UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NÁDIA GHINELLI AMÔR

**Papel do receptor ST2 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular
induzido quimicamente**

BAURU
2015

NÁDIA GHINELLI AMÔR

**Papel do receptor ST2 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular
induzido quimicamente**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Campanelli

Versão corrigida

BAURU
2015

Am68p Amôr, Nádia Ghinelli
Papel do receptor ST2 no desenvolvimento de
carcinoma espinocelular induzido quimicamente /
Nádia Ghinelli Amôr. – Bauru, 2015.
87 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 001/2012
Data: 27/03/2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Júnior e Stella, que nunca mediram esforços e sacrifícios para que eu e meus irmãos fossemos atrás e alcançássemos nossos sonhos. Só nós sabemos todos os obstáculos que vocês enfrentaram e a maneira magnífica que nunca deixaram nada nos atingir, mesmo nos piores momentos. Vocês são a minha fonte inesgotável de amor e força e, sem dúvida, um exemplo de honestidade e perseverança a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Campanelli**, pela oportunidade, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais, pelo apoio, pela paciência, pela segunda chance, pela confiança. Obrigada por me ajudar a concluir mais essa etapa da minha vida e por me permitir continuar nesse caminho. Tenho você como um exemplo de profissional e pesquisadora a ser seguido.

Ao **Prof. Dr. João Santana** por ceder parte dos animais ST2KO utilizados nesta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Ramon Kaneno** por ceder a linhagem de células tumorais empregadas nos ensaios de citotoxicidade.

À **Prof^ª. Dr^ª Vanessa Soares Lara**, pela ajuda na análise histopatológica dos resultados.

À **Dr^ª. Maria Renata S. Nogueira** que foi quem me ajudou a dar os primeiros passos na pesquisa e quem me direcionou à Prof^ª Ana Paula. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e principalmente pelo carinho, cumplicidade e sorriso que sempre desprende quando nos encontramos.

Ao **Prof. Dr. Sérgio A. Torres** pelas conversas construtivas e divertidas. Obrigada pela boa companhia e pelos ensinamentos.

À **Prof^ª. Dr^ª. Gislaine A. Martins** pela supervisão na minha seleção do *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*. Muito obrigada pela oportunidade e pelo auxílio e discussões altamente produtivas sobre os resultados.

À colega de laboratório **Dr^ª. Thais H. Gasparoto**, que sempre esteve disposta a me ajudar. Obrigada pela segurança e apoio que você sempre me transmitiu. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, conselhos e risadas (muitas).

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, **André Luís da Silva**, que me auxiliou durante toda a execução do protocolo de pesquisa e sempre me proporcionou momentos alegres e divertidos e à **Lívia Maria de Melo**, pela companhia agradável e por toda ajuda.

À secretária do Departamento de Ciências Biológicas, **Dalva Ribeiro de Oliveira**, por sua solicitude em ajudar não só a mim, mas a todos que a procuram. Obrigada pela forma generosa e extremamente gentil que sempre me tratou.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, **Rudan Garcia, Graziela Perri, Kamilla Paes, Carine Oliveira e Cláudia Pinheiro** pela companhia, pela ajuda e apoio na execução do meu projeto, pelas conversas, pelas risadas e pela troca de experiências. Muito obrigada mesmo!

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, **Isabela, Stephanie, Vanessa e Kelly** pelo agradável convívio.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Luis Silva, Erasmo Silva, Elias Cresta e Richard Simões** pelo convívio extremamente agradável e pela ajuda com o cuidado dos animais. E também aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que sempre nos atenderam pronta e cordialmente.

Aos meus primos que estiveram integralmente presentes na minha vida e que sempre me auxiliaram nos momentos difíceis e comemoraram comigo as conquistas. São meus primos por acaso e amigos por escolha!

Às minhas tias, **Célia, Regina e Cristina** que são minhas mães do coração e aos meus tios e avós, que sempre participaram ativamente da minha vida. Obrigada pelo incentivo e amor incondicional.

Aos meus queridos amigos da graduação, em especial **Régis, Mariana e Natália**, com os quais dividi momentos inesquecíveis e construí um laço eterno de amizade. Obrigada por continuarem presentes na minha vida.

Ao meu grande amigo **Wilson Menezes Alves**, que partiu de forma dolorosa quando iniciei meu mestrado, mas que ainda permanece vivo em meu coração e memória.

Às amigas **Carol, Mariana, Letícia, Priscila, Isabela, Larissa e Camila** que mesmo longe participam significativamente da minha vida! Obrigada pelo apoio de vocês!

Aos colegas e amigos de pós-graduação, **Gabriela, Juliana, Clarissa, Cláudia, Franco, Agnes, Paula** pela companhia nas disciplinas, restaurante e pelos conhecimentos trocados e aos demais amigos, que proporcionam momentos alegres e com os quais quero compartilhar essa vitória.

Aos meus irmãos, **Afonso e Nicolas**, pelas risadas, brigas, cumplicidade, apoio, amor... Vivo por você dois.

Aos meus pais, **Stella e Júnior**, por serem o meu alicerce e nunca me abandonarem, sempre me incentivando à seguir em frente. Amo e admiro vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** – Universidade de São Paulo, na pessoa de sua diretora, Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À **Comissão de Pós-Graduação** da Área de Estomatologia e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de sua coordenadora, Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas** da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, na pessoa de seu chefe, Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet.

Ao **Laboratório de Microbiologia e Imunologia** da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, nas pessoas de seus docentes Prof^a. Dr^a. Ana Paula Campanelli e Prof. Dr. Sergio A. Torres.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de minha bolsa de mestrado (2013/12772-8) e pelo auxílio financeiro concedido (2014/06215-1).

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) é um dos cânceres humanos mais incidentes. Apesar do entendimento da fisiopatologia do CEC, as opções terapêuticas ainda são limitadas e o(s) exato(s) mecanismo(s) envolvido(s) na progressão deste tipo de tumor ainda não foi descrito. Estudos recentes mostram a existência de uma associação direta entre a resposta imune T_H1 e um melhor prognóstico em pacientes com CEC. Aumento da expressão de componentes do eixo IL-33/ST2 foi demonstrado contribuir para transformação neoplásica em diversos modelos tumorais, incluindo cânceres de estômago e de mama. Trabalho recente do nosso e de outros laboratórios indicam que IL-33 pode impedir a resposta imune T_H1 . Baseado nessas observações, a hipótese testada foi que o impedimento da resposta imune pela interação IL-33/ST2 pode contribuir para iniciação e progressão do CEC. Utilizando modelo de carcinogênese química em camundongos WT e deficientes de ST2 (ST2KO), os resultados mostram que a deficiência de ST2 leva a uma notável redução da severidade das lesões 20 semanas após a carcinogênese química, sugerindo que a sinalização ST2 é necessária para o desenvolvimento tumoral neste modelo. Análises do infiltrado inflamatório presente nas lesões em camundongos WT e ST2KO revelaram redução significativa nas percentagens de macrófagos, células T $CD4^+$ e células dendríticas, mas não em células T $CD8^+$, células B e células *natural killer* (NK) no microambiente tumoral de camundongos ST2KO. Além disso, células NK esplênicas isoladas de camundongos ST2KO exibiram atividade citotóxica aumentada contra células YAC quando comparado com células de camundongos do grupo controle (WT). Os resultados indicam que a via IL-33/ST2 contribui para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular recrutando células T $CD4^+$, macrófagos e células dendríticas e reduzindo a citotoxicidade de células NK.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Receptor ST2. IL-33. Imunologia tumoral

ABSTRACT

Role of ST2 receptor in squamous cell carcinoma development

Squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common form of skin cancer and is most commonly observed in photo-exposed areas of the body. The mechanism(s) involved in the progression of this tumor are unknown. Recent studies have shown that there is a direct association between a T_H1-related immune response and a better prognosis in patients with SCC. Increased expression of the IL33/ST2 axis components has been demonstrated to contribute to neoplastic transformation in several tumor models, including gastric and breast cancer. Recent work from ours and other laboratories indicate that can IL-33 impair T_H1-type immune responses. Based on these observations, we hypothesized that T_H1-type immune response impairment by IL33/ST2 could contribute to the initiation and progress SCC. We found that ST2 deficiency led to a marked decreased in severity of skin lesions at 20 weeks post-DMBA, suggesting that ST2 signaling is necessary for tumor development in this model. Analysis of tumor lesions in WT and ST2KO mice revealed that lack of ST2 led to a specific and significant reduction in the frequency of macrophages, T CD4⁺ and dendritic cells, but not CD8⁺, B and NK cells. In addition, splenic NK cells isolated from DMBA-treated ST2KO mice exhibited increased cytotoxicity activity against YAC cells targets when compared with WT splenic NK cells in the same cytotoxic assay. Altogether, our findings indicate that IL-33/ST2 pathway contributes to the SCC development by recruitment T CD4⁺ cells, macrophages, and dendritic cells and impairing NK cytotoxicity.

Key words: Squamous cell carcinoma. ST2 receptor. IL-33. Tumor immunology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração do protocolo de indução de carcinogênese química.....	36
Figura 2. Sinalização mediada por ST2 favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente.....	44
Figura 3. Sinalização mediada por ST2 favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente.....	45
Figura 4. Sinalização mediada por ST2 favorece o acúmulo de células T CD4 ⁺ , macrófagos e células dendríticas no microambiente tumoral.....	47
Figura 5. Ausência de ST2 influencia na percentagem de células <i>natural killer</i> produtoras de IL-33 isoladas do microambiente tumoral.....	50
Figura 6. A sinalização mediada por ST2 influencia na atividade citotóxica de células NK.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%.....	Porcentagem
°C.....	Graus Celsius
µg.....	<i>Microgram</i> , microgramas
µL.....	<i>Microliter</i> , microlitros
µM.....	<i>Micromolar</i> , micromolar
µm.....	<i>Micrometer</i> , micrômetro
A.....	Células alvo
APC.....	<i>Allophycocyanin</i> , alofocianina
APC.....	<i>Antigen-presenting cell</i> , célula apresentadora de antígeno
BALB/c.....	<i>Bagg Albinos C Mice</i> , camundogno Bagg albino C
BATF.....	<i>Basic Leucine Zipper Transcription Factor</i> , fator de transcrição zipper de leucina básica
Bcl-2.....	<i>B-cell Lymphoma</i> , linfoma de célula B
BSA.....	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina sérica bovina
CBC.....	Carcinoma basocelular
CCL22.....	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 22</i> , motivo C-X-C ligante de quimiocina 22
CD.....	<i>Cluster of Differentiation</i> , agrupamentos de diferenciação
CEC.....	Carcinoma espinocelular
CFSE.....	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i> , carboxifluoresceína succinidil éster
CTLA-4.....	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i> , antígeno de linfócito T citotóxico 4
CXCL9.....	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 9</i> , motivo C-X-C ligante de quimiocina 9
CXCL10.....	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 10</i> , motivo C-X-C ligante de quimiocina 10
D.....	Maior diâmetro
d.....	Menor diâmetro
DC.....	<i>Dendritic Cell</i> , célula dendrítica
DMBA.....	<i>7,12-Dimethylbenz[a]anthracene</i> , 7,12-dimetilbenz[a]antraceno

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , ácido desoxirribonucleico
E	Célula efetora
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , ácido etileno-dimano-tetra acético
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> , óxido nítrico-sintase endotelial
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i> , quinase regulada por sinal extracelular
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> , separação celular ativada por fluorescência
FasL	CD178
Fas	CD95
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoersceína
FL	<i>Fluorescent Light</i> , luz fluorescente
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FSC	<i>Forward Scatter</i> , parâmetro de análise celular por tamanho
g	<i>Grams</i> , gramas
H&E	<i>Haematoxylin and Eosin</i> , hematoxilina e eosina
h	Hora
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , antígeno leucocitário humano
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> , vírus do papiloma humano
IDO	<i>Indoleamine 2,3 Dioxygenase</i> , indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN-γ	<i>Interferon-gamma</i> , interferon gama
IgA	<i>Immunoglobulin A</i> , imunoglobulina A
IgE	<i>Immunoglobulin E</i> , imunoglobulina E
IgM	<i>Immunoglobulin M</i> , imunoglobulina M
IL	<i>Interleukin</i> , interleucina
IL-1RAcP	<i>Interleukin 1 Receptor Accessory Protein</i> , proteína acessória do receptor de IL-1
IL-33R	<i>Interleukin 33 Receptor</i> , receptor de interleucina 33
ILC-2	<i>Innate Lymphoid Cell 2</i> , célula linfóide inata 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> , óxido nítrico sintase induzível

