UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LUÍS FELIPE INGRASSIA CAMPESATO

Investigação do papel de SIGIRR/IL-1R8 no *crosstalk* entre células tumorais e o infiltrado leucocitário

Versão corrigida da Tese defendida conforme Resolução CoPGr 5890

A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SPG:

22/10/2015

LUÍS FELIPE INGRASSIA CAMPESATO

Investigação do papel de SIGIRR/IL-1R8 no *crosstalk* entre células tumorais e o infiltrado leucocitário

Tese apresentada ao Instituto de Química da

Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Lepique

São Paulo

2015

Dedico esta tese à minha companheira de vida Cristina, quem me deu força e apoio em todos os momentos, e à minha família, que sempre esteve ao meu lado, mesmo estando longe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Anamaria Camargo, por ter me acolhido como aluno e me orientado de forma tão atenciosa, dedicada e competente. Sou extremamente grato por todo seu apoio e confiança!

Ao Érico, por ter compartilhado tanto da sua experiência e conhecimento, por suas contribuições valiosas e por ter se tornado um grande amigo.

A todos os amigos bioinformatas que fiz durante a minha caminhada, em especial à Bruna, Fábio, Andrei e Gustavo. Aprendi muito com cada um, e certamente a parceria de vocês foi fundamental para a construção dessa tese, em todos os sentidos. Muito obrigado!

À Paola, Elisa, Gabi, Mari, Ana Paula, Juliana, Fran, Rubens, Leandro, e todos os colegas do Centro de Oncologia Molecular pela amizade e colaboração. Obrigado pelo apoio e todo aprendizado que tive com cada um de vocês.

À Paula, Fabi, Fernanda, Florêncio, Lílian, Ju, Bel e Nande, pelo importante apoio técnico e por todas as discussões que certamente contribuíram muito para minha formação como pesquisador.

À Dra. Cecília Garlanda, e todo seu grupo de pesquisa, em especial ao Andrea, Luna, Fede, Nadia, Edu, Seb e Martina. Ho imparato tantissimo con tutti voi. Grazie mille!

Aos meus amigos imunologistas, Rafael Zanin e Romualdo, pelas tantas discussões científicas e por terem enriquecido minha formação acadêmica.

À minha esposa, Cristina, a quem me deu seu apoio fundamental em todos os momentos, me acompanhou em tantas aventuras e muitas outras que nos aguardam pela frente, sempre com carinho, paciência e amor. Sem seu suporte não teria chegado aqui, obrigado por tudo!

Aos meus queridos pais, João e Lúcia, e meus irmãos, Juliana e Otávio, que mesmo infelizmente distantes fisicamente, estão sempre comigo em qualquer lugar, me trazendo força, foco e equilíbrio.

À minha segunda família, Carla, Walter, Clara e William, pelo constante apoio e carinho.

À FAPESP, pelo fundamental apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho nacional e internacionalmente. Também, ao Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, ao Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês e à Universidade de São Paulo, pela excelente estrutura fornecida e auxílios financeiros.

"O real não está no início nem no fim, ele se mostra pra gente é no meio da travessia..."

Guimarães Rosa

RESUMO

Campesato, L. F. **Investigação do papel de SIGIRR/IL-1R8 no *crosstalk* entre células tumorais e o infiltrado leucocitário.** 2015. 103p. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Células tumorais desenvolvem diversas estratégias para escapar da identificação e eliminação pelo sistema imune. Dessa forma, a investigação dos mecanismos envolvidos na comunicação celular no microambiente tumoral e na desregulação local do sistema imune é crítica para uma melhor compreensão da progressão da doença e para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes. Nós aqui demonstramos que SIGIRR/IL-1R8, um importante regulador negativo de receptores de Interleucina-1 (ILRs) e receptores do tipo *Toll* (TLRs), apresenta expressão aumentada em uma linhagem celular epitelial mamária transformada pela superexpressão do oncogene HER2 e em tumores primários de mama, e promove o crescimento tumoral e metástase através da modulação da inflamação associada ao câncer e da atenuação da resposta imune antitumoral. Observamos que IL-1R8 tem sua expressão correlacionada com HER2 em tecidos mamários e sua alta expressão é fator de pior prognóstico em câncer de mama de baixo grau. Notavelmente, níveis aumentados de IL-1R8 foram observados especialmente nos subtipos HER2+ e Luminais de tumores de mama, e sua expressão aumentada em células epiteliais de mama transformadas por HER2 diminui a ativação da via de NF-κB e a expressão de diferentes citocinas pro-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF, CSF2, CSF3 e IFN-β1). Meio condicionado de células transformadas por HER2, mas não de variantes celulares com o gene IL-1R8 silenciado, induz a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 e inibe a ativação de células NK. Em um modelo murino transgênico de tumorigênese espontânea mediada por HER2, MMTV-neu, verificamos que a deficiência de IL-1R8 (IL-1R8$^{-/-}$neu) retardou o aparecimento de tumores e reduziu a incidência, a carga tumoral e a disseminação metastática. Contudo, não foram observadas diferenças significativas no crescimento tumoral quando animais IL-1R8$^{-/-}$neu receberam medula óssea de animais IL-1R8+/+, confirmando um papel importante da expressão de IL-1R8 em células não hematopoiéticas na tumorigênese da mama. Tumores IL-1R8$^{+/+}$neu apresentaram maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e VEGF, e menores níveis da citocina imunomodulatória IFN-γ. Além disso, tumores que expressavam IL-1R8 apresentaram menor infiltrado de células NK maduras, células dendríticas (DCs) e linfócitos T-CD8^{+} e um maior infiltrado de macrófagos M2 e linfócitos T-CD4^{+}. Coletivamente, esses resultados indicam que a expressão de IL-1R8 em tumores de mama pode representar um novo mecanismo de escape da resposta imune e suportam IL-1R8 como potencial alvo terapêutico.

