

1 A INTERLEUCINA-10 E SEU PAPEL NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS1

2 *(THE INTERLEUKIN-10 AND YOUR ROLE IN BREAST CARCINOMAS CANINE)*

3
4
5
6
7

8 **RESUMO**

9 A interleucina-10 (IL-10) pode estar relacionada aos mecanismos de evasão tumoral,
10 promovendo a progressão do tumor. O objetivo deste trabalho foi determinar a relação entre
11 IL-10, a malignidade do tumor e a intensidade da reação inflamatória no sítio tumoral,
12 comparando a imunomarcção de IL-10, por imuno-histoquímica, entre os grupos carcinomas
13 mamários e tecido hígido. Houve aumento significativo no número de células imunomarcadas
14 no grupo carcinoma e, também, relação direta com a intensidade da inflamação. Nossos dados
15 demonstram a associação entre o aumento de IL-10 e malignidade tumoral e sugerem que um
16 ambiente imunossupressor é um dos mecanismos de evasão no sítio tumoral. Concluindo-se
17 que o aumento na secreção de IL-10 no tecido mamário neoplásico favorece a progressão
18 tumoral.

19 **Palavras-chave:** câncer; citocinas; reação inflamatória; evasão tumoral

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **ABSTRACT**

35 The interleukin-10 may be related to tumor evasion mechanisms, promoting tumor
36 progression. The aim of this study was to determine the relationship between the secretion of
37 IL-10, tumor malignancy and inflammatory reaction in the tumor site, comparing
38 immunostaining of IL-10 by immunohistochemistry, between healthy tissue and breast
39 carcinomas. It had a significant increase in the number of immunostained cells in the
40 carcinoma group and, also, a direct relationship with the intensity of inflammation. Our data
41 demonstrate an association between increased IL-10 and tumor malignancy and suggest that
42 an immunosuppressive environment is one of evasion mechanisms in tumor site. It was
43 concluded that the increased secretion of IL-10 in mammary tissue promotes the neoplastic
44 tumor progression.

45 **Key words:** cancer; cytokines; inflammatory reaction; tumor evasion

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73

INTRODUÇÃO

74
75 Na imunologia tumoral existem dois mecanismos importantes: os mecanismos de
76 imunovigilância e os mecanismos de evasão do sistema imune. Este último permite às células
77 neoplásicas criarem um ambiente de tolerância, levando ao crescimento e à malignidade
78 tumoral (SATYAM et al., 2011; DUNN et al., 2004). A malignidade dos tumores mamários
79 pode estar relacionada com a resposta inflamatória induzida por linfócitos e outras células
80 inflamatórias infiltradas no sítio de crescimento tumoral (REOME et al., 2004). Já a
81 resistência envolve mecanismos de destruição das células tumorais, tanto pela ação da
82 imunidade intata (macrófagos e células NK), quanto pela adquirida, por meio de linfócitos T,
83 que desencadeiam uma resposta imune celular (ABBAS et al., 2012). Linfócitos T
84 diferenciam-se em células CD4⁺ (HORIUCHI et al., 2007), que se subdividem em Th1 e Th2,
85 com um perfil de citocinas específicas, que levam a uma resposta imune celular (Th1) ou
86 humoral (Th2) (REED, 1995; YAMAZAKI et al., 2002; HORIUCHI, et al., 2007). O
87 desequilíbrio para um perfil Th2 está relacionado com o desenvolvimento de diversos
88 tumores, pela supressão da resposta antitumoral das células Th1 (SATYAM et al., 2011). A
89 IL-10 está envolvida na inibição da ativação dos macrófagos, limitando a produção de IL-1,
90 IL-6, TNF- α , bem como, a ativação antígeno-específico dos linfócitos T, pela regulação
91 negativa das células apresentadoras de antígenos e inibição da expansão de células T pela
92 inibição da produção de IL-2. A sua produção aumenta a expressão de MHC em células B,
93 inibe efeitos Th1, principalmente pela inibição da produção IFN- γ , inibe a liberação de
94 citocinas a partir de macrófagos, e estimula a multiplicação de mastócitos. Um dos
95 mecanismos pelo qual as células tumorais escapam do reconhecimento pelo sistema
96 imunológico pode incluir a IL-10 (HODI e SOIFFER, 2002). O objetivo deste trabalho foi
97 determinar a relação entre a secreção de IL-10, a malignidade do tumor e a intensidade da
98 reação inflamatória no sítio tumoral.