IRAK1	<i>Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 1</i> , quinase 1 associada a receptor de IL-1
IRAK4	<i>Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 4</i> , quinase 4 associada a receptor de IL-1
IRF4	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i> , fator regulador de interferon 4
ικBα	<i>Inhibitor Nuclear Factor Kappa B Alpha</i> , inibidor do fator nuclear kappa B alfa
kg	<i>Kilogram</i> , quilograma
LAG 3	<i>Lymphocyte-activation Gene 3</i> , gene de ativação de linfócito 3
M1	<i>M1-polarized Macrophages</i> , macrófagos M1 polarizados
M2	<i>M2-polarized Macrophages</i> , macrófagos M2 polarizados
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> , proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF	<i>Macrophage Colony-stimulating Factor</i> , fator estimulador de colônia de macrófagos
MDSC	<i>Myeloid-derived Suppressor Cell</i> , célula mielóide supressora
mg	<i>Milligram</i> , miligrama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , complexo principal de histocompatibilidade
mL	<i>Milliliter</i> , mililitros
mm	<i>Millimeter</i> , milímetros
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i> , gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> , fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer Cell</i> , célula matadora natural
NO	<i>Nitric Oxide</i> , óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
p38	<i>Protein 38</i> , proteína 38
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tapão fosfato salino
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i> , morte celular programada 1
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i> , ligante de morte celular programada 1
PE	<i>Phycoerythrin</i> , ficoeritrina
PercP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> , proteína clorofil peridina

pH	<i>Hydrogenionic Potential</i> , potencial hidrogeniônico
PI	<i>Propidium Iodide</i> , iodeto de propídeo
PKB	<i>Protein Kinase B</i> , proteína quinase B
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i> , acetate miristato de forbol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> , meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SD	<i>Standard Deviation</i> , desvio padrão
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , erro padrão da média
SSC	<i>Side Scatter</i> , parâmetro de análise celular por granularidade
sST2	<i>Soluble ST2</i> , ST2 solúvel
ST2	<i>Interleukin 33 Receptor</i> , receptor de interleucina 33
ST2KO	<i>ST2 Knockout</i> , camundongo geneticamente deficiente de ST2
ST2KO^{CEC}	<i>ST2 Knockout CEC</i> , camundongo geneticamente deficiente de ST2 com indução carcinogênica
ST2KO^{Sham}	<i>ST2 Knockout Sham</i> , camundongo geneticamente deficiente de ST2 sem indução carcinogênica
ST2L	<i>Transmembrane ST2</i> , ST2 transmembrana
ST2LV	<i>Variant Transmembrane ST2</i> , ST2 transmembrana variante
ST2V	<i>Variant ST2</i> , ST2 variante
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> , sinal de transdução e ativação de transcrição 3
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i> , sinal de transdução e ativação de transcrição 5
T CD4⁺	<i>Helper T Lymphocyte</i> , linfócito T auxiliar
T CD8⁺	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> , linfócito T citotóxico
TAM	<i>Tumor Infiltrating Macrophage</i> , macrófagos intratumorais
TCR	<i>T-cell Receptor</i> , receptor de célula T
TGF-β	<i>Tumoral Growth Factor</i> , fator de transformação de crescimento
T_H	<i>Helper T Lymphocyte</i> , linfócito T auxiliar
T_H1	<i>Helper T Lymphocyte 1</i> , linfócito T auxiliar 1
T_H2	<i>Helper T Lymphocyte 2</i> , linfócito T auxiliar 2
Tim3	<i>T-cell Immunoglobulin Mucin 3</i> , proteína mucina e imunoglobulina de célula T

TNF- α *Tumor Necrosis Factor Alpha*, fator de necrose tumoral alfa

T_{REG}..... *Regulatory T Lymphocyte*, linfócito T regulador

USP..... Universidade de São Paulo

UV..... Ultravioleta

V..... Volume

VEGF..... *Vascular Endothelial Growth Factor*, fator de crescimento vascular endotelial

WT..... *Wild Type*, selvagem

WT^{CEC}..... *Wild Type CEC*, camundongo selvagem com indução carcinogênica

WT^{Sham}..... *Wild Type Sham*, selvagem sem indução carcinogênica

YAC-1..... *Mus musculus Lymphoma*, linfoma murino

SUMÁRIO

Introdução e Revisão de Literatura.....	19
Proposição.....	29
Material e Métodos.....	33
1. Animais de experimentação.....	35
2. Carcinogênese química.....	35
3. Eutanásia e coleta de tecidos tumorais.....	36
4. Análise histopatológica.....	36
5. Separação de leucócitos da lesão.....	37
6. Anticorpos.....	37
7. Citometria de fluxo.....	37
8. Purificação de células <i>natural killer</i> (NK).....	38
9. Cultura de linhagem de célula tumoral.....	38
10. Avaliação da citotoxicidade de células NK.....	39
11. Análise estatística.....	39
Resultados.....	41
1. Sinalização mediada por ST2 favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente.....	43
2. Sinalização mediada por ST2 favorece o acúmulo de células T CD4 ⁺ e macrófagos no microambiente tumoral.....	46
3. Ausência de ST2 influencia na percentagem de células <i>natural killer</i> produtoras de IL-33 isoladas do microambiente tumoral.....	49
4. A sinalização mediada por de ST2 influencia na atividade citotóxica de células NK.....	51
Discussão.....	53
Conclusões.....	61
Referências Bibliográficas.....	65
Anexos.....	85

Introdução e Revisão de Literatura

Neoplasias são doenças complexas resultantes de mutações acumuladas no genoma que estariam associadas ao descontrole de programas essenciais que regulam a diferenciação, proliferação e morte celular (Revisto por MELO; JUNQUEIRA; CHAMMAS, 2003). Estas alterações seriam desencadeadas por fatores ambientais, tais como fatores hormonais ou infecções; hábitos de vida ou ainda por fatores genéticos (ALEXANDROV et al., 2013; PETO; HOULSTON, 2001). A neoplasia cutânea é o tumor maligno mais comum em humanos e pode ser dividido em duas categorias: melanoma, que se desenvolve a partir de melanócitos; e neoplasias cutâneas não melanoma, cuja origem são os queratinócitos (ELDER; MURPHY, 1991; MURPHY; ELDER, 1991). As neoplasias cutâneas não melanoma constituem o grupo de cânceres mais incidentes na população branca e são responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de tumores malignos só no estado de São Paulo (Instituto Nacional de Câncer – INCA 2014). Este tipo de neoplasia desenvolve-se a partir de células epiteliais, variando apenas quanto à localização na camada epidérmica: se originado da camada basal, é classificado como carcinoma basocelular (CBC) (BOWDEN, 2004; TING; KASPER; ARLETTE, 2005), quando localizado na camada espinhosa da epiderme é classificado como carcinoma espinocelular (CEC) (MACBETH; GRINDLAY; WILLIAMS, 2011; SAMARASINGHE; MADAN; LEAR, 2011).

A incidência do câncer cutâneo tem sido crescente nas populações brancas durante as últimas décadas, possivelmente em decorrência do aumento da expectativa de vida e da exposição de indivíduos saudáveis à radiação ultravioleta (UV). A exposição à luz UV é o fator de risco diretamente relacionado ao câncer cutâneo não melanoma (PRESTON; STERN, 1992; FEARS; SCOTTO, 1983). O câncer cutâneo primário não melanoma é a forma mais comum de neoplasia maligna na população branca (PORCEDDU; VENESS; GUMINSKI, 2015) e consiste, em sua maioria, do CBC, seguido do CEC. No Brasil, o número de casos novos de câncer cutâneo não melanoma oficialmente estimados em 2014 é de 98.420 casos em homens e de 83.710 em mulheres (Instituto Nacional de Câncer – INCA 2014). A radiação UV danifica o DNA das células (KVAM; TYRRELL, 1997; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004) e pode afetar genes que controlam a proliferação celular, favorecendo o surgimento de tumores (GRUIJL; van KRANEN; MULLENDERS, 2001). Além da radiação UV, outros fatores para o desenvolvimento de CEC são exposição à radiação ionizante, papilomavírus humano (HPV, do inglês *Human Papillomavirus*), imunossupressão, vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) e linfoma de Hodgkin, fatores ocupacionais, fumo, entre outros

fatores (ASGARI et al., 2008; MOLONEY et al., 2006; WILKINS et al., 2006; OTLEY, 2006; MAREHBIAN et al., 2007; ODENBRO et al., 2005).

A teoria da vigilância imunológica proposta há mais de 50 anos prevê que o sistema imune age como sentinela reconhecendo e eliminando células neoplásicas nascentes (BURNET, 1957). Contudo, a vigilância imunológica é muitas vezes contornada, resultando na progressão do tumor. Os mecanismos clássicos de escape tumoral incluem “down” modulação da expressão de moléculas de HLA classe I (do inglês *Human Leukocyte Antigen*) (SO et al., 2005) e de antígenos tumorais (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006), e secreção de citocinas supressoras como a interleucina-10 (IL-10, do inglês *Interleukin-10*) e fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β , do inglês *Transforming Growth Factor Beta*) (STRAUSS et al., 2007). A capacidade de células T CD4⁺ de diretamente suprimir a resposta antitumoral foi originalmente descrita no modelo de fibrossarcoma no início dos anos 1980 (NORTH; BURSUKER, 1984). Este estudo inicial demonstrou que durante a progressão tumoral, as células T CD4⁺ mediavam supressão do desenvolvimento da imunidade protetora (NORTH; BURSUKER, 1984), um fenômeno agora atribuído a diferentes subtipos de células T reguladoras (T_{REG}, do inglês *Regulatory T-cell*).

Durante a fase de escape, o sistema imune falha em restringir o crescimento tumoral e as células tumorais emergem causando a doença clinicamente visível (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; MITTAL et al., 2014). Nesta fase, as células tumorais evadem o reconhecimento imune possivelmente devido à perda de antígenos tumorais, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) ou moléculas co-estimuladoras (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; MITTAL et al., 2014). Além disso, as células tumorais podem expressar moléculas que aumentam a sua resistência, como STAT3 (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*); aumentam sua sobrevivência através de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 (do inglês *B-cell Lymphoma 2*) e ainda podem aumentar sua capacidade imunossupressora através de IDO (do inglês *Indoleamine 2,3 Dioxygenase*), PD-L1 (do inglês *Programmed Cell Death Ligand 1*), galectina-1/3/9, CD39, CD73, receptores adenosina, além de secretarem citocinas como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF- β , IL-6, fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) que aumentam a angiogênese (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). O próprio sistema imune pode atuar favorecendo o escape tumoral. Células mielóides supressoras (MDSC, do inglês *Myeloid-*

derived Suppressor Cell), macrófagos M2 e células dendríticas (DC, do inglês *Dendritic Cell*) podem expressar moléculas imunoregulatórias, como arginase e IDO, e secretar citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , que inibem a proliferação de células T CD8⁺ ou induzem apoptose (MITTAL et al., 2014). Células mielóides supressoras e células dendríticas expressando IDO também induzem a geração de células T_{REG} (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; MITTAL et al., 2014). Células T, incluindo as T_{REG}, expressam receptores inibitórios como PD-1 (do inglês *Programmed Cell Death 1*), CTLA-4 (do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), Tim-3 (do inglês *T-cell Immunoglobulin Mucin Protein 3*) e LAG 3 (do inglês *Lymphocyte-Activation Gene 3*) que suprimem a resposta imune antitumoral e favorecem o crescimento tumoral (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; MITTAL et al., 2014). Na fase de escape, o balanço é desviado para a progressão tumoral devido à presença de citocinas e moléculas imunossupressoras como IL-10, TGF- β , VEGF, IDO, PD-L-1 (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; MITTAL et al., 2014; DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