Palavras-chave: SIGIRR/IL-1R8, ErbB2/HER2, câncer de mama, TLRs, ILRs, resposta imune antitumoral.

ABSTRACT

Campesato, L. F. **Investigating the role of SIGIRR/IL-1R8 in the crosstalk between tumor cells and the immune system.** 2015. 103p. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tumor cells develop numerous strategies to fine-tune inflammation and avoid detection and eradication by the immune system. Identification of new players that regulate the cellular crosstalk within the tumor microenvironment and promote local immune dysregulation is critical to understand disease progression and to improve therapeutic strategies. Here, we demonstrate that SIGIRR/IL-1R8, a negative regulator of IL-1R and TLRs, is up-regulated in a HER2-transformed epithelial mammary cell line and in primary breast tumors and promotes tumor growth and metastasis by modulating cancer-related inflammation and impairing anti-tumor immunity. IL-1R8 expression is correlated with HER2 in mammary tissue, and higher tumor IL-1R8 expression is a poor prognostic factor in lower grade breast tumors. Notably, higher levels of IL-1R8 expression were observed in HER2+ and Luminal breast tumor subtypes and IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed mammary epithelial cells inhibited NF-κB activation and the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNFα, CSF2, CSF3, IFN-β1). Conditioned medium from HER2-transformed cells, but not from IL-1R8 knockdown variants, induced M2-macrophage polarization and inhibited natural-killer (NK) cell activation. IL-1R8 deficiency in a transgenic mouse model of breast tumorigenesis (MMTV-neu) significantly delayed tumor onset and reduced tumor incidence, burden and metastasis. No significant differences in tumor growth were observed when IL-1R8$^{-/-}$neu mice were transplanted with bone marrow from IL-1R8+/+ animals, confirming an important role for IL-1R8 expression in non-hematopoietic cells during breast tumorigenesis. IL-1R8$^{+/+}$neu mammary tumors presented higher levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β and VEGF, but lower levels of IFN-γ. Besides, a lower infiltrate of mature NK cells, dendritic cells (DCs) and CD8^{+} T cells but higher infiltrate of M2-macrophages and CD4^{+} T cells were present in IL-1R8 expressing tumors. Collectively, our results support IL-1R8 expression as a novel tumor immune escape mechanism in breast cancer and putative target for immunotherapy.

Keywords: SIGIRR, ErbB2/HER2, breast tumors, TLRs, ILRs, antitumor immunity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação da função desempenhada ErbB2/HER2 na célula tumoral 17
Figura 2. Representação da heterogeneidade celular presente no microambiente de tumores sólidos 21
Figura 3. Ilustração do conceito de imunoedição 25
Figura 4. Ilustração do receptor regulatório SIGIRR/IL-1R8 32
Figura 5. IL-1R8 é um gene “up-regulado” no modelo de transformação celular mediado pela superexpressão de ErbB2/HER2 50
Figura 6. Expressão de IL-1R8 é “up-regulada” em tumores mamários em dados de RNAseq do TCGA 51
Figura 7. A expressão de IL-1R8 correlaciona-se com ErbB2 em amostras normais e tumorais mamárias do TCGA 52
Figura 8. A expressão de IL-1R8 prediz sobrevida livre de recorrência em pacientes com câncer de mama de baixo grau 53
Figura 9. A expressão de IL-1R8 não é reduzida pelo tratamento com Lapatinib 55
Figura 10. Controle da eficiência do tratamento com Lapatinib 56
Figura 11. Tratamento com Lapatinib não reduz expressão de IL-1R8 em linhagens tumorais de mama 57
Figura 12. Aumento de expressão do fator de transcrição SP1 no modelo de transformação celular mediado por HER2 é independente da sua atividade tirosina-quinase 58
Figura 13. Silenciamento de IL-1R8 no modelo de transformação celular mediado pela superexpressão de ErbB2/HER2 59
Figura 14. Silenciamento de IL-1R8 aumenta atividade do fator de transcrição NF-κB por ensaio de EMSA 60
Figura 15. Silenciamento de IL-1R8 promove maior expressão de citocinas pró-inflamatórias 60
Figura 16. Silenciamento de IL-1R8 promove maior secreção de citocinas pró-inflamatórias 61