99

MATERIAIS E MÉTODOS

100 Foram colhidas 30 amostras de tecido mamário de cadelas, sem predisposição de raça
101 ou idade. Instituíram-se dois grupos: controle, com cinco amostras e, carcinomas simples,
102 com 25 amostras, colhidas, respectivamente, no XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX
103 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX. Os fragmentos, incluídos
104 em parafina, foram submetidos à imunomarcção pelo anticorpo anti-IL10 (diluição: 1:400),
105 por imuno-histoquímica, por meio do complexo de polímeros ligados a peroxidase.

106 De forma geral o procedimento foi:

107 Passo 1: Desparafinização dos cortes de tecido de glândula mamária em estufa a 60°C
108 por 1 hora seguido de banhos em soluções de xilol (I e II) por 10 minutos cada. Após isso os
109 cortes passaram por processo de hidratação em bateria de álcool absoluto I, II, III, 95% I, 95%
110 II, 80% I e 80% II. Em seguida os cortes foram lavados 10 vezes em água destilada.

111 Passo 2: Recuperação antigênica em panela de pressão tipo Pascal (Dako, cód. S2800)
112 em tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0).

113 Passo 3: Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio e
114 metanol (30 v/v) a 8%, à temperatura ambiente, em câmara úmida por 30 minutos.

115 Passo 4: Bloqueio das proteínas inespecíficas com produto comercial (Protein Block
116 Serum-Free, Dako, cód. X0909) por 30 minutos, à temperatura ambiente.

117 Passo 5: Incubação do anticorpo primário por 18 horas a 4°C

118 Passo 6: Incubação do anticorpo secundário. Para cada reação a incubação foi realizada
119 à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos. Entre cada uma das etapas
120 descritas fez-se banhos com tampão TBS, pH 7,4.

121 Passo 7: Detecção da imunomarcção com o cromógeno diaminobenzidina (Liquid
122 DAB + Substrate Chromogen System, DAKO, cód. K3468), por 3 minutos. Seguiu-se a
123 imersão dos cortes em água deionizada para interromper a reação com o DAB.

124 Passo 8: Contra-coloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com
125 Entellan (Merck).

126 A densidade das células imunomarcadas foi determinada pela contagem de células em
127 cinco campos de grande aumento (área igual a $0,19625 \text{ mm}^2$ por campo). Para a análise
128 estatística confrontou-se a densidade de células imunomarcadas para a IL-10 entre os grupos
129 controle e carcinomas simples através de teste T de Student ($\alpha=5\%$). O teste para múltiplas
130 médias de Student Newman Keuls (SNK) foi utilizado para avaliar as médias do grupo
131 carcinoma simples, quando subdividido em segundo seu padrão histológico em papilares,
132 tubulares ou sólidos. Foi realizado o teste exato de Fisher para averiguar a relação entre os
133 níveis categóricos de IL-10 (0-5) e os níveis categóricos de inflamação (0-5). Os testes
134 estatísticos foram realizados com o auxílio do programa estatístico SAS 9.1 (SAS Institute,
135 Cary, NC, USA).

136

137

RESULTADOS E DISCUSSÃO

138 As células imunomarcadas para IL-10 apresentaram-se distribuídas difusamente nos
139 tumores, principalmente nos carcinomas papilares e tubulares. A distribuição foi focal nos
140 carcinomas sólidos. Leucócitos e células epiteliais malignas apresentaram secreção de IL-10
141 (figura 1). A densidade de células imunomarcadas para IL-10 foi maior no grupo dos
142 carcinomas em relação ao grupo controle ($p<0,0001$) (figura 2). As médias e o erro padrão
143 foram $50,58 \pm 5,65$ e $2,84 \pm 0,89$ respectivamente. Quando o grupo de carcinomas foi
144 subdividido, não houve diferença estatística entre os grupos com tumores papilares, tubulares
145 ou sólidos entre si, porém, todos se diferenciaram significativamente do grupo controle
146 ($p<0,00001$). O teste exato de Fisher mostrou haver relação direta entre os níveis de IL-10 e a
147 intensidade da inflamação ($p<0,0002$).