Sabe-se que a resposta imune do hospedeiro pode suprimir o crescimento tumoral e há poucas décadas vem se demonstrando que pacientes com câncer são capazes de iniciar uma resposta imune humoral e celular contra o próprio tumor, reconhecendo vasto número de epítomos, próprios ou modificados (JÄGER et al., 1998; GNJATIC et al., 2002; KREITER et al., 2015). Evidências indicam que nos estágios iniciais da tumorigênese o sistema imune consegue eliminar as células com potencial maligno, tal fato evidencia o importante papel das células do sistema imune no controle do desenvolvimento tumoral. Dentre as células envolvidas na imunidade tumoral destaca-se o papel de linfócitos T CD8⁺. Estas células reconhecem e eliminam células tumorais que apresentam antígenos via moléculas MHC de classe I; secretam citocinas como interferon-gama (IFN- γ), estimulam a imunidade adaptativa e podem induzir a morte celular através da ligação de receptores de morte celular como o Fas/FasL (CD95/CD178) (GORELIK; FLAVELL, 2001; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; LIEBERMAN, 2003). Linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos tumorais e podem controlar o desenvolvimento tumoral (BRAUMÜLLER et al., 2013; TRAN et al., 2014). Ademais, coordenam a resposta imune antitumoral através da produção de citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ e induzem a ativação de células da imunidade inata como os macrófagos através da liberação de IFN- γ produzido por células T CD4⁺ tipo 1 (T_H1, do inglês *T Helper 1*) (CASERTA; BORGER; ZAMOYSKA, 2012). Células *natural killer* (NK) apresentam

importante papel no controle do desenvolvimento tumoral e metástase (ZAMAI et al., 2007). Elevado número de células NK no microambiente tumoral foi relacionado com melhor prognóstico em pacientes com carcinoma colorretal, gastrointestinal e espinocelular de pulmão (COCA et al., 1997; ISHIGAMI et al., 2000; VILLEGAS et al., 2002). Macrófagos representam a população de células mais abundante no microambiente tumoral (NOY; POLLARD, 2014). Inúmeros estudos apontam que macrófagos podem desempenhar papel tumoricida ou promover a progressão neoplásica dependendo do seu fenótipo (MANTOVANI et al., 2002; SICA; MANTOVANI, 2012; KRAUSGRUBER et al., 2011; ONG et al., 2012). Macrófagos do fenótipo M1 eliminam células tumorais através da produção de iNOS (do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*), citocinas inflamatórias como IL-12, IL-23 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *Tumoral Necrose Factor Alpha*) e/ou secreção de quimiocinas como CXCL9 (do inglês *Chemokine C-X-C Motif Ligand 9*) e CXCL10 responsáveis pelo recrutamento de células T_{H1} (SICA; MANTOVANI, 2012; KRAUSGRUBER et al., 2011; ONG et al., 2012). Macrófagos do fenótipo M2 produzem IL-6, IL-10, arginase, IDO e CCL22 (do inglês *Chemokine C-C Motif Ligand 22*) e participam mais ativamente do processo de reparo tecidual, remodelação e angiogênese, potencialmente contribuindo para progressão tumoral (MANTOVANI et al., 2002; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Modelos experimentais com diferentes tipos de tumores mostram que a polarização para um perfil de resposta T_{H1} está associada com resolução do câncer, enquanto que a polarização para T_{H2} está associada com progressão tumoral (GHOSH et al., 1995; HU; URBA; FOX, 1998; LEE et al., 1997). A resposta imune tipo T_{H1} é caracterizada pela expressão de citocinas envolvidas na resposta pro-inflamatória como, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α , que participam da resposta imune antitumoral. IFN- γ leva a inibição da angiogênese, evento chave da manutenção e progressão tumoral (IKEDA; OLD; SCHREIBE, 2002). As células T_{H1} podem ainda mediar a rejeição tumoral diretamente através de mecanismos que incluem efeitos citotóxicos diretos contra células tumorais via produção de TNF- α (FRANSEN et al., 1986) ou via expressão de FasL que induz apoptose mediada por contato de células tumorais Fas⁺ (RAMSDELL et al., 1995). Por outro lado, a resposta imune do tipo T_{H2}, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, parece favorecer a progressão tumoral (MURPHY, 2012). A citocina IL-4 atua diretamente em células tumorais aumentando a expressão de moléculas anti-apoptóticas, o que favorece a sobrevivência das células tumorais (CONTICELLO et al., 2004) e também pode promover o crescimento e

invasão tumoral induzindo atividade de catepsina em macrófagos intratumorais (GOCHEVA et al., 2010). A citocina IL-6 contribui para a progressão tumoral via interação com seu receptor que culmina na ativação da via de sinalização JAK/STAT e transcrição de genes responsáveis pela proliferação e inibição da apoptose da célula tumoral (HODGE; HURT; FARRAR, 2005). Adicionalmente, IL-6 pode induzir tumorigênese através de hipermetilação de genes supressores tumorais resultando na inativação dos mesmos e favorecendo a transformação neoplásica (GASCHE et al., 2011). IL-10 favorece crescimento tumoral afetando a capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas, reduzindo a geração de células T CD8⁺ e a produção de citocinas associadas com a resposta imune do tipo T_H1 (SHARMA et al., 1999).

Em diferentes tipos de neoplasias, a predominância de citocinas T_H1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α) ou T_H2 (IL-4, IL-5, IL-13), também está associada com resolução e progressão tumoral, respectivamente (ASHKENAZI et al., 1997; CHEN et al., 1997; CORTES; KURZROCK, 1997; ELSÄSSER-BEILE et al., 1998; HIRSHBERG et al., 1999). Assim, evidências apontam para a possibilidade de que o balanço das respostas T_H1 e T_H2 pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral. Sabe-se que células T CD4⁺ (T_H1) promovem a sobrevivência e induzem a memória de células T CD8⁺ citotóxicas por meio da indução de IL-2 (HUANG et al., 2007). Dessa forma, deficiências na resposta imune T_H1 em pacientes com câncer podem facilitar a progressão de tumores e limitar a eficiência da imunoterapia (NAKAYAMA et al., 2000; AGARWAL et al., 2006; KANAZAWA et al., 2005).

Recentemente foi demonstrada a expressão seletiva de receptores de IL-18 e ST2 em células T_H1 e T_H2, respectivamente (XU et al., 1998a; XU et al., 1998b). Ambos receptores são membros da família de receptores IL-1 e são fundamentais para as funções de T_H1 e T_H2 (XU et al., 1998a; XU et al., 1998b; LÖHNING et al., 1998). O ST2 é um receptor formado por um complexo heterodimérico composto por ST2 e pela proteína acessória do receptor da IL-1 (IL-1RAcP, do inglês *Interleukin-1 Receptor Accessory Protein*) (CHACKERIAN et al., 2007), é expresso por várias células do sistema imune e está relacionado com a produção de citocinas do padrão T_H2 (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). Foram identificadas quatro isoformas de ST2: a isoforma solúvel sST2; a transmembrana ST2L; e as isoformas variantes ST2V e ST2LV (WERENSKIOLD, 1992; YANAGISAWA et al., 1993; TOMINAGA et al., 1999; IWAHANA et al., 2004). Enquanto ST2L é constitutivamente expresso em células hematopoiéticas, a expressão de

sST2 é induzível e parece ser restrita a tecidos do tegumento, retina, mamário e osteogênico (BERGERS et al., 1994; RÖSSLER et al., 1995). A radiação ultravioleta ou citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , induzem a expressão de sST2 por células da derme (KUMAR et al., 1997). A isoforma ST2V é expressa predominantemente em órgãos gastrointestinais e baço (TAGO et al., 2001). Enquanto que a isoforma ST2LV parece ser expressa na fase final da embriogênese no tecido cerebral, ocular, cardíaco e pulmonar, restringindo-se ao tecido ocular na vida adulta (IWAHANA et al., 2004).

Estudos mostram que o tratamento de camundongos com anticorpo anti-ST2 aumenta a resposta imune do tipo T_H1 e sua neutralização inibe a inflamação das vias aéreas (LIEW; LIU; XU, 2005). Elevados níveis da forma solúvel de ST2 (sST2) foram encontrados na circulação de pacientes com várias doenças inflamatórias e a administração exógena de doses farmacológicas de sST2 neutralizam seu ligante e promovem uma redução da inflamação (DINARELLO, 2005). Evidências indicam que o gene ST2 também é expresso por vários tipos de linhagens de células neoplásicas, tais como neoplasias hematológicas (TOMINAGA et al., 1992; YANAGISAWA et al., 1997; YOSHIDA et al., 1995) e câncer de mama (RÖSSLER et al., 1993). Além disso, a detecção de elevada concentração da proteína ST2 na pleura de pacientes com câncer de pulmão pode estar relacionada com o desenvolvimento do câncer (OSHIKAWA et al., 2002). Estudos que avaliaram o papel do receptor ST2 em linhagens de células de glioblastoma verificaram que a expressão de ST2 suprimiu o crescimento destas células neoplásicas (HAGA et al., 2003).

Como descrito na literatura, ST2 é um receptor órfão membro da família de receptores IL-1 (TOMINAGA, 1989) e em 2005 seu ligante foi identificado como sendo a citocina IL-33 (SCHMITZ et al., 2005). Trata-se de uma citocina da família da IL-1, que fica armazenada na forma de pró-IL-33 (SCHMITZ et al., 2005). IL-33 é expressa em diferentes tecidos como estômago, pulmão, medula espinal, cérebro e pele; e tipos celulares como células dendríticas e macrófagos em situações basais em roedores e após estímulo com TNF- α e IL-1 β em humanos (SCHMITZ et al., 2005). IL-33 é constitutivamente expressa em células de barreiras epiteliais e funciona como sinal endógeno de perigo em resposta a danos teciduais (PICHERY et al., 2012; PALMER; GABAY, 2011). As fontes de IL-33 incluem células epiteliais, endoteliais e fibroblastos e trata-se de uma citocina envolvida principalmente na resposta imune T_H2 (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). Seu principal efeito ocorre nas células imunes inatas e adaptativas, incluindo as células linfóides inatas-2 (ILC-2, do inglês *Innate Lymphoid Cells 2*) células T_H2 e em macrófagos

M2 (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). Porém, existem evidências de que a IL-33 possa também mediar outras respostas adaptativas além de T_H2 (SMITHGALL et al., 2008; KOMAI-KOMA et al., 2011) e também respostas inatas, como a migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite (VERRI et al., 2010).

Ademais, IL-33 atua como citocina pró-inflamatória através da ligação com o complexo que compõem seu receptor (CHACKERIAN et al., 2007; GREENFEDER et al., 1995). Tal interação permite que MyD88 (do inglês *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*) se associe com a parte intracelular da IL-1RAcP, recrutando IRAK1 (do inglês *Interleukin-1 Receptor-associated Kinase*) e IRAK4 (SCHMITZ et al., 2005). Uma vez recrutadas, as IRAKs fosforilam diversas moléculas sinalizadoras incluindo ERK 1 e 2 (do inglês *Extracellular Signal-regulated Kinase*), p38 e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (do inglês *Inhibitor Nuclear Factor Kappa B Alpha*), que por sua vez, permite a ativação de NF- κ B (do inglês *Nuclear Factor Kappa B*) resultando na ativação do gene alvo (SCHMITZ et al., 2005). Adicionalmente, IL-33 pode ter funções intrínsecas independente de receptor, atuando como repressor transcripcional, uma vez que é capaz de se translocar para o núcleo celular e associar-se com heterocromatina (CARRIERE et al., 2007; ROUSSEL et al., 2008). IL-33 é um potente ativador da resposta imune inata. Células dendríticas ativadas por IL-33 favorecem a polarização de células T_H2 (BESNARD et al., 2011). Em macrófagos, IL-33 favorece a produção de citocinas e quimiocinas e a polarização para o perfil M2 (ESPINASSOUS et al., 2009; KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009). Macrófagos do fenótipo M2 apresentam atividade supressora e estão relacionados com a promoção tumoral, angiogênese e metástases (MURRAY; WYNN, 2011). Dados apontam que IL-33 polariza células T CD4⁺ ao fenótipo T_H2 caracterizado pela produção de IL-5 e IL-13, mas não de IL-4 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008; MILLER et al., 2008; XU et al., 2008). IL-33 pode induzir a produção de citocinas em células T_H2 efectoras independente da sinalização via receptor de célula T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*), um processo aumentado pela presença do STAT5 (GUO et al., 2009). Combinado com TGF- β , IL-33 aumenta a produção de IL-9 pelas T CD4⁺ (BLOM et al., 2011; UYTENHOVE; BROMBACHER; VAN SNICK, 2010). IL-33 também regula a atividade citotóxica de células T CD8⁺ aumentando sua função em modelo de infecção com o vírus da coriomeningite linfocitária (BONILLA et al., 2012). Além das células do sistema imune, outras células também respondem à IL-33, incluindo células endoteliais que produzem óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*) em resposta à esta citocina de uma maneira dependente de PKB (do inglês *Protein Kinase B*) e eNOS (do

inglês *Endothelial Nitric Oxide Synthase*) (CHOI et al., 2009). Tanto células epiteliais quanto células endoteliais produzem IL-6 e IL-8 bem como MCP-1 (do inglês *Monocyte Chemotactic Protein 1*) em resposta à IL-33 (YAGAMI et al., 2010) e de forma similar, fibroblastos murinos respondem produzindo citocinas pró-inflamatórias e fatores quimiotáticos (FUNAKOSHI-TAGO et al., 2008).