Figura 17. Macrófagos THP-1 são polarizados a fenótipo M1-*like* in vitro sob estímulo com meio condicionado de células transformadas de mama silenciadas para IL-1R8 63
Figura 18. Atividade de células NK em co-cultura com modelo de transformação celular silenciado para IL-1R8 64
Figura 19. Expressão de IL-1R8 em tumores mamários do modelo MMTV-neu 65
Figura 20. Co-localização da expressão de IL-1R8 e HER2 em tumores mamários do modelo MMTV-neu 66
Figura 21. Deficiência de IL-1R8 retarda a incidência de tumores mamários 67
Figura 22. Deficiência de IL-1R8 reduz o número médio de tumores mamários por animal 68
Figura 23. Deficiência de IL-1R8 reduz volume tumoral mamário total por animal 68
Figura 24. Deficiência de IL-1R8 reduz o número de metástases pulmonares 69
Figura 25. Cinética de crescimento tumoral de camundongos quimeras para medula óssea não é revertida em animais IL-1R8$^{-/-}$neu. 70
Figura 26. Análise histopatológica de tumores mamários coletados na 24ª semana 71
Figura 27. Quantificação de células CD45+ por imunohistoquímica em tumores mamários de animais na 24ª semana de idade 73
Figura 28. Deficiência de IL-1R8 altera o infiltrado leucocitário em tumores mamários de animais de 24 semanas 73
Figura 29. Quantificação de macrófagos (F4/80+) por imunohistoquímica em tumores mamários de animais na 24ª semana de idade 74
Figura 30. Análise do infiltrado leucocitário em tumores mamários de animais de 24 semanas por FACS – outras populações 75
Figura 31. Expressão de IL-1R8 altera os níveis de citocinas intratumorais em tumores mamários coletados de animais na 24ª semana 76
Figura 32. Quantificação de células CD3+ e Ki67 por imunohistoquímica em tumores mamários de animais na 24ª semana de idade 77
Figura 33. Incidência de tumores com 500 mm3 de volume (grupo size-point) 78
Figura 34. Deficiência de IL-1R8 altera o infiltrado leucocitário em tumores 79

mamários de mesmo tamanho
Figura 35. Expressão de marcadores de ativação em populações de células mielóides do infiltrado leucocitário tumoral 80
Figura 36. Deficiência de IL-1R8 altera a expressão de marcadores de polarização em monócitos e macrófagos purificados de tumores mamários 81

Tabela 1. Conexões entre inflamação e câncer 18
Tabela 2. Primers das reações de PCR em tempo real 41
Tabela 3. Primers das reações de genotipagem por PCR 44
Tabela 4. Características histopatológicas de tumores mamários coletados na 24ª semana 72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

1.1. O câncer de mama 13

1.2. O oncogene ErbB2/HER2 15

1.3. Inflamação e câncer 17

1.4. Microambiente imune tumoral 20

1.5. Mecanismos de escape da resposta imunonológica 23

1.6. Imunidade inata: receptores do tipo *Toll* e Interleucina-1 28

1.7. SIGIRR/IL-1R8: estrutura e função 31

2. OBJETIVOS 36

3. MATERIAIS E MÉTODOS 37

3.1. Linhagens celulares e cultura de células 37

3.2. Análise da expressão gênica *in silico* por bioinformática 38

3.3. Análise de expressão protéica por Western-blot 38

3.4. Ensaio de ativação de NF-κB por retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) 39

3.5. Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real 40

3.6. Preparação de meio-condicionado e quantificação de citocinas 41

3.7. Ensaio de polarização de macrófagos *in vitro* 42

3.8. Ensaio de ativação de células NK 43

3.9. Ensaios *in vivo* de crescimento tumoral 43

3.10. Experimentos de transplante de medula óssea e crescimento tumoral em animais quimeras 45

3.11. Histopatologia e imunohistoquímica 45

3.12. Quantificação de citocinas por *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)* 46

3.13 Análise do infiltrado leucocitário tumoral por Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 47

3.14. Purificação de TAMs 47
3.15. Análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real em TAMs purificados 48
3.16. Análises estatísticas 49

