-4R, γc</i>
<i>IL-5</i>		<i>IL-5Rα, IL-5Rβ</i>
<i>IL-6</i>		<i>IL-6Rα, gp130</i>
<i>IL-10</i>		<i>IL-10Rα, IL-10Rβ</i>
<i>IL-13</i>		<i>IL-13Rα1, IL-13Rα2, IL-4R</i>
<i>IL-15</i>		<i>IL-15Rα, IL-2Rβ, γc</i>
<i>IL-16</i>		<i>IL-16R</i>
<i>IL17b</i>		<i>IL-17Rb, IL-17RH1, IL-25R</i>
<i>IL-18</i>		<i>IL-18Rα, IL-18Rβ</i>
<i>IFNγ</i>		<i>IFNγR1, IFNγR2</i>
<i>TNFα</i>		<i>TNFαR1, TNFαR2</i>

Fonte: ROSSI e ZLOTNIK (2000); RAMAN et al. (2007).

Algumas citocinas como TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), e fatores de crescimento como MCSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*) e TGF- β (*Transforming Growth Factor*), estão associados aos processos de transformação celular, crescimento tumoral, e aumento da invasão e metástases (revisado por BEN-BARUCH 2006). Adicionalmente, trabalhos da literatura mostram associação entre quimiocinas e seus receptores, e os processos de tumorigênese e metástase, uma vez que são capazes de recrutar células endoteliais entre outros tipos celulares para o local do tumor, que induzem aumento da angiogênese e contribuem para a invasão de células neoplásicas (revisado por ROSSI e ZLOTNIK 2000).

O fator de necrose tumoral (TNF) é um dos mediadores do processo inflamatório na pele e mucosas. Na literatura, existe contradição quanto ao papel desta citocina, que pode apresentar atividades anti- ou pró-tumorais (BALKWILL 2002). TNF α é indutor clássico do fator de transcrição NF κ B. Em determinadas circunstâncias, TNF α pode contribuir para a manutenção de células neoplásicas em tumores de ovário e gastrointestinal (WU et al. 1993; TSELEPIS et al. 2002). Em queratinócitos infectados por HPV-16, esta citocina inibe a expressão dos genes precoces E6 e E7 (KYO et al. 1994). Estudos *in vitro* mostraram que TNF α é um potente inibidor da proliferação de queratinócitos humanos (BASILE et al. 2003), entretanto, em culturas de células infectadas por HPV-16 e 18 foi observada resistência ao efeito anti-proliferativo de TNF α (VILLA et al. 1992; BOCCARDO et al. 2004). Em modelo de tumores de pele induzidos por carcinógeno químico, a ausência

de $TNF\alpha$ confere resistência ao desenvolvimento tumoral, indicando o papel importante desta citocina na carcinogênese destes tumores (MOORE et al. 1999). $TNF\alpha$ também tem papel em quadros inflamatórios crônicos que facilitam processos de carcinogênese, como é o caso de câncer de cólon (POPIVANOVA et al. 2008).

Citocinas supressoras da resposta anti-tumoral têm recebido atenção especial em estudos de mecanismos de evasão do sistema imune. Entre elas, as moléculas multifuncionais $TGF-\beta$ e a Interleucina-10 (IL-10) parecem contribuir para a inibição da resposta antitumoral mediada pelos linfócitos T $CD8+$ (revisado por BEN-BARUCH 2006). Ambas podem ser secretadas por diversos tipos celulares, como macrófagos, monócitos, linfócitos T e pelas próprias células tumorais (revisado por SALAZAR-ONFRAY 2007).

A citocina $TGF-\beta$ está envolvida no controle da proliferação de células epiteliais, formação de matriz extracelular, entre outros processos associados ao crescimento de uma variedade de tumores. Além disso, $TGF-\beta$ contribui para a inibição da resposta antitumoral mediada pelos linfócitos T $CD8+$ (LOEFFLER et al. 1992). Em células infectadas por HPV-16, as proteínas E6 e E7 são capazes de inibir a ação citostática de $TGF-\beta$ na proliferação e diferenciação destes queratinócitos (NEES et al. 2000; LEE et al. 2002), contribuindo para o processo de imortalização associada ao HPV. O bloqueio de $TGF-\beta$ parece ter efeito anti-tumoral em modelos animais de mesotelioma (SUZUKI et al. 2007) e tumores associados ao HPV-16 (KIM et al. 2008). Estes estudos sugerem um importante papel de agentes bloqueadores de $TGF-\beta$ em imunoterapias.

IL-10 é uma citocina pleiotrópica, porém com características predominantemente imunossupressoras, capaz de inibir a apresentação de antígenos via MHC-I (MATSUDA et al. 1994) e inibir a produção de citocinas de perfil Th1, como IL-2 e IFN- γ (revisado por MOORE et al. 2001). Estudos revelam a capacidade de IL-10 em inibir a produção de citocinas, como TNF α , IL-1 β e IL-6, pelas células mielóides, através da inibição do fator de transcrição NF κ B (WANG et al. 1994, 1995). IL-10 pode ser produzida por células mielóides, como macrófagos, e linfócitos B e T. Recentemente, a produção desta citocina pelas células T regulatórias (UHLIG et al. 2006) tem sido fortemente associada a uma série de neoplasias (STRAUSS et al. 2007; KRYCZEK et al. 2009). Adicionalmente, diversos estudos têm gerado evidências da atividade supressora de IL-10 sobre a resposta celular (de WAAL MALEFYT et al. 1993; SALAZAR-ONFRAY 2007). Em modelo animal de infecção por LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*), IL-10 tem papel fundamental na inibição da resposta mediada por linfócitos T CD8+, contribuindo para o estabelecimento de uma infecção persistente (BROOKS et al. 2006). Macrófagos são uma importante fonte de IL-10 (FIORENTINO et al. 1991), e podem estar associados a progressão de determinadas neoplasias (LEWIS e POLLARD 2006).

1.6 CITOCINAS E MACRÓFAGOS

Macrófagos são células com elevada heterogeneidade fenotípica, resultado principalmente do microambiente a que estão expostos, ou seja,

do repertório de moléculas expressas no local e da interação com células do sistema imune e do estroma. Estas células podem ser classificadas de acordo com o fenótipo que adquirem, características que podem ser conferidas pelas citocinas e quimiocinas responsáveis pela diferenciação e ativação destes macrófagos. Macrófagos são normalmente classificados em M1 e M2. A população M1 tem características citotóxicas, expressa TNF- α e espécies reativas de oxigênio (MANTOVANI et al. 2002). A população M2, por outro lado, é mais associada a homeostase do tecido, fagocitando células mortas ou debris e muitas vezes exercendo efeitos supressores sobre a resposta adaptativa. Além disso, macrófagos associados a tumores podem ter fenótipo M2 ou um fenótipo misto, sendo designados como TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*) (SICA e BRONTE 2007). Macrófagos também funcionam como células apresentadoras de antígenos e o repertório de citocinas expressas pelas mesmas na fase de ativação da resposta adaptativa determina o tipo de resposta que será gerada.

Macrófagos recrutados na fase inicial de um processo inflamatório, em geral, apresentam atividade citotóxica (M1), no entanto, macrófagos presentes num ambiente de inflamação crônica apresentam um fenótipo imunossupressor e relacionado à regeneração tecidual (M2). Apesar de muitas vezes, estes fenótipos serem bem caracterizados, ainda não se sabe como e porque ocorre a transição entre fenótipos tão diferentes, ou ainda se monócitos recrutados para o tecido inflamado em diferentes fases da resposta inflamatória podem diferenciar-se diferentemente. No caso específico de infiltrados tumorais, o fenótipo de macrófagos associados a

estas lesões varia muito de acordo com o tipo de tumor. Além disso, mais de uma população pode estar presente no mesmo tumor, inclusive outras células mielóides que também podem ter caráter supressor, como as células derivadas mielóides supressoras (MDSC, *Myeloide Derived Supressor Cells*) (SICA e BRONTE 2007). Dentre os fatores cruciais para a diferenciação destas células está a exposição à citocinas (STOUT et al. 2005).

Os principais marcadores das populações de macrófagos M1 e M2 estão relacionados ao metabolismo do aminoácido L-Arginina. Os macrófagos M1 caracterizam-se pela ativação de iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*), enzima que catalisa a síntese de óxido nítrico (NO) e citrulina a partir de L-Arginina, expressa por diversas células do sistema imune. Por outro lado, macrófagos M2 caracterizam-se pela ativação de Arginase 1 (Arg1), enzima que catalisa a hidrólise de L-Arg em L-ornitina e urea (revisado por SICA e BRONTE 2007). Arginase 1 é induzida em macrófagos e monócitos por citocinas como IL-10, IL-4 (MANTOVANI et al. 2002; STOUT et al. 2005), TGF- β (BOUTARD et al. 1995) e IL-13 (MANTOVANI et al. 2002). Enquanto iNOS II é induzida na presença de IFN- γ , IL-1 e TNF- α (revisado por SICA e BRONTE 2007).

O balanço entre a atividade de Arginase 1 e iNOS II é crucial para determinação de uma resposta favorável ou não ao desenvolvimento tumoral, uma vez que estas proteínas estão envolvidas na caracterização fenotípica de células mielóides com importante atividade citotóxica e no processo de apresentação de antígenos (MUNDER et al. 1999; revisado por SICA e BRONTE 2007). Na literatura, estudos descrevem a elevada

atividade de Arginase 1 em células mielóides presentes em carcinoma de células renais (ZEA et al. 2005), e em modelos animais de câncer de colon e linfoma (BRONTE et al. 2003). A caracterização fenotípica destas células, que muito frequentemente infiltram tumores, é essencial para o entendimento da atividade anti-ou pró-tumoral que as mesmas podem exercer.

1.7 INFLAMAÇÃO E CÂNCER

Estudos epidemiológicos têm revelado que a inflamação crônica é um fator preditivo para o desenvolvimento de algumas neoplasias, como câncer colo-retal, tumores de pâncreas e fígado (revisado por COUSSENS e WERB 2002). Além disso, fatores associados à inflamação, como a presença de infiltrado leucocitário, expressão de citocinas e quimiocinas, remodelamento tecidual e angiogênese, frequentemente estão presentes em tumores.

Em estudo realizado por DE VISSER et al. (2005), foi avaliado o papel das respostas inata e adaptativa em modelo de progressão de tumores associados ao HPV-16. Os autores descrevem a presença de infiltrado de células da resposta inata em lesões pré-malignas (COUSSENS et al. 1999; DE VISSER et al. 2004) que torna-se reduzido em animais cuja resposta adaptativa é deficiente (DE VISSER et al. 2005). A diminuição do recrutamento de células da resposta inata é acompanhada de redução do remodelamento tecidual e angiogênese, que conseqüentemente inibe o processo de carcinogênese. O dado mais interessante consiste na

restauração do foco inflamatório após a transferência de células B para os animais que não possuem resposta adaptativa, indicando um papel importante destas células na indução da inflamação.

Dentre as células da resposta inata que frequentemente infiltram tumores epiteliais, estão os neutrófilos, mastócitos e macrófagos, capazes de produzir citocinas e quimiocinas que recrutam outros leucócitos para o local da lesão. Estas células hematopoiéticas podem ter papel crucial na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases (COUSSENS e WERB 2002). Particularmente, os chamados macrófagos associados a tumores (TAMs) apresentam fenótipo imunossupressor e têm sido relacionados a um pior prognóstico. Estes macrófagos podem produzir fatores indutores de angiogênese, proteases e fatores de crescimento gerando um ambiente favorável para sobrevivência e proliferação das células tumorais (revisado por POLLARD 2004). Outra população de células mielóides, as chamadas células derivadas mielóides supressoras (MDSC), foram recentemente descritas como componente do infiltrado leucocitário de muitos tipos de tumores (SICA e BRONTE 2007).

As MDSC são uma população de células bastante heterogênea caracterizadas pela ausência de marcadores de células mielóides maduras e com potencial imunossupressor. Em geral, elas expressam as moléculas CD11b, Gr1 e IL-4R α e estão presentes no sangue e órgãos linfóides, como o baço, de animais com tumores (MELANI et al. 2003). As MDSC compartilham características fenotípicas de macrófagos M1 e M2, contudo, assim como os TAMs, a inibição da resposta celular mediada por linfócitos

TCD8+ é o seu principal mecanismo de ação imunossupressor (revisado por SICA e BRONTE 2007). Adicionalmente, as MDSC, além de inibirem a resposta efetora de linfócitos T, induzem o desenvolvimento de células T regulatórias (CD4+/Foxp3+) que possuem atividade imunossupressora (HUANG et al. 2006). A relação entre as MDSC e os TAMs ainda não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que ambas as populações celulares podem infiltrar tumores e contribuir para a progressão tumoral, sendo a inibição da resposta imune celular um dos principais mecanismos de ação destas células.

Existe um enorme esforço em avaliar o papel das citocinas no desenvolvimento de tumores, muitos trabalhos avaliam níveis circulantes de citocinas em pacientes com câncer (FORTIS et al. 1996; CLERICI et al. 1997; CHOPRA et al. 1997). Apesar destas informações serem importantes, o microambiente tumoral inicia toda a sinalização que eventualmente torna-se sistêmica. Porém este é ainda relativamente pouco estudado. A maioria dos trabalhos presentes na literatura analisa o perfil de citocinas circulantes em mulheres que apresentam lesões associadas ao HPV (de JONG et al. 2002; WELTERS et al. 2003; BAIS et al. 2005). Dessa forma, nossa proposta é realizar uma análise *in situ* da expressão do perfil de citocinas, quimiocinas e outras moléculas que estão envolvidas no processo inflamatório em modelo de tumor associado ao HPV-16 em camundongos de forma a compreender a comunicação entre as células tumorais e o infiltrado leucocitário. Este trabalho nos permitiu identificar moléculas potencialmente importantes para o entendimento da resposta imune nestes tumores, o que

poderá eventualmente permitir melhor compreensão da progressão de neoplasias associadas ao HPV em humanos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo consiste em estudar o perfil de expressão de citocinas em modelo de tumor associado a HPV16 em camundongos (TC-1). Especificamente pretendemos avaliar a expressão *in situ* de citocinas, quimiocinas e seus receptores no infiltrado inflamatório e compará-la à expressão das mesmas nas demais populações celulares que compõem o tumor: células tumorais, endotélio e fibroblastos. Além disso, pretendemos avaliar o papel biológico de algumas das citocinas expressas nos tumores TC-1 na resposta imunológica contra estes tumores.

3 DESENHO EXPERIMENTAL

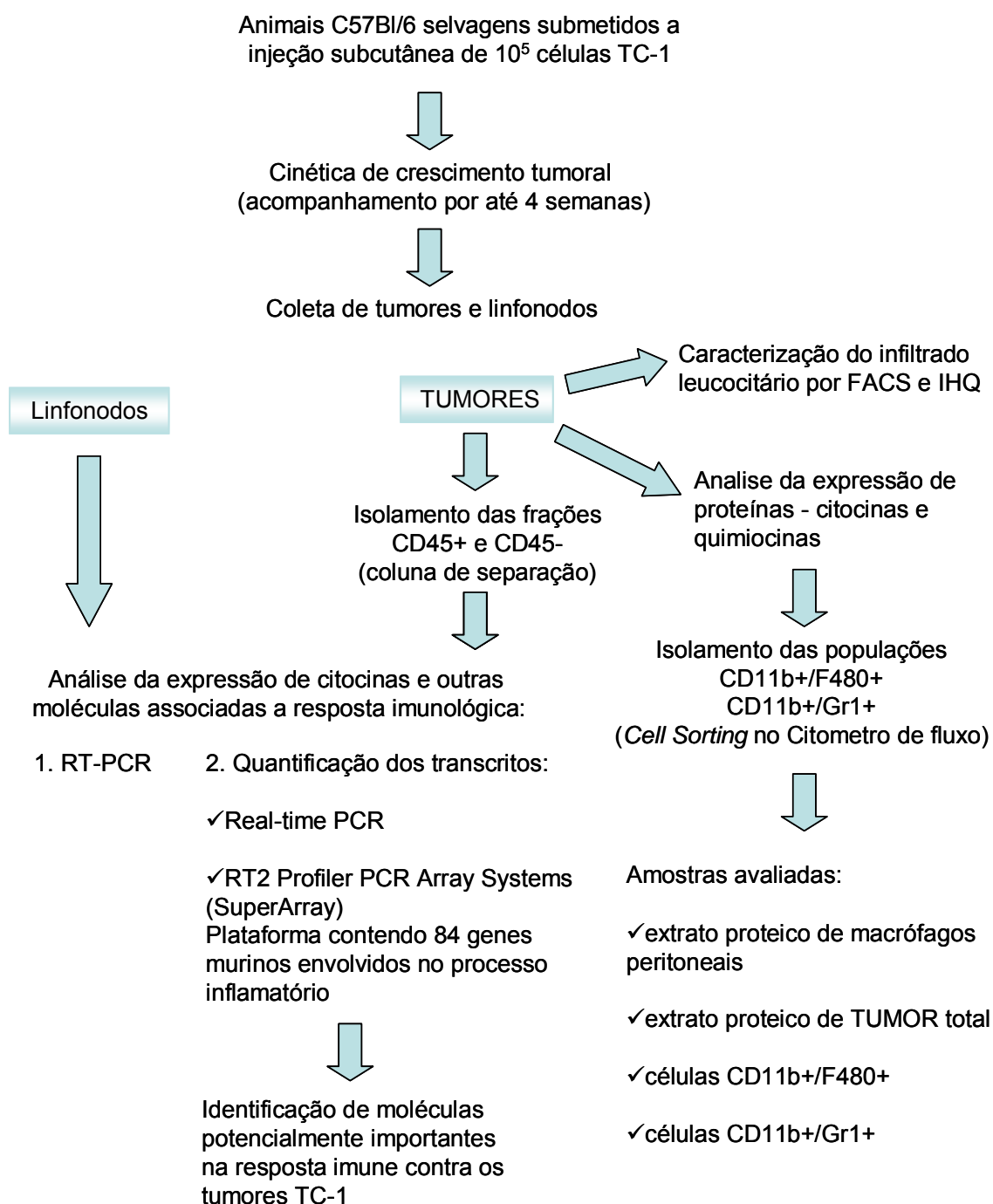
Para atingir os objetivos propostos utilizamos o modelo de células tumorais TC-1, que expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16. A linhagem celular XB-2, uma linhagem de queratinócitos murinos derivada de teratoma, foi utilizada como ferramenta para identificar os sinais de fato mediados por HPV16, uma vez que estas células foram traduzidas com vetor retroviral vazio, pLXSN, ou vetor retroviral codificando E6 e E7 de HPV16, pLXSN E6/E7.

O estudo da expressão de citocinas foi feito a partir de mRNA e proteína isolados de tumores totais ou de populações isoladas por coluna de separação submetida a campo magnético ou por separação de células no citometro de fluxo. A população total de leucócitos foi marcada com anti-CD45, e as populações específicas de células mielóides foram isoladas após marcação com um coquetel de anticorpos.

Para estudo do papel de IL-10 no crescimento tumoral, nós utilizamos camundongos deficientes para esta citocina e animais do tipo selvagem tratados com anticorpos neutralizantes contra o receptor de IL-10 e contra própria citocina. Nestes animais, foram avaliados: cinética de crescimento tumoral, infiltrado leucocitário, resposta contra antígenos virais no tumor e nos linfonodos periféricos.

Para avaliação do papel de CCL2 no recrutamento de células mielóides em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV16, foram

realizados ensaios de migração *in vitro* utilizando células TC-1 e células XB-2, tratadas ou não com anticorpos neutralizantes para esta quimiocina.



Identificação de **IL-10** e **CCL2**
 como possíveis alvos
 importantes na resposta imune
 contra os tumores TC-1

IL-10

Avaliação do papel de IL-10 no
 modelo TC-1



Grupos de animais avaliados:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. C57Bl/6 selvagens | 2. C57Bl/6 IL-10 ^{tm1Cgn} (IL-10 <i>knockout</i>) |
| 3. C57Bl/6 selvagens tratados com IgG | 4. C57Bl/6 selvagens tratados com anticorpos neutralizantes anti-IL10 e anti-IL10R |

✓ Comparação das cinéticas de crescimento tumoral

✓ Caracterização do infiltrado leucocitário por FACS

✓ Avaliação da especificidade do infiltrado linfocitário por IF e FACS

CCL2

Avaliação do papel de CCL2 no recrutamento de células mielóides em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV-16



Células utilizadas:
 TC-1
 XB2
 XB2 E6/E7



Ensaio de migração *in vitro*

Amostras avaliadas:

- | | | |
|--------------------|------------------------------------|--|
| 1. TC-1 | 2. TC-1 tratada com IgG | 3. TC-1 tratada com anti-CCL2 |
| 4. XB2 vetor vazio | 5. XB2 vetor vazio tratada com IgG | 6. XB2 vetor vazio tratada com anti-CCL2 |
| 7. XB2 E6/E7 | 8. XB2 E6/E7 tratada com IgG | 9. XB2 E6/E7 tratada com anti-CCL2 |

Contagem do número de células mielóides que migraram em resposta a cada tipo de célula avaliada

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS E ANIMAIS

As células TC-1 (LIN et al. 1996) são derivadas de epitélio pulmonar de camundongo C57Bl/6 transformadas com E6 e E7 de HPV-16 e com o oncogene *Ha-ras*. Esta linhagem celular foi cultivada em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (R10) (*Gibco*), e Neomicina (G418) na concentração de 400µg/ml, em estufa úmida a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂. Após descongeladas, as células foram mantidas em meio R10 por um dia, até que fosse feita a troca do meio e adição do antibiótico Neomicina; o meio de cultura era trocado a cada 2 dias, ou as células cultivadas até atingirem densidade de 70 a 80% da área da garrafa. A tripsinização (0,25% tripsina) foi feita após lavagem em solução tampão salina fosfato (PBS).

As células XB-2 (ATCC: CL-177) são derivadas de teratoma de camundongo e foram modificadas com vetor retroviral pLXSN vazio ou com o vetor pLXSN E6/E7 que expressa as principais oncoproteínas de HPV-16. Estas células (XB2pLXSN ou XB2E6/E7) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) com 20% de soro fetal bovino (D20), em estufa úmida a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂.

Camundongos C57Bl/6 selvagens foram submetidos à injeção subcutânea de células TC-1 para geração de tumores. Os animais foram

acompanhados por até 4 semanas, sacrificados por asfixia (em atmosfera saturada de CO₂), ou por anestesia profunda com halotano (Laboratório Cristália). Após a eutanásia, era feita a coleta do tumor, retirada dos linfonodos e baço, e coleta de macrófagos peritoniais, para as análises propostas. Os animais receberam injeção subcutânea de 10⁵ células TC-1 ressuspensas em PBS contendo 1mM CaCl₂ e 0,5mM MgCl₂ (PBS++) (RUSSEL e SAMBROOK 2001) em um volume final de 100µl.

Camundongos IL-10^{tm1Cgn} (KÜHN et al. 1993) em background C57Bl/6 provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP), foram adquiridos com o objetivo de avaliar o papel desta citocina em nosso modelo. Os animais da linhagem IL10^{-/-} foram submetidos a injeção subcutânea de 10⁵ células TC-1, e acompanhados por três semanas. Estes animais foram sacrificados de acordo com protocolo descrito anteriormente para os camundongos C57Bl/6 selvagens.

A aquisição destes animais, assim como a manipulação de todos os camundongos utilizados neste estudo, e a realização dos experimentos propostos foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente (Hospital A.C. Camargo) (número processo: 005/05).

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E REAGENTES

Para a análise da população de leucócitos infiltrantes nos tumores TC-1 foi realizada digestão do tecido com Colagenase I (100µg/ml) em

tampão MTH (Mouse tonic Hank's – 1X HBSS, 5% soro fetal bovino, 0,5U/ml DNase I) a 37°C sob agitação. Após a digestão, as suspensões de células foram filtradas e sedimentadas por centrifugação a 1100rpm, 4°C. Cada suspensão de células foi incubada com até 4 anticorpos específicos marcados com fluoróforos diferentes. Para leitura no citometro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) foram separadas alíquotas de $0,5 \times 10^6$ células para cada marcador. Os anticorpos utilizados neste estudo foram: anti-F4/80-like receptor purificado (clone 6F12) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), anticorpo secundário anti-rato IgG PE Cy5.5 (PercP) (Caltag, Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-CD45-APC (LCA, Ly-5), anti-CD4-FITC (L3T4, GK1.5), anti-CD8a-PE (Ly-2, 53-6.7) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), anti-Gr1 (clone RB6-8C5), anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD19 (clone 1D3), anti-CD45 (clone 30-F11) (BD Biosciences San Diego, CA), anti-F4/80 conjugado com PE-Cy5.5 (clone BM8) e anti-Perforina conjugado com APC (eBiosciences San Diego, CA). Após a incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas com MTH, e ressuspensas em 300µl de MTH, prontas para a leitura em citometro de fluxo.

4.3 ISOLAMENTO DOS LEUCÓCITOS TUMORAIS

Para separação da população de leucócitos infiltrantes do tumor foi realizada digestão do tecido com colagenase I (100µg/ml) em tampão MTH (Mouse tonic Hank's – 1X HBSS, 5% soro fetal bovino, 0,5U/ml DNase I)

para posterior isolamento das células CD45+ em coluna de separação submetida a campo magnético (MACS LS+ Separation Columns – Miltenvy Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). As células foram incubadas com anti-CD45 biotinilado (1:150) (BD Bioscience, San Jose, CA), e em seguida, com microesferas associadas a Streptavidina (*streptavidin-microbeads*; MACS - Miltenvy Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A suspensão de células e microesferas foi passada por uma coluna acoplada a um magneto de forma que as células marcadas com as esferas ficam retidas na coluna e em seguida são eluídas após a retirada da mesma do magneto. Após a análise da pureza das populações alvo em citometro de fluxo, tanto as células CD45+ quanto as CD45-, foram lisadas para extração de RNA com RNeasy Mini kit (*Qiagen*), para posterior avaliação da expressão de citocinas por RT-PCR e quantificação dos transcritos através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (PAMM-011A, *SuperArray Bioscience Corporation*, Frederick, USA) e por Real-time PCR.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS

Uma primeira análise de expressão de citocinas foi realizada através de ensaios de RT-PCR para estudo qualitativo da expressão de algumas citocinas em tumores TC-1. RNA total dos tumores e linfonodos coletados após a injeção de células TC-1 foi isolado utilizando TRIzol Reagent (*Invitrogen*), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a

extração, os RNA foram quantificados em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) e sua qualidade verificada por fracionamento por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A qualidade dos RNAs obtidos aparece ilustrada na Figura 2, e os iniciadores empregados nas reações de RT-PCR desta primeira análise estão contidos na Tabela 2.

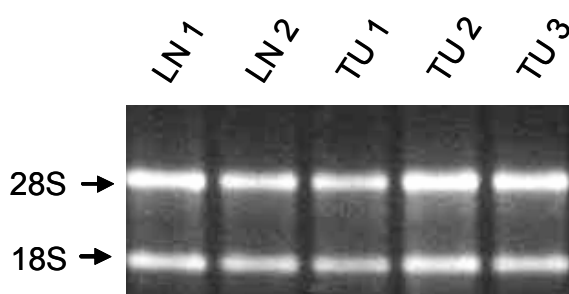


Figura 2 - Representação da qualidade dos RNA extraídos dos linfonodos e tumores coletados dos animais sacrificados após injeção subcutânea de 10^5 células TC-1.

LN: RNA dos linfonodos. **TU:** RNA dos tumores TC-1

Tabela 2 - Seqüências de iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.

Alvo	Seqüências	Access number (GenBank)
CD11c	R 5'CAGTCTGGCAGATGTGGCTA3' F 5'CACCACCAGGGTCTTCAAGT3'	NM_021334.2
Foxp3	R 5'TTCATGCATCAGCTCTCCAC3' F 5'AGACTCCATTTGCCAGCAGT3'	NM_054039
M-CSF	R 5' GACCCCTCGAGTCAACAGAGC 3' F 5' TGTCAGTCTCTGCCTGGATG 3'	BC066205
VEGF	R 5' CAGGCTGCTGTAACGATGAA 3' F 5' GCCTTGGCTTGTACATTTT 3'	NM_001025257
TGF-β	R 5'AGCCCGAAGCGGACTACTAT3' F 5'TCCACATGTTGCTCCACACT3'	BC013738
TNF-α	R 5' CGTCAGCCGATTTGCTATCT 3' F 5' CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	NM_013693
IFN-γ	R 5'ACTGGCAAAGGATGGTGAC3' F 5'TGAGCTCATTGAATGCTTGG3'	NM_008337
IFN-β	R 5'CCCTATGGAGATGACGGAGA3' F 5'CTGTCTGCTGGTGGAGTTCA3'	NM_010510
IL-2	R 5' AACCTGAAACTCCCCAGGAT 3' F 5' TCATCATCGAATTGGCACTC 3'	NM_008366
IL-4	R 5'TCAACCCCAGCTAGTTGTC3' F 5'TGTTCTTCGTTGCTGTGAGG3'	NM_021283
IL-5	R 5' ATGGAGATTCCCATGAGCAC 3' F 5' CCCACGGACAGTTTGATTCT 3'	NM_010558
IL-10	R 5'CCAAGCCTTATCGGAAATGA3' F 5'TTTTCACAGGGGAGAAATCG3'	NM_010548

4.4.1 Quantificação da expressão de citocinas e quimiocinas

Reações de Real-time PCR convencionais foram realizadas para quantificar a expressão de IL-10, CCL2/MCP1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), CCL5/Rantes (RANTES, *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*), MCSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e seu receptor MCSF-R, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), IL-6 e

MMP9 (*Matrix Metalloproteinase 9*) em amostras de tumor total, e nas frações CD45+ (leucócitos infiltrantes) e CD45- (demais células que constituem os tumores TC-1). Anti-CD45 foi o anticorpo utilizado para isolar os leucócitos infiltrantes dos tumores. Este anticorpo reconhece uma fosfatase de membrana expressa em todas as linhagens hematopoiéticas (ABBAS e LICHTMAN 2005).