De modo relevante, foi descrito que IL-33 é expressa, constitutivamente, por queratinócitos e tem sua expressão aumentada em amostras de pele inflamada de pacientes com dermatite atópica (MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008; PUSHPARAJ et al., 2009). Estudos demonstraram que IL-33 pode ativar diretamente células dendríticas de camundongos e direcionar a polarização de células T *naïve* para o fenótipo T_H2 e também pode atuar diretamente em células T_H2 induzindo a secreção de citocinas como IL-5 e IL-13 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008; XU et al., 2008). Além disso, IL-33 pode atuar como um fator quimiotático para células T_H2 e ativar células B (KOMAI-KOMA et al., 2007; KOMAI-KOMA et al., 2011). Análises *in vivo* mostram que camundongos tratados com IL-33 apresentam alterações patológicas nas mucosas, incluindo eosinofilia nos pulmões, esôfago e intestino, além de induzir esplenomegalia e altos níveis de imunoglobulina A (IgA, do inglês *Immunoglobulin A*) e IgE no soro (GADINA; JEFFERIES, 2007). Embora grande parte do trabalho experimental até a data concentrou-se sobre os efeitos de IL-33/ST2 em promover a resposta do tipo T_H2, recente atenção começou a voltar-se para o papel desta interação em câncer. Em modelo experimental de câncer de mama, a ausência de sinalização mediada por IL-33 levou a redução no número de tumores primários, menor taxa de crescimento e menor incidência de metástases no pulmão e fígado (JOVANOVIC et al., 2011). Além disso, no mesmo estudo foi detectado que a ausência da interação de IL-33 com seu receptor ocasionou aumento no número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, aumento de atividade citotóxica de células NK e linfócitos T citotóxicos e aumento no número de células NK expressando IFN- γ (JOVANOVIC et al., 2011), eventos-chave da imunidade antitumoral. Por outro lado, em modelo de câncer de pulmão o aumento da expressão IL-33 foi correlacionado com a atenuação do desenvolvimento de metástase, por ter sido observado maior ativação de células T CD8⁺ e NK (GAO et al., 2013). Estes dados contrários reforçam a necessidade de mais estudos acerca do papel e IL-33 na progressão tumoral. Ademais, a ausência de trabalhos publicados que estabeleçam a relação específica da citocina IL-33 com o desenvolvimento e progressão de carcinoma espinocelular de pele ressalta a relevância e originalidade do estudo proposto.

Proposição

O objetivo do presente estudo é analisar se a ausência da sinalização de ST2 afeta o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele induzido quimicamente. Assim, propõe-se:

- a) Avaliar o desenvolvimento e progressão de carcinoma espinocelular em camundongos geneticamente deficientes de ST2 (ST2KO);
 - b) Analisar o fenótipo das células do infiltrado inflamatório presente em lesões de carcinoma espinocelular;
 - c) Analisar a atividade de células *natural killer*.
-

Material e Métodos

1. Animais de experimentação

O estudo foi realizado após a aprovação pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (Protocolo: 001/2012, 27/03/2012). Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c (WT) e geneticamente deficientes de ST2 (ST2KO), fêmeas, de 8 semanas, provenientes do Biotério Central do Campus USP da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram alocados, ao acaso, em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições apropriadas, com livre acesso à água e a uma dieta padrão de laboratório. Com base nas linhagens e perfil de indução carcinogênica, os camundongos foram divididos em quatro grupos, como segue:

Grupo 1: Camundongos BALB/c que não foram submetidos à carcinogênese química (WT^{Sham});

Grupo 2: Camundongos BALB/c que foram submetidos à carcinogênese química (WT^{CEC});

Grupo 3: Camundongos BALB/c deficientes de ST2 que não foram submetidos à carcinogênese química (ST2KO^{Sham});

Grupo 4: Camundongos BALB/c deficientes de ST2 que foram submetidos à carcinogênese química (ST2KO^{CEC}).

2. Carcinogênese química

O protocolo de indução de carcinogênese química utilizado no projeto compreendeu duas fases: iniciação, através da aplicação, no dorso dos camundongos, de dose única de 7,12-dimetilbenz[a]ntraceno (DMBA) em concentração de 50µg/200µL de acetona; seguida de mais três aplicações em concentração de 25µg em 100µL de acetona; e promoção, com três aplicações semanais, no dorso dos camundongos, de acetato miristato de forbol (PMA, do inglês *Phorbol 12 Myristate 13-Acetate*) na concentração de 10µg/100µL de acetona, durante as 20 semanas de indução, com auxílio de pipeta automática (Eppendorf Research - 100µL) (MOORE et. al., 1999). O desenvolvimento do tumor foi acompanhado visualmente no transcorrer de todo o período experimental e as alterações morfológicas devidamente registradas. A análise da variação de peso foi realizada semanalmente em balança analítica digital (Radwag WTB 2000). A taxa de sobrevida foi obtida com a observação diária da sobrevivência dos camundongos submetidos à carcinogênese química. O

tamanho das lesões foi medido com auxílio de paquímetro digital (DIGIMESS) e o volume calculado segundo a equação $V = 0,4 \times D \times d^2$ (D refere-se ao maior diâmetro e d, ao menor diâmetro).

Figura 1. Ilustração do protocolo de indução de carcinogênese química.

3. Eutanásia e coleta de tecidos tumorais

Os camundongos sofreram eutanásia através de inoculação intraperitoneal de barbitúrico Tiopental Sódico 2,5% (200mg/kg) associado com anestésico local (cloridrato de lidocaína na dosagem de 10mg/kg) no período de 20 semanas após o início da aplicação do carcinógeno. As lesões e o baço foram coletados e armazenados em meio RPMI a 4°C e, em seguida, encaminhados para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) USP. No laboratório, este material foi dividido em duas partes: um fragmento foi fixado em solução de paraformaldeído a 10% durante seis horas para coloração com hematoxilina e eosina (H&E); e o segundo fragmento foi destinado à separação do infiltrado celular através da realização de digestão enzimática do tecido.

4. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica, as amostras de tecido, coletadas como descrito acima, foram fixadas em solução de paraformaldeído 10%, pH 7.4, em temperatura ambiente, pelo tempo máximo de 6 horas. O passo seguinte foi a desidratação gradativa em álcool, seguida de xilol e inclusão em parafina. Cortes seriados com espessura de 5µm foram obtidos através de um micrótomo, montados em lâminas (Sigma), e corados com coloração em (H&E). A análise histopatológica foi realizada através da observação de cortes seriados em microscopia óptica, visando basicamente a análise da presença e da localização de células

inflamatórias no microambiente tumoral, assim como as características histológicas do tecido tumoral. As lesões foram classificadas de acordo com o crescimento epitelial: lesões com crescimento epitelial predominantemente exofítico (*papiloma-like*) e lesões que apresentaram invasão epitelial relevante (carcinoma invasivo).

5. Separação de leucócitos da lesão

Para caracterização dos leucócitos presentes no microambiente tumoral, amostras do tecido foram coletadas, fragmentadas e incubadas por 40 minutos a 37°C com meio RPMI contendo 500 µg/ml de colagenase. Após este procedimento, o tecido foi então processado em presença de tampão PBS + BSA + EDTA (0,5%) usando Medimachine (BD PharMingen), por 4 minutos. As células foram colhidas, lavadas e a viabilidade celular determinada por exclusão do azul de Trypan.

6. Anticorpos

Foram utilizados anticorpos anti-*mouse*: CD19 FITC (1D3), CD3 PE/APC (145-2C11), CD4 PE/PercP (RM4-5), CD8 FITC/PercP (53-6.7), NK1.1 PE (PK136), CD11b PE (M1/70), CD14 FITC (rmC5-3), CD27 APC (LG3A10), DC PE (33D1) provenientes da BD Biosciences (San Diego, CA, USA), F4/80 PE (BM8) proveniente da eBioscience (Cleveland, OH, USA) e anticorpos purificados anti: ST2 (245707) e IL-33 (396118) provenientes da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Os respectivos isotipos controle e anticorpos secundários de camundongo, cabra e/ou coelho foram utilizados.

7. Citometria de fluxo

A análise da expressão de marcadores de superfície foi realizada com o intuito de fenotipar a população de leucócitos isolados do tecido tumoral dos animais de experimentação. As células (1×10^6 células) foram lavadas e incubadas com o bloqueio de ligações inespecíficas por 60 minutos a 4°C. Em seguida, os anticorpos foram incubados por 1 hora a 4°C. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas duas vezes com RPMI incompleto, sendo centrifugadas a 460g por 10 minutos. As amostras foram adquiridas em FACS Callibur™ (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ) e as análises realizadas usando o programa CELLQuest™ (BD Immunocytometry Systems) os quais

permitem analisar todas as células adquiridas ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou “*gates*”) selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

8. Purificação de células *natural killer* (NK).

Para a separação da população de células *natural killer* (NK) foi utilizado o sistema de purificação por meio de microesferas magnéticas (Mouse NK Cell Enrichment Set-DM BD IMag, BD Bioscience) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A purificação das células NK foi realizada em uma única etapa, assim, células do baço de camundongos submetidos à carcinogênese química foram incubadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados a biotina (anti-CD4, anti-CD5, anti-CD8a, anti-CD19, anti-CD24, anti-Gr-1 e anti-Ter-119) e, em seguida, incubadas com partículas de estreptavidina magnéticas. Após esse procedimento, as células NK foram coletadas da suspensão celular pela exposição do tubo contendo células a um campo magnético fornecido pelo equipamento magneto (BD Imagnet). Para a alta pureza, a seleção positiva da fração de células foi realizada duas vezes consecutivas. Desta forma, a população celular de interesse foi obtida: células NK.

9. Cultura de linhagem de célula tumoral

A linhagem tumoral YAC-1 (linfoma murino) foi utilizada neste estudo como células alvo nos ensaios para avaliação da citotoxicidade de células NK. A linhagem foi mantida em meio RPMI completo. A manutenção da linhagem tumoral ocorreu a cada 48-72h, quando foram supridas com meio de cultura novo e as células repicadas sempre que necessário. Para a avaliação da citotoxicidade celular, as células alvo foram marcadas, previamente ao ensaio de citotoxicidade, com CFSE. As células ($2,5 \times 10^5$ células) foram incubadas em PBS 5 μ M de CFSE, por 10 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Após este passo, as células foram lavadas duas vezes (centrifugação por 5 minutos, 4°C, 250g) em meio RPMI completo.

10. Avaliação da citotoxicidade de células NK.

A atividade citotóxica das células NK foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se a linhagem celular YAC-1 (linfoma murino) como célula alvo. As células alvo (YAC-1, A) marcadas com CFSE foram co-cultivadas com as células efetoras (NK, E) nas proporções de 10:1, 25:1 e 50:1 (E:A) e incubadas por 4h à temperatura de 37°C (em triplicata). Após este período, iodeto de propídeo (PI, do inglês *Propidium Iodide*) foi adicionado à preparação. Dez minutos após a adição do PI os tubos contendo as misturas de células alvo e células efetoras foram resfriados em banho de gelo e as células avaliadas através da citometria de fluxo. As misturas de células efetoras e células alvo foram analisadas após o ajuste apropriado dos canais SSC/FSC, permitindo localizar cada uma destas populações celulares, com aquisição de 30.000 eventos. A citotoxicidade foi calculada segundo a fórmula: percentagem de células mortas = [(morte tubo teste – morte espontânea de células alvo) / (morte espontânea de células alvo)] x 100 (modificação de MARCUSSON-STAHLE; CEDERBRANT, 2003).