148 Nossos resultados mostram que o aumento da expressão de IL-10 está associado à
149 presença de neoplasia mamária, mas não aos subtipos histológicos. Isto indica que não há uma
150 diminuição na expressão desta citocina em tumores menos agressivos ou de caráter crônico,
151 evidenciando uma progressão contínua do tumor, posto que a IL-10 desenvolve importante
152 papel na inibição da ativação de macrófagos e de linfócitos T, principalmente, pela inibição
153 de um perfil de resposta Th1, decorrente da supressão na secreção do IFN- γ , que é a principal
154 citocina de ativação da resposta Th1 e importante para a ação antitumoral, estando
155 normalmente suprimido durante o desenvolvimento tumoral (REOME et al., 2004; HODI e
156 SOIFFER, 2002).

157 A relação direta entre a intensidade da inflamação e a imunomarcação para IL-10 sugere
158 que o aumento na presença de linfócitos está vinculado a um aumento na presença de
159 linfócitos T regulatórios (Tregs) no sítio tumoral, causando um incremento no infiltrado
160 inflamatório, mas tornando-o imunologicamente deficitário. Os linfócitos Tregs são um
161 constituinte particular da população de linfócitos T auxiliares (CD4+), que se diferenciam em
162 Tregs na presença de IL-10, e modulam os efeitos do sistema imune pela inibição da atividade
163 de outros leucócitos (RISSETO et al., 2010). Esses efeitos supressivos são mediados pela
164 produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 ou por contato direto entre as
165 células (O'NEILL et al., 2009; BILLER et al., 2007). No câncer há evidência de que as Tregs
166 podem ser induzidas pelo tumor e suprimir a resposta do sistema imune aos antígenos
167 tumorais (STANDISH et al., 2008), possivelmente pelo mimetismo das células tumorais na
168 secreção de citocinas como evidenciado neste trabalho.

169 **CONCLUSÕES**

170 Concluimos que o aumento na secreção de IL-10 pelo tecido mamário neoplásico cria
171 um ambiente tumoral favorável para a progressão tumoral, tanto pela supressão de outras

172 citocinas, como o IFN- γ e a IL-2, como pelo aumento na diferenciação de linfócitos T
173 auxiliares em linfócitos T regulatórios, que ocorrem na presença de IL-10.

174

175

AGRADECIMENTOS

176 À FAPESP (processo XXX/XXXX-X) pelo auxílio financeiro à pesquisa e pela bolsa
177 de estudo (processo XXXX/XXXX-X). Este trabalho é parte da Tese de Doutorado do
178 primeiro autor.

179 Aprovado pelo COBEA e CEUA (protocolo XXXXX/XX).

180

181

REFERÊNCIAS

182 ABBAS, A.K.; LICHTMAN; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. Elsevier
183 Saunders, 2012. p. 389-406.

184 BILLER, BJ; ELMSLIE, RE; BURNETT, RC; AVERY, AC; DOW, SW. Use of FoxP3
185 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with câncer. Veterinary
186 Immunology and immunopathology. V. 116, p. 69-78, 2007).

187 DUNN, G.P.; OLD, L.J.;SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. Annual
188 Review Immunology, v. 22, p. 211-7. 2004. Doi:
189 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.

190 HODI, F.S.; SOIFFER, R.J. Interleukin. In: BERTINO, J. Encyclopedia of cancer. Academic
191 Press, 2002. p. 530-31.

192 HORIUCHI, Y.; NAKAJIMA, Y.; NARIAI, Y.; ASANUMA, H.; KUWABARA, M.
193 Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes – A flow cytometric study.
194 Veterinary Immunology Immunopathology, v.118, p.179-185. 2007.

195 O`NEILL, K; GUTH, A; BILLER,B; ELMSLIE, R; DOW, S. Changes in Regulatory T cells
196 in dogs with câncer and associations with tumor type. J. Vet Intern Med. v.23, p. 875-881,
197 2009.

198 REED, M.J. The discriminant-function test: a marker of Th1/Th2 cell cytokine secretion and
199 breast tumour oestrogen synthesis. Molecular Medicine Today, v.1, p.98-103. 1995.

200 REOME, J.B.; HYLIND, J.C.; DUTTON, R.W.; et al. Type 1 and type 2 tumor infiltrating
201 effector cell subpopulations in progressive breast cancer. *Clinical Immunology*, v.111, p.69-
202 81, 2004.

