

**INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO
FIGUEIRA – IMIP**

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

**EXPRESSÃO RECEPTOR TOLL LIKE 9 NO
CARCINOMA ESPINOCELULAR NA PELE
FOTOEXPOSTA EM ADULTOS E IDOSOS**

MARIA CAROLINA AMANDO DO NASCIMENTO MATIAS

Recife

Agosto de 2018

**INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO
FIGUEIRA – IMIP**

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

**EXPRESSÃO TOLL LIKE RECEPTOR 9 NO
CARCINOMA ESPINOCELULAR NA PELE
FOTOEXPOSTA EM ADULTOS E IDOSOS**

**Projeto de pesquisa apresentado ao
Programa Institucional de Bolsas
de Iniciação Científica referente ao
processo seletivo do edital PIC/FPS
2017/2018.**

Autora:

Maria Carolina Amando do Nascimento Matias

Alunas colaboradoras:

Raquel Nogueira Cordeiro

Mariana Ádelle da Rocha Santos

Sílvia Helena de Melo Souza

Lucimere Alves dos Santos

Orientadora:

Mecciene Mendes Rodrigues

Recife

Agosto de 2018

DADOS DA ORIENTADORA:

1. Mecciene Mendes Rodrigues

Médica Dermatologista e Professora associada da Pós-graduação do IMIP¹

Telefone: (81) 9.9451-2159

E-mail: mecciene@gmail.com

DADOS DA ALUNA AUTORA:

Maria Carolina Amando do Nascimento Matias

Estudante de medicina do 10º período da Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS²

Bolsista PIC/FPS.

Telefone: (81) 99946-8101

E-mail: carolina_amando@hotmail.com

DADOS DAS ALUNAS COLABORADORAS:

Raquel Nogueira Cordeiro

Estudante de medicina do 10º período da Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS²

Estudante colaboradora PIC/FPS

Telefone: (81) 99274-1645

E-mail: raquelnogueiracordeiro@gmail.com

Mariana Ádelle da Rocha Santos

Estudante de medicina do 10º período da Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS²

Telefone: (81) 99647-2397

E-mail: mariana_adelle@hotmail.com

Lucimere Alves dos Santos

Estudante de medicina do 10º período da Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS²

Telefone: (81) 9.9958-8455

E-mail: meryalvesmed22@gmail.com

Silvia Helena de Melo Souza

Estudante de medicina do 10º período da Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS²

Telefone: (81) 9.9212-0304

E-mail: silvinha_melo101@hotmail.com

1. Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP: Rua dos Coelhos, 300 – Boa Vista – Recife/PE – CEP: 52.050-300.

2. Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS: Av. Jean Emile Favre, 422 – Imbiribeira – Recife/PE – CEP: 51.200-060.

RESUMO

Introdução: Os cânceres da pele não melanoma (CPNM) ocorrem mais frequentemente em caucasianos e o carcinoma espinocelular (CEC) representa 20% dos CPNM. Receptores Toll-like 9 (TLR9) são receptores de superfície celular citoplasmáticos e são expressos em células do sistema imune e queratinócitos. Eles são componentes do sistema imune inato e foram estudados em CEC na cabeça e pescoço e colo do útero e pulmões. **Objetivo:** No presente estudo avaliamos o TLR9 no CEC na pele foto-exposta de adultos e idosos. **Método:** Trata-se de um estudo secundário tipo caso controle e que tem como projeto âncora uma tese de doutorado. Este estudo avaliou 19 pacientes com CEC na pele foto-exposta de adultos e idosos e 16 sem diagnóstico de câncer, atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP). **Resultados:** Dos casos de CEC, 80% apresentaram UVBs ($p < 0,05$); 94,7% dos casos eram de pele tipos I e II de Fitzpatrick ($p < 0,000$); 73,4% eram do sexo masculino ($p < 0,012$) com média de idade de 70 anos \pm 13 ($p < 0,000$). Observamos que a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de TLR9 nos linfócitos totais foi menor nos pacientes com CEC quando comparados ao grupo controle ($p < 0,04$). A expressão do MFI TLR9 no total de leucócitos, linfócitos totais e células B foi menor nos pacientes com UVBs quando comparados aos pacientes com UVB-resistente (UVBr) ($p < 0,01$, 0,004 e 0,01, respectivamente). **Conclusão:** Estes achados sugerem a supressão do sistema imune inato e adaptativo através da expressão deficiente de TLR9 em indivíduos UVBs e em casos de CEC, e que os UVBs também podem constituir um risco maior de CEC via TLR9. A idade média de 70 anos registrada nos pacientes com CEC também pode estar associada a uma expressão deficiente de TLR9 e também pode ser atribuída a alterações ultra-estruturais na pele de senescência. **Palavras-chaves:** *Neoplasias Cutâneas, Carcinoma de Células Escamosas, Carcinoma Basocelular, Receptor Toll-Like 9*