11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) ou média $\pm$ erro padrão da média (SEM) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni, ou pelo teste t com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego CA USA). Todos os valores foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

Resultados

1. Sinalização mediada por ST2 favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente.

Relatos da literatura têm demonstrado que o desenvolvimento tumoral está associado à alterações fisiopatológicas que são observadas nos animais de experimentação. Desta forma, avaliaram-se eventuais alterações fisiológicas e possíveis modificações na sobrevivência de camundongos submetidos à carcinogênese química. Durante o período de vinte semanas não foi observado óbito (**Figura 2A**) nem alterações de comportamento, alimentação e ciclo circadiano dos camundongos (dados não apresentados).

Os resultados da análise semanal do peso revelaram que, a partir da décima segunda semana, camundongos do grupo WT^{CEC} apresentaram média de peso significativamente menor que os camundongos do grupo WT^{Sham}, exceto na décima oitava semana, quando não foram observadas diferenças significativas na média de peso (**Figura 2B**). Não se observou diferenças estatisticamente significativas na média de peso entre os camundongos do grupo ST2KO (**Figura 2B**).

O desenvolvimento tumoral foi acompanhado visualmente no transcorrer de todo o período experimental. Os resultados revelaram que a partir da sétima semana 60% dos camundongos WT^{CEC} apresentaram lesões detectáveis, enquanto que apenas 40% dos camundongos ST2KO^{CEC} apresentaram lesões (**Figura 2C**). Os resultados revelaram que 100% dos animais WT^{CEC} apresentaram lesões na décima semana. De modo contrário, apenas na décima quinta semana de carcinogênese química 100% dos animais ST2KO^{CEC} apresentaram lesões (**Figura 2C**). De modo relevante, o volume dos tumores detectado em camundongos WT^{CEC} ($690,1 \pm 294,9 \text{ mm}^3$) foi maior que o detectado em camundongos ST2KO^{CEC} ($58 \pm 39 \text{ mm}^3$) (**Figura 2C**).

Amostras de pele de camundongos submetidos ou não à carcinogênese química foram coletadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para a análise microscópica do desenvolvimento de carcinoma espinocelular (**Figura 3**). As lesões foram classificadas de acordo com o grau de progressão tumoral e os resultados revelaram que a maioria dos camundongos WT^{CEC} (70%) apresentaram lesões mais invasivas quando comparado com os camundongos ST2KO^{CEC} que, em sua maioria (90%), apresentaram lesões do tipo papiloma-*like* (**Figura 3B**).

A

B

C

Figura 2. Sinalização mediada por ST2 favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente. (A) O gráfico representa a sobrevivência e (B) média de peso registrados semanalmente para cada animal submetido ou não à carcinogênese química. (C) O gráfico representa percentagem de camundongos sem tumor e o volume tumoral detectado após 20 de indução carcinogênica. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. (*) WT^{Sham} em relação ao WT^{CEC} $P < 0,05$.

Figura 3. Sinalização mediada por ST2 favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente. Amostras de pele foram coletadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). (A) As barras representam a determinação do grau de progressão tumoral baseado no crescimento epitelial. (B) Fotomicrografias de amostras de pele e lesões coletadas após 20 semanas de carcinogênese. Dados representativos de três experimentos independentes.

A análise histopatológica das amostras de pele de camundongos do grupo controle (WT^{Sham} e ST2KO^{Sham}) revelou a presença de epitélio escamoso estratificado apresentando poucas camadas de células e presença dos anexos cutâneos (folículos pilosebáceos) (**Figura 3B**). A análise histopatológica das amostras de tecido de camundongos WT^{CEC} na 20ª semana após a carcinogênese química, revelou hiperplasia epitelial caracterizada pelo aumento no número de células nas camadas epiteliais (**Figura 3B**). Observou-se na maioria das amostras áreas displásicas distinguidas pela perda de estratificação com presença de células pleomórficas, núcleos hipercromáticos e ilhotas displásicas e pérolas córneas no tecido conjuntivo fibroso (características de carcinoma espinocelular invasivo) além de intenso infiltrado inflamatório (**Figura 3B**). A análise microscópica das amostras de tecidos de camundongos ST2KO^{CEC} revelou haver predominantemente hiperplasia epitelial com projeções exofíticas digitiformes intercaladas por tecido conjuntivo fibroso (hiperplasia papiloma-like) apresentando infiltrado inflamatório moderado e características displásicas presentes principalmente nas camadas epiteliais basais das formações papilomatosas (**Figura 3B**).

2. Sinalização mediada por ST2 favorece o acúmulo de células T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas no microambiente tumoral

Para determinar o perfil de leucócitos presente no microambiente tumoral, as células foram isoladas das lesões de camundongos submetidos à carcinogênese química e da pele de camundongos do grupo controle (Sham) e a análise realizada nas populações celulares com base em características de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) por citometria de fluxo.

Após 20 semanas de carcinogênese química, os resultados mostraram aumento significativo no número de leucócitos isolados das lesões de camundongos WT^{CEC} ($1,16 \pm 0,16 \times 10^6$) comparado ao número de leucócitos isolados da pele de camundongos WT^{Sham} ($0,2 \pm 0,04 \times 10^6$) (**Figura 4A**). O número de leucócitos obtidos das lesões de camundongos ST2KO^{CEC} ($0,94 \pm 0,12 \times 10^6$) foi maior que o número de leucócitos obtidos de camundongos ST2KO^{Sham} ($0,27 \pm 0,03 \times 10^6$) (**Figura 4A**). Ademais, os resultados evidenciaram que camundongos do grupo WT^{CEC} apresentaram leve aumento no número de leucócitos isolados das lesões quando comparado com animais ST2KO^{CEC} (**Figura 4A**), apesar de não ter sido detectada diferenças estatísticas.

Figura 4. Sinalização mediada por ST2 favorece o acúmulo de células T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas no microambiente tumoral. O número absoluto e o fenótipo dos leucócitos presentes em amostras de pele e lesão de animais WT e ST2KO foi determinado por citometria de fluxo. O primeiro gráfico representa a média $\pm$ SEM do (A) número total de leucócitos isolados da amostra. A percentagem de (B) linfócitos T CD4⁺ e (C) T CD8⁺, (D) células B, (E) células *natural killer* (NK), (F) macrófagos e (G) células dendríticas (DC) foi determinada e as barras representam a média $\pm$ SEM. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. *P < 0,05.

A fenotipagem das populações de linfócitos demonstrou que camundongos WT^{CEC} ($21,84 \pm 1,99\%$) apresentaram percentagens elevadas e significativas de linfócitos T CD4⁺ isoladas das lesões quando comparado aos camundongos WT^{Sham} ($2,73 \pm 1,05\%$) (**Figura 4B**). Diferenças estatísticas não foram detectadas entre os camundongos ST2KO^{CEC} ($7,69 \pm 0,55\%$) e ST2KO^{Sham} ($2,56 \pm 0,96\%$) (**Figura 4B**). Ademais, os resultados evidenciaram que camundongos do grupo WT^{CEC} apresentaram maior percentagem de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ isolados das lesões quando comparado com animais ST2KO^{CEC} (**Figura 4B**).

Em relação aos linfócitos T CD8⁺, os resultados evidenciaram que camundongos WT^{CEC} ($5,67 \pm 0,52\%$) apresentaram percentagens elevadas e significativas de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ quando comparado aos camundongos WT^{Sham} ($1,61 \pm 0,86\%$) (**Figura 4C**). De modo contrário, camundongos ST2KO^{CEC} ($3,91 \pm 0,91\%$) apresentaram percentagens de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ similar aos camundongos ST2KO^{Sham} ($1,26 \pm 0,4\%$) (**Figura 4C**). Os resultados evidenciaram ainda que camundongos do grupo WT^{CEC} apresentaram maior percentagem de linfócitos T CD8 isolados das lesões quando comparado com animais ST2KO^{CEC} (**Figura 4C**), apesar de não ter sido detectada diferenças estatísticas.

Análise da população de células B (CD19⁺) revelou que camundongos WT^{CEC} ($6,9 \pm 1,5\%$) apresentaram percentagens elevadas e significativas de linfócitos CD19⁺ isolados das lesões quando comparado a camundongos do grupo controle (WT^{Sham}, $0,5 \pm 0,27\%$) (**Figura 4D**). De modo semelhante, camundongos ST2KO^{CEC} ($13,15 \pm 4,16\%$) apresentaram maior percentagem de linfócitos B isolados das lesões quando comparado com camundongos ST2KO^{Sham} ($0,47 \pm 0,14\%$) (**Figura 4D**). Os resultados evidenciaram ainda que camundongos do grupo WT^{CEC} apresentaram menor percentagem de linfócitos B isolados das lesões quando comparado com animais deficientes de ST2 (**Figura 4D**), apesar de não ter sido detectada diferenças estatísticas.

Em relação às células NK, o resultados evidenciaram que camundongos WT^{CEC} ($14,35 \pm 2,55\%$) apresentaram percentagens significativas de células NK1.1⁺ isoladas das lesões quando comparado a camundongos WT^{Sham} ($0,96 \pm 0,04\%$) (**Figura 4E**). De modo semelhante, camundongos ST2KO^{CEC} ($11,86 \pm 2,41\%$) apresentaram maior percentagem de células NK quando comparado a camundongos do grupo controle (ST2KO^{Sham}, $1,74 \pm 0,09\%$) (**Figura 4E**). Entretanto, os resultados demonstraram não haver diferenças significativas na percentagem de células NK isoladas das lesões de camundongos dos grupos WT^{CEC} e ST2KO^{CEC} (**Figura 4E**).

A detecção de macrófagos demonstrou que camundongos WT^{CEC} ($50,36 \pm 5,49\%$) apresentaram percentagens elevadas e significativas de macrófagos (F4/80⁺) isoladas das lesões quando comparado aos camundongos WT^{Sham} ($0,12 \pm 0,04\%$) (**Figura 4F**). De modo semelhante, camundongos ST2KO^{CEC} ($13,5 \pm 2,81\%$) apresentaram maior percentagem de macrófagos quando comparado ao grupo ST2KO^{Sham} ($2,8 \pm 0,49\%$) (**Figura 4F**). De modo relevante, os resultados evidenciaram maior percentagem de macrófagos isolados das lesões de camundongos WT^{CEC} em comparação com animais deficientes de ST2 (**Figura 4F**).

Em relação à análise da percentagem de células dendríticas, os resultados revelaram que camundongos WT^{CEC} ($18,08 \pm 2,66\%$) apresentaram maior percentagem de células DC quando comparado ao grupo WT^{Sham} ($3,06 \pm 0,33\%$) (**Figura 4G**). Contudo, os resultados mostraram que camundongos ST2KO^{CEC} ($5,76 \pm 2,57\%$) apresentaram percentagens semelhantes de células DC isoladas das lesões quando comparado aos camundongos ST2KO^{Sham} ($4,31 \pm 0,2\%$) (**Figura 4G**). Ademais, os resultados evidenciaram percentagem de células dendríticas significativamente maior nas lesões de camundongos WT^{CEC} em comparação com animais do grupo ST2KO^{CEC} (**Figura 4G**).

3. Ausência de ST2 influencia na percentagem de células *natural killer* produtoras de IL-33 isoladas do microambiente tumoral

Recentemente, foi descoberto outro membro da família IL-1, a IL-33, expressa constitutivamente em células da barreira epitelial e abundantemente presente em diferentes tecidos (SCHMITZ et al. 2005). IL-33 tem como função biológica induzir a produção de citocinas associadas ao padrão T_H2 (SCHMITZ et al. 2005). Devido à importância desta citocina nos mecanismos efetores da resposta imune, avaliamos a expressão de IL-33 e seu receptor (ST2, IL-33R) por células isoladas das amostras de tecido de camundongos submetidos à carcinogênese química (**Figura 5**).