Para a síntese de cDNA foram utilizados 2µg de RNA tratado com a DNase RQ-1 RNase-Free DNase (1U/µl) (Promega), e a enzima M-MLV RT (Invitrogen, Calrsbad, CA, cat 28025-021). Em seguida foram feitas as reações de PCR em tempo real realizadas em equipamento ABI 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), nas condições de reação e ciclagem descritas na Tabela 3. O sistema de detecção empregado foi SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, UK). O gene HPRT foi utilizado como normalizador. As sequências dos iniciadores e os respectivos valores de eficiência aparecem ilustrados na tabela 4. O valor de eficiência ($E=10^{(-1/\text{slope})}$) para cada gene avaliado foi utilizado no cálculo da expressão relativa de acordo com o método descrito por PFAFFL (2001). A fórmula utilizada para o cálculo da expressão relativa foi a seguinte:

$$\text{Razão} = E_{\text{alvo}}^{(Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{amostra}})} / E_{\text{constitutivo}}^{(Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{amostra}})}$$

Onde E_{alvo} e $E_{\text{constitutivo}}$ são as eficiências dos iniciadores para os genes alvo e HPRT, respectivamente. Ct (*threshold cycle*) refere-se ao ciclo no qual ocorre a amplificação do gene alvo ou HPRT nas amostras controle ou de interesse. RNA extraído de células TC-1 mantidas em cultura foi utilizado como amostra referência.

Tabela 3 - Condições de reação e perfil de ciclagem das reações Real-time PCR.

Constituintes da reação
10ng cDNA, 5µl de iniciadores nas concentrações 0,8µM ou 1,6µM (<i>IDT</i>), 10µl SYBR Green PCR master mix (<i>Applied Biosystems</i>), água para volume final de 20µl.
Perfil de ciclagem
50°C- 2' / 95°C- 10' (1X) / 95°C- 15"; 60°C- 1' (40X); curva de dissociação: 95°C- 15"; 60°C- 1'; 95°C- 15"

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores empregados na reação Real-time PCR.

Sequência dos iniciadores	Amplicon	Eficiência
IL-10: F = CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG R = CACTGCCTTGCTCTTATTTTACACA	86pb	IL-10: E=1,8711519
CCL2: F = GCTGGAGCATCCACGTGTT R = GTGAATGAGTAGCAGCAGGTGAGT	70 pb	CCL2: E=2,042834
CCL5: F = CCCTCACCATCATCCTCACT R = GCACTTGCTGCTGGTGTAGA	152 pb	CCL5: E=2,052915
MCSF: F = GCTCCTGCCTACCAAGACTG R = CAGCCCTTTCTCTTTGGTTG	91 pb	MCSF: E=1,929772
MCSF-R: F = GGCAGTACCACCATCCACTT R = TCAACCACTGTCACCTCCTG	80 pb	MCSF-R: E=2,012779
VEGF: F= CAGGCTGCTGTAACGATGAA R= TATGTGCTGGCTTTGGTGAG	101 pb	VEGF: E=2,00708
IL-6: F=CAGAGATACAAAGAAATGATGGATGCT R= CAGAAGACCAGAGGAAATTTTCAATA	83 pb	IL-6: E=1,828218
MMP-9: F= AGACGACATAGACGGCATCC R= GTGGTTCAGTTGTGGTGGTG	86 pb	MMP9: E=1,976733
HPRT: F = TGGATATGCCCTTGACTATAATGA R= GGCTTTTCCAGTTTCACTAATGACA	76pb	HPRT: E=1,883766

4.4.2 RT² Profiler PCR Array System (SuperArray)

Com o objetivo de ampliar nossa análise de expressão de moléculas inflamatórias envolvidas no desenvolvimento dos tumores TC-1, foi realizado um *array* para Real-time PCR envolvendo genes de citocinas, quimiocinas e seus respectivos receptores relacionados ao processo inflamatório (PAMM-011A, *SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, USA*). Este *array* é composto por uma placa de 96 poços contendo oligonucleotídeos imobilizados específicos para 84 genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores, 5 genes constitutivos (*GUSB - Glucuronidase beta*; *Hsp90ab1 - Heatshock protein 90KDa alpha class B member 1*; *ACTB - β actin*, *GAPDH - Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*; e *HPRT*), 3 controles da reação de transcriptase reversa (*RTC, Reverse Transcriptase Control*), 3 controles da reação de PCR (*PPC, Positive PCR Control*), e 1 controle para contaminação por DNA genômico (*MGDC, Mouse Genomic DNA Control*). De acordo com dados fornecidos pelo fabricante, estes oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados de forma otimizada para amplificarem um único produto nas mesmas condições de reação e com eficiências muito semelhantes (todas acima de 90%). O sistema de detecção empregado foi o SYBR Green PCR master mix (cat 4309155, Applied Biosystems, Warrington, UK) e o equipamento utilizado ABI 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Amostras de cDNA sintetizadas a partir de RNA extraído das frações CD45⁺ e CD45⁻ foram utilizadas nestes experimentos. A análise dos dados foi realizada pelo método Δ Ct (LIVAK e SCHMITTGEN 2001), no qual

calcula-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct (*threshold cycle*) dos genes constitutivos (HKG, *Housekeeping genes*) dos valores de Ct do gene alvo. Os genes constitutivos são utilizados como normalizadores da reação, dessa forma, para o cálculo do ΔCt utiliza-se a seguinte fórmula: [Ct (amostra) – Ct (normalizadores)]. Para utilizarmos o método comparativo é necessário que as inclinações das retas (*slope*), geradas em um gráfico Ct *versus* quantidade de RNA, de cada par de iniciadores presentes na placa seja menor que 0,1 para que a eficiência de amplificação seja comparável. Dessa forma, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, assumimos que as eficiências dos iniciadores são muito próximas. A partir das razões geradas na análise foi possível identificar quais moléculas estão sendo expressas por cada uma das frações analisadas.

4.5 TIPAGEM DOS CAMUNDONGOS C57BL/6 IL-10^{TM1CGN}

Para confirmação do genótipo dos animais deficientes para IL-10, foi realizada genotipagem de acordo com o protocolo sugerido pelo *The Jackson Laboratory* (<http://jaxmice.jax.org/pub-cgi/protocols/protocols>). DNA de amostras de sangue e linfonodo destes animais foram utilizados para reação de PCR cujos iniciadores e condições da reação aparecem descritos na Tabela 5. Os DNAs foram extraídos utilizando o kit QiAmp DNA minikit (Qiagen) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras de sangue foram coletadas imediatamente após a eutanásia, misturadas a

heparina e lavadas com PBS submetidas à centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se tampão de lise ACK (NH₄Cl 0.15M, KHCO₃ 10mM, EDTA 0.1mM) para lisar as células vermelhas e obter o pellet de leucócitos.

Tabela 5 - Seqüência de iniciadores e condições da reação de PCR empregada para genotipagem dos camundongos C57Bl/6 *IL-10^{tm1Cgn}*.

<i>Iniciadores</i>
IMR0086: 5' GTGGGTGCAGTTATTGTCTTCCCG 3'
IMR0087: 5' GCCTTCAGTATAAAAGGGGGACC 3'
IMR0088: 5' CCTGCGTGCAATCCATCTTG 3'

<i>Constituintes da reação</i>
20ng DNA; 1,2µl Buffer 10X; 1,2µl dNTP 2mM; 0,96µl MgCl ₂ 25mM; 0,06µl Taq polimerase 5U/µl; 0,6µl Iniciadores 20µM, H ₂ O para volume final de 12µl.

<i>Perfil de ciclagem</i>
94°C- 3' (1X) / 94°C- 30"; 64°C- 45"; 72°C- 45" (35X) / 72°C- 2' / ∞ 10°C

De acordo com a Figura 3 confirmamos os genótipos esperados dos animais C57Bl/6 *IL-10^{tm1Cgn}* (~450pb) e dos C57Bl/6 selvagens (~200pb).

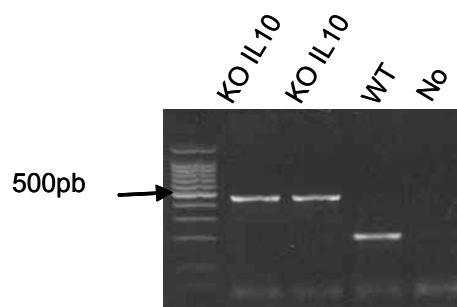


Figura 3 - Genotipagem dos camundongos deficientes para IL-10 (**KO IL10**) e camundongos do tipo selvagem (**WT**) de acordo com protocolo descrito na tabela 5.

Os produtos das reações de PCR foram fracionados em gel agarose 1% em 1X TBE e corados com 0,5ug/ml brometo de etídeo. A primeira linha corresponde a um marcador de peso molecular. As duas primeiras amostras (2ª e 3ª linhas) são amostras de camundongos KO IL10, cujo produto amplificado apresenta aproximadamente 450pb. A amostra WT corresponde a DNA de camundongo C57Bl/6 selvagem que apresenta fragmento amplificado de aproximadamente 200pb. **No**: controle negativo da reação.

4.6 ANÁLISE DO INFILTRADO TUMORAL

4.6.1 Imunohistoquímica

Para complementar a análise por citometria de fluxo, parte das amostras de tumores originados da injeção subcutânea de 10^5 células TC-1 foram utilizadas para caracterização do infiltrado inflamatório através da técnica de imunohistoquímica (IHQ). Os tecidos frescos foram congelados em *Tissue Freezing Medium* (Triangle Biomedical Sciences, Durham N.C.) para posterior secção em criostato e realização de IHQ com os anticorpos contra marcadores celulares conforme especificado na Tabela 6.

Cortes de $5\mu\text{m}$ de espessura foram dispostos em lâminas *Superfrost Plus* (Fisherbrand – Fisher Scientific, USA) e fixados em acetona gelada por

30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% durante 10 minutos, seguido de banhos em PBS. Os bloqueios da avidina e biotina endógenas foram feitos com o kit *Avidin/Biotin Blocking* (Vector Laboratories, Inc.). Aos cortes foi adicionada solução bloqueadora (soro fetal bovino 5% em PBS) por 30 minutos, seguida da adição do anticorpo primário biotilado (BD Bioscience) na sua respectiva concentração. Os tecidos permaneceram em câmara úmida por 30 minutos, lavadas em PBS, e para amplificação do sinal, foram incubadas com ABC *Elite* (*avidin-biotin complex* – Vector Laboratories, Inc.) por 30 minutos à temperatura ambiente. Para revelação do sinal foi adicionada solução de 3-3' *diaminobenzidine* (DAB) (Vector Laboratories, Inc.) por aproximadamente 2 minutos, seguida da adição do corante hematoxilina de Mayer's (Zymed) (contra-coloração). Após a desidratação as lâminas foram montadas com resina sintética Entelan. A reação foi analisada em microscopia óptica convencional.

Tabela 6 - Anticorpos empregados nas reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição	Alvo
anti-CD45	30-F11	1:150	todos os leucócitos
anti-CD3e	145-2C11	1:50	todos os linfócitos T
anti-CD4	GK 1.5	1:100	linfócitos TCD4+
anti-CD8a	53-6.7	1:100	linfócitos TCD8+
anti-CD1d	1B1	1:350	células de Langerhans, células dendríticas
anti-CD11b	M1/70	1:300	macrófagos, granulócitos, células NK
anti-CD45R/B220	RA3-6B2	1:100	linfócitos B
anti-CD54/ICAM-1	3E2	1:400	molécula de adesão ICAM-1
anti-Ly6G/Ly6C	RB6-8C5	1:500	neutrófilos, eosinófilos

4.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO *IN VITRO*

Para avaliação do papel das quimiocinas CCL2/MCP1 e CCL5/Rantes no recrutamento de monócitos em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV16, foram realizados ensaios de migração *in vitro* utilizando anticorpos neutralizantes para estas quimiocinas. Nestes ensaios foram utilizadas células TC-1 e células XB-2 pLXSN e XB-2 E6/E7. As células XB-2 (CL-177, ATCC number) são células embrionárias de camundongos geneticamente modificadas com vetor retroviral pLXSN vazio ou pLXSN E6/E7 que expressam as principais oncoproteínas de HPV-16. O isolamento da população enriquecida de monócitos CD11b⁺ empregada nos ensaios de migração foi realizado através da separação de populações segundo a sua densidade por Gradiente de Percoll.

4.7.1 Gradiente de Percoll

Para obtenção dos monócitos, foram coletadas células provenientes de medula óssea de camundongos C57Bl/6 selvagem. As células coletadas da medula foram submetidas a um gradiente de Percoll 63,5% (Percoll Plus, cat 17089101, GE Healthcare, Uppsala) para enriquecimento da população CD11b⁺. As células a serem separadas pelo gradiente (total=30x10⁶ células de medula óssea) foram adicionadas à uma solução de Percoll 63,5% totalizando um volume de 2,5ml. Em seguida adicionou-se 750µl de tampão MTH (Mouse Tonic Hank's: 15 mM HEPES pH 7,4, 1X HBSS) sem soro. Para obtenção do gradiente, as células foram submetidas à centrifugação a

uma rotação de 700G por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, a população enriquecida de células CD11b+ foi coletada com pipeta Pasteur a partir da interface gerada pelo gradiente, conforme ilustrado no esquema da figura 4. As células coletadas foram lavadas com tampão MTH (Mouse Tonic Hank's – 1X HBSS, 5% soro fetal bovino, 0,5U/ml DNase I), contadas e aliquotadas na quantidade necessária para realização do ensaio de migração. A população separada após o gradiente de Percoll é composta aproximadamente por 75% de células CD11b+.

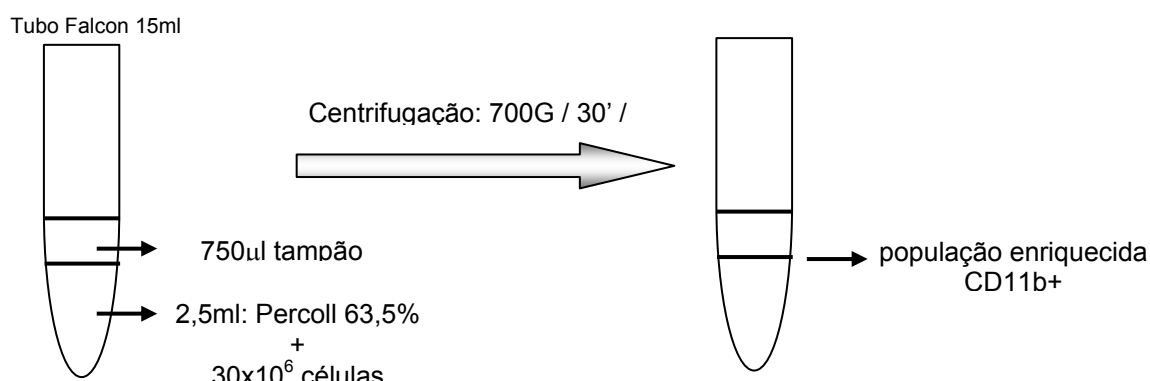


Figura 4 - Esquema do processo de isolamento de células CD11b+ a partir de células mielóides isoladas de medula óssea de camundongo C57Bl/6 através de gradiente de Percoll.

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para visualizar a vascularização presente nos tumores TC-1, foi realizada reação de imunofluorescência com anticorpo específico para o marcador de células endoteliais CD31. Cortes histológicos de 5µm de

espessura provenientes de tumores TC-1 coletados 20 dias após a injeção subcutânea, foram fixados em solução de acetona/metanol na proporção de 2:1, bloqueados com 5% de soro fetal bovino em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-CD31 purificado (Chemicon, cód. CBL1337) por 30 minutos. Após a lavagem com PBS, seguiu-se a incubação com anticorpo secundário biotilado (Vectastain ABC kit, Vector Laboratory, Burlingame, CA) seguido pela adição de streptavidina conjugada com AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Oregon, USA). A contracoloração foi feita com 4'6-diamidino2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) para identificação dos núcleos. Por último, as lâminas foram montadas com Prolong (Invitrogen, Carlsbad, CA) e as imagens obtidas em microscópio de fluorescência BX61 Olympus (Olympus, Corp. Tokyo, Japan).

5 RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados serão divididos em 2 manuscritos, um em preparação e outro já submetido, revisado e re-submetido. Além disso, dados que complementam os resultados apresentados nos manuscritos e permitem melhor entendimento da biologia dos tumores TC-1 serão apresentados nesta sessão.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS POR RT-PCR

A primeira etapa deste trabalho consistiu na análise de expressão de um painel inicial de citocinas e fatores de crescimento nos tumores TC-1 e linfonodos coletados de animais que continham tumores. Para comparar o perfil de expressão destas moléculas com o modelo *in vitro*, foi extraído RNA total das células TC-1 mantidas em cultura. Em seguida, com o objetivo de determinar os tipos celulares responsáveis pela expressão das moléculas avaliadas, os tumores TC-1 foram submetidos à digestão enzimática para posterior separação dos leucócitos em coluna submetida a um campo magnético. Foram analisados mRNA das células CD45+ (leucócitos infiltrantes) e das células CD45- (demais células que constituem o tumor, como células tumorais, fibroblastos e células endoteliais). A Tabela 7 ilustra os resultados obtidos por RT-PCR a partir dos mRNA dos tumores,

linfonodos, das frações CD45+ e CD45- isoladas dos tumores TC-1, e das células TC-1 cultivadas *in vitro*. Nós observamos que o padrão de expressão de citocinas em células CD45-, população constituída na sua grande maioria por células TC-1, é diferente do padrão de expressão de células TC-1 em cultura como demonstrado na tabela 7. Este dado sugere que a presença de células recrutadas pelas células tumorais podem modular a expressão de citocinas nas mesmas, contribuindo para o crescimento tumoral.

Tabela 7 - Perfil de expressão de citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas, por RT-PCR, em amostras coletadas de animais submetidos à injeção de células TC-1.

<i>Alvo</i>	<i>TU total</i>	<i>LN</i>	<i>TC1</i> (<i>in vitro</i>)	<i>CD45+</i> <i>leucócitos</i>	<i>CD45-</i> (<i>demais células</i>)
IL-2	-	+	-	+	-
IL-5	-	-	-	-	-
IFNγ	+	+	-	+	-
TNFα	+	+	-	+	-
TGFβ	+	+	+	+	+
IL-10	+	+	-	+	-
VEGF	+	+	+	+	+
MCSF	+	+	+	+	+
Foxp3	+	+	-	+	-
CD11c	+	+	-	+	-
CD4	+	+	-	+	-

Avaliação do perfil de expressão de citocinas e demais moléculas por RT-PCR. Resultados obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Os dados são qualitativos e por isso representados como + para expressão detectada ou - quando a expressão da dada citocina não foi detectada. **TU total**: RNA total extraído de tumores TC-1 coletados 2 e 3 semanas após injeção subcutânea de 10⁵ células TC-1 (n=6 animais). **LN**: RNA total extraído de linfonodo de animais com tumor TC-1. **TC-1**: RNA de células mantidas em cultura. **CD45+**: RNA de leucócitos que infiltram tumores TC-1, separados por seleção positiva com anti-CD45 e coluna magnética (Streptavidin kit.... Miltenyi, estado, país). **CD45-**: RNA extraído das demais células que constituem o tumor (CD45-negativas: células tumorais, endoteliais, fibroblastos) após separação em coluna. **CD11c**: integrina expressa por leucócitos, como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, células NK, e por células dendríticas. **Foxp3** (*forkhead box p3*): fator de transcrição expresso por linfócitos T regulatórios. **CD4**: molécula expressa na superfície de linfócitos T *helper*. Interleucinas: **IL-2**, **IL-5**, **IL-10**. **IFN-g**: interferon-gama. **TNF-a**: Tumor Necrosis Factor-alpha. **TGF-b**: Transforming Growth Factor-beta. **VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor. **M-CSF**: Macrophage Colony Stimulating Factor.

A expressão de VEGF, TGF- β , M-CSF e IL-10 foi observada tanto nas amostras de tumores, quanto nas de linfonodos coletados dos camundongos C57Bl/6 com tumores TC-1. Estas moléculas são freqüentemente produzidas por células neoplásicas e leucócitos envolvidos no processo inflamatório e no recrutamento de células da resposta inata (revisado por BEN-BARUCH 2006). A expressão de IL-5, citocina de perfil Th2 relacionada com estimulação da resposta do tipo humoral e com proliferação de células da resposta inata, também foi testada. Porém, ao contrário dos resultados observados com IL-10, outra citocina de perfil Th2, todas as amostras foram negativas para IL-5.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NOS TUMORES TC-1

Com o objetivo de ampliar nossa análise de expressão de moléculas inflamatórias envolvidas no crescimento dos tumores TC-1, nós quantificamos a expressão de diversas citocinas por PCR em tempo real utilizando a plataforma Superarray (PAMM-011A, *SuperArray* Bioscience Corporation, Frederick, USA), onde iniciadores para um painel de citocinas, quimiocinas e seus respectivos receptores relacionados ao processo inflamatório, estão distribuídos em placas de forma que cada amostra de cDNA proveniente das amostras de RNA pode ser incubada em uma única placa para quantificação da expressão dos referidos genes. Os resultados obtidos a partir de três experimentos independentes estão apresentados na

Figura 1 do manuscrito *Characterization of cytokines and chemokines expression in HPV-16 tumor model in C57Bl/6 mice* (Manuscrito 1). Estes dados permitiram ampliar nosso painel de moléculas avaliadas, confirmar nossos achados anteriores por RT-PCR, e quantificar a expressão destas moléculas. Adicionalmente aos resultados obtidos através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD) julgamos importante avaliar a expressão de algumas moléculas que não faziam parte desta plataforma. Dentre os transcritos analisados, estão VEGF, M-CSF e seu receptor MCSF-R, IL-6 e MMP9. Todos foram avaliados por Real-time PCR convencional e os resultados destas quantificações aparecem ilustrados no manuscrito 1.

Para complementar o dado observado pelo *array* de Real-time, a expressão das quimiocinas CCL2/MCP-1 e CCL5/Rantes também foi confirmada por Real-time PCR convencional. Podemos observar na figura 5 as expressões relativas destas quimiocinas em amostras de tumores TC-1, e em suas respectivas frações CD45+ e CD45-.

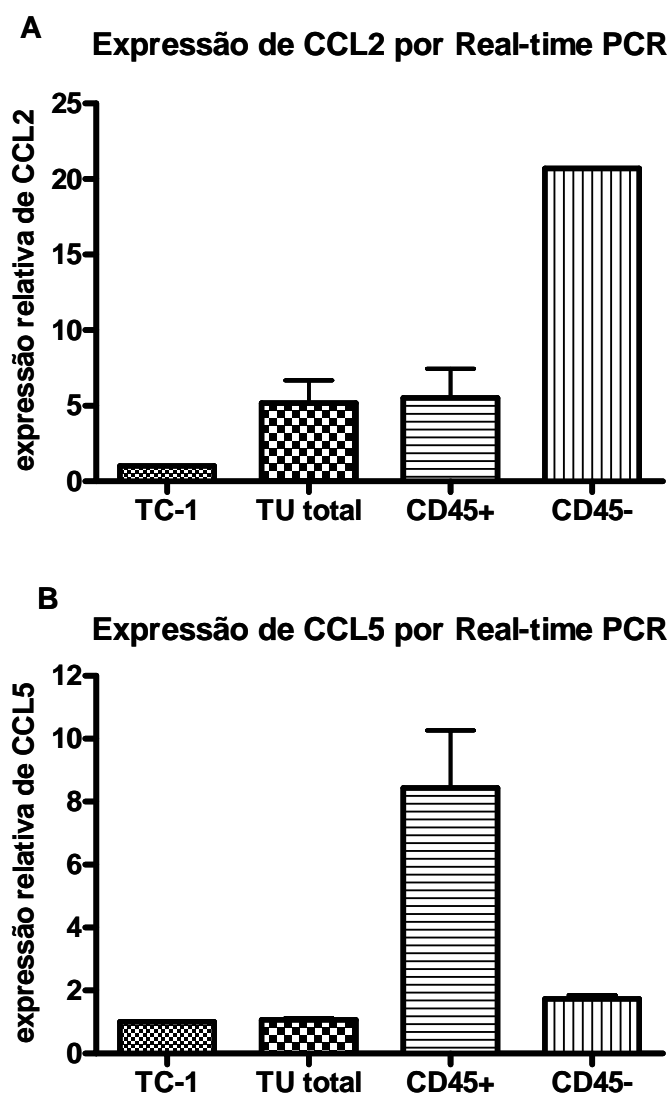


Figura 5: Expressão relativa de CCL2/MCP1 e CCL5/Rantes por Real-time PCR.

Real-time PCR empregado para avaliação da expressão de CCL2 (A) e CCL5 (B) nos tumores TC-1, leucócitos infiltrantes (CD45+) e demais células que constituem os tumores (CD45-) em relação ao controle TC-1 *in vitro*. Para o cálculo da expressão relativa foi aplicada a seguinte fórmula: Razão= $\frac{E \text{ alvo} (Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{amostra}})}{E \text{ normalizador} (Ct_{\text{controle}} - Ct_{\text{amostra}})}$. Onde E é a eficiência do iniciador utilizado. HPRT foi empregado como normalizador. Resultados obtidos com amostras de 3 experimentos independentes, todas em duplicatas para o gene avaliado. Amostra controle: TC-1, mRNA extraído de células TC-1 cultivadas *in vitro*. TU total: mRNA extraído de tumor TC-1 total. CD45+: mRNA extraído de leucócitos infiltrantes isolados de tumores TC-1. CD45-: mRNA extraído da fração CD45- composta principalmente pelas células tumorais, além de fibroblastos e células endoteliais que constituem os tumores TC-1.

Para análise da expressão relativa destas quimiocinas por esta metodologia, mRNA de células TC-1 cultivadas *in vitro* foi utilizado como amostra controle ou referência. Portanto os valores apresentados nos gráficos da figura 5 correspondem à expressão de CCL2 e CCL5 nas amostras em relação ao controle, de acordo com o método descrito por Pfaffl, 2001.

A quimiocina CCL2/MCP-1 é expressa tanto pelo infiltrado leucocitário (CD45+) quanto pelas células tumorais (CD45-). Na figura 5A é possível observar que esta quimiocina é expressa pelas células TC-1 *in vitro*, porém há um aumento significativo desta expressão no modelo *in vivo*. A confirmação dos altos níveis de CCL2 nas células tumorais levantou a hipótese de que CCL2 poderia ter um papel fundamental no recrutamento de monócitos/macrófagos para o local do tumor, o que nos levou a realizar ensaios de migração *in vitro* discutidos a seguir no manuscrito 1.

A expressão de CCL5 também foi confirmada por Real-time PCR convencional. Apesar de CCL5 ser expressa pelas células TC-1 cultivadas *in vitro*, o aumento da expressão desta quimiocina pelas células tumorais *in vivo* é discreto, conforme mostrado na figura 5B. Por outro lado, observamos a expressão de CCL5 pelo infiltrado leucocitário (CD45+) aumentada em relação às células tumorais (CD45-) (figura 5B). A expressão de CCL5 por macrófagos é um dos fatores que pode contribuir para caracterização fenotípica destas células (MANTOVANI et al. 2002).

5.2.1 Análise da plataforma RT² Profiler PCR Array System

Os dados gerados na plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD), que aparecem ilustrados no manuscrito 1, foram analisados de duas formas. Na primeira delas utilizamos apenas o cálculo do ΔCt conforme explicado no manuscrito 1. Em seguida, realizamos uma segunda análise utilizando o *software* fornecido pelo fabricante, no qual se aplica o método descrito por LIVAK e SCHMITTGEN (2001). Os resultados desta análise aparecem ilustrados nas figuras 6 a 8, nas quais estão representados os valores de expressão do gene alvo nas amostras CD45+ e CD45- em relação a amostra de tumor total, que neste caso foi utilizada como amostra referência. Este método nos permite identificar as moléculas diferencialmente expressas nas populações avaliadas. A expressão relativa cujo valor se aproxima de 1 não significa baixa quantidade de transcrito pelas amostras avaliadas, e sim que a expressão gênica é semelhante na amostra analisada e na amostra referência. Por exemplo, a expressão relativa de CCL5 nas frações CD45+ e CD45- é baixa (figura 6), no entanto ambas as amostras avaliadas apresentam elevada quantidade deste mRNA (vide figura 1 do manuscrito 1), assim como a amostra de tumor total. Para de fato identificar a real quantidade de transcrito devemos consultar a figura 1 apresentada no manuscrito 1. Porém, a combinação dos dois métodos de análise empregados neste estudo para representar os resultados gerados nesta plataforma nos permite: a) quantificar os transcritos expressos em ambas as amostras estudadas (Figura 1, manuscrito 1); e b) identificar os genes diferencialmente expressos entre estas duas populações celulares (Figuras 6 a 8).