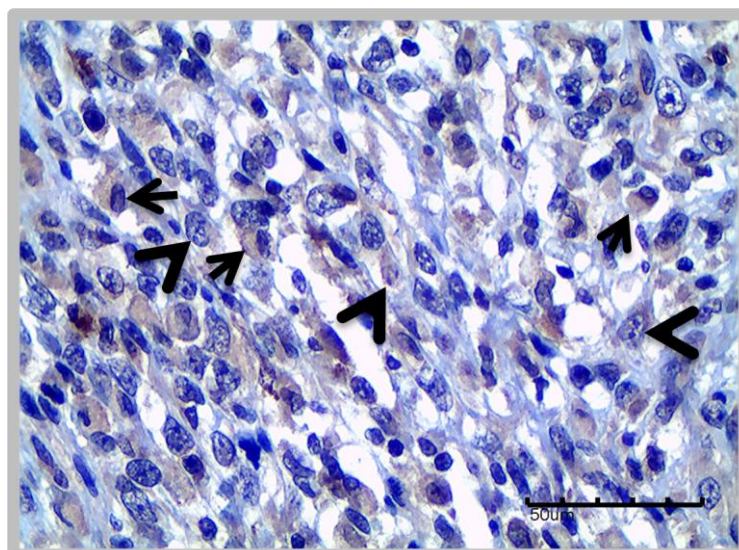
203 RISSETO, KC; INDT, H; SELTING, KA; VILLAMIL, JA; HENRY, CJ; REINERO, CR.
204 Cloning and expression of canine CD25 for validation of an anti-human CD25 antibody to
205 compare T regulatory lymphocytes in healthy dogs and dogs with osteosarcoma. *Veterinary*
206 *Immunology and Immunopathology*. V.135, p.137-145, 2010.

207 SATYAM, A.; SINGH, P.; BADJATIA, N.; et al. A disproportion of TH1/TH2 cytokines
208 with predominance of TH2 in urothelial carcinoma of bladder. *Urologic Oncology*, v.29, n.,
209 p.58-65, 2011.

210 STANDISH, LJ; SWEET, ES; NOVACK, J; WENNER, CA; BRIDGE, C; NELSON, A;
211 MARTZEN, M; TORKEKELSON, C. Breast cancer and immune system. *J. Soc Integr Oncol*.
212 V.6, n.4, p. 158-68, 2008.

213 YAMAZAKI, K.; YANO, T.; KAMEYAMA, T.; et al. Clinical significance of serum
214 TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery*, v.131, p.S236-41,
215 2002.

216



217

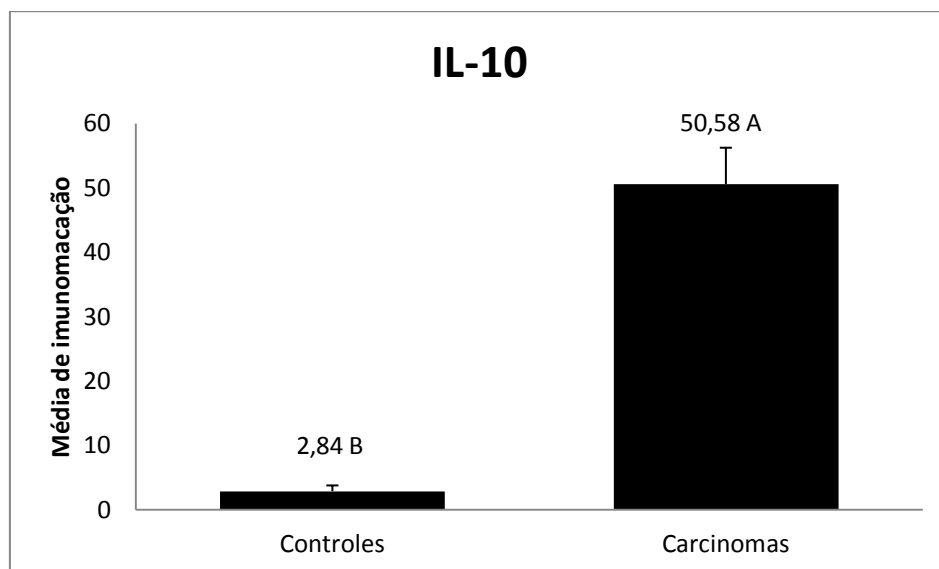
218 **Figura 1.** Fotomicrografia de tecido mamário canino
219 acometido por carcinoma mamário de padrão sólido.
220 Notar leucócitos (setas) e células neoplásicas (cabeça
221 de seta) imunomarcados pelo anticorpo anti-IL-10.

222 Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP).

223 Barra=50 μ m.

224

225



226

227 Figura 2. Densidade de células imunomarcadas para o anticorpo anti-

228 IL10 no grupo controle e no grupo de cadelas acometidas por carcinoma

229 mamário. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste T de

230 Student ($\alpha=5\%$).