4. RESULTADOS 50
4.1. SIGIRR/IL-1R8 é um gene *up*-regulado em tumores de mama 50
4.2. O aumento na expressão de IL-1R8 não depende da atividade tirosina-quinase de HER2 54
4.3. A expressão de IL-1R8 inibe a ativação de NF-κB e expressão de citocinas pró-inflamatórias. 58
4.4. Expressão de IL-1R8 em células de mama transformadas pela superexpressão de HER2 modula a polarização de macrófagos e ativação de células NK in vitro. 62
4.5. Knockout de IL-1R8 em um modelo transgênico MMTV-neu retarda o aparecimento e reduz a incidência, o volume tumoral e a disseminação metastática. 65
4.6. Deficiência de IL-1R8 promove o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral. 72

5. DISCUSSÃO 83

6. CONCLUSÕES 91

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93

LISTA DE ANEXOS 104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo mais frequente mundialmente e representa uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais (FERLAY et al., 2013). Neoplasias na mama são relativamente raras antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce de forma rápida e progressiva. No Brasil, estimativas feitas pelo INCA apontam a ocorrência de aproximadamente 57.000 novos casos de CM e mais de 13.000 óbitos decorrentes da doença no ano de 2014 (INCA, 2014). Embora significativa redução nos índices de mortalidade associados ao CM tenha sido observada ao longo dos últimos anos, a mediana de sobrevida dos 25% de pacientes que desenvolvem doença metastática continua de somente 2 a 3 anos (DESANTIS et al., 2011).

O CM é uma doença bastante heterogênea e que apresenta grande variabilidade clínica e histológica. Essa heterogeneidade reflete a alta complexidade etiológica da doença, a qual demonstra influência de diferentes fatores exógenos e endógenos (BIÈCHE e LIDEREAU, 1995). A apresentação clínica do CM pode variar desde formas não invasivas até formas altamente metastáticas. Mais de 95% dos CMs pertencem à classe dos carcinomas, originando-se do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula, mais especificamente das células luminais (HARRIS et al., 1999; PAGE et al., 1999). Casos de CM geralmente apresentam bom prognóstico e o sucesso terapêutico aumenta drasticamente quando há detecção precoce dos tumores mamários e o diagnóstico é realizado nas etapas iniciais da doença,

chegando nesses casos a uma taxa de cura próxima a 90% (ABREU e KOIFMAN, 2002).

Exemplos de fatores prognósticos tradicionais incluem o estadiamento pelo sistema de classificação TNM, que leva em conta o tamanho do tumor primário, comprometimento de linfonodos e metástase, bem como a expressão de receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP). Além disso, a presença de determinados oncogenes, como c-erbB2, MYC, Ras, e quantificação de DNA e de fase S também são exemplos de fatores prognósticos para CM (STYBLO e WOOD, 1998), e recentemente a inclusão de análise do infiltrado leucocitário tumoral por método de imunohistoquímica vem sendo adotada com sucesso em diferentes centros médicos (GALON et al., 2012).

Tumores mamários são classificados a partir de suas características moleculares em quatro subtipos, de modo análogo ao proposto por Perou e colaboradores em 2000: a) luminal A: receptor de estrógeno (RE) positivo, receptor de progesterona (RP) positivo (>20%), HER2 negativo e baixo índice de proliferação com KI67 < 14%; b) luminal B: RE e/ ou RP positivo e Ki67 ≥ 14% ou HER2 positivo; c) HER2 positivo: RE negativo, RP negativo e HER2 positivo (definido segundo os critérios do Colégio Americano de Patologia, ASCO/CAP 2013) (WOLFF et al., 2013); d) triplo negativo: RE negativo, RP negativo e HER2 negativo. Essa classificação é importante, sobretudo, pela sua implicação na escolha do tratamento das pacientes (PEROU et al., 2000).