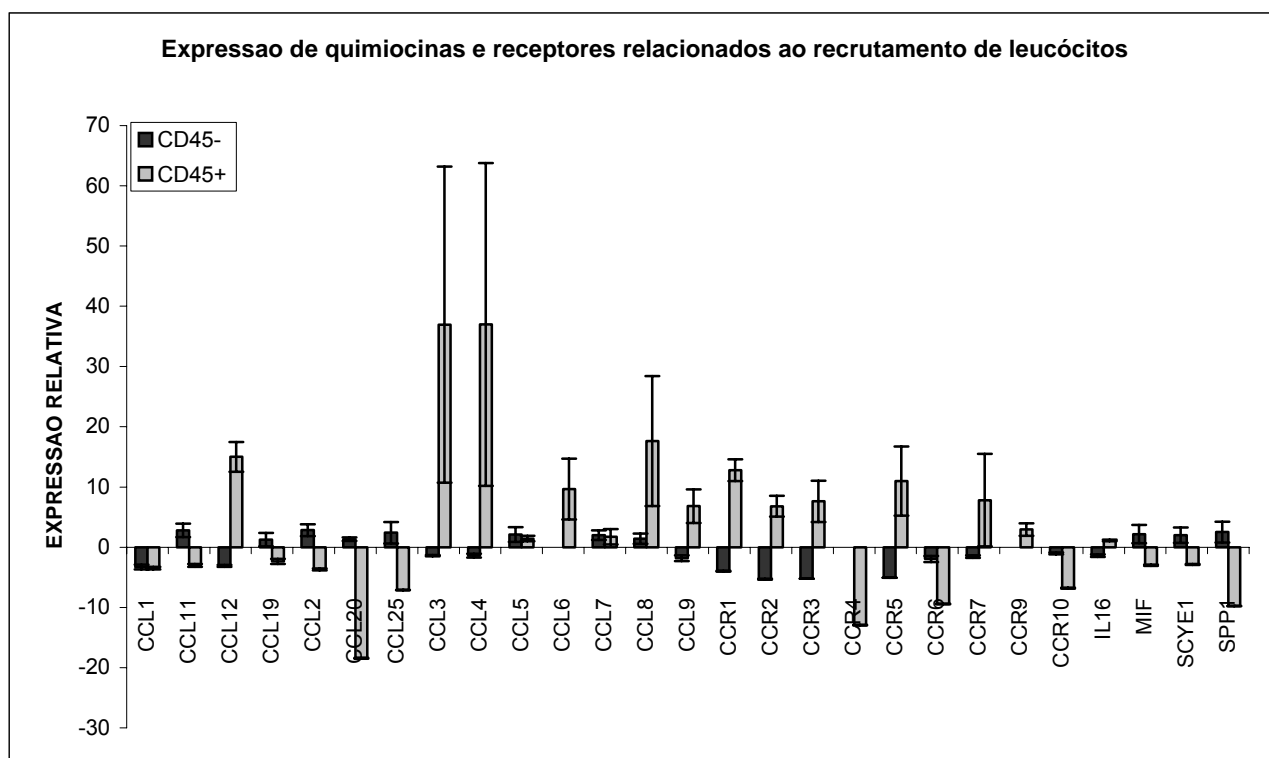


Figura 6 - Expressão relativa de quimiocinas e receptores associados ao recrutamento de leucócitos avaliados através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation).

Análise da expressão de quimiocinas e receptores associados ao recrutamento de leucócitos nas amostras CD45+ e CD45- em relação a amostra de tumor total. Avaliação realizada através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation). Fórmula aplicada para o cálculo das razões CD45+/TU total e CD45-/TU total: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). As células CD45+ e CD45- foram isoladas de tumores TC-1 coletados 20 dias após a injeção subcutânea de 10^5 células TC-1 em animais C57Bl/6 selvagens. Os resultados representados foram obtidos a partir das médias de 3 experimentos independentes. O eixo Y representa razão da expressão na fração tumoral/ expressão no tumor.

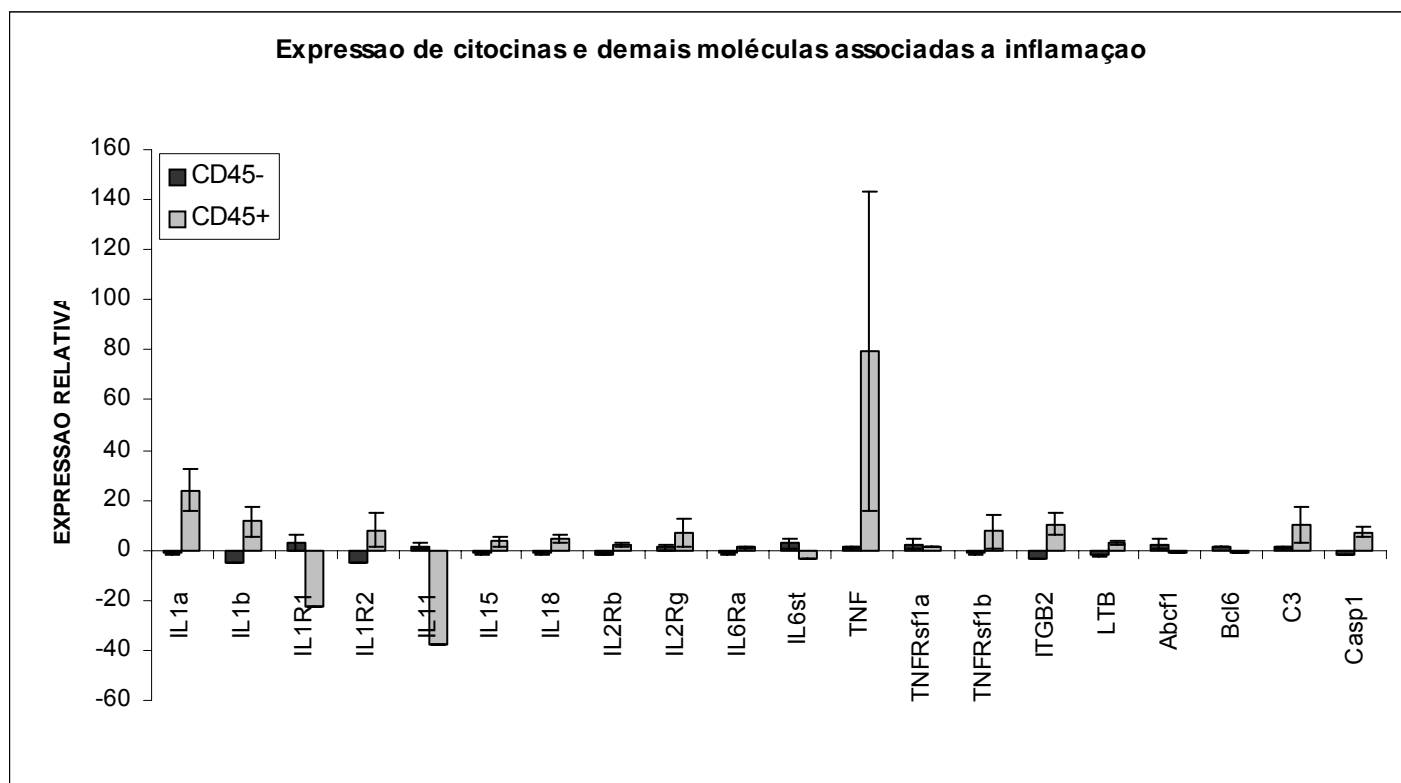


Figura 7 - Expressão relativa de citocinas e receptores associados a inflamação avaliados através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation).

Análise da expressão de citocinas e receptores associados à inflamação nas amostras CD45+ e CD45- em relação a amostra de tumor total. Avaliação realizada através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation). Fórmula aplicada para o cálculo das razões CD45+/TU total e CD45-/TU total: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). As células CD45+ e CD45- foram isoladas de tumores TC-1 coletados 20 dias após a injeção subcutânea de 10^5 células TC-1 em animais C57Bl/6 selvagens. Os resultados representados foram obtidos a partir das médias de 3 experimentos independentes. O eixo Y representa razão da expressão na fração tumoral/ expressão no tumor.

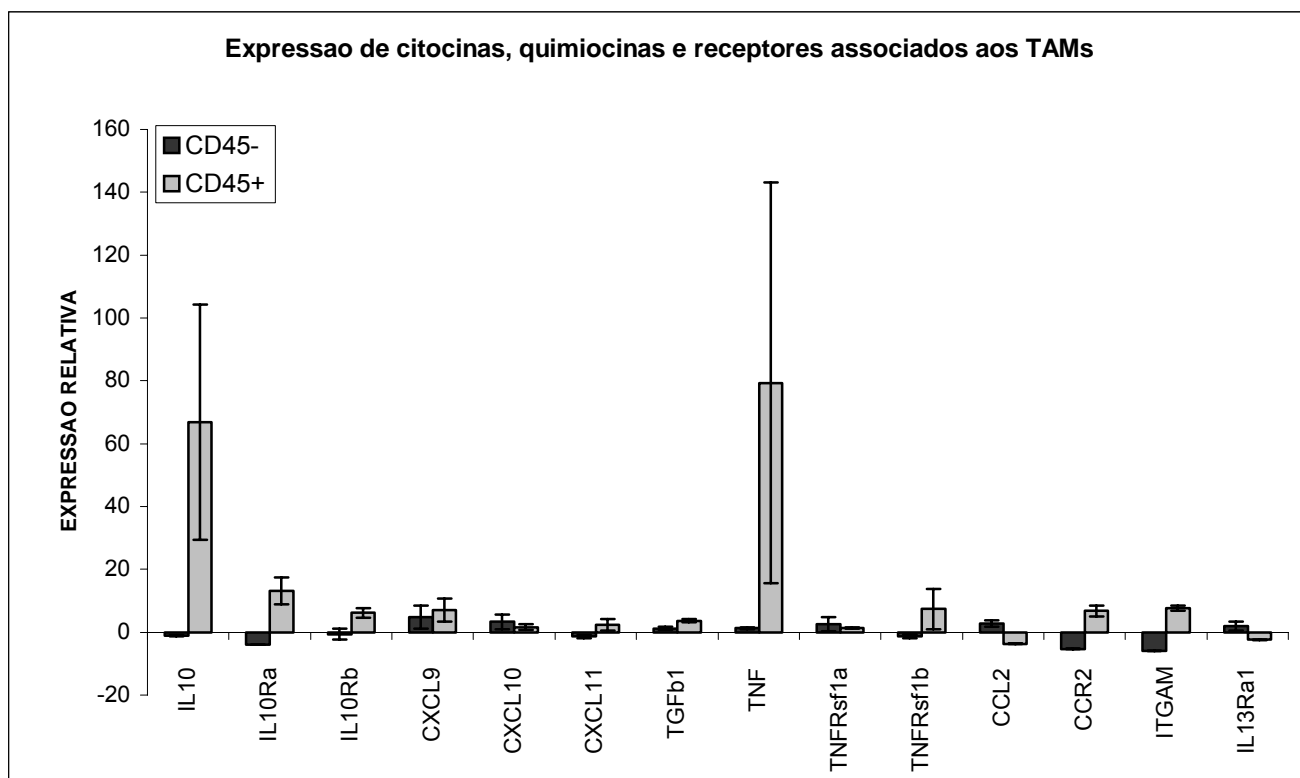


Figura 8 - Expressão relativa de citocinas, quimiocinas e receptores relacionados aos macrófagos associados a tumores (TAMs), avaliados através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation).

Análise da expressão de citocinas, quimiocinas e receptores associados aos TAMs nas amostras CD45+ e CD45- em relação a amostra de tumor total. Avaliação realizada através da plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation). Fórmula aplicada para o cálculo das razões CD45+/TU total e CD45-/TU total: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). As células CD45+ e CD45- foram isoladas de tumores TC-1 coletados 20 dias após a injeção subcutânea de 10^5 células TC-1 em animais C57Bl/6 selvagens. Os resultados representados foram obtidos a partir das médias de 3 experimentos independentes. O eixo Y representa razão da expressão na fração tumoral/ expressão no tumor.

Dentre os dados mais interessantes observados em nosso estudo, está a elevada expressão de CCL2/MCP-1 tanto pelas células do infiltrado (CD45+) quanto pelas células tumorais (CD45-) (Figura 6 e Figura 1 do manuscrito 1). De acordo com dados gerados em nosso laboratório, a maioria do infiltrado leucocitário presente nos tumores TC-1 é composto por macrófagos associados a tumores (TAMs) com fenótipo M2 (LEPIQUE et al. 2009). Uma das principais características destas células é a produção de CCL2 adicionada à expressão do seu receptor CCR2 (Figura 6) (revisado por MANTOVANI et al. 2002; POLLARD 2004).

Outro resultado interessante observado no *array* de Real-time PCR foi a expressão de CCL5/Rantes por ambas as frações que constituem os tumores TC-1 (Figura 5 e Figura 1 do manuscrito 1). CCL5 é uma quimiocina pró-inflamatória que se liga com alta afinidade aos receptores CCR1, CCR3 e CCR5 (RAMAN et al. 2007), altamente expressos pelos leucócitos que infiltram os tumores TC-1 (Figura 6). A alta expressão dos receptores CCR1, CCR2, CCR3 e CCR5 pelo infiltrado leucocitário (figura 6) indica que estes leucócitos que infiltram os tumores TC-1 são responsivos às quimiocinas CCL2 e CCL5.

5.3 ANGIOGÊNESE NOS TUMORES TC-1

As quimiocinas CXC têm papel fundamental no processo de angiogênese, dependendo da presença ou não da sequência ELR (Glu-Leu-Arg) que precede o domínio CXC. Dentre as quimiocinas ELR+, que

estimulam a angiogênese, estão CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8/IL-8. As quimiocinas CXCL4, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 são ELR- e inibem a angiogênese (RAMAN et al. 2007). CX3CL1 pode ser produzida por células endoteliais, e tem o potencial de induzir angiogênese (RAMAN et al. 2007). Esta quimiocina aparece altamente expressa pelas células tumorais em nosso modelo (Figura 1 do manuscrito 1). Por outro lado, a quimiocina angiostática CXCL10 também apresenta expressão elevada pelos leucócitos que infiltram os tumores TC-1 e pelas próprias células tumorais (figura1 do manuscrito 1), e é capaz de inibir a angiogênese. Adicionalmente, CXCL4 é expresso pelos leucócitos infiltrantes (Figura 1 do manuscrito 1), e de acordo com dados da literatura sua capacidade de inibir a angiogênese deve-se a interação direta com FGF (*Fibroblast Growth Factor*) e VEGF, inibindo a capacidade destes fatores de crescimento se ligarem a seus receptores (revisado por RAMAN et al. 2007). Conforme mostrado na figura 9, embora possamos observar a expressão de quimiocinas que inibem a angiogênese, como CXCL4, CXCL9 e CXCL10, é possível observar a expressão pelas células tumorais de moléculas que estimulam a angiogênese, como CXCL1, CXCL5 e CX3CL1. Estes resultados, em conjunto com a elevada expressão de VEGF e MMP9, conforme mostrado no manuscrito 1, sugerem existir um balanço na produção destas moléculas, uma vez que observamos uma grande quantidade de vasos nos tumores TC-1, conforme ilustrado na Figura 10.

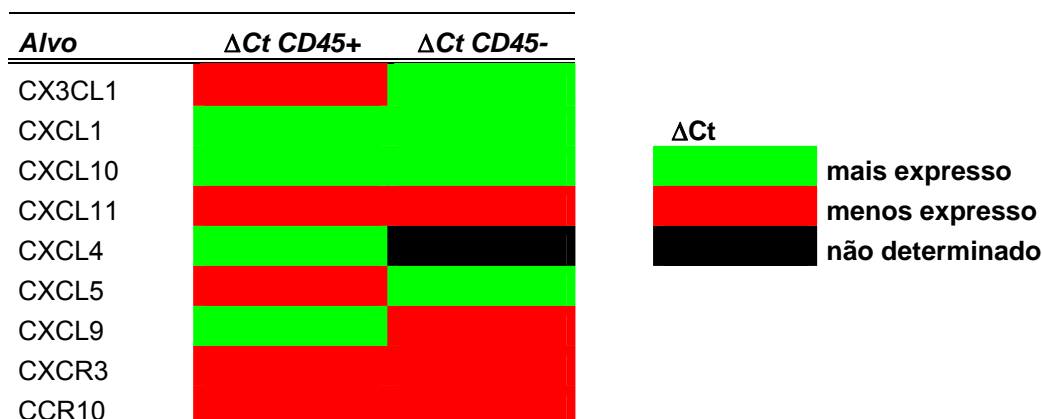


Figura 9 - Expressão de quimiocinas e receptores associados a angiogênese e avaliados através da plataforma RT² Profiler PCR System Array.

Foram avaliadas as amostras CD45+ e CD45- isoladas dos tumores TC-1. Os as cores se baseiam nos valores das médias dos ΔCt s obtidos de 3 experimentos independentes. De acordo com a legenda ao lado, verde significa maior expressão, e vermelho, menor expressão das moléculas avaliadas.

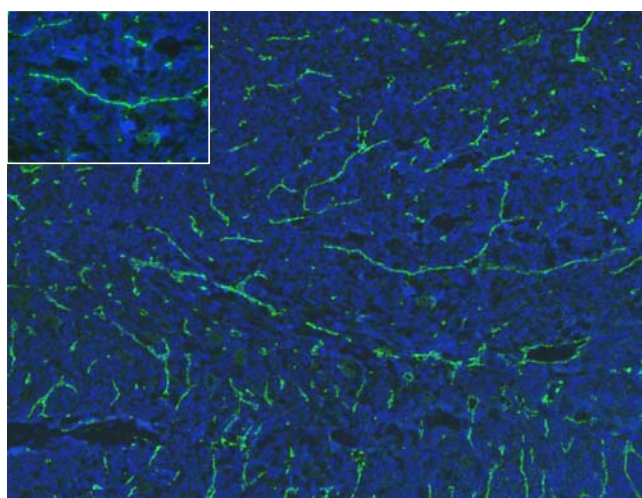


Figura 10 - Vascularização de tumor TC-1. Imunofluorescência com anticorpo anti-CD31.

Corte histológico de tumor coletado três semanas após injeção subcutânea de 10⁵ células TC-1, submetido a reação de imunofluorescência com o anticorpo anti-CD31 (verde) e contracorado com DAPI (azul), aumento de 100X. No destaque, o um vaso representado no aumento de 400X.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO LEUCOCITÁRIO PRESENTES NOS TUMORES TC-1

A análise por IHQ incluiu uma série de marcadores de diferentes leucócitos. Os anticorpos empregados neste estudo foram listados em *Materiais e Métodos*, e são capazes de identificar linfócitos TCD4+ e TCD8+, macrófagos, monócitos, granulócitos, neutrófilos, células NK, e linfócitos B. Foram analisados tumores de 1, 2 e 3 semanas, e os resultados encontrados foram semelhantes em todos os tecidos.

Nestas análises, observamos grandes quantidades de células positivas para anti-CD11b, marcador de macrófagos, granulócitos e células NK. Estas células infiltrantes são numerosas nos tumores, enquanto os linfócitos T são raramente encontrados, conforme podemos observar na Figura 11.

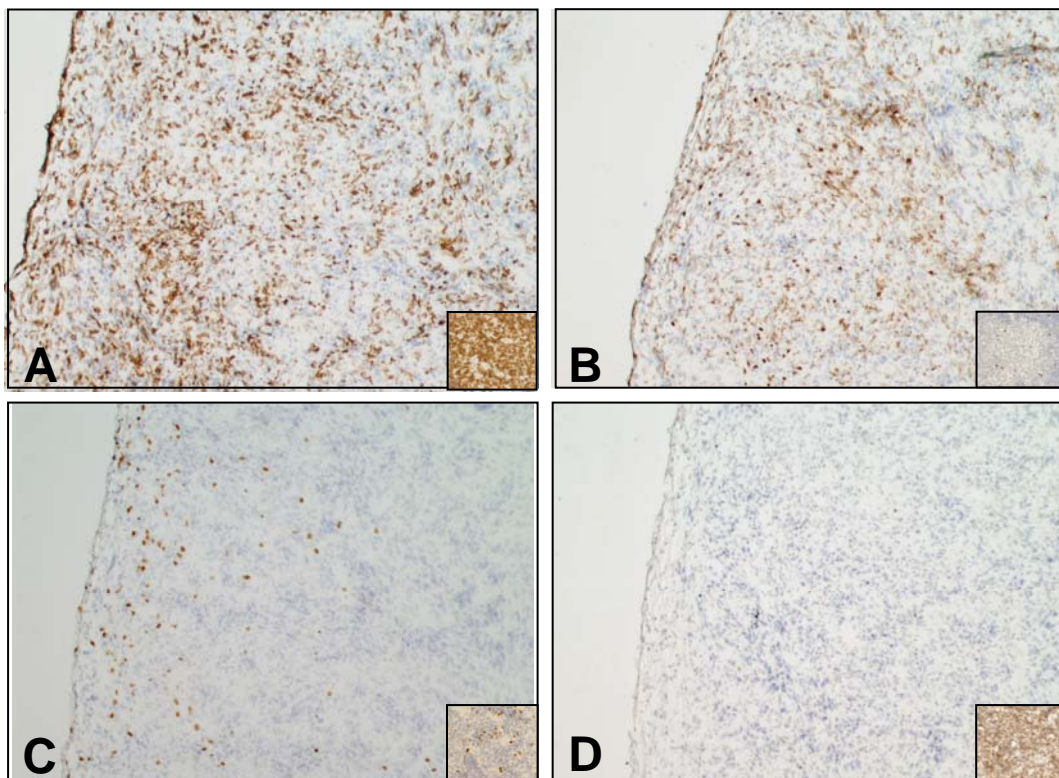


Figura 11 - Cortes histológicos de tumores coletados três semanas após injeção subcutânea de 10^5 células TC-1.

Reação de IHQ com os anticorpos anti-CD45 (A), anti-CD11b (B), anti-Ly6G/Ly6C (C) e anti-CD3 (D) (aumento de 200X). Anti-CD45 é marcador comum de todos os leucocitos; anti-CD11b reconhece a cadeia α de Mac-1, expresso em macrófagos, granulocitos e células NK. Anti-Ly6G/Ly6C interage com o antígeno de diferenciação Gr-1 expresso por neutrófilos e eosinófilos; e anti-CD3 é marcador de linfócitos T. Nos destaques, os respectivos controles positivos para cada anticorpo, realizados em timo de animal C57Bl/6.

Imunohistoquímica com anti-CD3e, anti-CD4 e anti-CD8a revelou ausência de linfócitos T nos tumores TC-1, que pode ser explicada pela presença de macrófagos infiltrantes capazes de suprimir a resposta celular. Granulócitos, marcados com anti-Gr1 (Figura 11C), foram encontrados na periferia dos tumores e em menor quantidade do que as células marcadas com anti-CD11b (Figura 11B). O extravasamento destas células da corrente sanguínea para o tecido inflamado envolve moléculas, como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), responsáveis pela adesão dos neutrófilos ao endotélio e posterior migração destas células para o tecido. Em nossos resultados, observamos a expressão de ICAM-1, marcada com anti-CD54, por toda área tumoral avaliada. Os tumores de 1, 2 e 3 semanas apresentaram mesmo padrão de expressão desta molécula.

Apesar de não observarmos células B (anti-CD45R/B220) nos tumores TC-1, alguns autores demonstraram que os linfócitos B parecem estar envolvidos no processo de inflamação crônica que predispõe ao desenvolvimento de tumores HPV-16 positivos (De VISSER et al. 2005). Outro estudo demonstrou em diferentes modelos de tumor em animais, que a depleção de células B melhora a resposta anti-tumoral mediada por linfócitos T e células NK *in vivo* (INOUE et al. 2006). Estes dados sugerem que as células B estão envolvidas na resposta imune a tumores, no entanto, ainda pouco se sabe sobre o papel destas células em modelos de tumores associados ao HPV.

5.5 PAPEL DE QUIMIOCINAS NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MIELÓIDES EM RESPOSTA ÀS CÉLULAS QUE EXPRESSAM E6 E E7 DE HPV16

O estudo de quimiocinas importantes para o recrutamento de monócitos ao local do tumor tem dado destaque principalmente às quimiocinas CCL2/MCP1 e CCL5/Rantes (BEN-BARUCH 2006). Como discutido anteriormente, CCL2 é um dos mais potentes quimioatraentes de células mielóides, inclusive de macrófagos associados a tumores (TAMs). Em modelos de tumor de mama, o papel de CCL2 e CCL5 no recrutamento de monócitos para o local do tumor está bem caracterizado (NEUMARK et al. 1999; AZENSHTEIN et al. 2002).

Com base em nossos resultados de expressão gênica, optamos por avaliar o papel destas quimiocinas na migração de células mielóides em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV16. Nestes ensaios de migração *in vitro* foram utilizados os anticorpos neutralizantes anti-CCL2/MCP1 e anti-CCL5/Rantes com o objetivo de bloquear a ação destas quimiocinas. A Figura 12 ilustra os resultados encontrados com os neutralizantes de CCL2 e CCL5.

Para o ensaio de migração *in vitro* utilizamos as células TC-1 e células XB2 que expressam E6 e E7 de HPV16. No controle negativo do ensaio foi utilizado apenas meio de cultura e como controle da presença ou não de HPV foram utilizadas as células XB2 contendo o vetor vazio (XB2 pLXSN). Para o controle da ação dos anticorpos, tanto as células TC-1 quanto as XB2 foram tratadas com o controle isotípico.

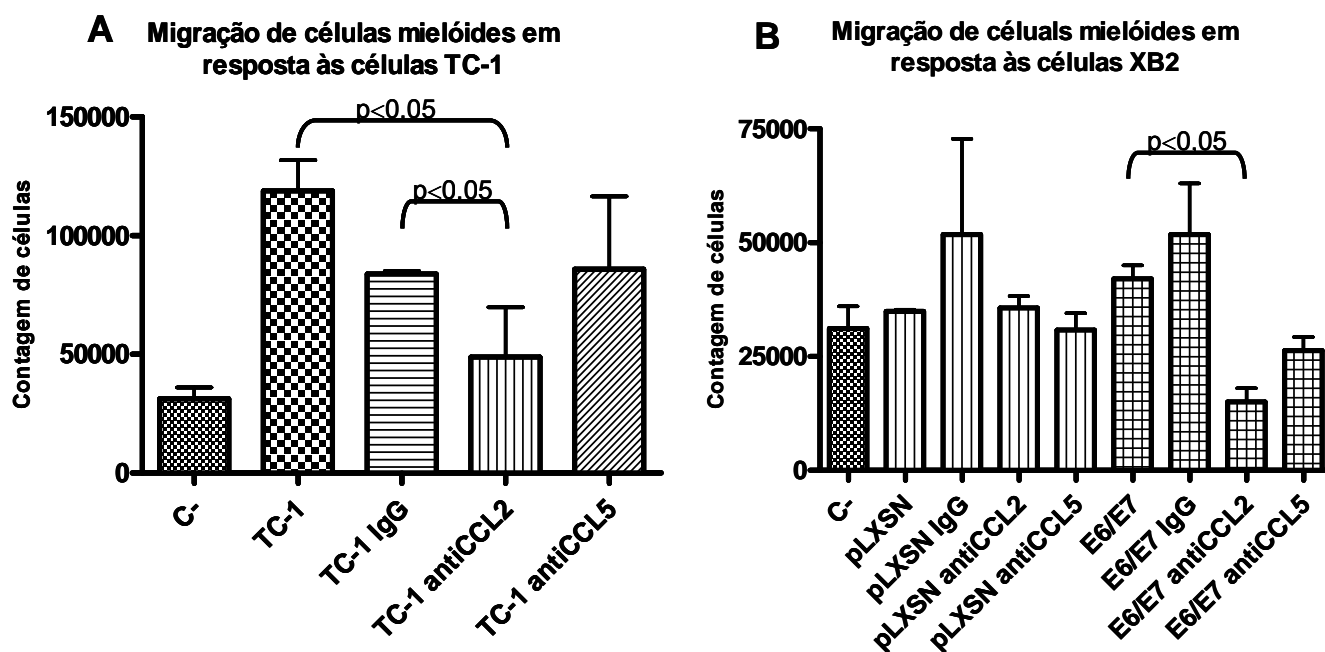


Figura 12: Ensaio de migração *in vitro*. **A:** Avaliação da migração de células mielóides em resposta às células TC-1. **B:** migração de células mielóides em resposta às células XB2. Os valores apresentados referem-se a contagem de células que migraram em cada amostra. **C-:** controle negativo composto apenas por meio de cultura. **TC-1:** células TC-1 não tratadas; **TC-1 IgG:** células TC-1 tratadas com IgG de rato (10µg/ml); **TC-1 antiCCL2:** células TC-1 tratadas com anticorpo neutralizante anti-CCL2/MCP1 (5µg/ml). **TC-1 antiCCL5:** células TC-1 tratadas com anticorpo neutralizante anti-CCL5/Rantes (10µg/ml); **pLXSN:** células XB2 transduzidas com o vetor pLXSN vazio não tratadas; **pLXSN IgG:** XB2 pLXSN tratadas com IgG de rato (10µg/ml); **pLXSN antiCCL2:** células XB2 pLXSN tratadas com neutralizante anti-CCL2/MCP1 (5µg/ml); **pLXSN antiCCL5:** células XB2 pLXSN tratadas com anticorpo neutralizante anti-CCL5/Rantes (10µg/ml); **E6/E7:** células XB2 transduzidas com o vetor pLXSN vetor que expressa E6 e E7 de HPV16 não tratadas; **E6/E7 IgG:** XB2 E6/E7 tratadas com IgG de rato (10µg/ml); **E6/E7 antiCCL2:** células XB2 E6/E7 tratadas com neutralizante anti-CCL2 (5µg/ml); **E6/E7 antiCCL5:** células XB2 E6/E7 tratadas com neutralizante anti-CCL5/Rantes (10µg/ml). Teste estatístico aplicado: t-Student, com significância $p < 0,05$.

Os dados obtidos com o anticorpo neutralizante anti-CCL2 foram significativos, e por isso também aparecem descritos na figura 4 do manuscrito 1. Estes resultados sugerem que CCL2 exerce um papel importante no processo de migração de células mielóides em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV16. Com relação à análise do papel de CCL5, observamos no ensaio *in vitro* uma tendência à redução da migração de células mielóides na presença do anticorpo neutralizante (figura 12B). Entretanto, este resultado não foi significativo.

5.6 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 1:

CHARACTERIZATION OF CYTOKINES AND CHEMOKINES EXPRESSION IN HPV-16 TUMOR MODEL IN C57BL/6 MICE

No trabalho apresentado a seguir descrevemos a caracterização da expressão de citocinas e quimiocinas nos tumores TC-1 em animais C57Bl/6 selvagens. Os resultados mostrados neste estudo ilustram o complexo painel de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem estar envolvidos no crescimento tumoral. Nossos estudos foram iniciados com análise da expressão de mRNA, como vários dos estudos descritos na literatura. Posteriormente, fizemos também ensaios para a caracterização do perfil de expressão de proteínas das populações de macrófagos tumorais e de células mielóides também presentes nos tumores. Neste estudo identificamos a expressão de citocinas tipicamente supressoras, como IL-10, expressa por macrófagos associados ao tumor. Mas também encontramos

expressão de citocinas relacionadas ao processo inflamatório e que podem estar envolvidas em inflamação crônica como fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias, como IL-1 β . Além disso, identificamos moléculas potencialmente importantes para o recrutamento de células do sistema imune, como CCL2.