Em relação à detecção de IL-33, os resultados demonstraram percentagens semelhantes de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-33 isolados das lesões de camundongos WT^{CEC} ($0,3 \pm 0,11\%$) quando comparado a camundongos ST2KO^{CEC} ($0,64 \pm 0,17\%$) (**Figura 5**). De modo semelhante, camundongos WT^{CEC} ($1,34 \pm 0,14\%$) apresentaram percentagens similares aos camundongos ST2KO^{CEC} ($1,25 \pm 0,14\%$) de linfócitos T CD8⁺ marcados

A

B

Figura 5. Ausência de ST2 influencia na percentagem de células *natural killer* produtoras de IL-33 isoladas do microambiente tumoral. As barras representam a média $\pm$ SEM da percentagem de linfócitos T CD4 e T CD8, células *natural killer* (NK), macrófagos e células dendríticas (DC) que produzem a citocina IL-33 ou que expressam seu receptor (IL-33R) no microambiente tumoral. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. (*) WT^{CEC} em relação ao ST2KO^{CEC} e (#) células NK WT^{CEC} em relação aos demais leucócitos WT^{CEC} $P < 0,05$.

positivamente para IL-33 (**Figura 5**). Contudo, os resultados evidenciaram aumento significativo de células NK produtoras de IL-33 obtidas de leões de camundongos WT^{CEC} ($2,25 \pm 0,45\%$) em relação a camundongos ST2KO^{CEC} ($0,66 \pm 0,27\%$) (**Figura 5**). As análises revelaram não haver diferença significativa na percentagem de macrófagos expressando IL-33 em lesões de camundongos WT^{CEC} ($1,54 \pm 0,33\%$) e ST2KO^{CEC} ($0,77 \pm 0,24\%$) (**Figura 5**). De modo similar, camundongos WT^{CEC} ($0,69 \pm 0,22\%$) apresentaram percentagens semelhantes de células dendríticas (DC) marcadas positivamente para IL-33 comparado aos camundongos ST2KO^{CEC} ($0,27 \pm 0,09\%$) (**Figura 5**).

Em relação ao receptor de IL-33 (ST2 ou IL-33R), como esperado os resultados revelaram não haver expressão deste receptor por células isoladas das amostras de tecido tumoral de camundongos ST2KO^{CEC} (**Figura 5**). Em amostras de camundongos WT^{CEC}, os resultados evidenciaram que percentagens significantes de linfócitos T CD8⁺ ($0,58 \pm 0,13\%$), células NK ($2,24 \pm 0,14\%$), macrófagos ($1,2 \pm 0,24\%$) e células dendríticas ($1,09 \pm 0,16\%$) foram marcadas positivamente para o IL-33R (ST2), quando comparado com as células de camundongos ST2KO (**Figura 5**).

4. A sinalização mediada por ST2 influencia na atividade citotóxica de células NK

As células NK apresentam importante papel no combate ao câncer e induzem a morte de células tumorais via liberação do conteúdo de seus grânulos ou por meio da sinalização de receptores de morte celular (LIEBERMAN, 2003; ZAMAI et al., 2007; VIVIER et al., 2012). Devido à importância destas células nos mecanismos de eliminação das células tumorais, avaliamos a citotoxicidade de células NK (E, efetora) isoladas do baço de camundongos dos grupos experimental (CEC) contra células de linfoma murino (YAC-1) (A, alvo) por citometria de fluxo (**Figura 6**).

Os resultados evidenciaram que nas proporções de 25:1 e 50:1 (E:A) a atividade citotóxica de células NK de camundongos WT^{CEC} ($56,57 \pm 3,21\%$ e $68,45 \pm 3,2\%$, respectivamente) foi significativamente menor comparada com atividade citotóxica de células NK de animais do grupo ST2KO^{CEC} ($73,05 \pm 3,57\%$ e $86,65 \pm 1,12\%$, respectivamente) (**Figura 6**).

Figura 6. A sinalização mediada por ST2 influencia na atividade citotóxica de células NK. A atividade citotóxica das células NK (E) isoladas do baço de camundongos WT e ST2KO submetidos à carcinogênese química foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se a linhagem celular YAC-1 como célula alvo (A). Os gráficos representam a percentagem de células mortas $\pm$ SEM. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste t. (*) WT^{CEC} em relação a ST2KO^{CEC} $P < 0,05$.

Discussão

A sinalização mediada pela citocina IL-33 influencia diversas células do sistema imune (LU et al., 2015) potencializando a resposta imune do tipo T_H2 sendo, desta forma, amplamente estudada em modelos experimentais e em pacientes acometidos por doenças alérgicas (LIEW; PITMAN; MCINNES, 2010; HAENUKI et al., 2012; SAVINKO et al., 2012; BAUMANN et al., 2013). A expressão de IL-33 é regulada por diversos estímulos refletindo as interações entre os componentes constitutivos e induzidos nos tecidos. Administração de IL-33 expande células ILC-2 e T_{REG} e evita rejeição em modelos de aloenxertos, dano tecidual e patologias causadas pelo excesso de respostas imunes do tipo T_H1 (BRUNNER et al., 2011; DUAN et al., 2012; LIANG et al., 2013; SCHIERING et al., 2014; TURNQUIST et al., 2011; YIN et al., 2013). IL-33 tem efeitos diversos em modelos tumorais, sendo que o aumento da expressão de IL-33 em neoplasmas promove a infiltração de células NK e linfócitos $T\ CD8^+$ e restringi o crescimento de câncer e metástase (GAO et al., 2013). Entretanto, outros dados recentes indicam que IL-33 pode ativar células neoplásicas, promovendo sobrevivência e metástase (KIM et al., 2015; LEVESCOT et al., 2014; YU et al., 2015). Em modelo de câncer de mama, IL-33 exógena levou a infiltração de células T de perfil T_H2 e acúmulo de células T reguladoras que sabidamente promovem o desenvolvimento tumoral e metástase (JOVANOVIC et al., 2014). Desta maneira, IL-33 pode ser um importante mediador do escape de células neoplásicas da vigilância imunológica. Baseado no exposto, buscamos avaliar se a interação IL-33/ST2 poderia favorecer o desenvolvimento tumoral em modelo de carcinogênese química.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que camundongos deficientes de ST2 (ST2KO) são menos susceptíveis à carcinogênese química, apresentando atraso no desenvolvimento tumoral, quando comparado com camundongos do grupo controle, sugerindo que a via de sinalização mediada por IL-33/ST2 tem um importante papel no desenvolvimento e progressão de carcinoma espinocelular induzido quimicamente. Associado ao atraso no desenvolvimento de carcinoma espinocelular, observou-se que camundongos ST2KO também apresentaram volume tumoral consideravelmente menor que o observado em camundongos do grupo controle (WT). Ademais, as análises histopatológicas confirmaram a influência de IL-33 na progressão de CEC, uma vez que camundongos ST2KO apresentaram lesões com menor grau de progressão, enquanto camundongos WT desenvolveram lesões invasivas com características malignas como formação de pérolas córneas e perda de arquitetura estrutural atingindo inclusive tecidos adjacentes à epiderme como tecidos muscular e adiposo após 20 semanas de carcinogênese química.

Uma vez demonstrado que a sinalização via o receptor de IL-33 (ST2) favorece o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente, o próximo passo foi avaliar o perfil de células inflamatórias no microambiente tumoral. Os resultados evidenciaram não haver diferenças significativas no número de leucócitos isolados das lesões dos animais do grupo controle e deficientes de ST2, indicando desta forma que a ausência da sinalização via o receptor de IL-33 não interfere de modo significativo com número de leucócitos infiltrando o microambiente tumoral. Entretanto, ao caracterizar o infiltrado inflamatório, foram observadas diferenças significativas quanto à composição deste. Em amostras de animais do grupo controle (WT), foi detectada maior percentagem de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4⁺, associada à baixa frequência de células B nas lesões destes animais. Por outro lado, em lesões de camundongos deficientes para o receptor de IL-33 (ST2KO^{CEC}) observou-se baixo número de células T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas. A migração de células T CD8⁺ para o microambiente tumoral não foi influenciada pela presença da citocina IL-33, pois detectou-se percentagens similares desta célula no microambiente tumoral de camundongos do grupo controle e deficientes de ST2. Estes resultados indicam que IL-33/ST2 regula aspectos críticos da resposta inflamatória durante o desenvolvimento de carcinoma espinocelular quimicamente induzido afetando o perfil de leucócitos no tecido inflamado. Em acordo com esses dados estudos mostraram que o bloqueio da sinalização IL-33/ST2 resultou em menor acúmulo de células inflamatórias e tal redução esteve associada com resolução da doença (OBOKI et al, 2010; WALZL et al., 2001).

No presente modelo de estudo, camundongos deficientes do receptor de IL-33 (ST2KO) foram menos suscetíveis ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular através de um mecanismo associado ao menor acúmulo de linfócitos T CD4⁺ e macrófagos no microambiente tumoral, aumento na atividade citotóxica das células natural killer e diminuição no número de células NK produtoras de IL-33. Em acordo com nossos resultados, a presença de células T CD4⁺ e macrófagos infiltrando tumores está associada com a progressão neoplásica, em diferentes tipos de tumores (GU-TRANTIEN et al., 2013; QIAN; POLLARD, 2010). Linfócitos T CD4⁺ são importantes medidores da resposta imune e podem desempenhar função anti ou pró-tumoral (revisto por KENNEDY; CELIS, 2008). Seu destino e função dependem em grande parte do microambiente (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que a função efetora das células T CD4⁺, em situações onde há a sinalização mediada pelo receptor de IL-33 (IL-33R ou ST2) poderia

influenciar a diferenciação destas células e sua função de modo a influenciar negativamente a resposta imune antitumoral e consequentemente favorecer a progressão neoplásica. A identificação de que camundongos deficientes do receptor de IL-33 apresentaram menor frequência de linfócitos T CD4⁺ e esta poderia ser associada com a menor progressão tumoral, poderia indicar que nesse modelo a sinalização via a citocina IL-33 favoreceria a progressão de carcinoma espinocelular induzido quimicamente. Sabe-se que a interação IL-33/ST2 potencializa polarização de células T *naïve* para o fenótipo T_H2 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008) e o bloqueio desta via amplifica resposta imune T_H1 (COYLE et al., 1999; LÖHNING et al., 1998) o que poderia explicar a menor progressão de CEC em camundongos deficientes do receptor de IL-33 (ST2KO).

Outra possível explicação para o maior desenvolvimento de CEC associado ao acúmulo de linfócitos T CD4⁺ seria a polarização dos mesmos para o fenótipo regulador. Estudo recente detectou expressão de ST2 em células T_{REG} naturais e sua interação com IL-33 resultou na expansão direta destas células *in vitro* (MATHEWS et al., 2012). Adicionalmente, IL-33 induz a função das células T_{REG} no intestino (SCHIERING et al., 2014) e, juntamente com reguladores transcricionais como IRF4 (do inglês *Interferon Regulatory Factor 4*) e BATF (do inglês *Basic Leucine Zipper Transcription Factor*), orquestra o desenvolvimento e manutenção de T_{REG} residentes do tecido adiposo (VASANTHAKUMAR et al., 2015). Ademais, as citocinas produzidas pelas T_{REG}, TGF- β e IL-10, contribuem para a progressão tumoral, pois inibem a função efetora de linfócitos T (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Trabalhos do nosso e de outros grupos relataram aumento no número de T_{REG} em amostras de pacientes com câncer (GASPAROTO et al., 2010; WOO et al., 2001) e a depleção destas células resultou em redução no desenvolvimento de carcinoma espinocelular em modelo murino (RAMOS et al., 2012).

No presente modelo de estudo, não foi detectado diferenças nas percentagens de linfócitos T CD8⁺ no microambiente tumoral. Dado a importância destas células na imunidade antitumoral, uma vez que induzem a apoptose da célula tumoral através da liberação de grânulos, via interação Fas-FasL ou induzindo TRAIL nas células tumorais (SHANKARAN, 2001; TRAPANI; SMYTH, 2002; WHITMAN; BARBER, 2015; VAN DER MOST et al., 2009), especulamos que, embora a presença destas células não tenha sido afetada pela ausência/presença de ST2, a interação de IL-33 com seu receptor poderia regular negativamente a função efetora dos linfócitos T CD8⁺. Relatos da literatura corroboram com esta hipótese, em modelo de malária cerebral experimental, IL-33 exerceu efeitos protetores

associado com redução no número de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e granzima B (BESNARD et al., 2015). Adicionalmente, em modelo de câncer de mama, a ausência de IL-33 foi correlacionada com aumento da atividade citotóxica das células T CD8⁺ (JOVANOVIĆ et al., 2011). Esses relatos sugerem que a IL-33 pode, de fato, afetar os mecanismos efetores de linfócitos T CD8⁺.