A principal forma de tratamento para o câncer de mama é a ressecção cirúrgica, seguida ou não de terapia adjuvante (PAZ et al., 2007). Terapia adjuvante é oferecida após tratamento local com o objetivo de diminuir o risco de recidiva da

doença tanto local quanto à distância. Seu uso é empregado de acordo com a estimativa de risco de recidiva, levando em conta fatores como classificação TNM e subtipo molecular. A extensão da ressecção depende de vários fatores que incluem a histologia, o comprometimento das margens, o estado geral do paciente e a capacidade de tolerância à terapia adjuvante. Modalidades de terapia adjuvante comumente utilizadas são quimioterapia (ex. taxanos e antraciclinas), terapia hormonal (ex. Tamoxifeno e inibidores de aromatase), radioterapia e drogas anti-HER2, como o Trastuzumabe (VAN POZNAK e SEIDMAN 2002).

Tratamento neoajduvante também pode ser indicado, como, por exemplo, com uso de quimioterapia ou drogas anti-HER2, de forma a reduzir o tamanho tumoral e comprometimento axilar, aumentando a possibilidade de cirurgia conservadora (PAZ et al., 2007). Recentemente, o uso de medicamentos imunoterápicos como os inibidores de *checkpoints* inibitórios, que têm como base promover a ativação da resposta imunológica contra células tumorais, apresenta resultados bastante promissores (VAN ROOIJEN et al., 2015). Dessa forma, o melhor entendimento das características biológicas do CM é essencial para a obtenção de intervenções terapêuticas mais eficientes.

1.2 O oncogene ErbB2/HER2

Um importante exemplo de mecanismo molecular encontrado em CM é a amplificação do oncogene ErbB2/HER2, presente em aproximadamente 20% dos tumores de mama, e clinicamente associada com uma rápida progressão da doença, resistência à quimioterapia e mau prognóstico, resultando em uma taxa de sobrevida de 3 anos, comparada a 6-7 anos quando não há associação com ErbB2

(YAMAUCHI et al., 2001; TIMMS et al., 2002). O ErbB2 é um proto-oncogene que codifica uma glicoproteína transmembrana (receptor) de 185-KDa com atividade tirosina-quinase em sua porção carboxi-terminal. Embora não tenha um ligante, ErbB2 é o parceiro preferencial dos membros da família EGFR que interagem com o domínio extracelular da ErbB2 favorecendo a formação de heterodímeros (DIERMEIER et al., 2005). Esse processo de heterodimerização leva a uma auto-fosforilação dos resíduos tirosina da porção carboxi-terminal da proteína e uma vez sob a forma de dímeros, essas proteínas retransmitem o sinal de ativação para outras proteínas tais como Ras, Raf, PI3K/MAPK ou c-Jun quinase podendo conduzir a alterações no crescimento e transformação celular (YAMAUCHI et al., 2001; ROSKOSKI, 2014;).

A superexpressão de ErbB2 promove a formação de homodímeros constitutivamente ativos com consequente sinalização de múltiplas vias de sinalização *downstream,* resultando em importante desregulação do transcriptoma global celular (STAAF et al., 2010). No entanto, as vias e alvos críticos a oncogênese mediada por HER2 permanecem não completamente entendidos (Figura 1).