MANUSCRITO 1

(em preparação)

Title: Characterization of cytokines and chemokines expression in HPV-16 tumor model in C57Bl/6 mice

Aline Bolpetti^{1,2}, Luisa Lina Villa¹ and Ana Paula Lepique¹.

¹Ludwig Institute for Cancer Research

Rua João Julião, 245, 1o andar, São Paulo, SP, 01323-903. Brazil.

Phone: 551133883200, fax: 551132847821

²Fundação Antônio Prudente - Hospital A.C. Camargo

Correspondence to Ana Paula Lepique

Rua João Julião, 245, 1o andar, São Paulo, SP, 01323-903. Brazil.

Phone: 551133883200, fax: 551132847821, email: alepique@ludwig.org.br

ABSTRACT

Infection with Human Papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer. Local immune response plays an important role in HPV infection and carcinogenesis. Cytokines and chemokines are key molecules in these processes owing to their immunomodulators activities. A great variety of these molecules are produced by tumor cells leading to the recruitment of leukocytes associated to tumor progression. Due to the importance of local immune response against tumor establishment we proposed to evaluate the expression of cytokines, chemokines and their receptors involved in the inflammatory response in HPV associated tumors. TC-1 cells were inoculated subcutaneously in C57B/6 mice and tumor growth kinetics was followed. Previous data showed us that TC-1 tumors were infiltrated mainly by CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ cells, and virtually no lymphocytes. CD45⁺ cells were sorted from the CD45⁻ population and both cell types were used for quantified mRNA expression. Our results showed the high expression of IL-10 and TNF α by the infiltrate. Additionally, we observed TGF β , IL-1 β , CXCL10, CCL2 and CCL5 expression by tumor cells as well as by the infiltrating leukocytes. We also verified high levels of IL-6, VEGF and MCSF in TC-1 tumors and elevated MCSF-R and MMP-9 expression by the infiltrate. The protein analysis confirms some of mRNA data. Based on the detection of CCL2 by tumor cells, we investigated its role in monocyte migration and found a reduction in cell migration when CCL2 is blocked. This result suggests that this chemokine produced by tumor cells may be an important regulator of leukocyte recruitment in this tumor model. In

conclusion, our results suggest that cytokines and chemokines produced by tumor cells as well as the infiltrate could play a role in local immune response and maybe contributing to tumor progression.

INTRODUCTION

Cervical carcinoma is the second leading cause of cancer death in women worldwide and is mainly attributable to high risk HPV persistent infection (BOSCH e DE SANJOSE 2003). Most persistent infection are caused by HPV-16, and the two viral oncoproteins E6 and E7 play an important role in the development and maintenance of the malignant phenotype. Persistent HPV infection is required for neoplastic progression and failure of virus clearance is attributed to a poor immunological response (TINDLE 2002).

Chronic inflammation resulting from viral persistent infection could predispose the pre-neoplastic development and tumor progression. The association between inflammation and cancer are mediated by cytokines and chemokines which are key molecules involved in local immune response. These small soluble molecules can be secreted by tumor cells as well as leukocyte infiltrate and they could be associated with angiogenesis, invasion and metastasis (COUSSENS and WERB 2002; RAMAN et al. 2007).

Macrophages are an important component of the leukocyte tumor infiltrate (COUSSENS and WERB 2002; MANTOVANI et al. 2002). Tumor-associated macrophages (TAM) produce cytokines and chemokines which can regulate or promote tumor growth. Moreover, these molecules profoundly affect the

phenotype of monocytes/macrophages (MANTOVANI et al. 2002). Previous studies have shown that TAMs correlate with a poor prognosis suggesting a role for these cells in tumor progression (BINGLE et al. 2002).

Here we study a mouse tumor model associated to HPV-16. In our study, previous data from our lab showed that most of the tumor infiltrating cells are CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺Arginase1⁺ macrophages with M2-like phenotype (LEPIQUE et al. 2009). TAMs produce high quantities of IL-10 and TGF- β , which suppress the immune adaptive response (SICA et al. 2000; MANTOVANI et al. 2002). They also produce chemokines as CCL2/MCP-1 and CCL5/Rantes, highly associated to tumor progression (UENO et al. 2000; AZENSHTEIN et al. 2002). Moreover these chemokines induce metalloproteases (MMPs) and VEGF production, enhancing tumor invasion and angiogenesis in breast carcinomas (AZENSHTEIN et al. 2002, 2005). TAMs also produce Tumor necrosis factor- α (TNF- α) which is a key cytokine that can act as an autocrine growth factor for these cells (ZINS et al. 2007).

Due to the importance of local immune response against tumor establishment we proposed to evaluate the expression of cytokines, chemokines and their receptors involved in the inflammatory response in HPV associated tumors. For this purpose, we isolated the leukocyte infiltrate from tumor cells and performed mRNA and protein quantification in both populations. Here we found that tumor cells as well as the infiltrating leukocytes produce cytokines and chemokines related to immunosuppression and tumor growth, as IL-10, TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, MCSF, CCL2/MCP-1 and CCL5/Rantes. In addition, we suggest that CCL2/MCP-1 produced by

tumor cells has a role in monocyte/macrophage migration in our tumor model.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and animal model:

TC-1 cells are derived from primary epithelial cells of C57BL/6 mice cotransformed with HPV-16 E6 and E7 and c-Ha-ras oncogenes (LIN et al. 1996). This cell line was kindly donated by Dr. TC Wu (John Hopkins, Baltimore, MD). These cells were cultivated in RPMI supplemented with 10% bovine fetal serum and 400 μ g/ml Neomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) in incubators with atmosphere of 5% CO₂. TC-1 cells were suspended in PBS⁺⁺ (1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂). We inoculated subcutaneously 10⁵ TC-1 cells in the right flank of C57Black/6 mice and followed tumor growth during 4 weeks or tumor size reached a maximum diameter of 1.5 cm. C57Bl/6 mice were maintained at the Ludwig Institute for Cancer Research mouse facility in *spf* conditions. All mouse protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Fundação Antonio Prudente, Sao Paulo, Brazil, protocol 05/05.

Cell Sorting:

Tumors were harvest approximately 20 days post TC-1 injection. Tumors were digested in 100 μ g/ml Collagenase under agitation at 37°C. The cell suspension was done in 1x Hanks' balanced salt solution with 15mM HEPES

pH7.4, supplemented with 5% fetal bovine serum and 0.5U/ml DNase. Cell suspension were filtered through a 70 μ m mesh and washed twice before use. We obtained approximately 98% of viable cells.

CD45+ cells were isolated from tumors by sorting using biotinilated anti-CD45 antibody and followed by incubation with Streptavidin micro-beads (Miltenyi Biotec, Germany). Cells were sorted through columns exposed to magnetic field (MACS LS+ Separation Columns) (Miltenyi Biotec, Germany). The negative fraction eluted from the columns was used as CD45- population for mRNA analyses. In general we obtained 95% pure cells with at least 90% viability.

For protein analyses we sorted peritoneal macrophages from the peritoneal resident cells by positive selection with purified anti-F4/80 antibody, followed by anti-rat PE and isolation using the EasySep anti-PE magnetic beads (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA). We also isolated two myeloid cell populations from TC-1 tumors that were digested as described before. Cell sorting was performed using the following antibodies: anti-CD11b FITC conjugated (clone M1/70) (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-Gr1 PE conjugated (clone RB6-8C5) (BD Biosciences, San Diego, CA) and anti-F4/80 PE-Cy5.5 conjugated (clone BM8) (eBiosciences, San Diego, CA). Cell sorting was carried out in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA) and we were able to separate CD45+/CD11b+/F4/80+ cells and CD45+/CD11b+/Gr-1+ cells.

RNA isolation and Reverse-Transcriptase reaction:

RNA from infiltrating leukocytes (CD45+) and tumor cells (CD45-) was isolated by RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany) methodology according to manufacture instructions. Real-time PCR arrays (RT² Profiler PCR Array System, SuperArray Bioscience Corporation) were performed using cDNA synthesized with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), oligo-dT primer (IDT) and random primers. In each 96-well plate was used cDNA synthesized from 1µg RNA.

RT² Profiler PCR Array System (SuperArray):

In order to analyze a panel of genes involved in the inflammatory response in our tumor model, Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors RT² Profiler PCR Array System (PAMM-011A) (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD) was performed. This Real-Time PCR array contains a panel of 96 primer sets including 84 genes of cytokines, chemokines and their receptors, five housekeeping genes and three RNA and PCR quality controls. Real-time PCR arrays were performed on an ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, UK).

Real-time PCR array (SuperArray) analysis:

The mRNA expression levels were represented by the ΔCt values which were calculated as the subtraction of the Ct averages of the housekeeping genes (HKG) from the Ct averages of the target gene (TG) ($\Delta Ct = Ct_{TG} -$

Ct_{HKG}). The amplification efficiencies of the targets (TG) and references (HKG) displayed no significant differences (data provided by SuperArray Bioscience Corporation, Fredrick, MD).

Quantitative Real-time PCR

Real-time PCR for MCSF, MCSF-R, VEGF and IL-6 expression were done in RNA samples from CD45⁺ and CD45⁻ cells isolated from TC-1 tumors. The reactions were performed in an ABI 7300 detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) with SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, UK) with specific primers for each transcript: MCSF (GenBank accession number BC066205) (F=GCTCCTGCCTACCAAGACTG and R=CAGCCCTTTCTCTTTGGTTG), MCSF-R (GenBank accession number NM_001037859) (F=GGCAGTACCACCATCCACTT and R=TCAACCACTGTCACCTCCTG), VEGF (GenBank accession number NM_001025369.1) (F=CAGGCTGCTGTAACGATGAA and R=TATGTGCTGGCTTTGGTGAG), IL-6 (GenBank accession number NM_031168) (F=CAGAGATACAAAGAAATGATGGATGCT and R=CAGAAGACCAGAGGAAATTTTCAATA), MMP-9 (GenBank accession number NM_013599) (F= AGACGACATAGACGGCATCC and R= GTGGTTCAGTTGTGGTGGTG) and HPRT (GenBank accession number NM_013556) (F= TGGATATGCCCTTGACTATAATGA and R= GGCTTTTCCAGTTTCACTAATGACA). The relative quantification of each target in comparison to a reference gene (HPRT) was determined as described (PFAFFL 2001). The relative expression ratio was calculated

based on Real-time PCR efficiency and the crossing points for the target and HPRT transcripts. The following formula was applied, $\text{Ratio} = E_{\text{target}}^{(\text{Ctcontrol} - \text{Ctsample})} / E_{\text{HPRT}}^{(\text{Ctcontrol} - \text{Ctsample})}$, where E is the primer efficiency, Ctcontrol and Ctsample are the cycle numbers where HPRT and the target amplification is detected above the threshold, respectively

Proteome Profiler™ Array

In order to determine the protein relative levels of some cytokines and chemokines in TC-1 tumor model, a Mouse Cytokine Array Panel (cat number ARY006) (Proteome Profiler™ Array, R&D Systems, Minneapolis, MN) was performed. This array consists of a panel of antibodies spotted in duplicate onto a nitrocellulose membrane. Protein extracts were obtained from TC-1 tumors, peritoneal macrophages and 2 populations of myeloid cells isolated from tumors. These cells were characterized by CD45+/CD11b+/F4/80+ and CD45+/CD11b+/Gr1+ expression. The assays were performed according to manufacture instructions. We used a total of 70 µg of each cell lysate for incubation with the membranes. The detection was performed using the ECL chemiluminescent reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ). X-ray films were exposed to the membranes for different periods of time. Densitometry was done to analyze the samples. Saturated signals were excluded from analyzes. After densitometry the data showed in figures 3 and 4 correspond to the relative signal from lysate from each population/relative signal from lysate of peritoneal macrophages. Where

relative signal = [(target signal duplicate average – background signal)/positive controls signals average*100].

Chemotaxis assay

Chemotaxis assays were performed using TC-1 and XB2 cells in order to verify if the monocyte migration through CCL2/MCP-1 is dependent of HPV16 E6/E7. XB2 are mouse embryonic cells that were transfected with empty pLXSN retroviral vector or with HPV16 E6/E7 viral oncogenes. Chemotaxis assay were conducted using membrane inserts with 5 μ m pores in 24-well plates (6.5mm Transwell® 5.0 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insert, Corning COSTAR). TC-1 and XB2 cells were plated for 48h in RPMI medium with 10% FBS. Freshly isolated myeloid cells were obtained from C57Bl/6 bone marrow using 63,5% Percoll gradient (Percoll Plus, GE Healthcare, Uppsala). Myeloid cells were placed in the upper chambers of inserts and the 24-well plates were incubated at 37°C / 5% CO₂ for 3 hours. At the end of incubation period, the inserts were removed and myeloid cells, which had migrated through the membrane to the lower chamber, were counted manually. Chemotaxis was inhibited by adding anti-CCL2 (clone 123602) (10 μ g/ml, R&D Systems, MN). The negative controls were medium alone in the lower compartments of the chambers. All the conditions were done in triplicate.

RESULTS

Cytokines and chemokines expression in TC-1 tumors

In our laboratory we have previously found, by FACS and immunohistochemistry analyzes, that TC-1 tumors are infiltrated mainly by CD45+CD11b+F4/80+ cells (macrophages) while T lymphocytes are rarely found (LEPIQUE et al. 2009). In the present study we observed, by RT² Profiler PCR Array System analysis, that the infiltrate (CD45+) expresses high amount of cytokines and chemokines related to immunosuppression, monocytes recruitment and tumor growth. In figure 1 we demonstrated the expression of cytokines, chemokines and their receptors according to Δ Ct values obtained from mRNA quantitative analysis. Our data revealed high CCL2/MCP-1, CCL5/Rantes, CXCL10 and TGF- β expression by both CD45+ and CD45- populations. All these molecules are involved in the suppression of immune response caused by tumor associated macrophages (TAMs) (MANTOVANI et al. 2002). In addition, tumor infiltrating leukocytes express IL-10 and TNF- α (figure 1), both also related to tumor progression (HALAK et al. 1999; ZINS et al. 2007). In parallel to this study we verified that elevated levels of IL-10 are strongly associated to suppression of cellular response in our tumor model (data not shown). Moreover, tumor cells (CD45-) express low levels CCL3/MIP1-a (figure 1), a chemokine that enhances the trafficking of effector T cells to tumor site.

It is interesting to note that receptors for all these chemokines cited before, as CCR1, CCR2, CCR3 and CCR5, are highly expressed by infiltrating

leukocytes (CD45+). We also observed high levels of IL-1 α and IL-1 β expressed by tumor infiltrate (figure 1). IL-1 and TNF- α are the most potent pro-inflammatory cytokines generated by macrophages and responsible to induce a cascade of other cytokines and molecules involved in the inflammatory process that frequently accompanies tumor growth. The above results shown us the complex panel of cytokines, chemokines and their respective receptors expressed by both cell populations analyzed. Tumor cells as well as the infiltrating leukocytes produce inflammatory and immunosuppressive molecules which can be contributing to tumor progression.

In order to complement the data obtained by RT² Profiler PCR Array System analysis, we performed quantitative real-time PCR for transcripts that we judged important to analyze in our tumor model. As shown in figure 2, we verified that MCSF, an important growth factor for monocytes, is increased in tumor cells (CD45-) while its receptor MCSF-R is highly expressed by the leukocyte infiltrate (CD45+). This suggests that MCSF expressed by tumor cells can be strongly associated with dense leukocytic infiltration that expresses MCSF-R. We also noted high expression of VEGF in TC-1 tumors (figure 2D). This growth factor is expressed by tumor cells as well as the infiltrate. As we can see in figure 2C, IL-6, a multifunctional cytokine also involved in monocyte differentiation (CHOMARAT et al. 2000), is highly expressed by tumor cells and infiltrating leukocytes in the TC-1 model. We also analyzed MMP-9 expression, an extracellular protease frequently involved in angiogenesis and tumor invasion (STETLER-STEVENSON and

YU 2001). Here we observed MMP-9 highly expressed by tumor infiltrating leukocytes (figure 2E). This observation can contribute to characterize the M2 macrophage phenotype present in TC-1 tumors (LEPIQUE et al. 2009). Furthermore, a proteome array for chemokines and cytokines was performed in addition to mRNA quantification. For this purpose we isolated two populations of myeloid cells from TC-1 tumors and analyzed protein extracts from these cells compared to peritoneal macrophages. In figure 3 we showed results which confirm that protein analyses are in agreement with mRNA data. We verified an elevated IL-10 and IL-1 β production by myeloid cells (figure 3A). We also observed CCL2/MCP-1 highly produced by both myeloid populations as well as by tumor cells (figure 3B). CCL3/MIP-1a and CXCL9 produced by TAMs (CD11b⁺/F4/80) (figure 3B), and MCSF produced by CD11b⁺/Gr1⁺ cells (figure 4A). In general, the cytokines and chemokines produced by the myeloid infiltrate may reflect immunosuppression that can contribute to TC-1 tumor growth.

CCL2/MCP-1 has a role in monocytes migration in response to TC-1 cells

Based on the observation that CCL2/MCP-1 is highly expressed by tumor cells in our model, we decided to explore the effect of this chemokine in the recruitment of monocytes/macrophages in response to TC-1 cells. For this purpose we performed an *in vitro* chemotaxis assay using neutralizing antibodies against this molecule. As we can see in figure 5A, there is a significant reduction in monocyte migration in the presence of anti-CCL2. The

same result was observed when we analyzed XB-2 cells that contain E6 and E7 HPV16 (figure 5B). Interestingly it was not possible to observe this effect in XB-2 cells that not contain the viral oncogenes. Our data suggest a strong tendency to inhibition of leukocyte migration when CCL2/MCP-1 is inhibited, suggesting that this chemokine produced by tumor cells may be an important regulator of monocyte/macrophage recruitment in this model. In K14-HPV/E2 model, the presence of tumor infiltrating macrophages is mediated by CCL2/MCP-1 (PAHLER et al. 2008).

DISCUSSION

Tumor cells can produce various cytokines and chemokines that attract and determine the phenotype of leukocytes which influence the local immune response and frequently control the tumor growth. Infiltrating leukocytes also produce cytokines in tumor environment that can drive the immune response to be effective. On the other hand, they can be involved in tumor growth, invasion and metastasis. The expression of suppressor cytokines like IL-10 and TGF- β has been described in many malignancies (SALAZAR-ONFRAY et al. 2007). Moreover, chemokines and cytokines, as CCL2/MCP-1, TNF- α and VEGF are strongly associated with tumor growth, increase of invasion and angiogenesis (RAMAN et al. 2007). Due to the importance of these molecules in tumor microenvironment we characterized the profile of cytokines and chemokines, as well as their receptors, expressed in tumor cells and infiltrating leukocytes in TC-1 tumor model.

Our laboratory has been working on the characterization of the leukocyte population that infiltrates this mouse tumor model. We previously showed that these cells, represented as the CD45⁺ tumor fraction, are CD11b⁺F4/80⁺Arginase1⁺ macrophages with M2-like phenotype (LEPIQUE et al. 2009). These leukocytes express different cytokines, among them IL-10, IL-1 β , TNF- α , TGF- β (figure 1) and IL-6 (figure 2C). IL-10 increased expression in HPV associated lesions has been correlated to disease progression (BERMUDEZ-MORALES et al. 2008; MINDIOLA et al. 2008). Moreover, we recently demonstrated that IL-10 has a role in the inhibition of cellular response in our tumor model (BOLPETTI et al. submitted).

We also observed high levels of IL-1 β produced by the infiltrate (figures 1 and 3A). Others studies recently described this cytokine as an important factor in tumor development (APTE et al. 2006; KRELIN et al. 2007). Cytokines as TNF- α and TGF- β are abundantly expressed in TC-1 tumors (figure 1), and they are frequently involved in mechanisms of immune evasion contributing to tumor growth (JARNICKI et al. 2006; ZINS et al. 2007). In addition, our data showed that IL-6 is expressed by tumor cells and infiltrating leukocytes (figure 2C). IL-6 controls monocyte differentiation by inducing the increase of MCSF-R on these cells (CHOMARAT et al. 2000). In fact, the leukocytes present into TC-1 tumors express high levels of this receptor (figure 2B). Furthermore, IL-6 is capable to up-regulate CCL2/MCP-1 expression (ROMANO et al. 1997; HESS et al. 2000) which it is also abundant in TC-1 tumors (figures 1 and 3B).

The growth factor MCSF is important in promoting monocyte survival and differentiation. High levels of this molecule have been found in a variety of neoplasias, (KACINSKI 1995; LIN et al. 2001) and its role in tumor growth has been also described (KIRMA et al. 2004). MCSF was suggested to mediate monocyte recruitment to tumor sites and it is associated with the presence of TAMs into tumors (LEWIS and POLLARD 2006). In our model, according to LEPIQUE et al. (2009), TAMs are the major component of tumor infiltrate. Based on this observation, we suggest that elevated MCSF expression can be associated to the high number of infiltrating TAMs in TC-1 tumors.

In addition, the high expression of chemokines as CCL2/MCP-1 and CCL5/Rantes induces macrophages to produce MMP-9 (AZENSHTEIN et al. 2002). Here we found high MMP-9 expression by tumor infiltrating leukocytes (figure 2E). This result contributes to the hypothesis of M2 macrophage infiltrating the TC-1 tumors (LEPIQUE et al. 2009). Altogether, the characterization of cytokines and chemokines as well as others molecules expressed by tumor infiltrate contribute to determine the phenotype of these cells.

Chemokines, as CCL2/MCP-1 and CCL5/Rantes, highly expressed in TC-1 tumors, are also present in a diversity of malignancies (UENO et al. 2000; AZENSHTEIN et al. 2002). In our study, mRNA and protein analysis revealed high levels of CCL2/MCP-1 produced by infiltrating leukocytes as well as tumor cells (figures 1 and 3B). This chemokine, acting through its receptor CCR2, which we also detected in the tumor infiltrate (figure 1), induces the

migration and activation of monocytes and regulate the recruitment of TAMs into tumors (UENO et al. 2000; LOBERG et al. 2007). Here we show there is a significant reduction in monocyte migration when CCL2/MCP-1 is blocked *in vitro*. Moreover, this effect is dependent of the presence of HPV16 oncoproteins (figure 5B). The role of this chemokine and its receptor in another cervical tumor model was recently described by PAHLER et al. (2008). In conclusion, our results suggest that this CCL2/MCP-1 could be an important factor responsible for the monocyte/macrophage recruitment into TC-1 tumor.

In summary, our findings show the characterization of the complex panel of cytokines and chemokines expressed in a tumor model associated to HPV-16. Here we observed the expression of immunosuppressive cytokines, as IL-10 and TGF- β , as well as inflammatory molecules, like TNF- α , IL-1 β and IL-6. We also detected VEGF and MMP-9, both involved in angiogenesis process. Chemokines, as CCL2/MCP-1 and MCSF, important to monocyte migration into tumors were also found in our tumor model. The presence of these molecules is very important to the understanding of local immune response, since they could influence the recruitment and the differentiation of leukocytes into the tumor site. Moreover, it is crucial to determine the expression of cytokines, chemokines and their receptors, once these interactions into tumor microenvironment could be involved in immunosuppression and facilitate tumor growth. Our study contributes to the characterization of cytokines and chemokines expressed in the microenvironment in a HPV16 associated tumor model.