RESUMO EXPANDIDO

Introdução: Os cânceres da pele não melanoma (CPNM) ocorrem mais frequentemente em caucasianos e o carcinoma espinocelular (CEC) representa 20% dos CPNM. A exposição à radiação ultravioleta B (UVBR) é o principal fator de risco para o CEC na pele fotoexposta, e cerca de 90% dos indivíduos com CEC são suscetíveis à UVB (UVBs). Receptores Toll-like 9 (TLR9) são receptores de superfície celular citoplasmáticos e são expressos em células do sistema imune e queratinócitos. Eles são componentes do sistema imune inato e foram estudados em CEC na cabeça e pescoço e colo do útero e pulmões. **Objetivo:** No presente estudo avaliamos o TLR9 no CEC na pele foto-exposta de adultos e idosos. **Método:** Este estudo avaliou 19 pacientes com CEC na pele foto-exposta de adultos e idosos e 16 pacientes sem câncer de pele. **Resultados:** Dos casos de CEC, 80% apresentaram UVBs ($p < 0,05$); 94,7% dos casos eram de pele tipos I e II de Fitzpatrick ($p < 0,000$); 73,4% eram do sexo masculino ($p < 0,012$) com média de idade de 70 anos \pm 13 ($p < 0,000$). Observamos que a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de TLR9 nos linfócitos totais foi menor nos pacientes com CEC quando comparados ao grupo controle ($p < 0,04$). A expressão do MFI TLR9 no total de leucócitos, linfócitos totais e células B foi menor nos pacientes com UVBs quando comparados aos pacientes com UVB-resistente (UVBr) ($p < 0,01$, 0,004 e 0,01, respectivamente). **Conclusão:** Estes achados sugerem a supressão do sistema imune inato e adaptativo através da expressão deficiente de TLR9 em indivíduos UVBs e em casos de CEC, e que os UVBs também podem constituir um risco maior de CEC via TLR9. A idade média de 70 anos registrada nos pacientes com CEC também pode estar associada a uma expressão deficiente de TLR9 e também pode ser atribuída a alterações ultra-estruturais na pele de senescência. A expressão de TLR9 no sangue periférico por citometria de fluxo foi de fácil execução e com baixo risco. Mais pesquisas com um número maior de participantes são necessárias. **Palavras-chaves:** *Neoplasias Cutâneas, Carcinoma de Células Escamosas, Receptor Toll-Like 9*

ABSTRACT

Introduction: Non-melanoma skin cancers (NMSC) occur most commonly in Caucasians and squamous cell carcinoma (SCC) accounts for 20% of NMSCs. Exposure to ultraviolet B radiation (UVBR) is the major risk factor for SCC in photo-exposed skin, and about 90% of individuals with SCC are UVB-susceptible (UVBs). Toll-like receptors 9 (TLR9) are cytoplasmic cell surface receptors and are expressed in cells of the immune system and keratinocytes. They are components of the innate immune system, and have been studied in SCC in the head and neck and cervix and lungs. **Objective:** In the present study we assessed the TLR9 in SCC in the photo-exposed skin of adults and older people. **Methodology:** This study evaluated 19 patients with SCC on photo-exposed skin of adults and older people, and 16 controls. **Results:** Of the SCC cases, 80% presented with UVBs ($p < 0.05$); 94.7% of the cases were Fitzpatrick skin types I and II ($p < 0.000$); 73.4% were male ($p < 0.012$) with a mean age of 70 years \pm 13 ($p < 0.000$). We observed that the mean fluorescence intensity (MFI) of the TLR9 expression in the total lymphocytes was lower in patients with SCC when compared to the control group ($p < 0.04$). The MFI TLR9 expression in the total leukocytes, total lymphocytes and B cells was lower in UVBs patients when compared to the UVB-resistant (UVBr) patients ($p < 0.01$, 0.004 and 0.01, respectively). **Conclusions:** These findings suggest suppression of the innate and adaptive immune systems through deficient TLR9 expression in UVBs individuals and in SCC cases, and that UVBs may also constitute a greater risk of SCC via TLR9. A mean age of 70 years recorded in the SCC patients may also be associated with a deficient TLR9 expression and may also be attributed to ultra-structural changes in senescence skin. The TLR9 expression in peripheral blood by flow cytometry was easy to perform and with low risk. Further research with a larger number of participants is required. **Key words:** *Skin Neoplasms, Carcinoma Squamous Cell, Toll-Like Receptor 9*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPNM Câncer da pele não melanoma

CEC Carcinoma espinocelular

UVBR Radiação ultravioleta B

UVBs UVB-sensíveis.

UVBr UVB-resistente

TLR9 Receptores Toll-like 9

DAMPS Padrões moleculares associados a danos

HCP Hospital de Câncer de Pernambuco

MED Dose mínima de eritema

DPCP Diphencyprone

HE : Hematoxilina-eosina

MFI Intensidade média de fluorescência

INTRODUÇÃO

O câncer de pele não melanoma (CPNM) é o câncer mais frequente no Brasil, apresenta uma taxa de 30% de todos os tumores malignos no país e, esperam-se, para o ano de 2018, no Brasil, cerca de 165.580 novos casos de CPNM (85.170 casos novos nos homens e 80.410 nas mulheres)¹. A exposição à radiação ultravioleta B (UVBR) continua sendo o principal fator de risco para o CPNM, e o carcinoma espinocelular (CEC) é o segundo mais prevalente no grupo, correspondendo a cerca de 20% de todos os CPNMs^{1,2}.

A suscetibilidade à radiação ultravioleta B (UVBs) é um marcador de risco para CPNM, é de herança autossômica e está presente em cerca de 90% dos indivíduos com CEC, contra 40% da população³⁻⁵. Em indivíduos com UVBs, células que sofreram

danos no DNA por meio de UVBR expressam mutação no gene p53, com dano à apoptose e a consequente indução de CEC⁶.

A exposição a UVBR leva a danos celulares e fotoprodutos podem constituir padrões moleculares associados a danos (DAMPs)⁷. DAMPs são reconhecidos pelos receptores toll-like (TLRs), que são componentes do sistema imune inato⁸. Receptores Toll-like são receptores de superfície celular citoplasmáticos expressos em monócitos/macrófagos, linfócitos B, células dendríticas e em células epiteliais⁹. Dez TLRs (TLR1 a TLR10) já foram descritos, dos quais o TLR9 é um dos mais importantes no processo de carcinogênese, podendo levar a um aumento das citocinas IL-6, IL-12 e TNF α . As citocinas IL-6, IL-12 e TNF α são conhecidas por promover carcinogênese^{10,11}.

A expressão de TLR9 pode, portanto, promover uma desregulação da resposta imune e levar à oncogênese por meio de reação inflamatória crônica, angiogênese e imunossupressão¹¹⁻¹³.