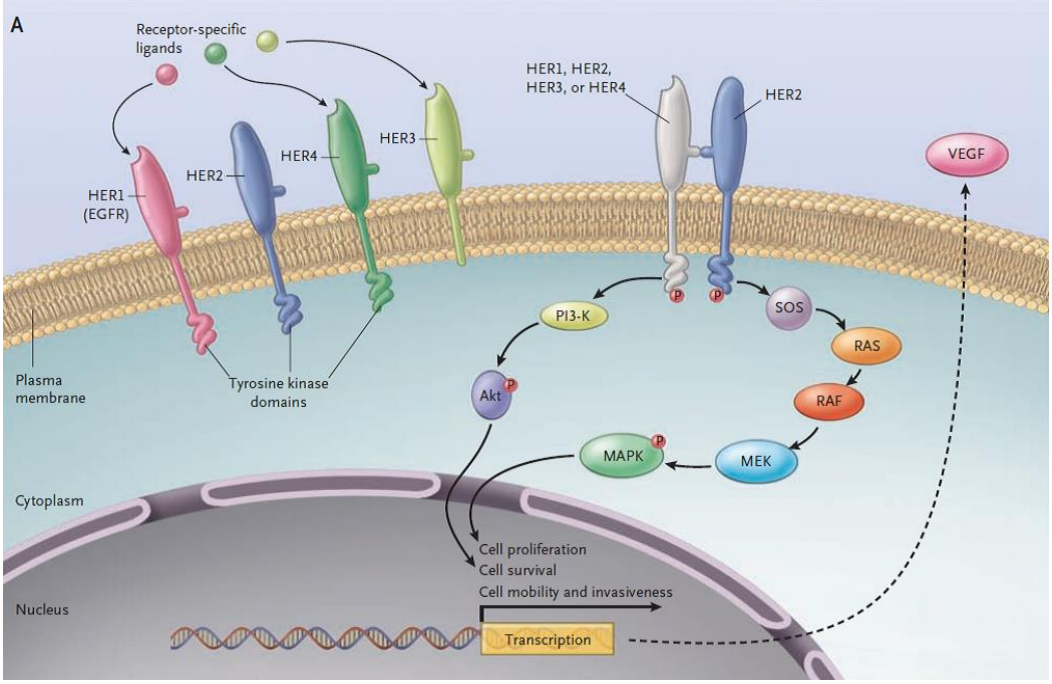


Figura 1. Representação da função desempenhada ErbB2/HER2 na célula tumoral. Como demonstrado acima, os quatro membros da família HER são HER1, HER2, HER3, e HER4. Um domínio intracelular tirosina-quinase existe para HER1, HER2 e HER4. Fosforilação do domínio tirosina-quinase por homo ou heterodimerização de receptores HER ativa a enzima fosfatidilnositol 3-quinase (PI3K), a qual se liga e fosforila Akt, induzindo assim sinais de proliferação e sobrevivência celular (Adaptado de HUDIS, 2007).

1.3 Inflamação e câncer

Estudos epidemiológicos indicam que o processo inflamatório crônico e não resolvido é um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer. Exemplos importantes desta associação são observados, por exemplo, na maior incidência de tumores de cólon em indivíduos com doenças inflamatórias do intestino, tais como colite ulcerativa crônica e doença de Chron (COUSSENS e WERB, 2002). Além disso, a infecção por Hepatite C no fígado predispõe ao desenvolvimento de carcinoma de fígado; material particulado proveniente da fumaça do tabaco é considerado um importante promotor de tumores de pulmão por sua habilidade de gerar inflamação alveolar crônica, enquanto que gastrite induzida

por Helicobacter pylori é a principal causa de câncer de estômago (COUSSENS e WERB, 2002). O papel da inflamação na tumorigênese é hoje amplamente aceito no meio científico, e é cada vez mais evidente que um microambiente inflamatório representa um componente essencial de todos os tipos de tumores sólidos, incluindo aqueles como o câncer de mama para os quais, até o momento, não há indícios de uma relação causal direta com inflamação crônica (MANTOVANI et al., 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Conexões entre inflamação e câncer. Adaptado de BALKWILL et al., 2005.

Tabela 1. Conexões entre inflamação e câncer.
• Inflamação crônica aumenta o risco de desenvolvimento de câncer, e muitos tumores surgem em sítios de inflamação persistente;
• Células imunes que medeiam a inflamação crônica são encontradas em tumores e promovem crescimento tumoral em experimentos in vitro;
• Mediadores químicos que regulam a inflamação estão presentes em tumores;
• Inibição ou deleção de mediadores inflamatórios inibe o desenvolvimento de tumores em modelos experimentais;
• Variações genéticas em genes associados à inflamação alteram a suscetibilidade ao câncer;
• Uso prolongado de agentes anti-inflamatórios não esteroides reduz o risco de desenvolvimento de certos tipos de tumores.

A conexão entre inflamação e câncer não ocorre somente por um mecanismo extrínseco, exemplificado por condições inflamatórias que aumentam o risco de desenvolvimento de câncer, mas também por mecanismos intrínsecos da célula tumoral, que consistem em alterações genéticas que causam inflamação e neoplasia (por exemplo, pela sinalização gerada por oncogenes) (MANTOVANI et al., 2008).

Na realidade, a maior parte dos tumores sólidos (senão todos) induz uma resposta inflamatória intrínseca e constante, através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, os quais mantêm um microambiente pró-tumoral (MANTOVANI et al., 2008). Além de ativar sinais proliferativos, certos oncogenes, tais como membros da família RAS e MYC, induzem um programa transcricional que leva ao remodelamento do microambiente tumoral através do recrutamento de leucócitos, expressão de citocinas pró-tumorais e indução de um “switch” angiogênico (SOUCEK et al., 2007; SPARMANN e BAR-SAGI, 2004). Pelo processo contínuo de renovação celular e proliferação induzida pela inflamação associada, tumores já foram descritos como “feridas que não cicatrizam” (DVORAK, 1986).