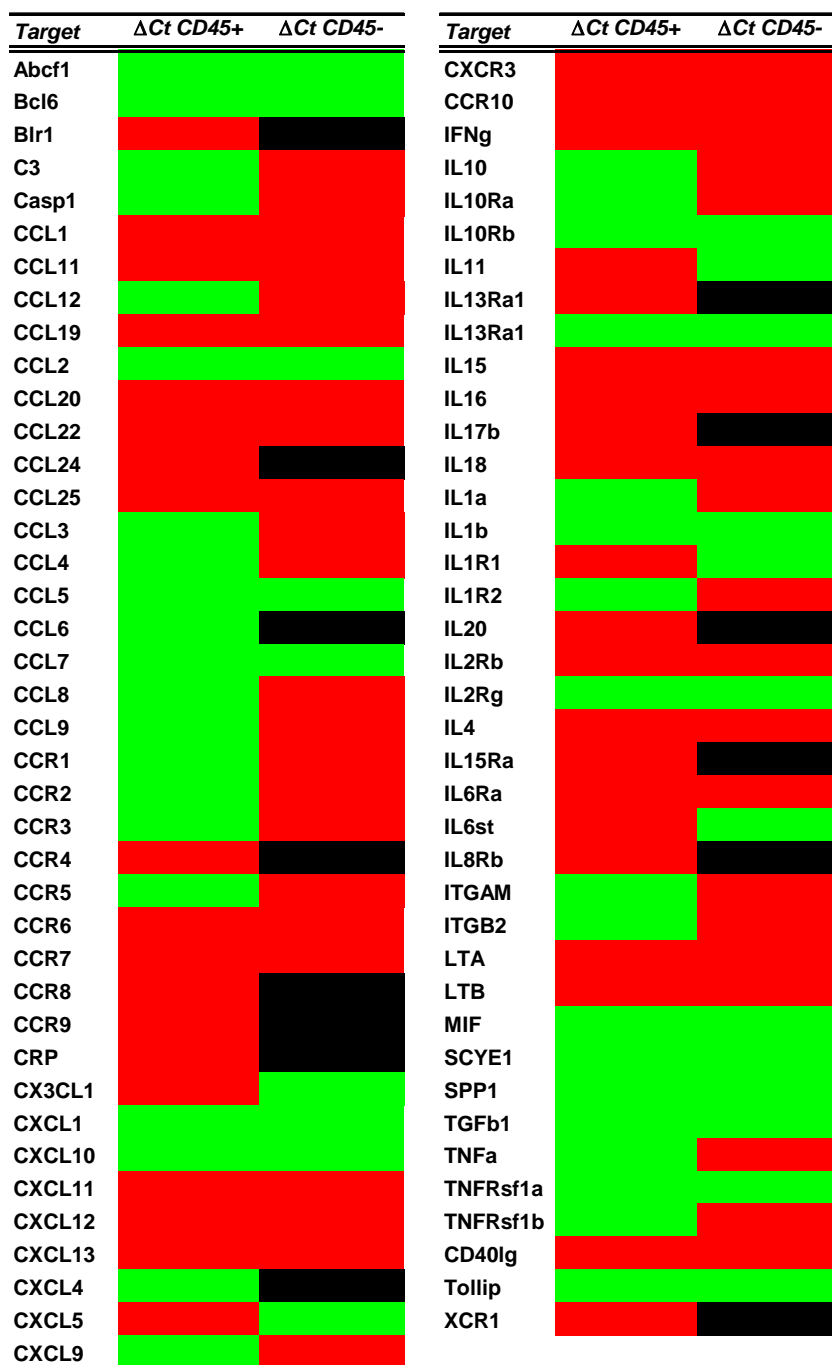


Figure 1

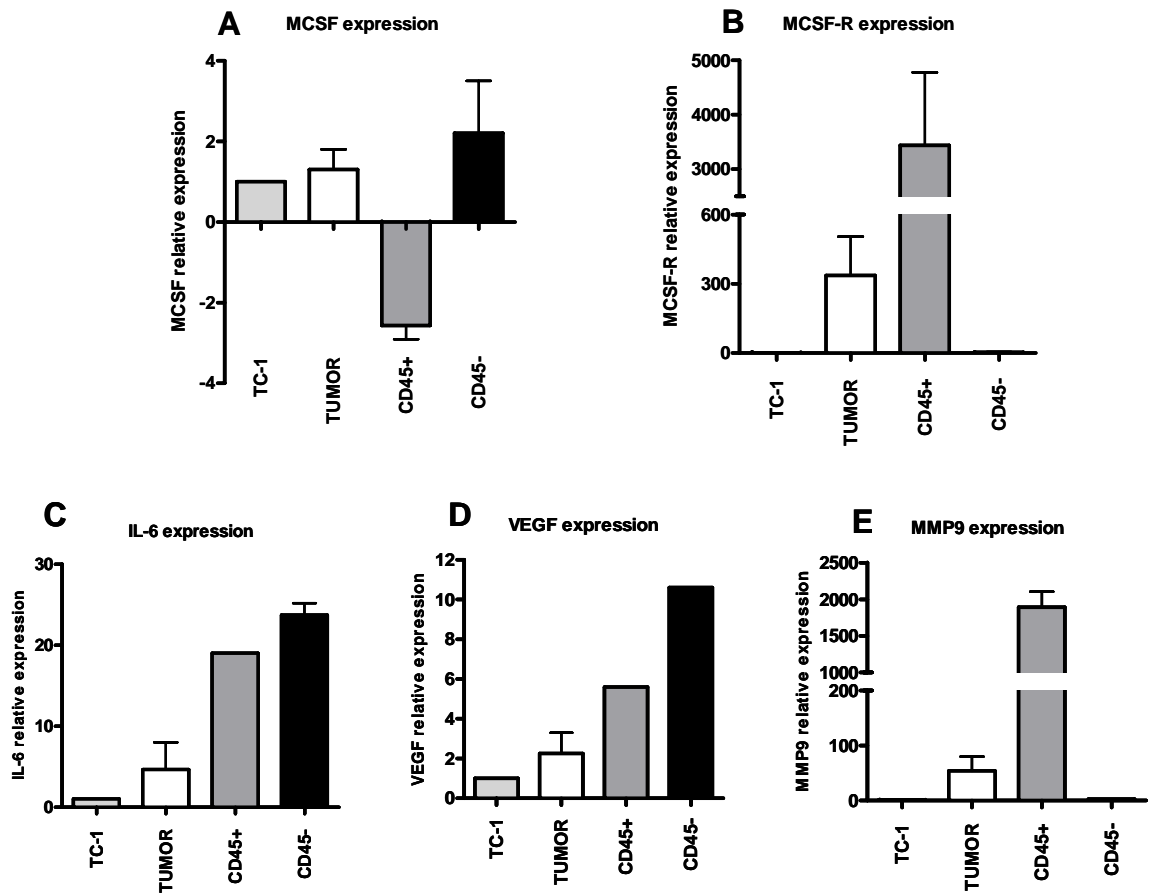


Figure 2

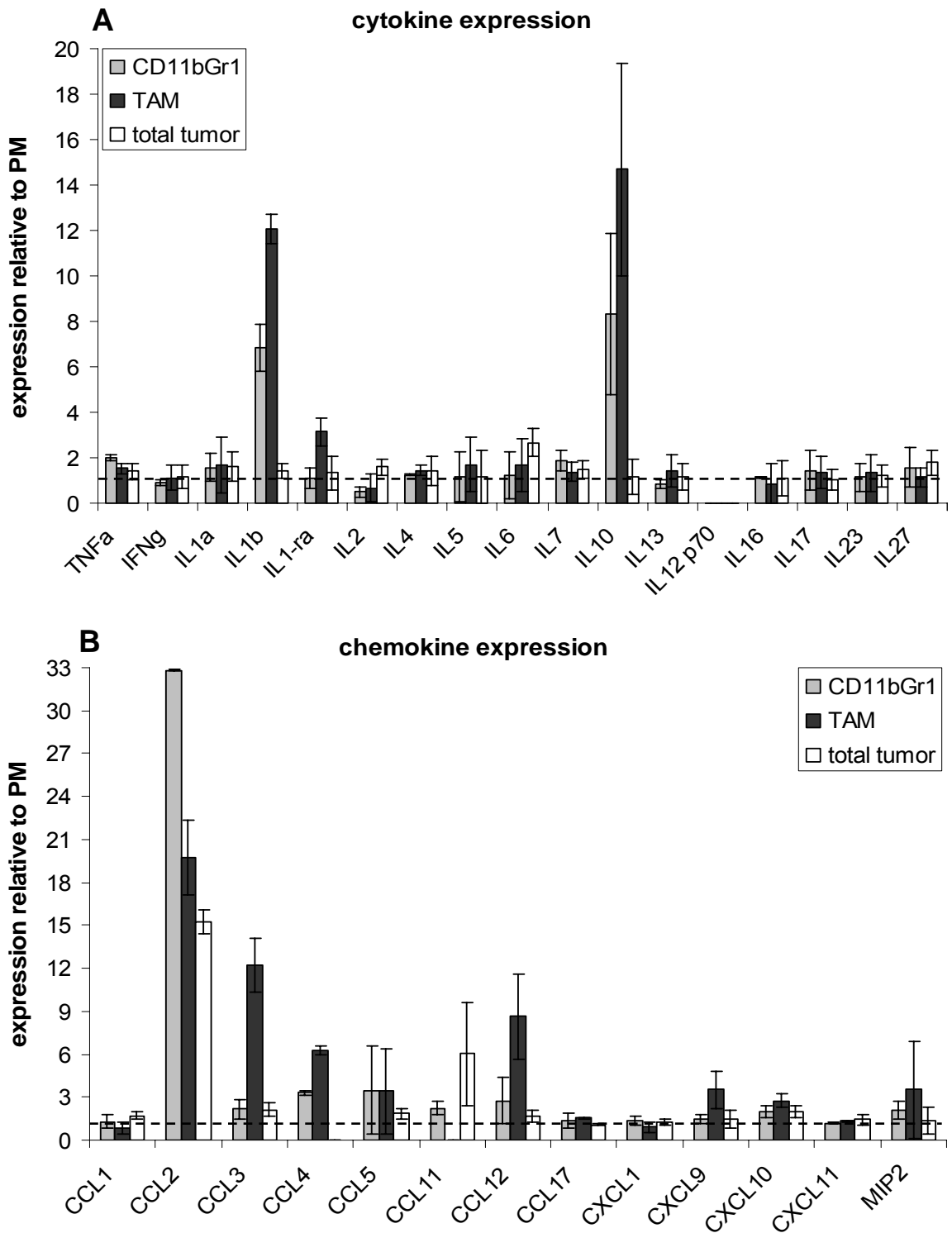


Figure 3

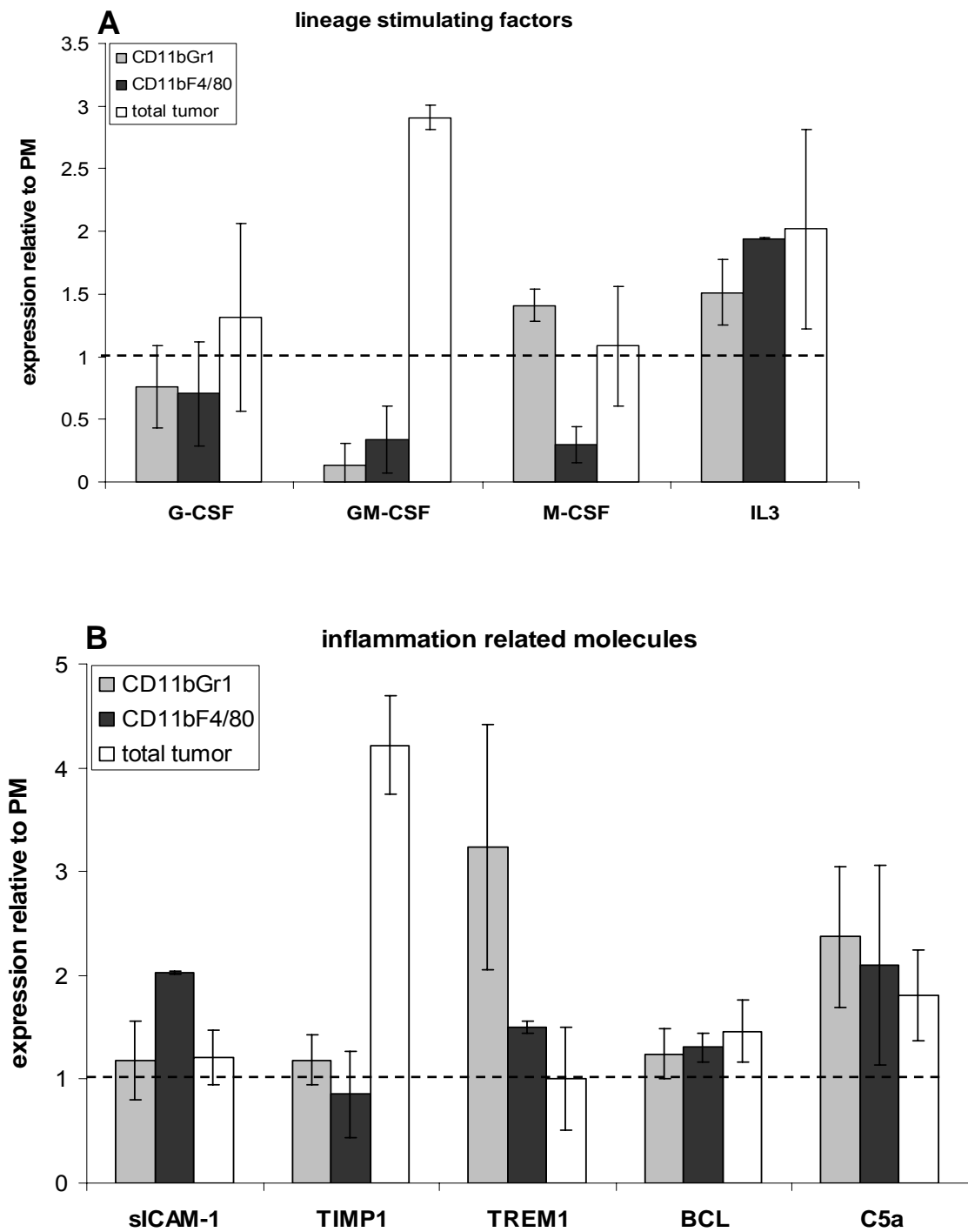


Figure 4

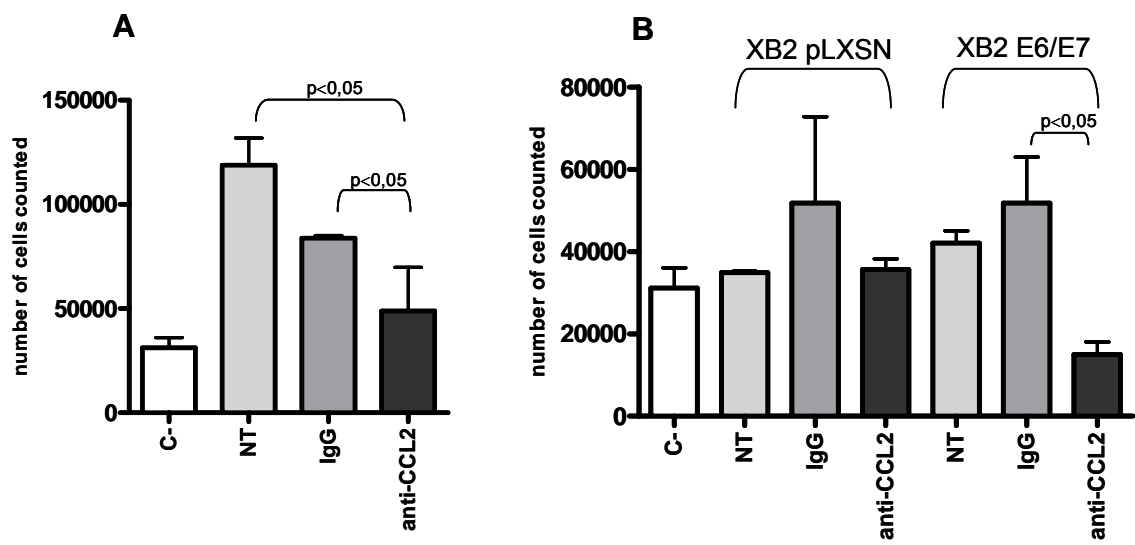


Figure 5

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Expression of cytokines, chemokines and receptors in tumor cells (CD45⁻) and leukocyte infiltrate (CD45⁺) isolated from TC-1 tumors. Quantitative mRNA analyses were performed using SuperArray RT-PCR. Data is presented as the ΔCt values which were calculated according to the following formula: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{TG}} - \text{Ct}_{\text{HKG}}$, where the Ct_{HKG} correspond to the averages of the housekeeping genes (HKG) and Ct_{TG} correspond to the averages of the target gene (TG). Since the numerical value of the Ct (threshold cycle) is inversely related to the amount of amplicon in the reaction, the lower the ΔCt , the greater the amount of the target transcripts. Thus, based on ΔCt values (cutoff = 5) we represented high expression of the target gene in GREEN and low expression in RED. Undetermined samples are in black. Data were obtained from 3 independent experiments. Samples were cDNAs obtained from CD45⁺ sorted cells total RNA and from CD45⁻ sorted cells total RNA.

Figure 2 - Quantitative Real-time PCR analysis.

Quantification of MCSF (**A**), MCSF-R (**B**), IL-6 (**C**), VEGF (**D**) and MMP-9 (**E**) expression in total TC-1 tumors (white bars), CD45⁺ (dark gray bars) and CD45⁻ (black bars) tumor fractions compared to mRNA from TC-1 cells maintained *in vitro* (light gray bars). The graphs illustrate the fold induction of the target gene expression in each sample compared to TC-1. The relative expression ratio was calculated based on $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

Figure 3 - Proteome array analysis.

Protein relative levels of some cytokines (**A**) and chemokines (**B**) were analyzed by Mouse Cytokine Array Panel (Proteome ProfilerTM Array, R&D Systems. Protein expression analyzes of the indicated populations compared to peritoneal macrophages. Samples obtained from total TC-1 tumors (white bars), CD45⁺/CD11b⁺/F480⁺ cells (black bars) and CD45⁺/CD11b⁺/Gr1⁺ cells (gray bars) were analyzed after densitometry. Data correspond to the ratio: relative signal from lysate from each population / relative signal from lysate of peritoneal macrophages. Where relative signal = [(target signal duplicate average - background signal)/positive controls signals average*100].

Figure 4 - Proteome array analysis of some lineage stimulating factors (A) and inflammation related molecules (B).

Protein relative levels were analyzed by Mouse Cytokine Array Panel (Proteome Profiler™ Array, R&D Systems). Protein expression analyzes of the indicated populations compared to peritoneal macrophages. Samples obtained from total TC-1 tumors (white bars), CD45+/CD11b+/F480+ cells (black bars) and CD45+/CD11b+/Gr1+ cells (gray bars) were analyzed after densitometry. Data correspond to the ratio: relative signal from lysate from each population / relative signal from lysate of peritoneal macrophages. Where relative signal = [(target signal duplicate average– background signal)/positive controls signals average*100].

Figure 5 - Inhibition of monocyte migration is associated to the presence of HPV16.

A: Chemotaxis assay showing monocyte migration in response to TC-1 cells. **B:** Chemotaxis assay showing monocyte migration in response to XB-2 cells. These XB-2 cells were analyzed in order to verify the role of viral oncoproteins E6 and E7. **C-:** negative control/ medium alone; **NT:** non-treated cells; **IgG:** cells treated with rat IgG (10µg/ml); **anti-CCL2:** cells treated with the neutralizing antibody anti-CCL2/MCP1 (5µg/ml). **XB2 pLXSN:** XB2 cells containing pLXSN insert; **XB2 E6E7:** XB2 cells containing HPV16 E6 and E7 insert. Each condition was performed in triplicate. It is a represented graphic from 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using *t* test and *p* value <0.05 was considered significant.

5.7 APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 2:

IL-10 PRODUCTION BY TUMOR INFILTRATING MYELOID CELLS PLAYS A ROLE IN HPV16 TUMOR GROWTH

Nosso estudo de expressão de citocinas em diferentes populações de tumores TC-1 mostrou que IL-10 é expressa por células mielóides que infiltram estes tumores. Dados publicados do nosso laboratório mostram que os macrófagos associados a estes tumores têm papel na supressão da resposta celular anti-tumoral. Dadas as funções biológicas de IL-10, nós decidimos testar a hipótese de que IL-10 tem papel no mecanismo de supressão da resposta de células T desencadeada por macrófagos associados aos tumores TC-1.

Neste estudo, observamos que os tumores TC-1 crescem mais lentamente em animais deficientes para IL-10, resultado confirmado em animais cujo efeito de IL-10 foi bloqueado com anticorpos neutralizantes. Além disso, demonstramos que IL-10 inibe a resposta imune mediada por linfócitos T CD8+, uma vez que na ausência desta citocina observamos células T CD8+ efectoras infiltrando os tumores TC-1. Estes resultados sugerem que IL-10 exerce um papel importante no controle da resposta imune em modelo de tumor associado ao HPV16.

MANUSCRITO 2

Title: IL-10 production by tumor infiltrating myeloid cells plays a role in HPV16 tumor growth

Aline Bolpetti^{1,2}, João Santana Silva³, Luisa Lina Villa¹, Ana Paula Lepique¹

¹Ludwig Institute for Cancer Research

Rua João Julião, 245, 1o andar, São Paulo, SP, 01323-903. Brazil.

Phone: 551133883200, fax: 551132847821

²Fundação Antônio Prudente

³Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo

Correspondence to Ana Paula Lepique

Rua João Julião, 245, 1o andar, São Paulo, SP, 01323-903. Brazil.

Phone: 551133883200, fax: 551132847821, email: alepique@ludwig.org.br

Aline Bolpetti: abolpetti@ludwig.org.br; Luisa Lina Villa: llvilla@ludwig.org.br;

João Santana Silva: jsdsilva@fmrp.usp.br.

Keywords: immune evasion, tumor microenvironment, tumor infiltrating lymphocytes, tumor associated macrophages.

ABSTRACT

Tumor infiltrating leukocytes have a relevant role in tumor fate. Depending on the tumor type, infiltrating leukocytes differentiate in suppressor cells, inhibiting anti-tumor T cell responses. Cytokines are part of the signaling that mediate this process, IL-10, for instance. In Human Papillomavirus (HPV) associated lesions a positive correlation was found between lesion grade and IL-10 mRNA expression.

Here we used a HPV animal tumor model, TC-1, to study the role of IL-10 in the immune response against HPV16 E6 and E7 expressing tumor cells. While TC-1 cells do not express or respond to IL-10, they recruit leukocytes which, within the tumor environment, produce this cytokine.

In IL-10 deficient mice or wild type mice treated with neutralizing antibodies against IL-10 and IL-10R, tumor growth was diminished in parallel with an increase in tumor infiltration by HPV16 E7 specific CD8 lymphocytes. Infiltrating CD8 cells expressed Granzyme B and Perforin, indicating cytotoxic activity. At the same time, we observed that upon antigen stimulation less T cells were observed in lymph node cultures from IL-10R neutralizing antibody treated mice than from control mice.

Our data shows that E6/E7 expressing tumor cells recruit myeloid cells, which produce IL-10 thus inhibiting anti-tumor T cell responses. These results explain for the first time the mechanism behind the epidemiological data that linked enhanced IL-10 expression with HPV associated lesion progression.

INTRODUCTION

High risk human papillomavirus, HR-HPV, is the main etiologic factor for cervical cancer and for a percentage of other anogenital and oropharyngeal tumors (International Agency for Research on Cancer-IARC 2007).

Immune responses against HPV antigens eliminate most of the infections and precursor lesions in women. Moreover, only a percentage of the infected women show persistent infection that leads to malignant disease (SCHLECHT et al. 2001, 2003). The virus display several mechanisms for evading the host's immune system, for example: maintenance of low viral protein levels in the cell, expression of capsid proteins only in external layers of the epithelium and therefore out of reach of antigen presenting cells (TINDLE 2002), inhibition of interferon responsive element (PARK et al. 2000; UM et al. 2002), and production of regulatory cytokines like TGF β (HAZELBAG et al. 2004; XU et al. 2006). One cytokine which expression has been associated with HPV related disease is IL-10 (CHOPRA et al. 1997; CLERICI et al. 1997; JACOBS et al. 1998). IL-10 is a pleiotropic cytokine produced by myeloid cells and lymphocytes that displays both immunoregulatory and immunostimulatory effects (SALAZAR-ONFRAY et al. 2007). IL-10 inhibits the production of other cytokines such as Interleukin-2 (IL-2), Interferon γ (IFN γ), Interleukin-12 (IL-12), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and it is also associated to Major Histocompatibility Complex-I (MHC-I) downregulation (MATSUDA et al. 1994; PETERSSON et al. 1998) resulting in reduction of Th1 response. Different studies have reported increased IL-10

serum levels in patients with melanoma (SATO et al. 1996) and other solid tumors (FORTIS et al. 1996), as well as the expression of IL-10 by tumor cells (BELLONE et al. 1999; HERBEUVAL et al. 2004; TODARO et al. 2006). In cervical cancer patients, IL-10 is the only cytokine secreted by regulatory CD4 lymphocytes stimulated with HPV antigens (de JONG et al. 2004). Higher expression of IL-10 in cervical tissue correlates with higher grade lesions (AZAR et al. 2004; BERMUDEZ-MORALES et al. 2008; MINDIOLA et al. 2008). Furthermore, polymorphisms in IL-10 gene promoter have been associated with susceptibility to precursor lesions associated to HPV infection as well with infection clearance (ZOODSMA et al. 2005; SHRESTHA et al. 2007).

Tumor associated macrophages and myeloid derived suppressor cells express IL-10, among other cytokines, as part of the mechanism of suppression of T cell anti-tumor responses (MANTOVANI et al. 2002; SICA and BRONTE 2007). Interestingly, increased numbers of macrophages per lesion area have been associated with higher grade cervical disease (HAMMES et al. 2007; MAZIBRADA et al. 2007; KOBAYASHI et al. 2008).

Our laboratory has been investigating the role of tumor associated myeloid cells in the HPV16 mouse tumor model, TC-1. We have previously shown that TC-1 tumors are infiltrated mainly by CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺Arginase1⁺ macrophages, as well as some CD45⁺CD11b⁺Gr1⁺ cells (LEPIQUE et al. 2009). In the present study we tested the hypothesis that IL-10 is part of the mechanism by which tumor infiltrating macrophages inhibit anti-tumor T cell activity (KOBAYASHI et al. 2008). We injected TC-1 cells in IL-10 deficient

mice or mice treated with anti-IL-10 and anti-IL-10R neutralizing antibodies. In these mice, tumors exhibited a slower growth kinetics and higher infiltration by CD4 and CD8 lymphocytes, including E7 HPV16 specific CTL Perforin+ cells. Furthermore, we observed that IL-10 is necessary for the expansion of B cells in the lymph nodes of tumor bearing mice. Altogether, our results indicate that suppression of T cell anti-tumor response is a key element in the mechanism by which high IL-10 expression is associated to cervical higher grade lesions.

MATERIALS AND METHODS

Mice and cell lines:

C57Bl/6 and C57Bl/6 IL-10^{tm1Cgn} (B6.129P2-Il10^{tm1Cgn}/J #002251) mice (KÜHN et al. 1993) were maintained in standard mouse facility at the Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brazil) with irradiated food and autoclaved water, with cycles of light and dark of 12 hours.

Alternatively, C57Bl/6 mice used for the neutralizing antibodies assays were maintained at the Ludwig Institute for Cancer Research mouse facility in *spf* (specific pathogen free) conditions. All mouse protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Fundação Antônio Prudente, São Paulo, Brazil, protocol 05/05.

TC-1 cell line was kindly donated by Dr. TC Wu (John Hopkins, Baltimore, MD). This cell line is derived of lung epithelium transformed with HPV16 E6

and E7 oncogenes and Ha-ras (LIN et al. 1996). These cells were cultivated in RPMI supplemented with 10% bovine fetal serum and 400 $\mu\text{g/ml}$ Neomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) in incubators with atmosphere of 5% CO_2 .

Tumor formation:

TC-1 cells were suspended in PBS^{++} (1mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2) at a concentration of 10^5 cells/ $100\mu\text{l}$ of suspension. Each mouse was injected with 10^5 TC-1 cells subcutaneously in the right dorsal flank. Tumor formation and size was measured with a caliper until a maximum diameter of 1.5 cm.

Neutralizing antibody treatment:

Mice received intraperitoneal doses of $10\mu\text{g}$ of anti-IL-10 antibody (mAb417 R&D Systems, Minneapolis, MN) alternated with intraperitoneal doses of $10\mu\text{g}$ of anti-IL-10R antibody (AF-474-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN) spaced by 4 days. The first dose was given in the same day as the TC-1 cells injection and it was a double dose of anti-IL-10 and anti-IL-10R. Doses were determined according to the antibody activity information given by the manufacturer. Alternatively, mice were treated with $500\mu\text{g}$ of protein G purified anti-IL10R clone 1B13a. As controls, mice were treated with equal amounts of rat IgG catalog number AB 108-C (R&D Systems, Minneapolis, MN) or catalog number I4131 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Cell preparations:

All cell preparations were performed in 1x Hanks' buffered saline solution supplemented with 5% fetal bovine serum and 0.5U/ml DNase.

For tumor preparations, these were harvested after mouse euthanasia, a fraction was frozen in Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe, NL) for immunofluorescence studies, the rest of the tumor was minced and digested in 100 μ g/ml Collagenase under agitation at 37°C. The cell suspension was filtered through a 70 μ m mesh and washed twice before use. Spleen and lymph node suspensions were made by mechanical dissociation of the tissue and filtration through nylon mesh. Splenocytes were submitted to hypotonic cell lyses to eliminate red cells. Peritoneal macrophages were harvested after mouse euthanasia; by injecting 5 ml ice cold PBS into the peritoneal cavity and aspiration of the solution containing the resident cells. After centrifugation, cells were resuspended in Hanks' buffer, counted and used for macrophage sorting.

FACS analyzes:

Single cell suspensions were incubated with the antibodies indicated in each figure. Tumor and spleen suspensions were blocked with Fc ligand (CD16/CD32, clone 2.4G2) (BD Biosciences, San Diego, CA) before incubation with the specific antibodies. The antibodies used in this work were anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-Gr1 (clone RB6-8C5), anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD19 (clone 1D3), anti-CD45 (clone 30-F11) purchased from BD Biosciences (San Diego, CA), PE-Cy5.5 conjugated

F4/80 (clone BM8) and APC conjugated anti-Perforin were purchased from eBiosciences (San Diego, CA). MHC-I tetramers containing the HPV16 E749-57 epitope or an irrelevant peptide were a kind donation from Dr. Immanuel Luescher and Dr. Philippe Guillaume (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland). The lymphocyte populations were analyzed after gating on the CD45⁺F4/80⁻ compartment. Cells were analyzed in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). The number of acquired events is indicated in the figure legends. For cell cycle analyzes, TC-1 cells were harvested by trypsinization, fixed in 4% buffered formaldehyde and incubated in a buffer containing 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.2mg/ml RNase (DNase free) (Sigma, St Louis, MO) and 10 μ g/ml propidium iodide (BD Biosciences, San Diego, CA) for 15 min at 37°C with gentle agitation. Cells were subsequently washed and analyzed in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA).

Cell sorting:

CD45⁺ cells were sorted from total tumor suspensions by positive selection after incubation with biotin conjugated anti-CD45 and streptavidin conjugated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Germany) and loading in columns exposed to magnetic field (MACS LS+ Separation Columns) (Miltenyi Biotec, Germany). The negative fraction was used as CD45⁻ population for RNA expression analyzes. In general we obtained 95% pure cells with at least 90% viability.

Peritoneal macrophages were sorted from the peritoneal resident cells by positive selection with purified anti-F4/80 antibody, followed by anti-rat PE and isolation using the EasySep anti-PE magnetic beads (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA).

For protein expression experiments, tumors were digested as described before, and single cell suspensions were blocked with Fc blocking reagent and stained with FITC conjugated anti-CD11b, PE conjugated anti-Gr1, PECy5.5 conjugated anti-F4/80 and APC conjugated anti-CD45. Populations CD45+CD11b+F4/80+ or CD45+CD11+Gr1+ were sorted in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). These sortings resulted in populations with 90-95% viability, approximately 90% purity for the F4/80+ population, which is the most abundant in the tumors, and approximately 80% purity for the Gr1+ population.

Lymphocyte ex-vivo cultures:

Total cell suspensions from peripheral lymph nodes were seeded in 24 well culture dishes, 10^6 cells/well in 10% fetal bovine serum and stimulated with 15 μ g/ml each HPV16 E749-57 peptide and HPV16 E6 . After 5 days of incubation, cells were harvested, stained with anti-CD4 (cloneGK1.5), anti-CD8 (clone 53-6.7), fixed and stained with anti-Foxp3 (clone FJK-16S) using the FITC anti-rat/mouse Foxp3 staining set (eBioscience, San Diego, CA). Cells were analyzed by flow cytometry, when 100000 events were acquired for posterior analyzes.

RNA analyses:

Cytokine expression analyses were performed by RT-PCR using RNA obtained from tumors collected 20 days post injection of TC-1 cells. Total RNA was extracted from infiltrating leukocytes (CD45⁺) and tumor cells (CD45⁻) using the RNeasy mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's recommended protocol. cDNA synthesis was performed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), oligo-dT and random primers, according to the manufacturer recommendation. We used 50ng of cDNA in each amplification reaction. Expression of the constitutive gene HPRT was used as internal control. Amplified fragments were resolved in 1% agarose gels stained with 0.5µg/ml ethidium bromide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Quantitative Real-time PCR analyses for IL-10 expression were done in CD45⁺ and CD45⁻ cells isolated from TC-1 tumors. The reaction was performed in an ABI 7300 detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) with SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, UK) and specific primers for IL-10 (Forward CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG and Reverse CACTGCCTTGCTCTTATTTTCACA) and GAPDH (Forward GGGCTGGCATTGCTCTCA and Reverse TGCTGTAGCCGTATTCATTGT). The relative quantification of IL-10 in comparison to a reference gene (GAPDH) was determined as described (PFAFFL 2001). The relative expression ratio was calculated based on Real-time PCR efficiency and the crossing points for the IL-10 and GAPDH transcripts. The following formula was applied, $\text{Ratio} = E_{\text{IL-10}}^{(\text{Ct}_{\text{control}} - \text{Ct}_{\text{sample}})} / E_{\text{GAPDH}}^{(\text{Ct}_{\text{control}} - \text{Ct}_{\text{sample}})}$, where E is

the efficiency, Ct_{control} and Ct_{sample} are the cycle numbers where GAPDH and IL-10 amplification is detected above the threshold, respectively.

In order to analyze a panel of genes involved in the inflammatory response in our tumor model, Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors RT² Profiler PCR Array System (PAMM-011A) were used (SABiosciences Corporation, Frederick, MD). RT² Profiler PCR Array System analysis was performed using cDNA obtained from total RNA of CD45⁺ and CD45⁻ sorted cells. Samples of cDNA were synthesized with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), oligo-dT primer (IDT) and random primers. The reactions were performed on an ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, UK). The mRNA expression levels were calculated as the ratio of the Ct averages of the housekeeping genes (HKG) and the Ct averages of the target gene (TG), where Ct (Cycle threshold) is the number of amplification cycles required for detection of fluorescence in a given cDNA sample. The amplification efficiencies of the targets (TG) and references (HKG) displayed no significant differences (data provided by SABiosciences Corporation, Fredrick, MD).

Immunohistochemistry:

Ice-cold acetone fixed 5µm cryo-sections were blocked with 5% fetal bovine serum in PBS for 30 min at room temperature prior to incubation with biotinylated primary antibodies. The ABC Vectastain kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used for antibody detection, followed

by Mayer's hematoxylin counterstaining and slide mounting in Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Images were obtained with an IX70 Olympus fluorescence microscope (Olympus, Corp. Tokyo, Japan), a DP70 Olympus camera, using its own software.

Immunofluorescence:

Acetone/methanol (2:1 v/v) fixed 5 μ m cryo-sections were blocked with 5% fetal bovine serum in PBS for 30 min at room temperature prior to incubation with primary antibodies. Anti-CD8 antibody (clone 53-6.7, BD Biosciences, San Diego, CA), was incubated for 30 min after blocking. Tetramers (a kind donation from Dr. Luescher laboratory, Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland) were incubated for 2 hours at room temperature. Tissue was counter-stained with 4'6-diamidino2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). For Granzyme B staining, sections were fixed in 4% formaldehyde after anti-CD8 staining and washing, washed, blocked and permeabilized with 5% FBS, 0.5% Triton X-100, 1mg/ml rat IgG. Anti-Granzyme B (clone 16G6, eBiosciences, San Diego, CA) was incubated for 30 min at room temperature, followed by counter-staining with DAPI. Slides were mounted with Prolong (Invitrogen, Carlsbad, CA). Images were obtained with a BX61 Olympus fluorescence microscope (Olympus, Corp. Tokyo, Japan), a DP70 Olympus camera, using its own software.