A pele é o maior órgão do corpo humano, está em contato com o ambiente externo e é um dos componentes do sistema imune inato, já que é a principal barreira física do corpo¹⁴. Devido à sua localização externa, a pele é exposta a estresse oxidativo, inflamação, imunossupressão, dano celular ao DNA e mutação genética, fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento causado pela exposição a UVBR¹⁵⁻¹⁶.

A expressão de TLR9 tem sido estudada em CECs em locais não expostos à radiação ultravioleta (UVBR) em CECs bucais, de cabeça e pescoço, estômago, pulmão e cervical. No entanto, não há estudos com CEC na pele exposta à UVBR em adultos e idosos¹⁷⁻²⁵.

Embora já se tenham passado quase 50 anos desde que foram descobertas as alterações imunológicas e a carcinogênese associada à exposição à UVBR, ainda

existem lacunas sobre quais moléculas estão envolvidas e como elas levam a mudanças nos sistemas imunes inato e adaptativo²⁶.

O presente estudo investigou a associação UVBs e a expressão de TLR9 no CEC na pele foto-exposta de adultos e idosos.

MÉTODO

Trata-se de um estudo secundário tipo caso controle que tem como projeto âncora uma tese de doutorado. A amostra do estudo foi composta por adultos e idosos atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP). A população foi de 35 pacientes no total, 19 com diagnóstico de CPNM, tipo CEC e 16 pacientes sem câncer de pele, definidos pelos critérios de inclusão e exclusão do trabalho âncora, que foram os seguintes:

- Critérios de inclusão:

- com 18 anos ou mais

- Critérios de exclusão:

- Pacientes com outros tipos de câncer papilomatoso ou verrucoso;
- Pacientes que apresentam doenças com comprovada relação com os UVBs, como herpes simples recorrente, doença de Hanson ou pitiríase versicolor;
- Pacientes que apresentam doenças imunossupressoras, infecções repetidas da pele ou outras infecções, uso de corticoterapia ou uso de outros imunossupressores;
- Gestantes;
- Aqueles com histórico de exposição prévia ao diphenyprone, um hipersensibilizador de contato que foi usado para identificar indivíduos UVBs.

Os dados analisados foram o sexo, idade, diagnóstico de câncer de pele tipo CEC, expressão TLR9 e a UVBs. As informações foram digitadas em dupla entrada e

comparados no programa *validate* do *software epi-info* versão 6,0. A análise univariada foi realizada no *epi-info*. Foram calculados o *oddsratio* bruto e ajustado, intervalo de confiança de 95% e valor de *p* para avaliar a associação entre a Expressão TLR9, a UVBs e o CEC.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi dispensado e todos os dados foram manejados e analisados de forma anônima, sem identificação nominal dos participantes.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira (IMIP), sob o CAAE de número 76915317.1.0000.5201

As variáveis analisadas:

As variáveis analisadas no projeto âncora foram determinadas das seguintes formas:

- Determinando os UVBs

Determinando a dose mínima de eritema (MED)

Para determinar o MED, a exposição à UVBR foi realizada utilizando uma fonte manual de banda estreita, que emite radiação ultravioleta com espectro contínuo e pico entre 313 e 317nm (aparelho A Pro Lumina) mantido a uma distância de 2,5 cm. O tempo de exposição foi expresso em energia por unidade de área (Kj/m²). A área escolhida da superfície do corpo era a porção não-bronzeada do terço inferior do tronco dorsal.

A área de teste foi revestida com filme foto-opaco, com seis aberturas de 2cm², irradiadas por 120 segundos (3 Kj/m²); 180 segundos (4,5 Kj/m²); 240 segundos (6 Kj/m²); 360 segundos (9 Kj m²); 480 segundos (12 Kj/m²); 720 segundos (18 Kj/m²). Os quadrados foram fechados progressivamente nos tempos correspondentes. Os pacientes foram instruídos a evitar a exposição ao sol durante o período de observação.

O MED foi definido como o tempo necessário para a formação de um eritema discreto, bem definido e sem bolhas, após exposição única ao UVBR, expresso como

energia por unidade de área (Kj/m²). Após 16 a 24 horas de exposição, o eritema foi lido e o MED foi identificado.

-Teste de contato em região dorsal previamente irradiada

Numa área correspondente a duas vezes o MED, 0,1 ml de diphenyprone a 0,05% (DPCP) foi aplicado, diluído em acetona contido e fixado à pele irradiada por um adesivo hipoalergênico, que foi removido após 24 horas quando o efeito irritante do sensibilizador foi observado.

-Teste de Suscetibilidade à Radiação Ultravioleta B (UVBs)

Após 21 a 28 dias de sensibilização com DPCP a 0,05%, foi realizado um teste de contato para verificar a hipersensibilidade de contato ao DPCP diluído a 0,001%, colocado na área não irradiada das costas ao nível da lâmina do ombro. A leitura foi realizada 48 horas após a aplicação, sempre pelo mesmo observador, que aguardou pelo menos 30 minutos após a retirada do adesivo. A leitura observou os seguintes critérios.

(Quadro 1)

Quadro 1: Interpretando a leitura do teste com DPCP à 0.001%

| | |
|--------|--|
| (-) | Reação Negativa; |
| (+) | Reação Fraca = eritema discreto, infiltração pequena, sem edema; |
| (++) | Reação Forte = eritema moderado, pápulas ocasionais, poucas vesículas; |
| (+++) | Reação muito forte = edema importante e várias vesículas; |
| (++++) | Reação extrema = formação de bolhas e ulceração. |

-Negativo = não reator: considerado UVB-susceptível (UVBs);

-Positivo = reator: UVB-resistente (UVBr).