A menor presença de macrófagos no microambiente tumoral de animais do grupo deficiente de ST2 poderia esclarecer a baixa progressão do carcinoma espinocelular neste grupo. Número crescente de evidências aponta para o impacto negativo dos macrófagos na resposta imune antitumoral (KOMOHARA; JINUSHI; TAKEYA, 2014; ZHANG et al., 2015). Relatos da literatura evidenciam que, uma vez estabelecido o tumor, os macrófagos intratumorais (TAM, do inglês *Tumor Infiltrating Macrophages*) são “educados” a se tornarem pró-tumorais (POLLARD, 2004; QIAN; POLLARD, 2010) e expressam predominantemente genes típicos do fenótipo M2. (BISWAS et al., 2006; SACCANI et al., 2006). Macrófagos M2 expressam ST2 e a interação com IL-33 contribui para resposta imune do tipo T_H2 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009). Além disso, macrófagos M2 contribuem à progressão tumoral através da expressão de moléculas imunoregulatórias como arginase e IDO e secretam citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β que inibem a proliferação de linfócitos T CD8⁺ (MITTAL et al., 2014). De fato, nossos resultados evidenciaram menor percentagem de macrófagos isolados no microambiente tumoral de animais de ST2KO positivos para IL-33R. Deste modo, pode-se inferir que camundongos ST2KO poderiam ser menos susceptíveis ao desenvolvimento tumoral devido à menor presença de macrófagos de fenótipo M2 no microambiente tumoral. Entretanto, estas suposições são meramente especulativas e novos estudos são necessários para comprová-las.

Células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen-presenting cell*) e desempenham papel crucial na iniciação da resposta imune antitumoral. Infiltração de células dendríticas em diferentes tipos de tumores tem sido relatada como importante parâmetro prognóstico, favorável ou não, e frequentemente depende da sua localização e grau de maturação celular (IWAMOTO et al., 2003; EISENTHAL et al., 2001; SANDEL et al., 2005). No microambiente tumoral, observa-se o acúmulo de células dendríticas imaturas e que expressam baixos níveis de moléculas co-estimulatórias, apresentam baixa produção de IL-12, atividade endocítica diminuída e processamento de antígenos deficiente (CHAUX et al., 2013; SHURIN et al., 2006; TOURKOVA et al., 2007; BENNACEUR et al., 2009). Estes dados sugerem que a influência do tumor na função das

DC representa mais um mecanismo de escape tumoral (YANG et al., 2013). Camundongos deficientes para o receptor de IL-33 apresentaram menor suscetibilidade ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular quimicamente induzido associado à reduzida frequência de células dendríticas no microambiente tumoral, sugerindo que a sinalização mediada pela citocina IL-33 favorece acúmulo de células dendríticas intratumorais e essa maior infiltração parece contribuir para a progressão tumoral. Em acordo com nossos resultados, a presença intensa de células dendríticas no microambiente tumoral esteve associada com progressão neoplásica em câncer de bexiga (AYARI et al., 2013).

Outro aspecto relevante para o rápido estabelecimento e desenvolvimento de CEC em camundongos do grupo controle poderia estar relacionado à maior percentagem de células *natural killer* produtoras de IL-33 no microambiente tumoral. Os resultados do presente estudo demonstraram que a ausência de ST2, embora não tenha afetado a infiltração de células *natural killer*, reduziu a percentagem de células NK positivas para IL-33 sugerindo que, no carcinoma espinocelular induzido quimicamente, a sinalização IL-33/ST2 pode atuar de forma autócrina nas células NK como retroalimentação positiva para aumentar expressão de ST2 e IL-33. De fato, outras citocinas pertencentes à família de citocinas IL-1 apresentam atividades semelhantes induzindo aumento de sua própria expressão através de retroalimentação, como as citocinas IL-1 β e IL-18 (JIMBO et al., 2005; VANDERBRINK et al., 2011). Estudos mostram que a deleção de ST2 aumenta significativamente a atividade citotóxica das células NK (MILOVANOVIC et al., 2012), indicando assim que sinalização via IL-33/ST2 poderia ser um mecanismo de redução de sua atividade citotóxica, o que indicaria mais um possível papel imunomodulador para esta citocina. Desta maneira, a maior susceptibilidade dos camundongos do grupo controle ao desenvolvimento de CEC poderia estar relacionada com a menor atividade citotóxica das células NK. De fato, a ausência de ST2 aumentou a atividade citotóxica das células NK, permitindo inferir que a IL-33 pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de carcinoma espinocelular regulando negativamente e de forma autócrina a atividade citotóxica das células NK.

Embora a maioria das pesquisas em câncer enfatizem as mudanças sofridas pelas células neoplásicas e terapêuticas diretas contra estas células, é reconhecido agora que células não malignas presentes no microambiente tumoral contribuem para a gravidade da doença e o fenótipo de malignidade (JOYCE; POLLARD, 2009). Assim sendo, os resultados do presente estudo demonstraram que a ausência de ST2 leva a menor progressão do carcinoma espinocelular, que pode ser resultado da deficiência no recrutamento e modulação de

linfócitos T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas presentes no microambiente tumoral e aumento da atividade citotóxica das células NK, principal tipo celular envolvido com a resposta imunológica antitumoral. Desta forma, os resultados obtidos reforçam as evidências de que IL-33 pode colaborar com o mecanismo pelo qual as células neoplásicas escapam da vigilância imunológica (JOVANOVIĆ et al., 2014; LIU et al., 2014a; LIU et al., 2014b; YAMADA et al., 2015), sugerindo que o bloqueio da sinalização via IL-33 poderia ser um mecanismo de imunoterapia para favorecer a defesa imunológica antitumoral.

Conclusões

Nossos resultados nos permitem concluir que camundongos ST2KO são menos suscetíveis ao desenvolvimento de CEC induzido quimicamente. Tal susceptibilidade está correlacionada com a menor percentagem de células T CD4⁺, macrófagos, células dendríticas encontradas no microambiente tumoral dos camundongos deficientes de ST2 juntamente com o aumento na atividade citotóxica das células NK. Mais estudos são necessários para o entendimento completo de como a via de sinalização IL-33/ST2 atua na modulação da resposta imune antitumoral e contribui para o escape das células neoplásicas da vigilância imunológica.

Referências Bibliográficas

Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK, Saxena S. Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Jun;55(6):734-43.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415-21.

Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, Raugi GJ, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1409-17.

Ashkenazi E, Deutsch M, Tirosh R, Weinreb A, Tsukerman A, Brodie C. A selective impairment of the IL-2 system in lymphocytes of patients with glioblastomas: increased level of soluble IL-2R and reduced protein tyrosine phosphorylation. *Neuroimmunomodulation*. 1997 Jan-Feb;4(1):49-56.

Ayari C, LaRue H, Hovington H, Caron A, Bergeron A, Têtu B, Fradet V, Fradet Y. High level of mature tumor-infiltrating dendritic cells predicts progression to muscle invasion in bladder cancer. *Hum Pathol*. 2013 Aug;44(8):1630-7.

Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Tilgner L, Gaertner-Akerboom M, Scheckenbach K, et al. Nasal levels of soluble IL-33R ST2 and IL-16 in allergic rhinitis: inverse correlation trends with disease severity. *Clin Exp Allergy*. 2013 Oct;43(10):1134-43.

Bennaceur K, Chapman JA, Touraine JL, Portoukalian J. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1795(1):16-24.

Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J*. 1994 Mar 1; 13(5): 1176–1188.

Besnard AG, Guabiraba R, Niedbala W, Palomo J, Reverchon F, Shaw TN, et al. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. *PLoS Pathog*. 2015 Feb 6;11(2):e1004607.

Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011 Jun;41(6):1675-86.

Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2112-22.

Blom L, Poulsen BC, Jensen BM, Hansen A, Poulsen LK. IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PLoS One*. 2011;6(7):e21695.

Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science*. 2012 Feb 24;335(6071):984-9.

Bowden GT. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):23-35.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

Braumüller H, Wieder T, Brenner E, Aßmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 2013 Feb 21;494(7437):361-5.

Brunner SM, Schiechl G, Falk W, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S. Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transpl Int*. 2011 Oct;24(10):1027-39.

Burnet FM. Cancer: a Biological Approach. *BMJ*. 1957 Apr 6;1(5022): 841–847.

Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 2;104(1):282-7.

Caserta S, Borger JG, Zamoyska R. Central and effector memory CD4 and CD8 T-cell responses to tumor-associated antigens. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(2):97-126.

Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2551-5.

Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest.* 1996 May; 74(5):975-83.

Chen YM, Yang WK, Ting CC, Tsai WY, Yang DM, Whang-Peng J, et al. Cross regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the helper T cells and the cytolytic activity of lymphocytes from malignant effusions of lung cancer patients. *Chest.* 1997 Oct;112(4):960-6.

Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, et al. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood.* 2009 Oct 1;114(14):3117-26.

Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1997 Jun 15;79(12):2320-8.

Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, Stassi G, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5467-77.

Cortes J, Kurzrock R. Interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1997 Jul;26(3-4):251-9.

Coyle AJ, Lloyd C, Tian J, Nguyen T, Eriksson C, Wang L, et al. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):895-902.

Dinarello CA. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. *Immunity.* 2005 Nov;23(5):461-2.

Duan L, Chen J, Zhang H, Yang H, Zhu P, Xiong A, Xia Q, Zheng F, Tan Z, Gong F, Fang M. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3⁺ regulatory T-cell responses in mice. *Mol Med.* 2012 Jul 18;18:753-61.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov;6(11):836-48.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004 Aug;21(2):137-48.

Eisenthal A, Polyvkin N, Bramante-Schreiber L, Misonznik F, Hassner A, Lifschitz-Mercer B. Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum Pathol*. 2001 Aug;32(8):803-7.

Elder DE, Murphy GF. *Melanocytic Tumors of the Skin: Atlas of Tumor Pathology*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1991.

Elsässer-Beile U, Köhle N, Grussenmeyer T, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, Gallati H, et al. Th1 and Th2 cytokine response patterns in leukocyte cultures of patients with urinary bladder, renal cell and prostate carcinomas. *Tumour Biol*. 1998;19(6):470-6.

Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave JM, et al. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1446-55.

Fears TR, Scotto J. Estimating increases in skin cancer morbidity due to increases in ultraviolet radiation exposure. *Cancer Invest* 1983;1:119-26.

Fransen L, Van der Heyden J, Ruyschaert R, Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1986 Apr;22(4):419-26.

Funakoshi-Tago M, Tago K, Hayakawa M, Tominaga S, Ohshio T, Sonoda Y, et al. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signal*. 2008 Sep;20(9):1679-86.

Gadina M, Jefferies CA. IL-33: a sheep in wolf's clothing? *Sci STKE*. 2007 Jun 12;2007(390):pe31.

Gao K, Li X, Zhang L, Bai L, Dong W, Gao K, Shi G, Xia X, Wu L, Zhang L. Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett*. 2013 Jul 28;335(2):463-71.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1003-18.

Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ Jr, Costa MR, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jun;59(6):819-28.

Ghosh P, Komschlies KL, Cippitelli M, Longo DL, Subleski J, Ye J, et al. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Oct 4;87(19):1478-83.

Gnjatic S, Jäger E, Chen W, Altorki NK, Matsuo M, Lee SY, et al. CD8(+) T cell responses against a dominant cryptic HLA-A2 epitope after NY-ESO-1 peptide immunization of cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11813-8.

Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010 Feb 1;24(3):241-55.

Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockage of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 2001;7(10):1118-22.

Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem.* 1995 Jun 9;270(23):13757-65.

Grujil FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 2001 Oct;63(1-3):19-27.

Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K, et al. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 11;106(32):13463-8.

Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013 Jul;123(7):2873-92.

Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jul;130(1):184-94.e11.

Haga Y, Yanagisawa K, Ohto-Ozaki H, Tominaga S, Masuzawa T, Iwahana H. The effect of ST2 gene product on anchorage-independent growth of a glioblastoma cell line, T98G. *Eur J Biochem.* 2003 Jan;270(1):163-70.

Hirshberg B, Kramer MR, Lotem M, Barak V, Shustin L, Amir G, et al. Chronic eosinophilic pneumonia associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 1999 Feb;60(2):143-7.

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Nov;41(16):2502-12. Epub 2005 Sep 30.

Hu HM, Urban WJ, Fox BA. Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):3033-41.

Huang H, Hao S, Li F, Ye Z, Yang J, Xiang J. CD4⁺ Th1 cells promote CD8⁺ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology.* 2007 Feb;120(2):148-59.

Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Apr;13(2):95-109.

Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000 Feb 1;88(3):577-83.

Iwahana H, Hayakawa M, Kuroiwa K, Tago K, Yanagisawa K, Noji S, et al. Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 24;1681(1):1-14.

Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer.* 2003 Mar 10;104(1):92-7.

Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med.* 1998 Jan 19;187(2):265-70.

Jimbo K, Park JS, Yokosuka K, Sato K, Nagata K. Positive feedback loop of interleukin-1beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells in vitro. *J Neurosurg Spine.* 2005 May;2(5):589-95.

Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011 Jul;41(7):1902-12.

Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014 Apr 1;134(7):1669-82.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):239-52.

Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, Iwadata M, Watanabe K, Suzuki S, et al. Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer Res*. 2005 Jan-Feb;25(1B):443-9.

Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev*. 2008 Apr;222:129-44.

Kim JY, Lim SC, Kim G, Yun HJ, Ahn SG, Choi HS. Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene*. 2015 Sep 17;34(38):4928-38.

Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2584-91.

Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2007 Oct;37(10):2779-86.

Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*. 2014 Jan;105(1):1-8.

Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):231-8.

Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*. 2015 Apr 30;520(7549):692-6.

Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 27;235(3):474-8.

Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol*. 2008 Oct 1;181(7):8170-80.

Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6469-77.

Kvam E, Tyrrell RM. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*. 1997 Dec;18(12):2379-84.

Lee PP, Zeng D, McCauley AE, Chen YF, Geiler C, Umetsu DT, et al. T helper 2-dominant antilymphoma immune response is associated with fatal outcome. *Blood*. 1997 Aug 15;90(4):1611-7.

Levescot A, Flamant S, Basbous S, Jacomet F, Féraud O, Anne Bourgeois E, et al. BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Res*. 2014 May 15;74(10):2669-76.

Liang Y, Jie Z, Hou L, Aguilar-Valenzuela R, Vu D, Soong L, Sun J. IL-33 induces neutrophils and modulates liver injury in viral hepatitis. *J Immunol*. 2013 Jun 1;190(11):5666-75.

Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):361-70.

Liew FY, Liu H, Xu D. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. *Immunol Lett*. 2005 Jan 15;96(1):27-31.

Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol*. 2010 Feb;10(2):103-10.

Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol*. 2014a Apr 7;5:141.

Liu X, Zhu L, Lu X, Bian H, Wu X, Yang W, et al. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014b Oct 24;453(3):486-92.

Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6930-5.

Lu J, Kang J, Zhang C, Zhang X. The role of IL-33/ST2L signals in the immune cells. *Immunol Lett*. 2015 Mar;164(1):11-7.

Macbeth AE, Grindlay DJ, Williams HC. What's new in skin cancer? An analysis of guidelines and systematic reviews published in 2008-2009. *Clin Exp Dermatol*. 2011 Jul;36(5):453-8.

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 Nov; 23(11):549-55.

Marcusson-Ståhl M, Cederbrant K. A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. *Toxicology*. 2003 Dec 1;193(3):269-79.

Marehbian J, Colt JS, Baris D, Stewart P, Stukel TA, Spencer SK, et al. Occupation and keratinocyte cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Causes Control*. 2007 Oct;18(8):895-908.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:451-83.

Mathews L, Rosborough B, Thomson A, Turnquist H. IL-33 directly supports the proliferation of suppressive, naturally-occurring regulatory T cells expressing the IL-33 receptor, ST2. *The Journal of Immunology*. 2012; 188:161.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Mar 15;195(3):298-308.

Melo FHM, Junqueira MS, Chammas R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: FRG, Kowalski LP, Brentani MM. *Bases da Oncologia*. 2ª ed. São Paulo: Tedmedd Editora; 2003. p. 201-226.

Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):339-46.

Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res*. 2012 Apr;52(1-2):89-99.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16-25.

Moloney FJ, Comber H, Conlon PJ, Murphy GM. The role of immunosuppression in the pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2006 Apr;154(4):790-1.

Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*. 1999 Jul;5(7):828-31.

Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. 2008 Oct 6;3(10):e3331.

Murphy GF, Elder DE. Non-Melanocytic Tumors of the Skin: Atlas of Tumor Pathology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1991.

Murphy K. Cytokines. In: Immuno biology. In: Janeway's, editor. Garland Sciences. London and New York: Taylor and Francis group, LLC; 2012.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 14;11(11):723-37.

Nakayama H, Kitayama J, Muto T, Nagawa H. Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30: 301-5.

North RJ, Bursuker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med*. 1984 May 1;159(5):1295-311.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):49-61.

Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18581-6.

Odenbro A, Bellocco R, Boffetta P, Lindelöf B, Adami J. Tobacco smoking, snuff dipping and the risk of cutaneous squamous cell carcinoma: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer*. 2005 Apr 11;92(7):1326-8.

Ong SM, Tan YC, Beretta O, Jiang D, Yeap WH, Tai JJ, et al. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *Eur J Immunol*. 2012 Jan;42(1):89-100.

Oshikawa K, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga S, Sugiyama Y. Expression of ST2 in helper T lymphocytes of malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Apr 1;165(7):1005-9.

Otley CC. Non-Hodgkin lymphoma and skin cancer: A dangerous combination. *Australas J Dermatol*. 2006 Nov;47(4):231-6.

Palmer G, Gabay C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jun;7(6):321-9.

Peto J, Houlston RS. Genetics and the common cancers. *Eur J Cancer*. 2001 Oct;37 Suppl 8:S88-96.

Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol*. 2012 Apr 1;188(7):3488-95.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):71-8.

Porceddu SV, Veness MJ, Guminski A. Nonmelanoma Cutaneous Head and Neck Cancer and Merkel Cell Carcinoma: Current Concepts, Advances, and Controversies. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 8. pii: JCO.2014.60.7333.

Preston DS, Stern RS. Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med* 1992;327:1649-62.

Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 16;106(24):9773-8.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):39-51.

Ramos RN, Oliveira CE, Gasparoto TH, Malaspina TS, Belai EB, Cavassani KA, et al. CD25+ T cell depletion impairs murine squamous cell carcinoma development via modulation of antitumor immune responses. *Carcinogenesis*. 2012 Apr;33(4):902-9.

Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol*. 1994 Oct;6(10):1545-53.

Rössler U, Andres AC, Reichmann E, Schmahl W, Werenskiold AK. T1, an immunoglobulin superfamily member, is expressed in H-ras-dependent epithelial tumours of mammary cells. *Oncogene*. 1993 Mar;8(3):609-17.

Rössler U, Thomassen E, Hültner L, Baier S, Danescu J, Werenskiold AK. Secreted and membrane-bound isoforms of T1, an orphan receptor related to IL-1-binding proteins, are differently expressed in vivo. *Dev Biol*. 1995 Mar;168(1):86-97.

Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep*. 2008 Oct;9(10):1006-12.

Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11432-40.

Samarasinghe V, Madan V, Lear JT. Management of high-risk squamous cell carcinoma of the skin. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 May;11(5):763-9.

Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2576-82.

Savinko T, Matikainen S, Saarialho-Kere U, Lehto M, Wang G, Lehtimäki S, et al. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol*. 2012 May;132(5):1392-400.

Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 2014 Sep 25;513(7519):564-8.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):479-90.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.

Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, et al. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):5020-8.

Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, Chatta G, et al. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep; 25(3):333-56.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):787-95.

Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. 2008 Aug;20(8):1019-30.

So T, Takenoyama M, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Hanagiri T, et al. Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res*. 2005 Jul 1;65(13):5945-52.

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 Aug 1;13(15 Pt 1):4345-54.

Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, et al. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3;285(5):1377-83.

Ting PT, Kasper R, Arlette JP. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. *J Cutan Med Surg*. 2005 Jan;9(1):10-5.

Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi T, Tetsuka T. Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Dec 29;1171(2):215-8

Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett*. 1989 Dec 4;258(2):301-4.

Tominaga Si, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Oct 14;264(1):14-8.

Tourkova IL, Shurin GV, Wei S, Shurin MR. Small rho GTPases mediate tumor-induced inhibition of endocytic activity of dendritic cells. *J Immunol*. 2007 Jun 15; 178(12):7787-93.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):735-47.

Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*. 2014 May 9;344(6184):641-5.

Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellaneta A, Isse K, et al. IL-33 expands suppressive CD11b+ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L+ Foxp3+ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol*. 2011 Nov 1;187(9):4598-610.

Uyttenhove C, Brombacher F, Van Snick J. TGF- β interactions with IL-1 family members trigger IL-4-independent IL-9 production by mouse CD4(+) T cells. *Eur J Immunol*. 2010 Aug;40(8):2230-5.

van der Most RG, Currie AJ, Cleaver AL, Salmons J, Nowak AK, Mahendran S, et al. Cyclophosphamide Chemotherapy Sensitizes Tumor Cells to TRAIL-Dependent CD8 T Cell-Mediated Immune Attack Resulting in Suppression of Tumor Growth. *PLoS One*. 2009; 4(9):e6982.

VanderBrink BA, Asanuma H, Hile K, Zhang H, Rink RC, Meldrum KK. Interleukin-18 stimulates a positive feedback loop during renal obstruction via interleukin-18 receptor. *J Urol*. 2011 Oct;186(4):1502-8.

Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2015 Mar;16(3):276-85.

Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1697-703.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523-32.

Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002 Jan;35(1):23-8.

Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar 22;12(4):239-52.

Walzl G, Matthews S, Kendall S, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Openshaw PJ, et al. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J Exp Med*. 2001 Apr 2;193(7):785-92.

Werenskiold AK. Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene. *Eur J Biochem*. 1992 Mar 15;204(3):1041-7.

Whitman E, Barber A. NKG2D receptor activation of NF- κ B enhances inflammatory cytokine production in murine effector CD8(+) T cells. *Mol Immunol*. 2015 Feb;63(2):268-78. doi: 10.1016/j.molimm.2014.07.015. Epub 2014 Jul 31.

Wilkins K, Turner R, Dolev JC, LeBoit PE, Berger TG, Maurer TA. Cutaneous malignancy and human immunodeficiency virus disease. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Feb;54(2):189-206.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4766-72.

Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang Fp, Wheeler R, Piedrafita D, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med*. 1998a Mar 2;187(5):787-94.

Xu D, Chan WL, Leung PD, Hunter D, Schulz K, Carter RW, et al. Selective expression and Functions of Interleukin 18 Receptor on T helper(Th) Type 1 but not Th2 Cells. *J Exp Med*. 1998b Oct 19;188(8):1485-92.

Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):10913-8.

Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, et al. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol*. 2010 Nov 15;185(10):5743-50.

Yamada D, Rizvi S, Razumilava N, Bronk SF, Davila J, Champion MD, et al. Clin Cancer IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. *Hepatology*. 2015 May;61(5):1627-42.

Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, Arai T, Furukawa Y, Tomizuka H, et al.. The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *J Biochem*. 1997 Jan;121(1):95-103.

Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett*. 1993 Feb 22;318(1):83-7.

Yang Ma, Galina V. Shurin, Zhu Peiyuan, and Michael R. Shurin. Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment. *J Cancer*. 2013; 4(1): 36–44.

Yin H, Li X, Hu S, Liu T, Yuan B, Gu H, Ni Q, Zhang X, Zheng F. IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(4):347-53.

Yoshida K, Arai T, Yokota T, Komatsu N, Miura Y, Yanagisawa K, et al. Studies on natural ST2 gene products in the human leukemic cell line UT-7 using monoclonal antihuman ST2 antibodies. *Hybridoma*. 1995 Oct;14(5):419-27.

Yu XX, Hu Z, Shen X, Dong LY, Zhou WZ, Hu WH. IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. *Dig Dis Sci*. 2015 May;60(5):1265-72.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galviniereotti L, et al. NK cells and cancer. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4011-6.

Zhang H, Wang X, Shen Z, Xu J, Qin J, Sun Y. Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection. *Gastric Cancer*. 2015 Oct;18(4):740-50.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-27.

Anexos

ANEXO A – carta de Aprovação do Comitê de Ética **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais** **CEEPA-Proc. Nº 001/2012**

Bauru, 27 de março de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Papel do receptor ST2 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular quimicamente induzido**, de autoria de Carine Ervolino de Oliveira, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **26 de março de 2012**. Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Ana Paula Campanelli
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>