Cytokine proteome array:

To characterize IL-10 expression in different tumor populations, we used the Cytokine proteome array kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). CD45+CD11b+F4/80+ and CD45+CD11b+Gr1+ populations, as well as F4/80+ peritoneal macrophages and total tumor suspension were lysed according to the manufacturer's instructions. We used a total of 70µg of each cell lysate for incubation with the membranes where antibodies against cytokines were immobilized. After incubation, washing and incubation with the secondary antibody, detection was performed using the ECL chemiluminescent reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ). X-ray films were exposed to the membranes for different periods of time. Saturated signals were excluded from analyzes.

Cell cycle analyzes:

TC-1 cells were seeded in a density of 5×10^4 cells/well in 24 well plates in 10% calf serum supplemented RPMI. Cells were treated with 0 to 300 ng/ml of IL-10 for 4 days, after which cells were harvested by trypsinization. After washing in phosphate buffered saline (PBS), cells were fixed with 3.7% buffered formaldehyde for 24 hours at 4°C. Cells were washed twice with PBS and incubated for 45 min at 37°C in a 0.1% (v/v) Triton X-100, 200µg/ml DNase free RNase A (Sigma, St Louis, MO), 10µg/ml propidium iodide (BD Biosciences, San Diego, CA). Cells were washed once before acquisition in a FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA).

Statistical analyses:

Tumor growth kinetics experiments were tested by Mann-Whitney. Data from all other experiments were tested by t-test. In all cases, $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS**Leukocytes infiltrating TC-1 tumors express IL-10**

TC-1 cells express E6 and E7 from HPV16 (LIN et al. 1996). These two proteins are responsible for the maintenance of the transformed phenotype of HPV associated tumor cells, as well as for most of the immune evasion mechanisms displayed by these tumors (TINDLE 2002). TC-1 cells injected into C57B/6 mice form tumors within 10 days after injection (Fig. 1A). Histological analysis of these tumors showed leukocyte infiltrate distributed all over the tumor area (Fig. 1B). This result was confirmed by immunohistochemistry showing CD45+ cells, that represent the total leukocyte population, distributed throughout the tumor (Fig. 1C, left panel). We also observed that most of the infiltrate is of myeloid origin, CD11b+ cells (Fig. 1C, middle panel). No T cells, identified by anti-CD3, were found in TC-1 tumors by this method (Fig. 1C, right panel). CD11b+ tumor infiltrating cells may correspond to a number of populations from myeloid derived suppressor cells (MDSC) or tumor associated macrophages (SICA and BRONTE 2007), or even granulocytes. Data from our laboratory indicate that most of these

cells are tumor infiltrating macrophages with a M2-like phenotype (LEPIQUE et al. 2009).

Tumor inflammatory infiltrate may contribute to tumor fate and immune responses against tumors (MANTOVANI et al. 2002; SALAZAR-ONFRAY et al. 2007; SICA and BRONTE 2007). Aiming to characterize the tumor microenvironment and how the tumor infiltrating population influences the anti-tumor immune responses, we analyzed cytokine expression in the CD45⁺ and CD45⁻ tumor cell populations. Initially, we investigated mRNA expression of cytokines by RT-PCR. We observed that TGF β and M-CSF are expressed by both CD45⁻ tumor cells as by the CD45⁺ infiltrate. Other cytokines were exclusively expressed by the leukocyte infiltrate: IL-10, TNF α and IFN γ (Fig. 2A). To quantify IL-10 expression, RNA samples from total tumor tissue, CD45⁺ and CD45⁻ sorted cells were analyzed by real time PCR. Compared to the IL-10 expression in the total tumor population, CD45⁺ cells produced 700 times more IL-10 mRNA than CD45⁻ cells (Fig. 2B). Accordingly, using the SuperArray RT-PCR platform, we observed higher expression of IL-10 and its receptors chains correspondent mRNAs in CD45⁺ than in CD45⁻ cell samples (Fig. 2C). Other genes that were more expressed in CD45⁺ cells than in CD45⁻ cells were: Integrin α M (ITGAM), TNF α and TNF receptor b (TNFRsf1b). TGF β and TNFRsf1a displayed high expression in both tumor cell compartments, while IL-4 and IFN γ had low expression levels (Fig. 2C).

Our tumor model is infiltrated by at least 2 myeloid populations: CD11b⁺F4/80⁺ macrophages, for now on named TAMs (tumor associated

macrophages), and CD11b+Gr1+ cells (LEPIQUE et al. 2009). We sorted both these populations and compared the IL-10 protein expression in each of them and the total tumor suspension with the IL-10 expression in peritoneal macrophages. We observed that TAM expresses 2 fold and CD11b+Gr1+ cells express 3 fold more IL-10 than peritoneal macrophages, respectively (Fig. 2D). As a control, we used the expression profile of CXCL11. This chemokine is expressed by total tumor cells and CD11b+Gr1+ cells in the same levels as peritoneal macrophages. TAM on the other hand, express 3.3 fold less CXCL11 than peritoneal macrophages (Fig. 2E). Although CD11b+Gr1+ cells express more IL-10 than the TAM population, we must consider that the TAM population is 5 times more frequent in TC-1 tumors than the CD11+Gr1+ cells, and therefore must account for the main IL-10 production in this site.

Our cytokine expression data indicate that TC-1 tumors infiltrating myeloid cells display a mixed cytokine profile including pro-inflammatory cytokines like $TNF\alpha$, as well as potentially suppressive cytokines like IL-10 and $TGF\beta$.

IL-10 facilitates tumor growth

As the myeloid cells that infiltrate TC-1 tumors express IL-10 and are capable of inducing regulatory phenotype on T lymphocytes (LEPIQUE et al. 2009), we asked whether IL-10 plays a role in tumor growth and tumor infiltrating populations.

We injected TC-1 cells in IL-10 deficient mice or mice treated with neutralizing antibodies against IL-10 and/or IL-10R (same effect was

observed treating mice with alternate doses of 10 μ g of anti-IL-10 and anti-IL-10R from R&D Systems or doses of 500 μ g of the anti-IL-10R 1B13a monoclonal antibody purified in our laboratory). TC-1 tumor growth kinetics in IL-10 knockout mice was significantly slower than in wild type mice (Fig. 3A). At the same time, we observed that the tumors had a high number of CD11b+ infiltrating cells, which did not reflect an increase in numbers of TAM or CD11b+Gr1+ cells (Fig. 3B). Similarly, in mice treated with anti-IL10/anti-IL-10R or only anti-IL-10R antibodies, tumors also displayed a slower growth ratio than in controls. In Fig. 3C, we can observe the averages of tumor volumes from mice of each group at 18 days post TC-1 cell injection. One important observation from this result is the partial effect that the irrelevant IgG had on tumor growth. When comparing the correspondent time point in the tumor growth kinetics on Fig. 3A with the tumor volumes from Fig. 3C we observed a significant difference in tumor volumes comparing wild type mice and mice treated with irrelevant IgG. This effect seems to be a non-specific one since it does not reflect an increase in infiltration of tumors by specific lymphocytes or decrease of regulatory T cells by specific antigens as shown below. We did observe an accumulation of Gr1+ cells in the peripheral tumor area, and among these cells, some which clearly had granulocyte nuclear morphology (Supplem. Fig. 1B, arrow). We believe the injection of a foreign immunoglobulin might be activating the innate immune response and causing a non-specific effect on tumor growth.

In mice treated with neutralizing anti-IL-10/IL10-R antibodies, we also observed an increase in myeloid cells in the tumors when compared to

controls (Fig. 3D). In this case, CD11b⁺ cells were concentrated in the tumor periphery (Supplem. Fig. 1A green stained cells), while CD11b⁺Gr1⁺ cells (yellow stained cells, due to co-localization) were migrating to the center of the tumor (Supplem. Fig. 1A, arrow). In irrelevant IgG treated mice, most CD11b⁺Gr1⁺ cells (yellow stained cells) were concentrated in the tumor periphery (Supplem. Fig. 1A). In these mice, we also observed an increase in the CD11⁺F4/80⁺ macrophage population (Fig. 3D). The distribution pattern of this population was the same in all conditions tested (Supplem. Fig. 1C). IL-10 does not have any effect on TC-1 proliferation (Supplem. Fig. 2). Therefore the inhibition of tumor growth should be due to the lack of the suppressive effect that IL-10 may have on anti-tumor immune responses.

IL-10 decreases anti-tumor antigen T cell responses

IL-10 has the potential to suppress CD8 T cell responses (LOSER et al. 2007; BISWAS et al. 2007, 2008) and induce regulatory phenotype in T cells (GROUX et al. 1997). We next asked whether the decrease in tumor growth in IL-10 deficient mice or mice treated with neutralizing anti-IL-10/IL-10R had any effect on lymphocyte populations.

First, we observed a significant increase in CD4 and CD8 cell numbers in tumors from IL-10 deficient mice and mice treated with anti-IL-10/IL-10R neutralizing antibodies. In IL-10 deficient mice, there was 3.6 fold more CD4 lymphocytes and 4.2 fold more CD8 lymphocytes than what was found in tumors growing in wild type mice, and a decrease of 3.5 fold in the B cell population in the same tumors (Fig. 4A, asterisks indicate significant

differences between wild type and IL-10 deficient mice). In mice treated with anti-IL-10/IL-10R neutralizing antibodies compared to controls, we observed a 5 fold increase in the CD8 infiltrating cells specific for the E7₄₉₋₅₇ peptide (Fig. 4B), an epitope previously described as the immunodominant epitope presented by TC-1 cells in the MHC-I context. Approximately 2 fold increase in the number of double positive CD8 Perforin⁺ E7⁺ T cells was observed in the IL-10R neutralized mice compared to controls (Fig. 4B), indicating that the absence of IL-10 signaling enhances tumor infiltration by potentially cytotoxic T cells. These results were confirmed to some extent by staining tumor cryo-sections with tetramers and anti-CD8 and anti-Granzyme B antibodies. Figures 4C and 4E show CD8 and tetramer staining for IL10 deficient mice and mice treated with anti-IL10/IL-10R, respectively. And Figures 4D and 4F, show the same tumors stained with anti-CD8 and anti-Granzyme B. As observed previously, whenever IL-10 activity was blocked, we observed more CD8 E7 specific T cells infiltrating the tumors (Fig. 4C and E, arrowheads), while some non-specific T cells were also detected (Fig. 4C and E, arrows). We did not observe binding of tetramer loaded with an irrelevant peptide to any of the tumors. Granzyme B expression, another marker of cytotoxic activity, was highly detected in tumors from mice which IL-10 signaling was blocked (Fig. 4D and 4F, arrows).

These results indicate that lymphocytes migrate to TC-1 tumors when IL-10 signaling is blocked. Whether the migration is due to altered chemokine expression or simply activation of T cell responses was our next question.

Using E7 and E6 peptides as antigens, we observed that stimulated lymphocytes from mice treated with irrelevant IgG or wild type mice with TC-1 tumors had a higher proportion of Foxp3⁺CD4⁺ and Foxp3⁺CD8⁺ cells than mice treated with anti-IL-10R antibody (Fig. 5A and 5B). Foxp3 is a marker of regulatory lymphocytes, which function is to inactivate effector T cells. Our results indicate that, at least in part, IL-10 facilitates tumor growth by inducing T cell regulatory phenotype and therefore inhibiting T cell anti-tumor activity. As mentioned before, less B cells infiltrate tumors of IL-10 deficient mice. We observed that draining lymph nodes of mice with TC-1 tumors have a lower T/B cell ratio than naïve mice. When IL-10 is neutralized, the T/B cell ratio in the lymph nodes is similar to the observed ratios in the naïve mice (Fig. 5C), an indication that IL-10 may have a role in the proliferation and homing of B cells.

DISCUSSION

Several factors influence tumor fate, among them the immune responses against tumor antigens. In the case of tumors caused by viruses, viral antigens may be recognized by the host. However, viruses as well as tumor cells display several mechanisms of immune evasion. Among them, the expression of suppressor cytokines like IL-10 has been described in many malignancies (SATO et al. 1996; FORTIS et al. 1996), including tumors and tumor precursor lesions associated to HPV (AZAR et al. 2004; BERMUDEZ-MORALES et al. 2008; MINDIOLA et al. 2008). Our laboratory has been

working on the characterization of the leukocyte population infiltrating the mouse tumor model TC-1. Previous work from our laboratory show that most of the TC-1 tumor infiltrating leukocytes are M2-like macrophages and that depletion of this population inhibits tumor growth and enhances anti-tumor responses (LEPIQUE et al. 2009). In HPV associated tumors a positive correlation between macrophages and lesion progression was established in different studies (HAMMES et al. 2007; MAZIBRADA et al. 2007; KOBAYASHI et al. 2008).

In this work, we show that the CD45⁺ tumor fraction expressed different cytokines, among them IL-10, TNF α and TGF β . TC-1 tumor cells expressed TGF β , but not IL-10. The correlation between IL-10 increased expression and HPV associated lesions progression to high grade lesions have been well described in the literature (CHOPRA et al. 1997; JACOBS et al. 1998; CLERICI et al. 1997; AZAR et al. 2004; BERMUDEZ-MORALES et al. 2008; MINDIOLA et al. 2008). However, the cellular and molecular mechanisms underlying this correlation have not been characterized until now. Due to the described roles of IL-10 in the literature, like suppression of CD8 function (HALAK et al. 1999; RANKIN et al. 2003; BISWAS et al. 2007) and increase in B cell proliferation (HAGENBAUGH et al. 1997; NIMMERJAHN e RAVETCH 2007), as well as evidence from our laboratory described above, we decided to investigate if this cytokine is part of the immune evasion mechanism displayed by E6/E7 transformed cells.

In this study, we observed a decrease of tumor growth in mouse models where IL-10 signaling was blocked: IL-10 deficient mice or mice treated with

anti-IL-10/anti-IL-10R neutralizing antibodies. Prolonged survival and a decrease in tumor development were observed in other *in vivo* models using IL-10 deficient animals (HALAK et al. 1999; RANKIN et al. 2003). Moreover, transgenic mice expressing IL-10 show accelerated tumor growth that can be diminished by IL-10 neutralizing antibody (HAGENBAUGH et al. 1997). We realize that the TC-1 cell line is transformed with high risk HPV16 oncogenes E6/E7 and EJ-ras (LIN et al. 1996). Ras-associated tumors may induce IL-10 expression as a form of immune evasion. Indeed, this seems to be the case of some colon cancers (HERBEUVAL et al. 2004). On the other hand, thyroid tumors, which frequently display mutation in ras, respond to an autocrine IL-10 signalization loop where tumor cells secrete and proliferate in response to IL-10 (TODARO et al. 2006). Moreover, in colon cancer, although there is a discussion in the literature, IL-10 may be used as therapy once it could counter-act the action of pro-inflammatory cytokines that cause chronic inflammation leading to cancer (KOKURA et al. 2005). In our model, TC-1 cells do not secrete or proliferate in response to IL-10. Therefore the role IL-10 plays on TC-1 tumor growth is probably associated to the regulation of immune responses and its source, as demonstrated in this work, are the myeloid cell.

In parallel to a reduction in tumor growth, we observed in IL-10 deficient mice or mice treated with anti-IL-10/anti-IL-10R neutralizing antibodies that there was an increase tumor infiltration by CD4 and CD8 lymphocytes, which were rare in tumors from control wild type mice. Importantly, there was a significant increase in CD8 E7 specific cells with a cytotoxic phenotype in

mice that had the IL-10 signaling blocked compared to controls. When stimulated with E6 and E7 peptides, lymphocytes from control mice had higher proportion of Foxp3 regulatory cells than lymphocytes from mice with the IL-10 signaling neutralized. This result indicates that IL-10 suppresses T cell activity by inducing a regulatory phenotype on CD4 and CD8 lymphocytes. It does not, however, rule out a possible effect on tumor microenvironment that would facilitate T cell recruitment. In fact, we observed a significant increase in the CD11b⁺ myeloid population in IL-10 deficient mice and mice treated with anti-IL-10/IL-10R neutralizing antibodies when compared to controls. In mice treated with neutralizing antibodies the single positive CD11b⁺ population accumulated in the periphery of the tissue, while double positive CD11b⁺Gr1⁺ cells infiltrated areas in the center of the tumor. Interestingly, in mice treated with irrelevant IgG, where we observed the CD11b⁺Gr1⁺ cells in the periphery of the tissue as expected, some cells had the nuclear phenotype of polymorphonuclear cells. It is possible that irrelevant IgG treatment could activate innate immune responses leading to the partial decrease of tumor growth associated to tumor infiltration by cells like neutrophils.

In HPV16 tumor models, a role for CCL2 in the recruitment of macrophages for the tumor site was described by PAHLER et al. (2008). In our laboratory, using a keratinocyte cell line expressing HPV16 E6/E7 and its parental cell line, we were able to show that the CCL2 effect on myeloid cell recruitment is dependent on E6/E7 expression [BOLPETTI et al. in preparation]. Interestingly, IL-10 inhibits CCL2 expression (STOFFELS et al. 2009) in a way that it is possible that the increase in CD11b⁺ cells that infiltrate tumors

from either IL-10 deficient mice or mice treated with neutralizing anti-IL-10R antibody may be due to an increase in CCL2 expression.

Another effect of IL-10 neutralization in mice, was the decrease in tumor cell infiltration by B cells and reduction of the B cell numbers in peripheral lymph nodes. This result is not surprising since one described role for IL-10 is B cell proliferation (BANCHEREAU et al. 1994; ITOH e HIROHATA 1995). It is possible that IL-10 causes a skewing in adaptive response toward humoral response, which may contribute to the inhibition of T cell function or simply which is ineffective against tumor cells.

In conclusion, IL-10 production by tumor associated myeloid cells, mainly macrophages, inhibits T cell activity, at least in part by inducing regulatory phenotype on CD4 and CD8 T cells. We believe our work brings to light the mechanism behind the epidemiologic data correlating HPV associated tumor progression and increase in IL-10 expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil, process 04/00749-2. Aline Bolpetti received a graduation fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, process 05/59756-0. We thank Dr. Enrique Boccardo, Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brazil) for the critical review of this manuscript. We would like to thank Dr. Philippe Guillaume and Dr. Immanuel Luescher (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland) for providing the E7 and irrelevant tetramers.