- Biópsia cutânea e histopatológica

Um punch de biópsia descartável de 6 mm foi realizado, precedido de limpeza da pele com solução antisséptica e anestesia local.

Os fragmentos para exame histológico foram fixados em formaldeído a 10%, tamponados para histologia e corados com hematoxilina-eosina (HE).

CEC “in situ”: presença de queratinócitos atípicos ocupando parte ou toda a epiderme, com evidência de pleomorfismo nuclear. Há uma presença de hiperqueratose e paraqueratose.

CEC invasivo: a presença de uma proliferação de lóbulos e ilhas separadas de queratinócitos eosinofílicos brilhantes contendo um núcleo com algum grau de pleomorfismo e mitoses. O nucléolo pode ser proeminente com a presença de pérolas da córnea e células apoptóticas. A presença de invasão é representada por ilhas tumorais desconectadas em diferentes níveis da derme.

-Análise por citometria de fluxo da expressão de TLR9

Uma citometria de fluxo sanguíneo periférico foi realizada. Uma análise citométrica de fluxo do TLR9 foi conduzida utilizando reagentes BD™ Phosflow (BD Biosciences, EUA). As células foram fixadas com 100 µL de Cytofix/Cytoperm™ BD pré-aquecido e incubadas por 10 minutos a 37°C. Depois disso, foi realizado centrifugação a 250xg durante 8 minutos, o sobrenadante foi rejeitado e a marcação da superfície celular foi realizada com os anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD20. Após incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz, as células foram permeabilizadas com 750µl de Tampão Perm III a 4 ° C e incubadas durante 30 minutos em gelo, protegidas da luz. As células foram então lavadas com 3 ml de PBS, centrifugadas a 250xg durante 8 minutos e o sobrenadante foi rejeitado. Duas etapas de lavagem foram realizadas. Posteriormente, a marcação intracelular com o anticorpo monoclonal anti-TLR9 foi realizada e incubada por 40 minutos protegida da luz. Uma etapa de lavagem adicional foi realizada, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 300 µL de tampão de coloração e a aquisição foi realizada no citômetro de fluxo. Após o passo de permeabilização, adicionou-se mA anti-TLR9 (BD, Pharmigen®, San Diego, CA) e incubou-se a 4°C durante 30 minutos e

protegeu-se da luz. Após incubação, centrifugou-se 2 mL de Perm / Wash 1x concentrado (BD, Cytotfix / Cytoperm™ Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) a 300xg durante 5 minutos a 20°C (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Um total de 50.000 eventos celulares foram adquiridos e as análises dos resultados foram realizadas com BD FACS Suite (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em intensidade média de fluorescência (MFI).

RESULTADOS

Características Clínicas e Demográficas dos pacientes com CEC e Controle

Os UVBs foram observados em 80% dos pacientes com CEC e em 12,5% dos pacientes sem câncer (p-valor = 0,0001). Os pacientes do sexo masculino representaram 73,4% dos casos de CEC e 31,2% sem câncer (p-valor = 0,012). A média de idade foi de 70 (\pm 13) anos em pacientes com CEC e 47,2 (\pm 12,5) sem câncer (p-valor = 0,0001). As classificações de Fitzpatrick tipo I e II foram observadas em 94,7% dos pacientes com CEC e em 37,5% sem câncer (p-valor = 0,0001). **(Tabela 1)**

Análise da expressão de TLR9

Na análise da expressão de TLR9 nos leucócitos circulantes, observou-se que o IFM TLR9 dos linfócitos totais foi menor nos pacientes com CEC quando comparados aos pacientes sem o diagnóstico de câncer (p = 0,04). Não houve diferença estatística no TLR9 MFI em leucócitos totais, monócitos, granulócitos e células B entre os pacientes com CEC e controles, conforme apresentado na Figura 1.

Análise da expressão do TLR9 nos pacientes com UVBs e UVBr

Observou-se que o TLR9 MFI no total de leucócitos, linfócitos totais e células B foi menor nos pacientes com UVBs quando comparado ao UVBr (p = 0,01, 0,004 e 0,01, respectivamente). Não houve diferença estatística na expressão de TLR9 em monócitos e granulócitos entre os grupos UVBs e UVBr. **(Figura 2)**

DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que a maioria dos pacientes com CEC, portadores de UVBS, pele de tipos I e II de Fitzpatrick, eram idosos do sexo masculino. Nos pacientes com CEC, a IMF da expressão de TLR9 nos linfócitos totais encontrados no sangue periférico foi menor quando comparada aos controles. Os pacientes com UVBs também apresentaram MFI menor na expressão de TLR9 em leucócitos e linfócitos totais, e em células B quando comparados a UVBr.

A expressão de TLR9 pode ser avaliada em células do sistema imunológico, tais como monócitos, neutrófilos e linfócitos no sangue periférico e em queratinócitos da pele, mucosa ou células epiteliais no revestimento do sistema digestivo, pulmão, cervix ou células carcinomatosas⁹. No presente estudo, medimos a IMF no sangue periférico de casos de CEC da pele foto-exposta de adultos e idosos e nos controles. Além disso, nas células periféricas do sistema imune, pudemos observar a expressão do TLR9, representando o microambiente tumoral do CEC na pele exposta à UVBR tanto nos casos de CEC quanto nos controles sem CEC.

Chama-se atenção para a menor expressão de TLR9 nos linfócitos totais de pacientes com CEC em pele fotoexposta quando comparados aos controles e a expressão de TLR9 foi muito mais prejudicada em pacientes com UVBs quando comparados aos UVBr, onde foi observada a menor expressão de TLR9 no total linfócitos, leucócitos totais e células B. Portanto, hipotetizamos que uma diminuição na expressão de TLR9 pode ser mais intensamente prejudicada pela exposição a UVBR e UVBs. Os pacientes controle e UVBRs foram caracterizados por uma maior expressão de TLR9 e apresentaram reatividade ao teste de contato entre 21 e 28 dias após a aplicação do antígeno DPCP em pele previamente irradiada, representativa da resistência à UVBR, devido à integridade do inato e adaptativo sistemas imunológicos.