O tecido neoplásico é composto de um microambiente que seleciona de forma darwiniana o tipo e extensão da inflamação, favorecendo a progressão e o crescimento tumoral. A plasticidade é uma característica importante do processo inflamatório. A ativação de uma imunidade inata e montagem de uma resposta inflamatória aguda são geralmente seguidas de uma fase tardia onde mecanismos regulatórios, de reparação e remodelamento tecidual prevalecem (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; BALKWILL et al., 2005). Um processo inflamatório normal é autolimitante, já que a produção de fatores anti-inflamatórios segue de forma próxima a de fatores pró-inflamatórios. No entanto, a inflamação crônica parece ocorrer devido a uma persistência de fatores promotores ou uma falha em mecanismos necessários para a resolução da resposta inflamatória (COUSSENS e WERB, 2002).

Sabe-se que a inflamação crônica contribui para tumorigênese em todos os estágios do desenvolvimento tumoral. Ela contribui na iniciação, através da geração

de estresse genotóxico. Nesta fase, células imunes e seus mediadores (como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) têm a capacidade de desestabilizar o genoma celular por uma variedade de mecanismos, tais como pelo dano direto ao DNA, dano a sistemas de reparo de DNA e alteração de checkpoints do ciclo celular (COLOTTA et al., 2009). A inflamação também contribui na promoção, através da indução de proliferação celular; e por fim contribui na progressão, através do estímulo ao aumento de angiogênese e invasão (GRIVENNIKOV et al., 2010). Além disso, a inflamação crônica contribui de forma importante para a progressão tumoral por atenuar o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa efetora (DENARDO e COUSSENS, 2007).

1.4 Microambiente imune tumoral

Tumores apresentam grande heterogeneidade celular, e diversos estudos evidenciam que elementos não neoplásicos presentes na massa tumoral, tais como células derivadas de células mesenquimais e componentes dos sistemas imunológico e vascular, contribuem de forma significativa à carcinogênese, progressão e metástase (Figura 2) (VAN KEMPEN et al., 2003; MANTOVANI e SICA, 2010; LI et al., 2011). Essa diversidade de células comunica-se de forma dinâmica através de contato direto ou produção de citocinas e quimiocinas, e agem de maneira autócrina e parácrina de forma a controlar e modelar o crescimento tumoral (GRIVENNIKOV et al., 2010). Além disso, a expressão de citocinas quimiotáticas, ou quimiocinas, particularmente por células tumorais apresenta papel fundamental na evolução de seu crescimento. Alguns desses fatores quimiotáticos recrutam leucócitos ao microambiente que apresentam função pró-tumoral,

enquanto outros recrutam leucócitos que potencialmente antagonizam o crescimento tumoral (DENARDO et al., 2009; RICHMOND, 2010).

Ao contrário do que ocorre em uma resposta imune efetiva contra patógenos, células do sistema imune residentes no microambiente tumoral encontram-se frequentemente desreguladas e funcionalmente ineficientes. Os mecanismos envolvidos com a resposta imune ineficaz contra tumores e as complexas interações existentes entre os diferentes tipos celulares do microambiente tumoral estão sendo gradativamente melhor entendidas e estabelecidas como um importante *hallmark* do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