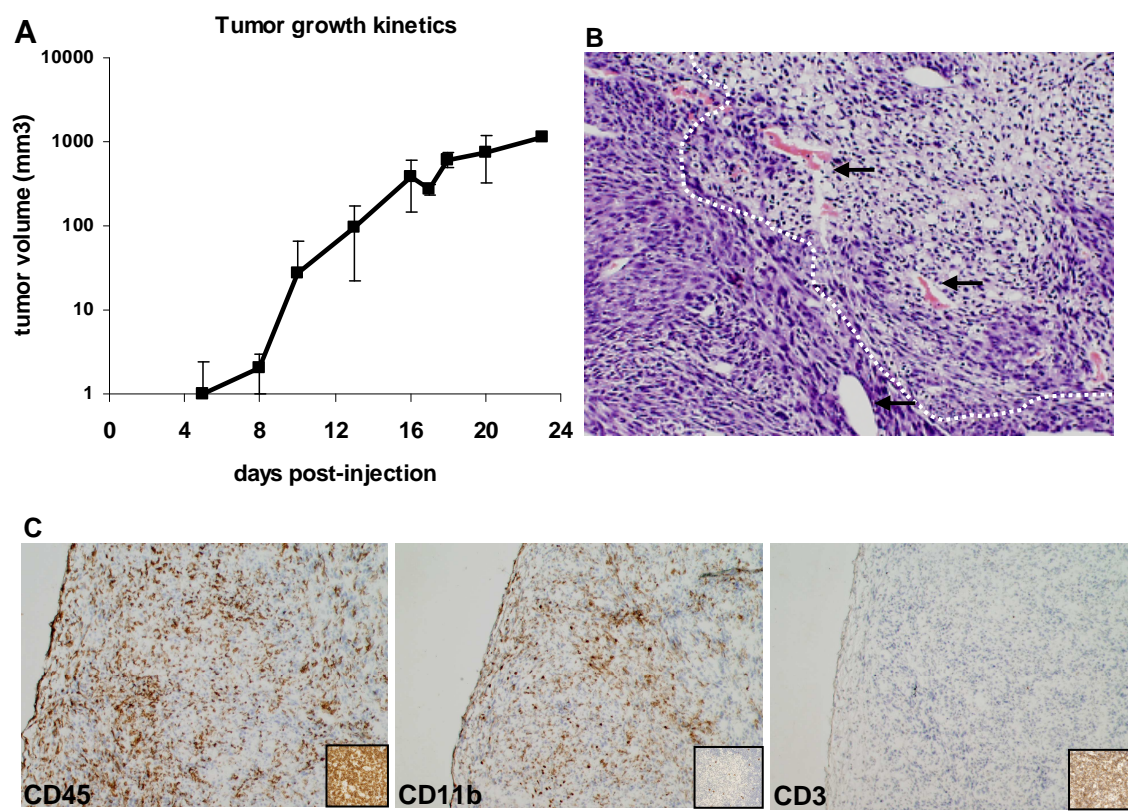


Figure 1
Bolpetti et al, 2009

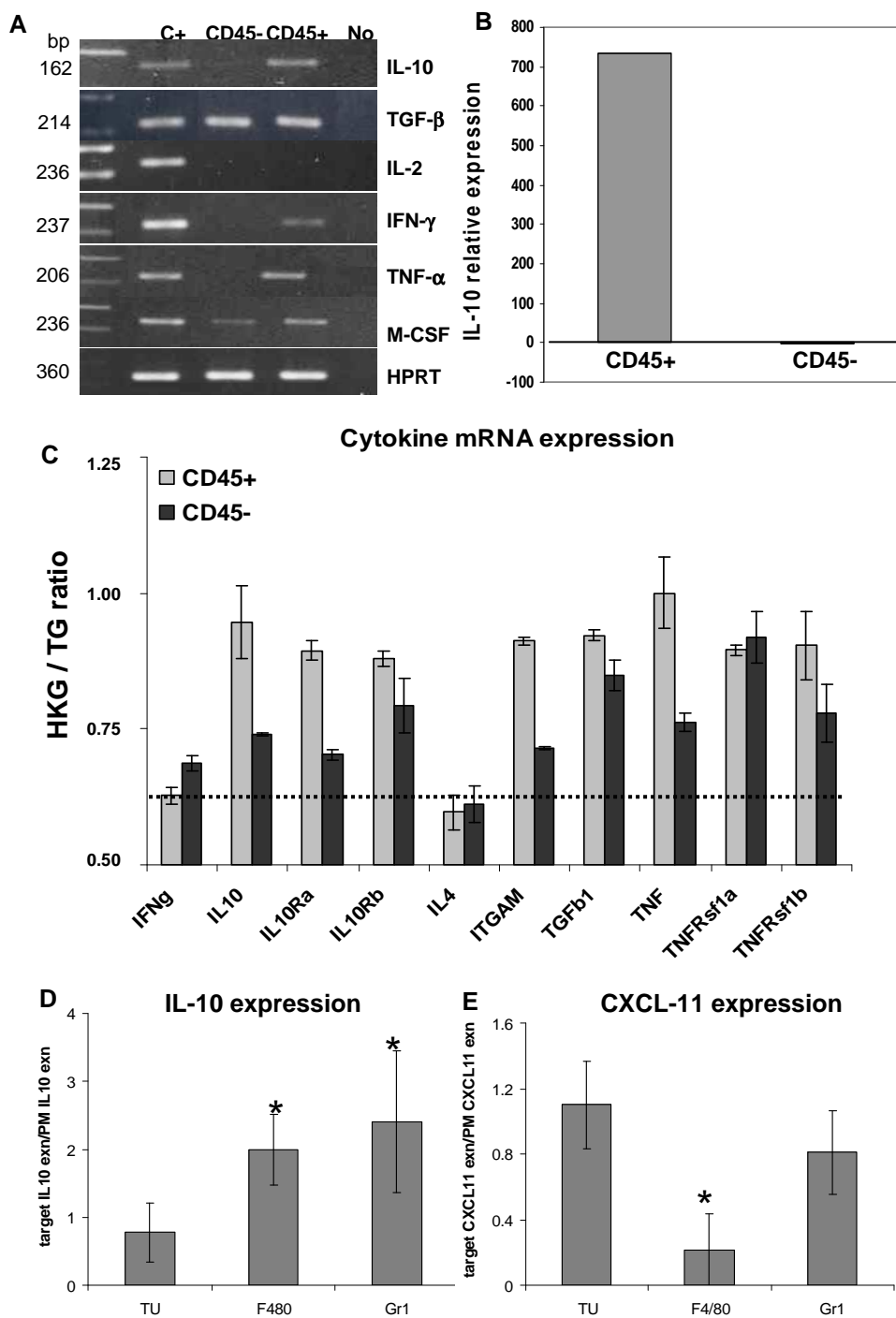


Figure 2
Bolpetti et al, 2009

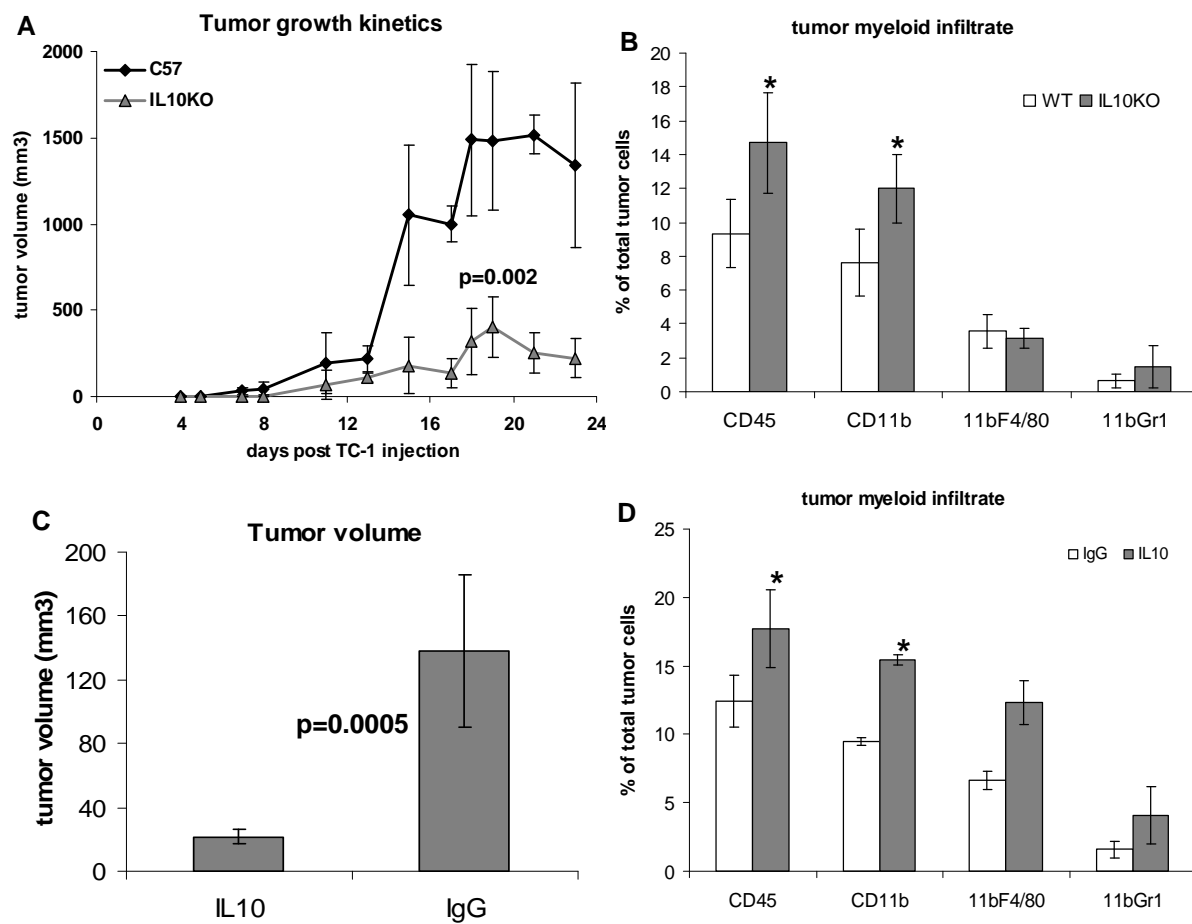


Figure 3
Bolpetti et al, 2009

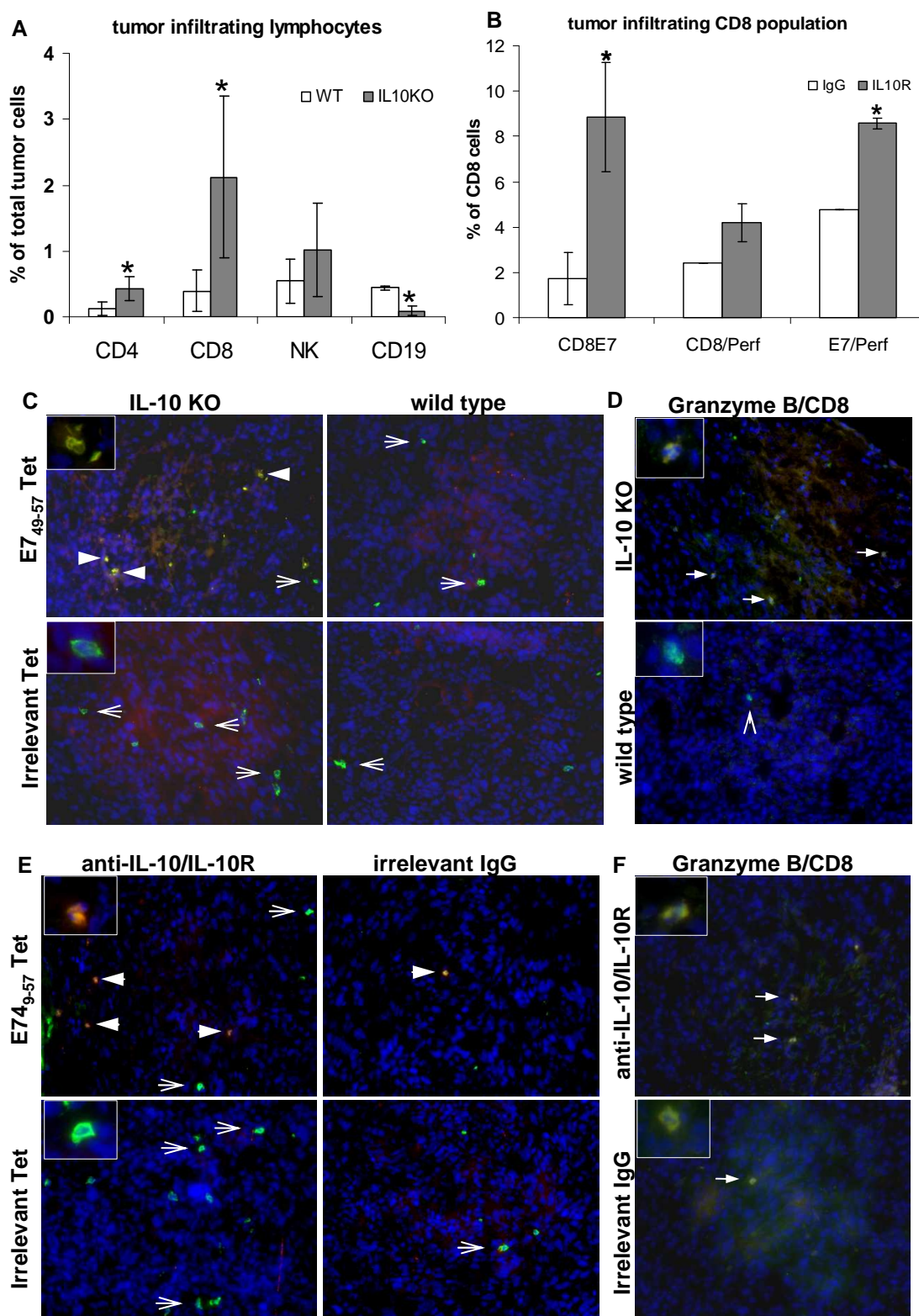


Figure 4
Bolpetti et al, 2009

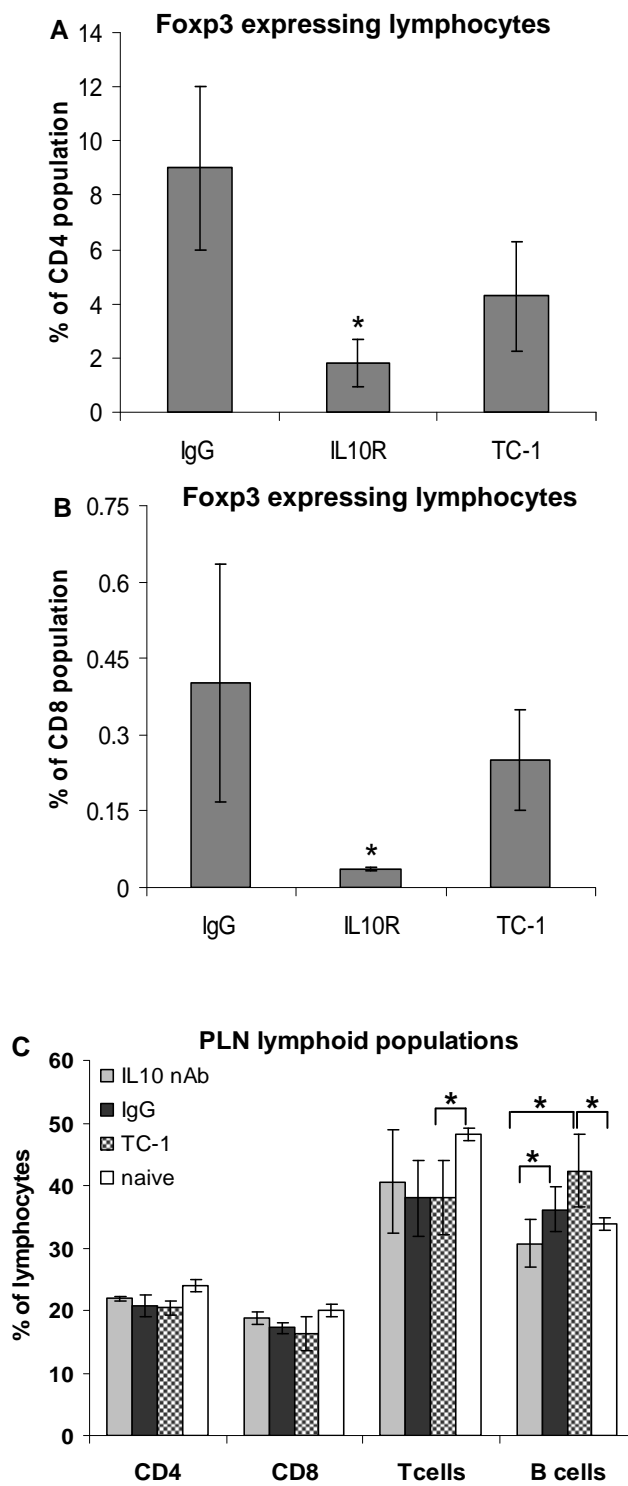


Figure 5
Bolpetti et al, 2009

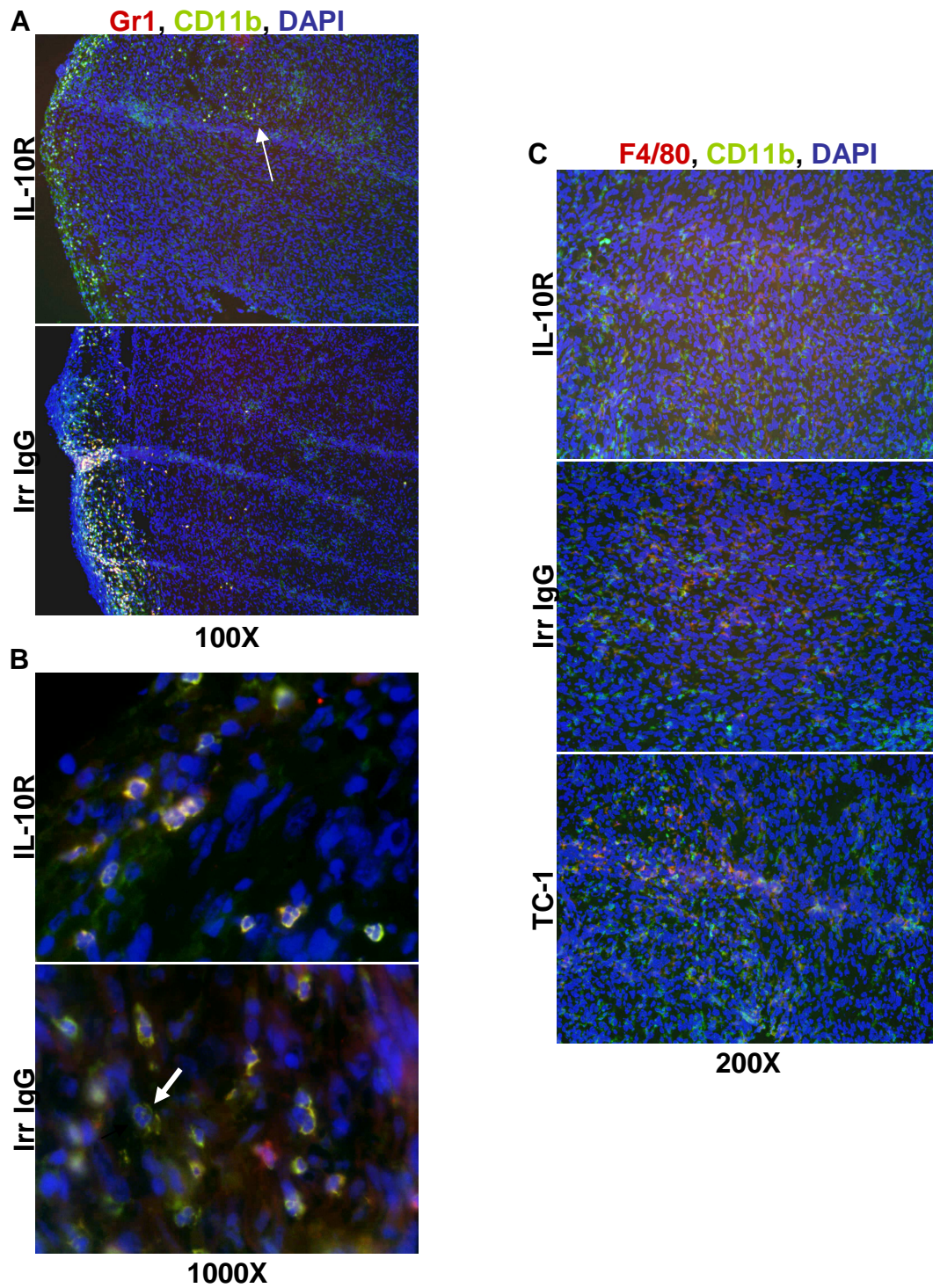


Figure 1
Supplemental material
Bolpetti et al, 2009

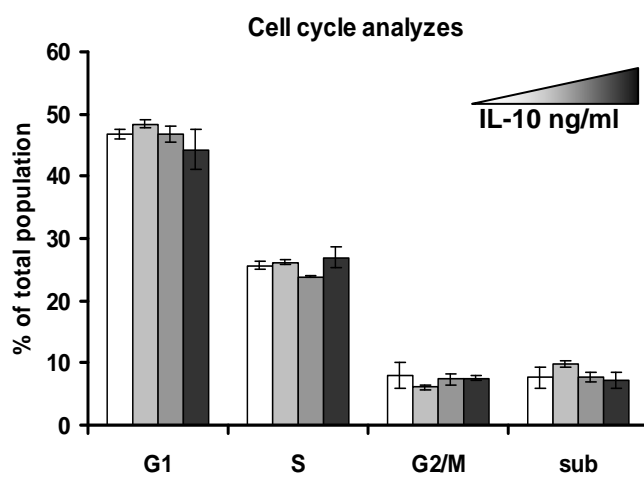


Figure 2
Supplementary material
Bolpetti et al, 2009

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Characterization of TC-1 derived tumors.

A. Tumor growth kinetics after injection of 10^5 TC-1 cells in the dorsal flank of C57B/6 mice. Results are the average of tumor measures from 9 mice. B. Histology of TC-1 tumors. Tumor cryo-sections stained with hematoxylin/eosin exemplifying areas of leukocyte infiltrate, circled by dotted lines (100x magnification). Arrows indicate some of the blood vessels. C. Immunohistochemistry characterization of TC-1 tumors. Tumor cryo-sections were incubated with antibodies against the indicated molecules. Antigen-antibody reaction was detected through peroxidase/DAB staining. Positive controls for each antibody are in the insets in each panel (200x magnification).

Figure 2 - Analysis of cytokine expression profile in TC-1 tumors.

RNA samples from $CD45^+$ (leukocytes) and $CD45^-$ (all other tumor cells) sorted cells were used for cytokine expression analyzes. **A.** Qualitative cytokine mRNA expression analysis in total RNA samples from cells sorted from tumors 20 days post-injection. HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase) was used as control. The lane indicating **C+** corresponds to different cell populations stimulated with different cytokines to obtain positive controls to each reaction. **No** corresponds to reactions without addition of cDNA. **B.** Quantitative Real-time PCR analysis of IL-10 expression in $CD45^+$ and $CD45^-$ tumor fractions compared to RNA from total tumor population. The graph illustrates the fold induction of IL-10 expression in $CD45^+$ and $CD45^-$ samples compared to total tumor. The relative expression ratio is calculated based on $\Delta\Delta C_t$ method. **C.** Results from SuperArray RT-PCR. Data is presented as the ratio of the housekeeping genes Ct (HKG) and the target gene Ct (TG). Expression was considered positive when the ratio value was above 0.6. Results are the average of 3 independent experiments. Light gray bars correspond to cDNAs obtained from $CD45^+$ sorted cells total RNA, and dark gray bars from $CD45^-$ sorted cells total RNA. **D** and **E.** IL-10 (D) and CXCL11 (E) protein expression analyzes of the indicated populations compared to peritoneal macrophages. Samples of 70 μ g of protein extracts from sorted cells were incubated with membranes from Cytokine Proteome Array (R&D Systems). Signals were detected after ECL reagent reaction and exposition of X-ray films to the membranes. Data presented correspond to relative signal from lysate from each population/relative signal from lysate of peritoneal macrophages, where relative signal = [(target signal duplicate average- background signal)/positive controls signals average*100]. Tu- corresponds to total tumor suspension lysate, F4/80 to $CD45^+CD11b^+F480^+$ cells lysate and Gr1 to $CD45^+CD11^+Gr1^+$ cells lysate. The results are the average of 2 independent experiments.

Figure 3 - Tumor growth and myeloid infiltrate in IL-10 deficient mice (A. and B) and in mice treated with anti-IL-10/IL-10R neutralizing antibodies (C and D).

A. TC-1 cells, 10^5 cells/mouse in $100\mu\text{l}$ of PBS^{++} , were injected into IL-10 KO and wild type C57Bl/6 mice and the tumor growth kinetics measured. The averages of tumor measurements of 24 mice are represented; p-value of the comparison between IL-10 KO and wild type mice is indicated. **B.** Analysis of tumor infiltrate by flow cytometry. Tumors were collected 20 days post injection. Total cell suspensions were stained with antibodies against the indicated markers and analyzed in a FACSCalibur. At least 10000 events were acquired per sample; the results are the average of 6 IL-10 KO mice and 6 wild type mice. Asterisks indicate significant differences between the IL-10 KO and wild type groups, tested by t-test. **C.** Mice were treated (intraperitoneal injections) with $10\mu\text{g/ml}$ anti-IL-10 or $10\mu\text{g/ml}$ anti-IL-10R in alternate doses, except for the first dose, which was a double anti-IL-10 and anti-IL-10R dose in the same day as TC-1 cells were injected. In some cases, mice were treated in the same frequency with $500\mu\text{g}$ of anti-IL-10R, clone 1b13a, purified in our laboratory from culture supernatant. Tumor volumes measured 18 days post TC-1 cell injection. **D.** Tumor infiltrate analyzes by flow cytometry. Total tumor cell suspension was stained with antibodies against the indicated markers and analyzed in a FACSCalibur. At least 30000 events were acquired for analyzes, where * indicate significant differences between groups.

Figure 4 - Lymphocyte infiltrate in tumors from IL-10 deficient mice (A, C and D) or from anti-IL10/IL-10R neutralizing antibody treated mice (B, E and F). **A.** Single cell suspensions were stained with the indicated antibodies plus anti-CD45 and anti-F4/80. Lymphocytes were analyzed in the $\text{CD45}^+\text{F4/80}^-$ population. **B.** After 6 hours incubation in tissue culture flasks, non adherent cells from total tumor suspension were harvested and stained with the indicated antibodies, tetramer and anti-CD45. **C and E.** Immunofluorescence of cryo-sections from tumors harvested from IL-10 KO and wild type mice, as indicated. Sections were stained with anti-CD8 (in FITC, green) and PE (red) conjugated HPV16 E7_{49-57} tetramer – E7_{49-57} Tet, and irrelevant tetramer – Irrelevant Tet. Cells were counterstained with DAPI (blue). Arrowheads indicate double positive cells in yellow, arrows indicate cells positive only for CD8. **D and F.** Granzyme B expression in tumor cryo-sections from IL-10 KO and wild type mice or mice treated with anti-IL10/IL-10R neutralizing antibodies and irrelevant IgG, as indicated. Sections were stained with anti-CD8 (green), followed by fixation, permeabilization and staining with anti-Granzyme B (red). Tissue was counterstained with DAPI. Solid arrows indicate double positive cells. In C and D, insets show details of cells positive only for CD8 (green) or double positive CD8/tetramer (C e E), CD8/Granzyme B (D e F) in yellow or orange due to the sobreponection of emission from FITC and PE (tetramer) or alexa 594 (Granzyme B).

Figure 5 - Induction of regulatory phenotype on T cells depends on IL-10.

A and B. Lymph node cultures were stimulated with HPV16 E6 and E7 peptides, 15 mg each, for 6 days. Cells were harvested and stained for CD4 (A), CD8 (B) and Foxp3 and analyzed by flow cytometry. For each sample, 10^5 lymphocytes were acquired. Lymph nodes were harvested from irrelevant IgG treated mice (IgG), anti-IL10R treated mice (IL10R) or TC-1 tumors bearing mice untreated (TC-1) 18 days after TC-1 cells injection. **C.** Flow cytometry analysis of peripheral lymph node suspensions stained with the indicated antibodies. Lymph node single cell suspensions were stained with antibodies against the indicated markers and analyzed by flow cytometry. At least 30000 events were acquired per condition. The results are the average of 6 mice. Naïve are cells obtained from mice never exposed to TC-1 tumors; TC-1 corresponds to cells obtained from untreated mice injected with TC-1 cells; IgG and IL-10 correspond to cells obtained from mice with tumors treated with irrelevant IgG and anti-IL-10 and anti-IL-10R, respectively. Asterisks indicate $p < 0.05$ in t-test.

Supporting material, Figure 1: Distribution of myeloid populations in tumors from mice treated with anti-IL10R neutralizing antibody.

Tumor cryo-sections were blocked with 5% bovine serum and Fc block, and stained with anti-Gr1 and antiCD11b (A e B) or anti-F480 and anti-CD11b (C). Nuclei were stained with DAPI. Irr IgG correspond to irrelevant IgG treated controls, IL-10R to tumors from mice treated with the 1b13a anti-IL10R antibody and TC-1 to tumors from untreated mice. In A, the arrow indicates a double positive CD11b+Gr1+ population infiltrating the tumor in a central area, while single CD11b+ cells were in the periphery. In B, the arrow indicates a polymorphonuclear cell.

Supporting material, Figure 2: Cell cycle analysis of TC-1 cells treated with IL-10.

A total of 25000 TC-1 cells were treated for 4 days with 0, 3, 30 or 300ng/ml IL-10. After this period, cells were harvested, fixed, stained and analyzed in a FACSCalibur. A total of 50000 cells were acquired per sample (note that after 4 days in culture, TC-1 cells have exponentially grown, resulting in a total of about 1 million cells in the end of the experiment). No significant differences were observed between the different conditions.

6 DISCUSSÃO

A análise inicial do perfil de citocinas por RT-PCR nos permitiu identificar moléculas importantes envolvidas no processo inflamatório e no desenvolvimento dos tumores associados ao HPV-16. Por exemplo, TGF β , M-CSF e VEGF são expressos tanto pelas células tumorais quanto pelo infiltrado inflamatório. Adicionalmente, identificamos citocinas preferencialmente expressas pela população leucocitária que infiltra os tumores TC-1, como IL-10 e TNF α . Conforme mostramos na tabela 7, a expressão de IFN- γ e TNF- α , citocinas de perfil Th1, nos tumores avaliados em nosso estudo mostram a complexidade do perfil de expressão destas moléculas no microambiente tumoral. As citocinas de perfil Th1 estimulam a resposta celular, enquanto as de perfil Th2, como IL-10, estão envolvidas na ativação da resposta humoral ou na supressão de respostas citotóxicas. O balanço entre ambas respostas é fundamental para atividade anti-tumoral das células envolvidas nestes processos.

Com relação à caracterização do infiltrado inflamatório, as análises por citometria de fluxo e imunohistoquímica revelaram altos índices de células CD11b⁺ infiltrando os tumores TC-1. Células marcadas com anti-Ly6G/Ly6C (Gr1), foram encontradas predominantemente na periferia dos tumores, porém em menor quantidade quando comparados com células CD11b⁺. Células Gr1⁺ podem ser neutrófilos que são fagócitos importantes que respondem rapidamente a estímulos quimiotáticos do processo

inflamatório agudo, além de serem responsáveis pela produção de uma série de fatores, como citocinas e quimiocinas, que irão recrutar outras células para o local da lesão, por exemplo, monócitos que se diferenciam em macrófagos ao penetrarem no tecido. Estas células também podem representar uma população mielóide imatura com características supressoras. Embora não tenhamos informações suficientes para definir o fenótipo destas células marcadas com anti-Gr1, observamos a expressão da molécula TREM-1 (manuscrito 1). Esta molécula é expressa em células mielóides, inclusive neutrófilos, associada a resposta inflamatória aguda, o que pode ser uma indicação de que estas células sejam de fato neutrófilos, uma vez que não existem referências na literatura que indiquem que células mielóides supressoras possam expressar TREM-1.

De acordo com os dados gerados em nosso laboratório, o infiltrado leucocitário presente nestes tumores é majoritariamente composto por macrófagos associados a tumores (TAMs) de fenótipo M2 (LEPIQUE et al. 2009). Na literatura, tem sido proposto que a exposição à citocinas, como IL-4 e IL-10, induza TAMs a produzirem fatores supressores da resposta celular (MANTOVANI et al. 2002). Estes macrófagos são importantes produtores de $TNF\alpha$, cuja expressão aumentada tem sido observada conforme a progressão dos tumores (revisado por POLLARD 2004). Neste trabalho, nós observamos por RT-PCR expressão de $TNF\alpha$ preferencialmente em células do infiltrado leucocitário. De fato, tanto a população de macrófagos $CD11b+F4/80+$ como $CD11b+Gr1+$ expressam em torno de 2 vezes mais

TNF α do que macrófagos peritoneais residentes, enquanto que as células tumorais não o fazem (figura 3A do manuscrito 1).

Nós encontramos expressão de vários fatores estimuladores de linhagens expressos nos tumores TC-1, especificamente a expressão de M-CSF (ou CSF-1) foi detectada tanto em ensaio de Real-time PCR quanto por ensaio de *proteome array*. O mRNA desta citocina é expresso predominantemente pelas células tumorais. Em ensaios de quantificação de expressão protéica nós encontramos um resultado interessante: expressão de M-CSF tanto por células tumorais quanto pela população CD11b+Gr1+ (figura 4A do manuscrito 1). Enquanto os macrófagos tumorais expressam muito menos M-CSF do que macrófagos peritoneais residentes (células não ativadas que expressam baixos níveis desta citocina). Apesar da população CD11b+Gr1+ expressar em quantidade por célula o mesmo que as células tumorais, esta população é minoritária no tumor e minoritária no infiltrado leucocitário. O enriquecimento da mesma para teste de expressão da proteína nos permitiu verificar que esta população também expressa esta citocina o que contribui para a caracterização desta população, mas provavelmente não contribui de forma significativa para a modulação do microambiente tumoral ou até manipulação sistêmica do hospedeiro.

Além da expressão de M-CSF, nós investigamos também a expressão do receptor desta citocina, que é positiva em leucócitos infiltrantes (CD45+) (Figura 2 do manuscrito 1) indicando que estas células são potencialmente responsivas a este fator. M-CSF é um fator de crescimento expresso em muitos tumores epiteliais (BAIOCCHI et al. 1991; LIN et al. 2001) que tem

sido frequentemente associado a um pior prognóstico. O recrutamento de monócitos estimulados por M-CSF pode ser acompanhado pela capacidade desta citocina em promover a diferenciação destas células em macrófagos, além de estimular sua proliferação no local do tumor (revisado por POLLARD 2004 e BEN-BARUCH 2006). Estes macrófagos, por sua vez, são capazes de regular a resposta adaptativa contribuindo para a tumorigênese local. Em modelos de tumor de mama, existem evidências do papel crucial de M-CSF no crescimento tumoral (AHARINEJAD et al. 2004; KIRMA et al. 2004), além de estar associado ao potencial metastático destas lesões (LIN et al. 2001). Em conjunto, estes estudos têm demonstrado que a expressão de M-CSF aparece sempre relacionada à atividade de macrófagos no local das lesões. Em nosso modelo, esta molécula, em conjunto com outros fatores, pode ter papel importante no recrutamento de monócitos e diferenciação destas células em TAMs que contribuem para o crescimento dos tumores TC-1 em animais C57Bl/6.

O fator de crescimento endotelial (VEGF) é importante para proliferação e manutenção das células endoteliais (FERRARA et al. 1996), estando intimamente relacionado ao aumento da vascularização comumente observada em tumores malignos. Dados da literatura mostram que a expressão elevada de VEGF em alguns tumores tem sido associada a um pior prognóstico, pois pode facilitar a progressão tumoral através do aumento da angiogênese local. A presença de VEGF foi observada em lesões associadas ao HPV de alto risco (SMITH-MCCUNE et al. 1997; BRANCA et al. 2006). A maior expressão deste fator de crescimento parece

estar associada à presença de E6 e E7 de HPV16 (TOUSSAINT-SMITH et al. 2004). Adicionalmente, a oncoproteína E6 HPV-16 é capaz de induzir a atividade do promotor de VEGF, indicando mais um fator que contribui para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (LOPEZ-OCEJO et al. 2000). Uma vez que este fator de crescimento aparece freqüentemente expresso em uma série de neoplasias, era esperada a presença de VEGF em nosso modelo tumoral. Observamos que VEGF é expresso pelas células TC-1 cultivadas *in vitro*, entretanto, esta expressão é significativamente aumentada nos tumores dos animais C57Bl/6, sendo expresso tanto pelo infiltrado leucocitário (CD45+) quanto pelas células tumorais (CD45-) (Figura 2 do manuscrito 1). A elevada marcação com anti-CD31 (marcador de células endoteliais), observada na figura 10, ilustra a grande quantidade de vasos presentes nos tumores TC-1, e a expressão de VEGF pode ser um dos fatores que contribui para esta vascularização.

Inicialmente, pudemos observar a expressão de $TNF\alpha$ em amostras de tumores e linfonodos dos respectivos camundongos, por RT-PCR (tabela 7). Em seguida, a plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD) revelou que esta citocina é expressa pelas células do infiltrado inflamatório em níveis próximos à expressão dos genes considerados controles positivos da reação, portanto em níveis relativamente altos (Figura 1 do manuscrito 1). Na literatura, estudos mostraram que $TNF\alpha$ pode contribuir para a manutenção de queratinócitos primários através da regulação da expressão de moléculas do ciclo celular, via indução de $NF\kappa B$ (BASILE et al. 2003). Em células de melanoma, $TNF\alpha$

tem papel fundamental na manutenção destas células (GRAY-SCHOPFER et al. 2007), em contrapartida ao seu potencial anti-proliferativo observado em queratinócitos (BASILE et al. 2003). Esta citocina é expressa em uma série de tecidos neoplásicos, e em geral, sua expressão é acompanhada pela presença de IL-6 e M-CSF, associados a um pior prognóstico (revisado por BALKWILL 2002). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que a inibição de TNF α produzido por macrófagos, reduz o crescimento de tumores de colo em camundongos (ZINS et al. 2007). Neste modelo, os autores descrevem o papel de TNF α sobre o aumento da migração de macrófagos para o local do tumor e a indução da produção de M-CSF por estes macrófagos. Dessa forma, existem evidências do importante papel de TNF α no desenvolvimento tumoral. Em nosso modelo, esta citocina pode estar contribuindo para o crescimento tumoral, entretanto, seu papel ainda não está esclarecido.

A plataforma RT² Profiler PCR Array System (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD) nos permitiu identificar a expressão de uma série de moléculas potencialmente importantes no contexto da resposta imunológica nos tumores TC-1. A citocinas inflamatórias IL-1 α e IL-1 β , junto com TNF α , estão entre os agentes pró-inflamatórios mais potentes descritos na literatura (APTE et al. 2006). Ambas são produzidas por células da resposta inata imediatamente após o surgimento do estímulo inflamatório, dando início à expressão de outros genes pró-inflamatórios e moléculas de adesão. A expressão destas moléculas resulta na expressão de uma cascata de citocinas efetoras responsáveis pela inflamação aguda no local da lesão. Apesar de IL-

IL-1 α e IL-1 β poderem exercer funções semelhantes, estas citocinas podem atuar de formas muito diferentes dependendo de suas concentrações no local da lesão. Enquanto altas doses de IL-1 α podem ter papel anti-tumoral, a elevada quantidade de IL-1 β favorece a expressão de fatores de crescimento e metaloproteases que contribuem para aumento da angiogênese e invasão tumoral (APTE et al. 2006). Estudo recente demonstrou, em modelo de fibrossarcoma induzido por agente químico, que animais deficientes para IL-1 β apresentam menor crescimento tumoral quando comparado com animais selvagens e com camundongos deficientes para IL-1 α , gerando evidências sobre o papel de IL-1 β no desenvolvimento tumoral (KRELIN et al. 2007). Dados da literatura demonstraram que tumores de animais deficientes para IL-1 β apresentam vascularização reduzida e ausência de metástases quando comparados com os grupos controle (VIDAL-VANACLOCHA et al. 1994; VORONOV et al. 2003). Em nosso modelo, a elevada expressão de IL-1 β nos tumores TC-1, pode estar relacionada à grande quantidade de VEGF e MMP9 encontrados nestes tumores, conforme mostrado no manuscrito 1.