O carcinoma de células escamosas está associado à exposição crônica aos efeitos UVBR e cumulativos, e aos UVBs, promovendo a infiltração celular e a produção de

citocinas e metabólitos pró-inflamatórios envolvidos na iniciação, promoção e progressão da oncogênese²⁷⁻³¹. Sabe-se que o UVBR induz estresse oxidativo e SCC por ativação do fator nuclear K β (NF- κ B), que é um fator de transcrição que regula a expressão de TLR9, que observamos ser menor em UVBs e em SCC em foto pele exposta³². Portanto, sugerimos que possíveis alterações com uma redução na transcrição de TLR9 via NF- κ B, podem ocorrer devido à exposição a RUVB em pacientes com UVBs. No entanto, alguns autores relataram ausência de TLR9 nas células epiteliais não expostas à radiação ultravioleta (UVBR) no CEC cervical, indicando a possibilidade de outros fatores associados além da exposição aos UVBR e UVBs. Mais pesquisas são necessárias para investigar outros fatores envolvidos com a resposta imune inata, a expressão favorável ou desfavorável de TLR9 à carcinogênese, que pode demonstrar o perfil de resposta em UVBs e UVBR^{12, 23}.

Embora tenhamos incluído uma população mista, observamos que as características de cor da pele, olhos e cabelos claros e predisposição à queimação e a incapacidade de se bronzear, conforme descrito na classificação de Fitzpatrick dos tipos de pele I e II, predominaram em nossos resultados, representando mais evidências sobre a participação da UVBR associada ao risco de CEC em caucasianos.

Um fato curioso observado foi a idade média de 70 anos, que caracterizou o grupo de pacientes com CEC. Assim, hipotizamos que a idade pode ser um fator importante na redução da expressão de TLR9 no CEC na pele fotoexposta. A pele senescente apresenta alterações ultraestruturais em função da idade, e nossa população de pacientes com CEC apresentou média de idade de 70 anos³³. Isso sugere que a redução da expressão de TLR9 no CEC também pode estar associada à idade. O carcinoma de células escamosas na pele exposta à fotografia ocorre com maior frequência a partir dos 60 anos e nessa faixa etária observamos instabilidade anatômica da pele, além das alterações ultraestruturais que ocorrem com o envelhecimento, levando à imunossenescência cutânea na população idosa e uma predisposição para

CEC, especialmente em países tropicais³⁴. Alterações são observadas na expressão e função de TLRs em alguns tipos de células, sinalizando mudanças na regulação do sistema imune no envelhecimento, e em células dendríticas plasmocitoides humanas (pDCs) um declínio também foi observado na expressão de TLR9 em envelhecimento^{34,35}.

O risco de desenvolver CEC é maior no sexo masculino, e Chen²⁴, que estudou as formas de exposição entre os sexos, observou diferenças entre os sexos, onde a exposição solar ao longo da vida esteve mais relacionada ao risco de CEC em mulheres. A exposição ao sol foi mais relacionada ao risco de CEC em machos. Determinantes de risco genético de diferentes CPNMs por gênero na supressão imunológica induzida por UVBR também foram relatados³⁶. Para Rudolph³⁷, a incidência de CEC está aumentando em ambos os sexos no mundo, no entanto, o aumento é predominantemente feminino.

CONCLUSÃO

O câncer de pele é um dos cânceres mais comum no mundo, e se detectado precocemente apresenta altos percentuais de cura. Um fator de risco amplamente conhecido é a exposição ao UVBR, que tem efeito cumulativo. Houve um crescente interesse na comunidade científica em relação aos receptores Toll Like (TLRs), devido seu papel na progressão do câncer. No presente estudo, procuramos esclarecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no microambiente tumoral em pele fotoexposta identificando a expressão Toll Like Receptor 9 (TLR-9) em leucócitos e linfócitos totais, monócitos (CD4), linfócitos B (CD20) e granulócitos. Em geral, observou uma menor expressão dos TLR-9 em pacientes com CEC e em pacientes idosos, indicando déficit da resposta imunológica inata e adaptativa como fator importante na oncogênese

do CEC. Mais pesquisas são necessárias para investigar outros fatores envolvidos com a resposta imune inata, a expressão favorável ou desfavorável de TLR9 à carcinogênese.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da Saúde, Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil, Brasília, 2018.
2. Armstrong BK, Kricger A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 63(2001) 8-18. [Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00198-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00198-1)].
3. Yoshikawa T, Kurimoto I, Streilein JW. Tumour necrosis factor-alpha mediates ultraviolet light B-enhanced expression of contact hypersensitivity, *Immunology.* 76 (1992) 264-271.
4. Kurimoto I, Streilein JW. Characterization of the immunogenetic basis of ultraviolet-B light effects on contact hypersensitivity induction, *Immunology.* 81 (1994) 352-8.
5. Yoshikawa T, Era V, Bruins-Slot, Van Den W, Berg JW, Taylor JR, Streilein JW. Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in man. *J . invest. Dermatol.* 95 (1990) 530.
6. Rebel HG, Bodmann CA, Van de Glind GC, Gruijl FR. UV-induced ablation of the epidermal basal layer including p53-mutant clones resets UV carcinogenesis showing squamous cell carcinomas to originate from interfollicular epidermis, *Carcinogenesis.* 33 (2012) 714–20. [Doi: [10.1093/carcin/bgs004](https://doi.org/10.1093/carcin/bgs004)].
7. De Fabo EC, Noonan FB. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology, *J Exp Med.* 158 (1983) 84-98. [Doi: [10.1084/jem.158.1.84](https://doi.org/10.1084/jem.158.1.84)].
8. Hernandez C, Huebener P, Robert F, Schwabe F. Damage-associated molecular patterns in cancer: A double edged sword. *Oncogene.* 35 (2016) 5931–5941. [Doi:[10.1038/onc.2016.104](https://doi.org/10.1038/onc.2016.104)].

9. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer research*. 65 (2005) 5009–5014. [Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0784].
10. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol*. 12 (2011) 715-23. [Doi: 10.1038/ni.2060].
11. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RH. The Yin and Yang of Toll-like Receptors in Cancer. *Oncogene*. 33 (2014) 3485–3495. [Doi:10.1038/onc.2013.302].
12. Takeshita F, Suzuki K, Sasaki S, Ishii N, Klinman D, Ishii KJ. Transcriptional regulation of the human TLR9 gene. *J. Immunol*. 173 (2004) 552-2561. [Doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2552].
13. Popovic PJ, DeMarco R, Lotze MT, Winikoff SE, Bartlett DL, Krieg AM, Guo ZS, Brown CK, Tracey KJ, Zeh HJ. High Mobility Group B1 Protein Suppresses The Human Plasmocitoid Dendritic Cell Response to TLR9 Agonists. *J Immunol* 177 (2006) 8701-8707. [Doi: 10.4049/jimmunol.org/content/177/12/8701].
14. Bangert C, Brunner PM, Stingl G. Immune function of the skin. *Clin Dermatol*. 29 (2011) 360-76. [Doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.01.006].
15. Katiyar SK, Meleth S, Sharma SD, Silymarin, a Flavonoid from Milk Thistle (*Silybum marianum L.*), Inhibits UV-induced Oxidative Stress Through Targeting Infiltrating CD11b⁺ Cells in Mouse Skin. *Photochem Photobiol*. 84 (2008) 266–71. [Doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00241.x].
16. Sluyter R, Halliday GM. Infiltration by inflammatory cell required for solar-simulated ultraviolet radiation enhancement of skin tumor growth. *Cancer Immunol Immunother*. 50 (2001) 151-6. [Doi: 10.1007/PL00006685].
17. Kotrashetti VS, Nayak R, Bhat K, Hosmani J, Somannavar P, *Biotech Histochem*. 88 (2013) 311-22. [Doi: 10.3109/10520295.2013.785592].
18. Min R, Siyi L, Wenjun Y, Shengwen L, Ow A, Lizheng W, Chenping Z. Toll-like receptor-9 agonist increase cyclin D1 expression partly through activation of

activator protein-1 in human oral squamous cell carcinoma cells, *CancerSci.* 103 (2012) 1938-45. [Doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02394.x].

19. Frenzel H, Hoffmann B, Brocks C, Schlenke P, Pries R, Wollenberg B. Toll-like receptor interference in myeloid dendritic cell through head and neck cancer, *Anticancer Res.* 26 (2006) 4409-13.
20. Sheyhidin J, Nabi G, Hasim A, Zhang RP, Ainiwaer J, Ma H, Wang H. Over expression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma, *World J Gastroenterol.* 17 (2011) 3745-51. [Doi: 10.3748/wjg.v17.i32.3745].
21. Belmont L, Rabbe N, Antoine M, Cathelin D, Guignabert C, Kurie J, Cadranel J, Wislez M. Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhance angiogenesis and is associated with a worse survival in lung cancer. *Int J Cancer.* 134 (2014) 765-77. [Doi: 10.1002/ijc.28413].
22. Ghosh A, Dasgupta A, Bandyopadhyay A, Ghosh T, Dalui R, Biswas S, Banerjee U, Basu A. A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 99 (2015) 720-4. [Doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.015].
23. Kumar MM, Adurthi S, Ramachandran S, Mukherjee G, Joy O, Krishnamurthy H, Krishna S, Bafna UD, Uma DK, Jayshree RS. Toll-like receptors 7, 8, and 9 expression and function in cervical cancer Langerhans cells: evidence of anergy, *Int J Gynecol Cancer.* 23 (2013) 184-92. [Doi: 10.1097/IGC.0b013e31827a2003].
24. Chen X, Wang S, Liu L, Chen Z, Qiang F, Kan Y, Shen Y, Wu J, Shen H, Hu Z. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.* 31 (2012) 766-71. [Doi: 10.1089/dna.2011.1427].
25. Lee W, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Song SY, Bae DS. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog.* 46 (2007) 941-7. [Doi:10.1002/mc.20325.8].

26. Ahmad I, Simanyi E, Guroji P. Toll-Like Receptor-4 deficiency enhance srepair of ultraviolet radiation induced cutaneous DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *J Invest Dermatol.* 134 (2014) 1710–7. [Doi:10.1038/jid.2013.530].
27. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight, *Adv Exp Med Biol.* 624 (2008) 89-103. [Doi: 10.1007/978-0-387-77574-6_8].
28. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. Lifetime risk for development of skin cancer in the US population: current estimate is now 1 in 5. *J Am Acad Dermatol.* 35 (1996) 1012–13. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622\(96\)90139-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622(96)90139-5).
29. DS Rigel. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer, *J Am Acad Dermatol.* 58 (2008) S129-32. [Doi: 10.1016/j.jaad.2007.04.034].
30. Meeran SM, Punathil T, S, et al. IL-12 deficiency exacerbates inflammatory responses in UV-irradiated skin and skin tumors, *J InvestDermatol.* 128 (2008) 2716-27. [Doi: 10.1038/jid.2008.140].
31. Marinescu A, Stepan AE, Mărgăritescu C, Marinescu AM, Zăvo RE, Simionescu CE, Niculescu M. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursor lesions, *Rom J Morphol Embryol.* 57(2016) 691–696.
32. J. W Wang, J. Ouyang, J. Li. Loss of Tumor Suppressor p53 Decreases PTEN Expression and Enhances Signaling Pathways Leading to Activation of Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B Induced by UV Radiation. *Cancer Res.* 65 (2005) 6601-11. [Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4184].
33. Olivieri F, Procopio AD, Montgomery RR. Effect of agging on micro RNAs and regulation of pathogen recognition receptors. *Current Opinion in Immunology.* 29 (2014) 29-37. [Doi:10.1016/j.coi.2014.03.006].
34. Jing Y, Shaheen E, Drake RR, Chen N, Gravenstein S, Deng Y. Aging is Associated with a numerical and Functional Decline in Plasmocitoid Dendritic Cells, whereas mieloide dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol.* 70 (2009) 777-784. [Doi: 10.1016/j.humimm.2009.07.005].