Outra citocina inflamatória avaliada em nosso trabalho é IL-6. IL-6 é uma citocina multifuncional cujo efeito depende da célula alvo. Em geral, trata-se de uma citocina pró-inflamatória sintetizada por macrófagos, linfócitos T e B, e por células de tumores epiteliais (OKAMOTO et al. 1997), inclusive associados ao HPV (EUSTACE et al. 1993; HESS et al. 2000; CHENG et al. 2008). Esta citocina tem sido relacionada à indução de vias envolvidas na proliferação celular, crescimento tumoral e aparecimento de metástases (OGATA et al. 1997). A expressão de IL-6 é induzida por IL-1 e TNF α , ambas também muito expressas nos tumores TC-1. Em nosso modelo, a expressão de IL-6 foi

detectada pelas células tumorais (CD45-), assim como pelo infiltrado leucocitário (CD45+) (Figura 2C do manuscrito 1), embora segundo nossos dados de proteína, a expressão de IL-6 em macrófagos tumorais seja 1,7 vezes maior do que a expressão em macrófagos peritoneais (figura 3A do manuscrito 1). IL-6 induz a diferenciação de monócitos em macrófagos promovendo aumento do receptor MCSF-R nestas células (CHOROMAT et al. 2000). De fato, como discutido anteriormente, este receptor é expresso pelo infiltrado leucocitário presente nos tumores TC-1 (Figura 2B do manuscrito 1). Outro dado interessante consiste na capacidade de IL-6 induzir a produção de CCL2/MCP1 (ROMANO et al. 1997; BISWAS et al. 1998). Esta observação é confirmada em células tumorais associadas ao HPV, uma vez que a produção desta quimiocina aparece reduzida na ausência de IL-6 (HESS et al. 2000). Como mostrado no manuscrito 1, CCL2 não apenas é expressa, mas aparentemente tem atividade biológica em tumores TC-1, e IL-6 pode ser um dos fatores que contribui para esta atividade.

Em outros modelos, CCL2 exerce um papel importante na indução de angiogênese e tumorigênese, via recrutamento de macrófagos (UENO et al. 2000; KURODA et al. 2005). Conforme discutido anteriormente, dados gerados em nosso laboratório mostram que a maioria do infiltrado leucocitário presente nos tumores TC-1 é composto por macrófagos associados a tumores (TAMs) com fenótipo M2 (LEPIQUE et al. 2009), e uma das principais características destas células é a produção de CCL2 (revisado por MANTOVANI et al. 2002; POLLARD 2004) adicionada à expressão do seu receptor CCR2 (MANTOVANI et al. 2002). CCL2 também atua sobre linfócitos T, induzindo resposta do tipo Th2 (GU et al. 2000; LUTHER e CYSTER 2001), e sobre as células

apresentadoras de antígenos (APCs) reduzindo a produção de IL-12 (LUTHER e CYSTER 2001). Interessantemente, as células infiltrantes dos tumores TC-1 não apresentam nenhuma expressão de IL-12 (Figura 3A do manuscrito 1).

Em relação ao papel de CCL2 no recrutamento de TAMs (LISS et al. 2001), a alta expressão desta quimiocina pelas células tumorais nos tumores TC-1 levantou a hipótese de que CCL2 poderia estar envolvida na migração de monócitos/macrófagos para o local do tumor. De acordo com os resultados apresentados na Figura 5 do manuscrito 1, CCL2 exerce efeito sobre a migração de células mielóides em resposta às células que expressam E6 e E7 de HPV16, um efeito que é especificamente mediado por proteínas de HPV. Nosso dado concorda com os achados recentes de PAHLER et al. (2008), que descrevem a inibição do recrutamento de macrófagos para local do tumor em animais deficientes para o receptor de CCL2 ($CCR2^{-/-}$). Neste estudo, os autores avaliaram, em modelo de camundongo transgênico para HPV16 e deficiente para a expressão de CCR2, o papel desta quimiocina no recrutamento de macrófagos e neutrófilos intratumorais. Adicionalmente, eles sugerem que na ausência de macrófagos infiltrando o tumor, provocada pela ausência de CCR2, neutrófilos passam a ser recrutados montando uma resposta alternativa que contribui para angiogênese e progressão tumoral (PAHLER et al. 2008).

Outro resultado que contribui para a caracterização do fenótipo M2 dos macrófagos que infiltram os tumores TC-1 é a expressão de MMP9 discutida no manuscrito 1 (Figura 2E). As metaloproteases, principalmente MMP2 e MMP9, são proteínas importantes envolvidas nos processos de invasão tumoral, angiogênese e desenvolvimento de metástases. MMP2 e MMP9 são

gelatinases expressas em uma série de neoplasias (STETLER-STEVENSON e YU 2001), inclusive em câncer de colo do útero (SHEU et al. 2003). Adicionalmente, a expressão de MMP9 tem sido associada à expressão de HPV16 e 18 em linhagens celulares (da SILVA CARDEAL et al. 2006; YOSHIDA et al. 2008). Em nosso estudo podemos observar a elevada expressão de MMP9 nos tumores TC-1. No entanto, apesar de as células tumorais (CD45-) expressarem esta metaloprotease, neste modelo os principais produtores são os macrófagos infiltrantes (CD45+). De acordo com dados da literatura, esta metaloprotease pode ser produzida por TAMs (GIRAUDO et al. 2004; SICA e BRONTE 2007), e a presença de CCL2 e CCL5 no microambiente tumoral pode estar contribuindo para a indução desta expressão (AZENSHTEIN et al. 2002; ROBINSON et al. 2002).

Um dos achados mais interessantes do nosso trabalho consistiu na identificação do papel de IL-10 na supressão da resposta celular mediada por linfócitos TCD8+. Esta hipótese partiu da observação de que IL-10 é expressa apenas pelas células do infiltrado leucocitário presente nos tumores TC-1. De acordo com os resultados apresentados no manuscrito 2, sugerimos que IL-10 favoreça o crescimento mais rápido dos tumores TC-1. Além disso, demonstramos que IL-10 inibe a resposta imune mediada por linfócitos TCD8+, uma vez que na ausência desta citocina observamos células TCD8+ efetoras infiltrando os tumores (figura 4 do manuscrito 2). Na literatura, este é o primeiro trabalho a descrever o papel desta molécula no modelo analisado. No entanto, em modelo de melanoma, RANKIN et al. em 2003, descreveu menor crescimento tumoral em camundongos IL-10^{-/-} quando comparados com animais selvagens. Particularmente neste estudo, os autores chamam atenção

para o papel das citocinas de perfil Th1, como IFN- γ , cujos níveis circulantes aparecem aumentados nos animais deficientes para IL-10. Outro trabalho mostrou que a ausência de IL-10 em modelo tumoral *in vivo*, melhora a resposta TCD8+ específica, aumentando a proliferação destas células e a produção de IFN- γ (DERCAMP et al. 2005).

Atualmente, IL-10 é uma citocina que tem chamado atenção de muitos pesquisadores, pois sua expressão têm sido frequentemente descrita em uma série de neoplasias (ZENI et al. 2007), inclusive em câncer de colo do útero (AZAR et al. 2004; BERMUDEZ-MORALES et al. 2008). Macrófagos associados a tumores (TAMs), assim como as células mielóides, são capazes de produzir IL-10, entre outras moléculas regulatórias, como mecanismo de inibição da resposta celular anti-tumoral (MANTOVANI et al. 2002; SICA e BRONTE 2007). Estudo realizado por pesquisadores brasileiros mostrou que a quantidade de macrófagos infiltrantes em lesões de colo uterino aumenta conforme a progressão da doença (HAMMES et al. 2007), mais uma evidência de que estas células podem estar colaborando para o desenvolvimento tumoral. A redução de macrófagos infiltrantes em tumores, em geral está associada à redução da progressão tumoral, invasão e metástase (LIN et al. 2001; LEPIQUE et al. 2009).

Adicionalmente aos dados de IL-10 produzida pelo infiltrado mielóide presente nos tumores TC-1, nosso trabalho mostrou que esta citocina também está associada a presença de células T regulatórias nestes tumores. Estas células caracterizam-se principalmente pela presença do fator de transcrição Foxp3, e são capazes de inibir a atividade de linfócitos TCD4+/CD25-, TCD8+, células NK, células dendríticas e linfócitos B (MURAKAMI et al. 2002; AZUMA

et al. 2003; LIM et al. 2005; CHEN 2006). A presença de linfócitos T regulatórios em tumores de colo uterino e lesões precursoras já foi descrita na literatura (VAN DER BURG et al. 2007; VISSER et al. 2007). Em nosso estudo, os resultados apresentados no manuscrito 2 (figura 5), indicam que IL-10 facilita o crescimento tumoral através da indução do fenótipo T regulatório. A análise de linfócitos isolados dos tumores TC-1 nos permitiu identificar menor quantidade de linfócitos TCD4+/Foxp3+ e TCD8+/Foxp3+ nos tumores nos quais IL-10 foi bloqueada. Em conjunto, estes resultados sugerem que IL-10 exerce um papel importante no controle da resposta imune celular em modelo de tumor associado ao HPV16.

7 CONCLUSÕES

Os resultados mostrados neste trabalho ilustram o complexo painel de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem estar envolvidos no crescimento tumoral e na resposta imune local. Estas moléculas podem influenciar o fenótipo de células do sistema imunológico recrutadas para o local da lesão, além de poder direcionar a uma resposta imune efetiva ou à tolerância. O esquema ilustrado na figura 13 propõe um modelo no qual as células TC-1, que expressam E6 e E7 de HPV16, desenvolvem mecanismos associados à evasão do sistema imune. Este trabalho, junto com outros estudos desenvolvidos em nosso laboratório tem como principais objetivos identificar os fatores envolvidos nestes mecanismos. Portanto, as principais conclusões deste estudo são:

- 1 Citocinas inflamatórias, como IL-1 α e IL-1 β , TNF α , IL-6, TGF β e IL-10, são expressas nos tumores TC-1, sendo algumas destas citocinas produzidas especificamente pelo infiltrado leucocitário. Duas classes de citocinas são expressas em nosso modelo: pró-inflamatórias representadas por IL1 α e IL1 β , TNF α e IL-6; e citocinas regulatórias representadas por IL-10 e TGF β . A expressão das citocinas regulatórias é associada a evasão da resposta imune celular, como de fato nós demonstramos em modelo onde a sinalização por IL-10 foi bloqueada. Já as citocinas pró-inflamatórias indicam que inflamação crônica pode ser parte do mecanismo, como um co-fator, pelo qual

tumores associados ao HPV se desenvolvem, porém esta hipótese não foi testada em nosso modelo.

- 2 O infiltrado leucocitário presente nos tumores TC-1 é na sua maioria composto por macrófagos caracterizados pelos marcadores CD11b/F480. Células mielóides CD11b+/Gr1+ também fazem parte do infiltrado leucocitário presente nos tumores TC-1, porém em menor quantidade.
- 3 Quimiocinas, como CCL2/MCP1, CCL5/Rantes e MCSF são altamente expressas tanto pelas células tumorais quanto pelos macrófagos infiltrantes. CCL2 é responsável pelo recrutamento de monócitos por células que expressam oncoproteínas de HPV16 *in vitro*.
- 4 A citocina IL-10 é parte do mecanismo de tolerância aos antígenos de HPV16, estando envolvida na diferenciação de células T regulatórias específicas para E7 e na supressão da atividade de linfócitos TCD8+ no modelo de tumores TC-1.

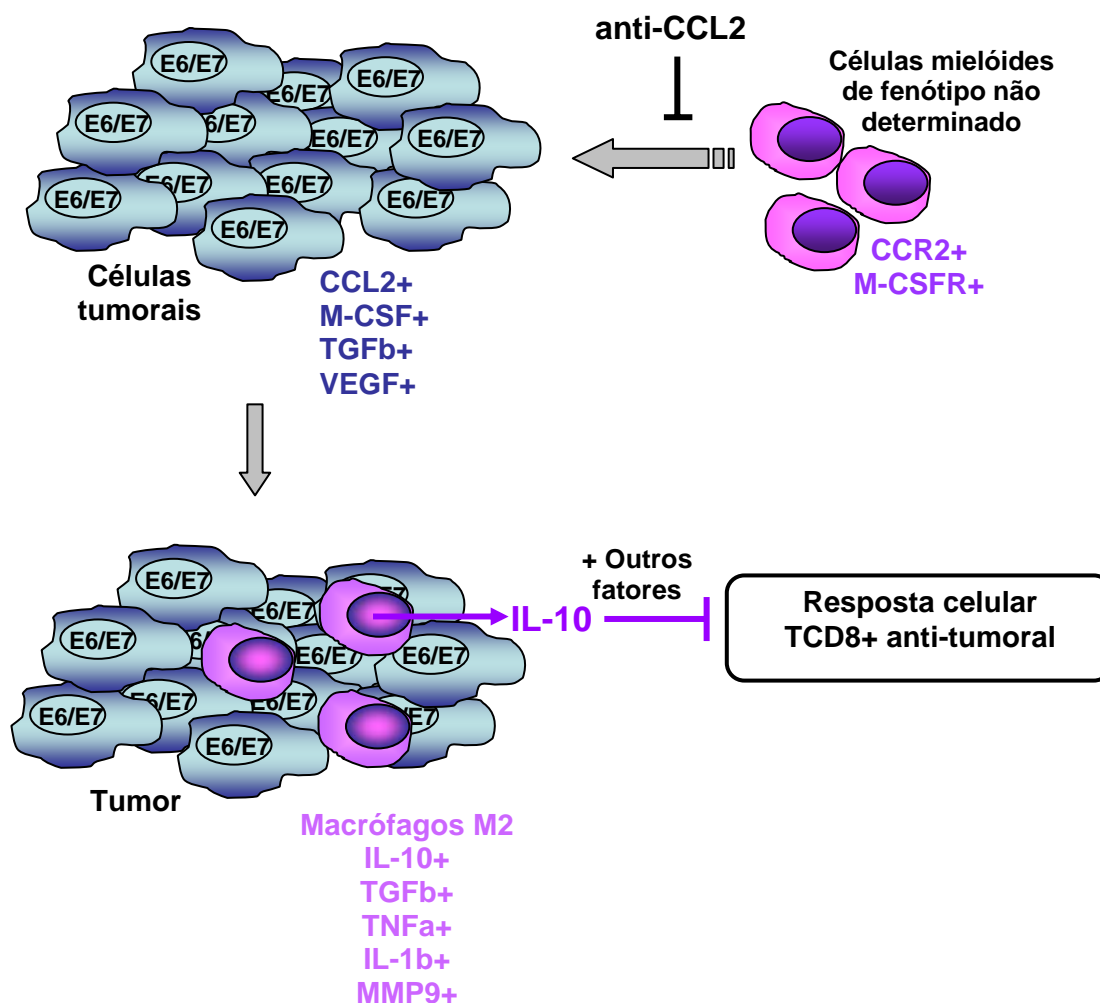


Figura 13 - Esquema ilustrativo que propõe um modelo de microambiente tumoral formado em resposta ao tumor TC-1, que expressa as principais proteínas de HPV16 E6 e E7, gerado em animais C57Bl/6 selvagens.

Neste estudo descrevemos a expressão de determinadas citocinas, como TGFβ e M-CSF, e quimiocinas como CCL2, pelas células tumorais. Células mielóides, que inicialmente apresentam um fenótipo indeterminado, expressam os receptores CCR2 e MCSF-R, sugerindo que sejam responsivas às quimiocinas produzidas pelo tumor, CCL2 e MCSF, respectivamente. Ao infiltrarem o tumor, estas células mielóides se diferenciam através de mecanismos ainda não conhecidos, e passam a expressar IL-10, TNFα, IL-1β e MMP9, caracterizando um fenótipo de macrófagos M2. IL-10 produzida por estes macrófagos inibem a resposta anti-tumoral mediada pelos linfócitos TC8+.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Lichtman AL. **Cellular and molecular immunology**. 5 ed. Trad. De C Reali. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. Apêndice: Principais características das moléculas CD: CD45; p.526.

Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, et al. Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. **Cancer Res** 2004; 64:5378-84

Apte RN, Dotan S, Elkabets M, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer Metastasis Rev** 2006; 25:387-408.

Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, et al. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. **Oncogene** 2002; 21:248-59.

Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **Int J Cancer** 2005; 113:276-83.

Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. **Hum Pathol** 2004; 35:1376-84.

Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, et al. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. **Cancer Res** 2002; 62:1093-102.

Azenshtein E, Meshel T, Shina S, Barak N, Keydar I, Ben-Baruch A. The angiogenic factors CXCL8 and VEGF in breast cancer: regulation by an array of pro-malignancy factors. **Cancer Lett** 2005; 217:73-86.

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

Baiocchi G, Kavanagh JJ, Talpaz M, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. **Cancer** 1991; 67:990-6.

Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine Growth Factor Rev** 2002; 13:135-41.

Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **J Clin Pathol** 2005; 58:1096-100.

Banchereau J, Brière F, Liu YJ, Rousset F. Molecular control of B lymphocyte growth and differentiation. **Stem Cells** 1994; 12:278-88.

Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. **Virology** 1999; 259:305-13.

Basile JR, Eichten A, Zacny V, Munger K. NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. **Mol Cancer Res** 2003; 1:262-70.

Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, et al. Tumor-associated transforming growth factor- β and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. **Am J Pathol** 1999; 155:537-47.

Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Semin Cancer Biol** 2006, 16:38-52

Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, et al. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. **Cancer Invest** 2008; 26:1037-43.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol** 2002; 196:254-65.

Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, et al. Interleukin-6 induces monocyte chemoattractant protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. **Blood** 1998; 91:258-65.

Biswas PS, Pedicord V, Ploss A, Menet E, Leiner I, Pamer EG. Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10. **J Immunol** 2007; 179:4520-8.

Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. **J Immunol** 2008; 180:2011-7.

Boccardo E, Noya F, Broker TR, Chow LT, Villa LL. HPV-18 confers resistance to TNF- α in organotypic cultures of human keratinocytes. **Virology** 2004; 328:233-43.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol** 2002; 55:244-65.

Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2003; 31:3-13.

Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **J Immunol** 1995; 155:2077-84.

Branca M, Giorgi C, Santini D, et al. HPV-Pathogen ISS Study Group. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. **J Clin Pathol** 2006; 59:40-7.

Bronte V, Serafini P, et al. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. **J Immunol** 2003; 170:270-8.

Brooks DG, Trifilo MJ, Edelman KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nat Med** 2006; 12:1301-9.

Chen W. Dendritic cells and (CD4+)CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. **Front Biosci** 2006; 11:1360-70.

Cheng YW, Lee H, Shiau MY, et al. Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:4705-12.

Cho YS, Kang JW, Cho M, et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. **FEBS Lett** 2001; 501:139-45.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, et al. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nat Immunol** 2000; 1:510-4.

Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum level of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. **Cancer Invest** 1997; 16:152-9.

Cid-Arregui A, Juarez V, Zur Hausen H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. **J Virol** 2003; 77:4928-37.

Clerici M, Merola M, Ferrario E, et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:245-50.

Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev** 1999; 13:1382-97.

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

Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, et al. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells. **J Exp Med** 2003; 197:1017-28.

da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TC, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. **Biochem Cell Biol** 2006; 84:713-9.

de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. **Cancer Res** 2002; 62:472-9.

de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, et al. Human papillomavirus type-16-positive cancer is associated with impaired CD4+ T cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Res** 2004; 64:5449-55.

de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. Early neoplastic progression is complement independent. **Neoplasia** 2004; 6:768-76.

de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell** 2005; 7:411-23.

de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **J Immunol** 1993; 150:4754-65.

Dercamp C, Chemin K, Caux C, Trinchieri G, Vicari AP. Distinct and overlapping roles of interleukin-10 and CD25+ regulatory T cells in the inhibition of antitumor CD8 T-cell responses. **Cancer Res** 2005; 65:8479-86.

Eustace D, Han X, Gooding R, Rowbottom A, et al. Interleukin-6 (IL-6) functions as an autocrine growth factor in cervical carcinomas in vitro. **Gynecol Oncol** 1993; 50:15-9.

Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Res** 1997; 57:2943-50.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature** 1996; 380:439-42.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A, et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol** 1991; 147:3815-22.

Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, et al. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. **Cancer Lett** 1996; 104:1-5.

Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **Int J Infect Dis** 2007; Suppl 2:S10-6.

Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, et al. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. **Cancer Res** 2005; 65:6534-42.

Giraud E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. **J Clin Invest** 2004; 114:623-33.

Gray-Schopfer VC, Karasarides M, Hayward R, Marais R. Tumor necrosis factor-alpha blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. **Cancer Res** 2007; 67:122-9.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature** 1997; 389:737-42.

Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Nature** 2000; 404:407-11.

Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, et al. Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. **J Exp Med** 1997; 16:2101-10.

Halak BK, Maguire HC Jr, Lattime EC. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. **Cancer Res** 1994; 15:911-7.

Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression-clinicopathological correlation. **Gynecol Oncol** 2007; 105:57-65.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **J Immunol** 2007; 178:3186-97.

Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Fleuren GJ. Prognostic relevance of TGF-beta 1 and PAI-1 in cervical cancer. **Int J Cancer** 2004; 112:1020-8.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol** 2006; 16:83-97.

Hess S, Smola H, Sandaradura De Silva U, et al. Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. **J Immunol** 2000; 165:1939-48.

Herbeuval J, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. **J Immunol** 2004; 172:4630-36.

Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. **Cancer Res** 2006; 66:1123-31.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: human papillomaviruses**. Geneva: WHO; 2007. (IARC Monographs Vol. 90)

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

Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation and differentiation. **J Immunol** 1997; 154:4341-50.

Jacobs N, Giannini SL, Doyen J, et al. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. **Clin Exp Immunol** 1998; 111:219-24.

Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, et al. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. **J Immunol** 2006; 177:896-904.

Kacinski BM. CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. **Ann Med** 1995; 27:79-85.

Kim S, Buchlis G, Fridlender ZG, et al. Systemic blockade of transforming growth factor-beta signaling augments the efficacy of immunogene therapy. **Cancer Res** 2008; 68:10247-56.

Kirma N, Luthra R, Jones J, et al. Overexpression of the colony-stimulating factor (CSF-1) and/or its receptor c-fms in mammary glands of transgenic mice results in hyperplasia and tumor formation. **Cancer Res** 2004; 64:4162-70.

Knowles G, O'Neil BW, Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. **J Virol** 1996; 70:8451-8.

Kobayashi A, Greenblatt RM, Anastos K, et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Res** 2004; 64:6766-74.

Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCunne K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunol** 2008; 1:412-20

Kokura S, Yoshida N, Ishikawa T, et al. Interleukin-10 plasmid DNA inhibits subcutaneous tumor growth of Colon 26 adenocarcinoma in mice. **Cancer Lett** 2005; 218:171-9.

Koromilas AE, Li S, Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine Growth Factor Rev** 2001; 12:157-70.

Krelin Y, Voronov E, Dotan S, et al. Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. **Cancer Res** 2007; 67:1062-71.

Kryczek I, Liu R, Wang G, et al. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. **Cancer Res** 2009; 69:3995-4000.

Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell** 1993; 75:263-274.

Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7629-36.

Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. **Virology** 1994; 200:130-9.

Lee DK, Kim BC, Kim IY, et al. The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. **J Biol Chem** 2002; 277:38557-64.

Lepique AP, Daghanli KR, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses. **Clin Cancer Res** 2009; 15:4391-400.

Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res** 2006; 66:605-12.

Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. **J Immunol** 2005; 175:4180-3.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med** 2001; 193:727-40.

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res** 1996; 56:21-6.

Liss C, Fekete MJ, Hasina R, et al. Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. **Int J Cancer** 2001; 93:781-5

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Loberg RD, Ying C, Craig M, et al. CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. **Neoplasia** 2007; 9:556-62.

Loeffler CM, Smyth MJ, Longo DL, et al. Immunoregulation in cancer-bearing hosts. Down-regulation of gene expression and cytotoxic function in CD8+ T cells. **J Immunol** 1992; 149:949-56.

López-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. **Oncogene** 2000; 19:4611-20.

Loser K, Apelt J, Voskort M, et al. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. **J Immunol** 2007; 179:365-71.

Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. **Nat Immunol** 2001; 2:102-7.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 2002; 23:549-55.

Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, et al. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. **Oncogene** 2002; 21:7808-16.

Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, et al. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. **J Exp Med** 1994; 180:2371-76.

Mazibrada J, Rittà M, Mondini M, et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. **Gynecol Oncol** 2007; 108:112-20.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol** 2001; 82:15-33.

Melani C, Chiodoni C, Forni G, Colombo MP. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. **Blood** 2003; 102:2138-45.

Mindiola R, Caulejas D, Nùñez-Troconis J, et al. Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. **Invest Clin** 2008; 49:533-45.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas/2008: incidência por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

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

Moore RJ, Owens DM, Stamp G, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. **Nat Med** 1999; 5:828-31.

Mrowietz U, Schwenk U, Maune S, et al. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. **Br J Cancer** 1999; 79:1025-31.

Munder M, Eichmann K, Morán JM, et al. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunol** 1999; 163:3771-7.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO J** 1989; 8:4099-105.

Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res** 2002; 89:213-28.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:518-27.

Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:8832-7.

Nees M, Geoghegan JM, Munson P, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. **Cancer Res** 2000; 60:4289-98.

Neumark E, Anavi R, Witz IP, Ben-Baruch A. MCP-1 expression as a potential contributor to the high malignancy phenotype of murine mammary adenocarcinoma cells. **Immunol Lett** 1999; 68:141-6.

Nicholls PK, Stanley MA. The immunology of animal papillomaviruses. **Vet Immunol Immunopathol** 2000; 73:101-27.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. **Adv Immunol** 2007; 96:179-204.

O'Brien PM, Saveria Campo M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. **Virus Res** 2002; 88:103-17.

Ogata A, Chauhan D, Teoh G, et al. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. **J Immunol** 1997; 159:2212-21.

Okamoto M, Hattori K, Oyasu R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. **Int J Cancer** 1997; 72:149-54.

Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, et al. Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. **Neoplasia** 2008, 10:329-40.

Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275:6764-9.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer** 2001; 37 Suppl 8:S4-66.

Petersson M, Charo J, Salazar-Onfray F, et al. Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. **J Immunol** 1998; 161:2099-105.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Res** 2007; 67:354-61.

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int J Cancer** 2002; 97:72-81.

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

Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest** 2008; 118:560-70.

Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. **Cancer Lett** 2007; 256:137-65.

Rankin EB, Yu D, Jiang J, et al. An essential role of Th1 responses and interferon gamma in infection-mediated suppression of neoplastic growth. **Cancer Biol Ther** 2003; 2:687-93.

Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. **Eur J Immunol** 2002; 32:404-12.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity** 1997; 6:315-25.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol** 2000; 18:217-42.

Russel DW, Sambrook J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Toronto: CSHL Press; 2001. Appendice A1.7.

Salazar-Onfray F, Lopez MN, Mendonza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines intumor immune surveillance and tumor immune escape. **Cytokine Growth Factor Rev** 2007; 18:171-82.

Sato T, McCue P, Masuoka K, et al. Interleukin 10 production by human melanoma. **Clin Cancer Res** 1996; 2:1383-390.

Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. Persistent human papillomavirus infection as a prediction of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA** 2001; 286:3106-14.

Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1336-43.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell** 1990; 63:1129-36.

Sheu BC, Lien HC, Ho HN, Lin HH, et al. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. **Cancer Res** 2003; 63:6537-42

Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, Lowy DR. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. **J Virol** 1986; 57:1-6

Selvakumar R, Schmitt A, Iftner T, Ahmed R, Wettstein FO. Regression of papillomas induced by cottontail rabbit papillomavirus is associated with infiltration of CD8+ cells and persistence of viral DNA after regression. **J Virol** 1997; 71:5540-8.

Shrestha S, Wang C, Aissani B, et al. Interleukin-10 gene (IL10) polymorphisms and human papillomavirus clearance among immunosuppressed adolescents. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007; 16:1626-32.

Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **J Clin Invest** 2007; 117:1155-66.

Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- κ B activation in Tumor-Associated Macrophages. **J Immunol** 2000; 164:762-67.

Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. **Cancer Res** 1997; 57:1294-300.

Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83:4680-4.

Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine** 2006; 24 Suppl 1:S16-22.

Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Semin Cancer Biol** 2001; 11:143-52.

Stoffels B, Schmidt J, Nakao A, Nazir A, Chanthaphavong RS, Bauer AJ. Role of interleukin 10 in murine postoperative ileus. **Gut** 2009; 58:648-60.

Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **J Immunol** 2005; 175:342-9.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. **J Virol** 1993; 67:4521-32.

Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. **J Virol** 1995; 69:3185-92.

Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4345-54.

Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum Pathol** 1992; 23:117-28.

Suzuki E, Kim S, Cheung HK, Corbley MJ, et al. A novel small-molecule inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor kinase (SM16) inhibits murine mesothelioma tumor growth in vivo and prevents tumor recurrence after surgical resection. **Câncer Res** 2007; 67:2351-9.

Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. **Annu Rev Immunol** 2005; 23:307-36.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:59-65.

Tselepis C, Perry I, Dawson C, et al. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. **Oncogene** 2002; 21:6071-81.

Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, et al. Autocrine Production of Interleukin-4 and Interleukin-10 Is Required for Survival and Growth of Thyroid Cancer Cells. **Cancer Res** 2006; 66:1491-9.

Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. **Oncogene** 2004; 23:2988-95.

Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine** 2006; 24 Suppl 1:S1-15.

Ueno T, Toi M, Saji H, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3282-9.

Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. **J Immunol** 2006; 177:5852-60.

Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Lett** 2002; 179:205-12.

Van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:12087-92.

Vidal-Vanaclocha F, Amézaga C, Asumendi A, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases. **Cancer Res** 1994; 54:2667-72.

Villa LL, Vieira KB, Pei XF, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. **Mol Carcinog** 1992; 6:5-9

Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res** 1997; 71:321-41.

Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. **Clin Exp Immunol** 2007; 150:199-209.

Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:2645-50.

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. **J Immunol** 1994; 153:811-6.

Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. **J Biol Chem** 1995; 270:9558-63.

Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. **Cancer Res** 2003; 63:636-41.

Welters MJ, van der Logt P, van den Eeden SJ, et al. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **Int J Cancer** 2006; 118:950-6.

Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, et al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. **Cancer Res** 1993; 53:1939-44.

Xu Q, Wang S, Xi L, et al. Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-beta 1 signaling pathway. **Gynecol Oncol** 2006; 101:132-9.

Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, et al. Ras modifies proliferation and invasiveness of cells expressing human papillomavirus oncoproteins. **J Virol** 2008; 82:8820-7.

Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. **Cancer Res** 2005; 65:3044-8.

Zeni E, Mazzetti L, Miotto D, et al. Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic factor in nonsmall cell lung cancer. **Eur Respir J** 2007; 30:627-32.

Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY, Frazer I. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. **J Virol** 1999; 73:4972-82.

Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. et al. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. **Cancer Res** 2007; 67:1038-45.

Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. **Int J Gynecol Cancer** 2005; 3:282-90.

Zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996; 1288:F55-78.