35. Shaw AC, Goldstein DG, Montgomery RR. Dysregulated innate immune function in aging. *Nat Rev Immunol.* 13 (2013) 875-87. [Doi: 10.1016/j.coi.2010.05.003].
36. Welsh MM, Karagas MR, Kuriger JK, Houseman A, Spencer SK, Perry AE, et al. Genetic Determinants of UV-Susceptibility in Non-Melanoma Skin Cancer, *PLoS ONE.* 6 (2011) 20019. [Doi:10.1371/journal.pone.0020019].
37. Rudolph C, Schnoor M, Eisemann N, Katalinic A. Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. *J Dtsch Dermatol Ges.* 13 (2015) 788-97.

FIGURAS

Figura 1: Valores da intensidade média de fluorescência (MFI) de TLR9 em leucócitos totais, linfócitos totais, monócitos, granulócitos e células B em pacientes com CEC e controles. O teste de normalidade de Shapiro Wilk foi realizado. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil 25-75%. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Ns: não significativo.

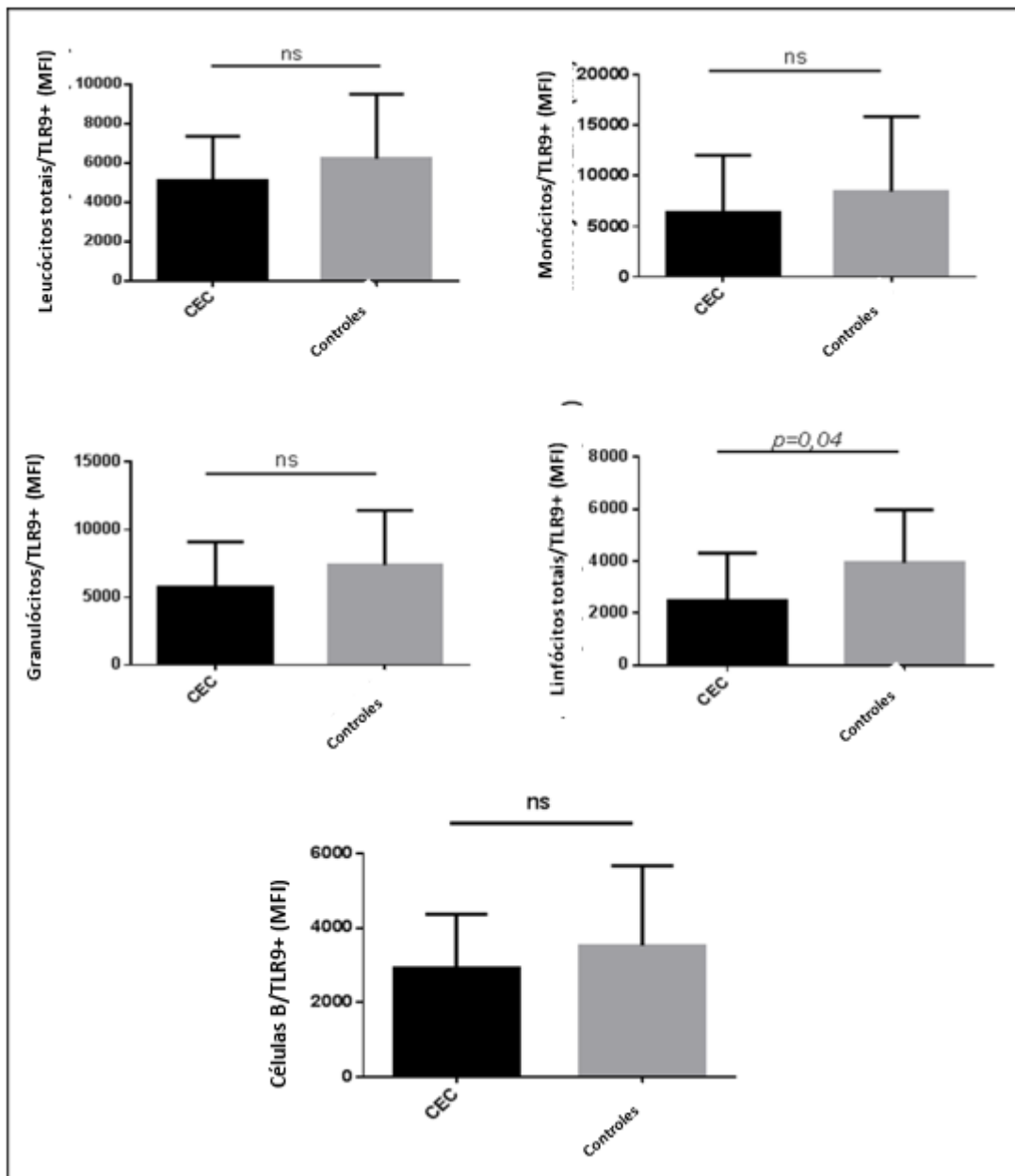
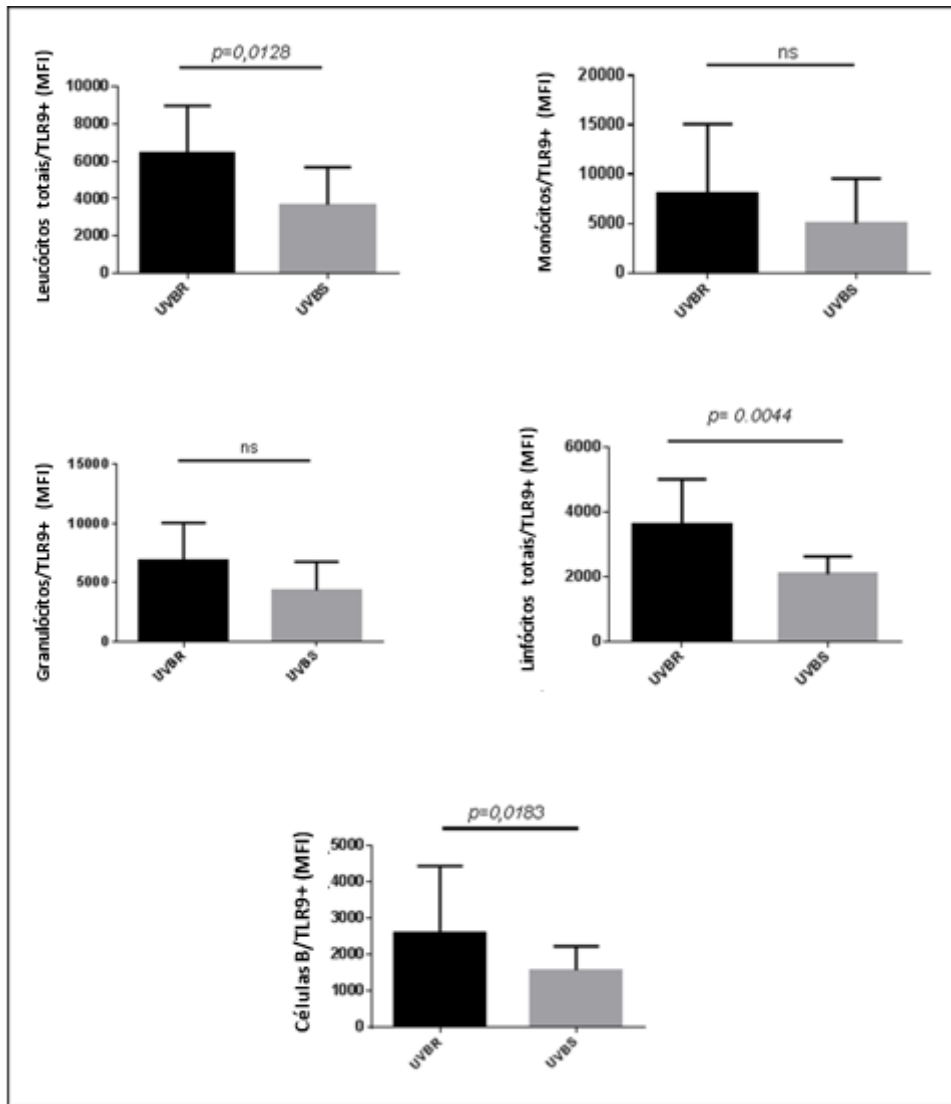


Figura 2: Valores da intensidade média de fluorescência (MFI) de TLR9 em leucócitos totais, linfócitos totais, monócitos, granulócitos e células B em pacientes UVBS e UVBR. O teste de normalidade de Shapiro Wilk foi realizado. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil 25-75%. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Ns: não significativo.



TABELA

Tabela 1. Características sociodemográficas, história de câncer de pele na família, exposição química, queimadura UVBR, tipo de pele de Fitzpatrick, UVBS e CEC em casos e controles analisados

| Variáveis | SCC | | p-value |
|-----------|--------------|--------------|---------|
| | Sim (n = 19) | Não (n = 16) | |

| | | | |
|---|-------------|-------------|-------|
| UVB | | | |
| Resistente | 3 (20.0%) | 14 (87.5%) | 0.000 |
| Susceptível | 12 (80.0%) | 2 (12.5%) | |
| Sexo: Masculino | 14 (73.4%) | 5 (31.2%) | 0.012 |
| Idade | 70.0 ± 13.3 | 47.2 ± 12.5 | 0.000 |
| BMI | 26.1 ± 3.2 | 26.8 ± 3.7 | 0.540 |
| História de câncer de pele na família | | | |
| Não | 0 (-) | 3 (18.7%) | 0.101 |
| Sim | 19 (100%) | 13 (81.3%) | |
| Fuma | | | |
| Nunca fumou | 9 (52.9%) | 14 (87.5%) | 0.031 |
| Atualmente é fumante ou já foi | 8 (47.1%) | 2 (12.5%) | |
| Número de cigarros (maço/ano) | | | |
| Nunca fumou | 9 (60.0%) | 14 (87.5%) | 0.060 |
| Menos que 35 | 6 (40.0%) | 1 (6.3%) | |
| Mais que 35 | 0 (-) | 1 (6.3%) | |
| Exposição a arsênico | | | |
| Não | 1 (5.3%) | 0 (%) | 0.352 |
| Sim | 18 (94.7%) | 16 (100%) | |
| Trabalho^a | | | |
| Outros | 12 (63.2%) | 14 (87.5%) | 0.101 |
| Agricultura | 7 (36.8%) | 2 (12.5%) | |
| Classificação do tipo de pele de Fitzpatrick | | | |
| III a VI | 1 (5.3%) | 10 (62.5%) | 0.000 |
| I e II | 18 (94.7%) | 6 (37.5%) | |
| Previamente queimado | | | |
| Não | 14 (73.7%) | 13 (81.2%) | 0.595 |
| Sim | 5 (26.3%) | 3 (18.8%) | |