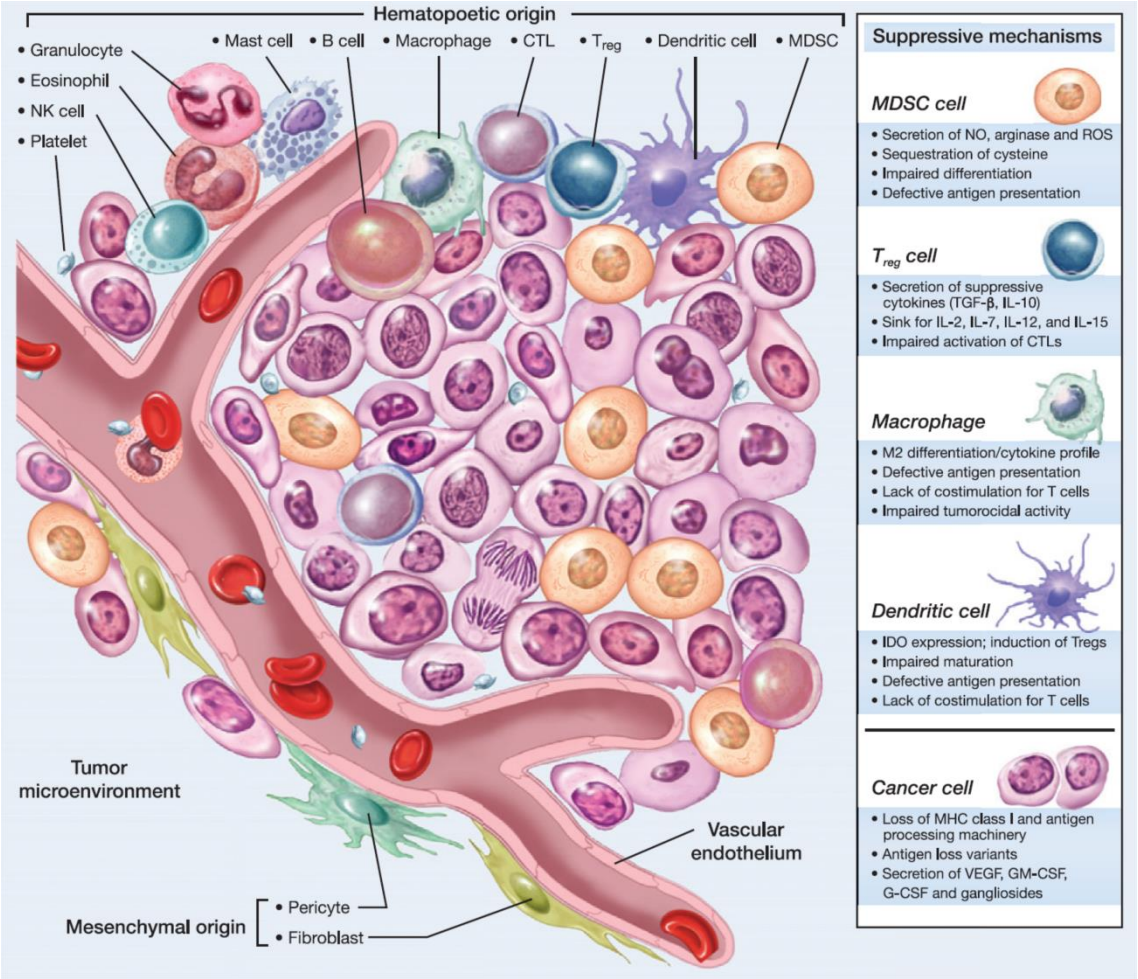


Figura 2. Representação da heterogeneidade celular presente no microambiente de tumores sólidos. Tumores estabelecidos contêm uma ampla variedade de células imunes que contribuem com o estroma tumoral para o

crescimento maligno. Tumores possuem células infiltradas da imunidade inata e adaptativa, tais como MDSCs, macrófagos, DCs, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, células NK e linfócitos. Essas células formam, de maneira coordenada, uma rede regulatória complexa que promove o crescimento tumoral por criar um ambiente permissivo para a evasão da imunovigilância (Figura: KERKAR e RESTIFO, 2012).

O sistema imunológico funciona de forma integrada a fim de reconhecer e proteger tecidos de infecções e dano celular. No entanto, seu papel no câncer parece ser dual: enquanto promove a tumorigênese e ajuda a manter um microambiente favorável ao desenvolvimento e progressão tumoral, o sistema imune também é capaz de exercer um poderoso papel antitumoral. Dessa forma, é seguro assumir que inflamação pró-tumoral e imunidade antitumoral co-existem em diferentes pontos ao longo da progressão do tumor, e condições ambientais e micro ambientais determinam o equilíbrio entre os dois (SWANN et al., 2008). Ambos os sistemas imune inato - representado por células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e células Natural Killer (NKs), além de proteínas do sistema de complemento – bem como o adaptativo - representado pelos linfócitos T e B e imunoglobulinas - foram implicados em promover e prevenir o crescimento tumoral (DE VISSER et al., 2006).

A heterogeneidade celular presente em tumores sólidos é um fator atualmente utilizado em diversos centros médicos como importante critério clínico preditivo (*Immunoscore*) (GALON et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que o poder preditivo do *Immunoscore* apresenta maior força estatística que o critério convencional TNM de classificação. É descrito, por exemplo, que alto infiltrado de linfócitos T ($CD3^+$) e linfócitos T $CD8^+$ é associado com melhor desfecho clínico em pacientes com câncer de cólon, ovário, esôfago e mama (ASHIDA et al., 2006; GALON et al., 2006; MAHMOUD et al., 2011; PAGÈS et al., 2009; SATO et al.,

2005). Embora o sistema imune tenha a habilidade de desenvolver respostas antitumorais, diversos mecanismos de imunossupressão desenvolvidos por células tumorais são capazes de prevenir esse processo.

1.5 Mecanismos de escape da resposta imunológica

Se por um lado há promoção da formação tumoral, através da criação de um microambiente inflamatório propício para o surgimento, proliferação e disseminação das células transformadas, por outro há uma capacidade de proteção contra a formação de tumores através de mecanismos de indução da imunidade inata e adaptativa. É importante salientar que a possibilidade de geração de resposta imune antitumoral abre o precedente para o desenvolvimento de medicamentos imunoterápicos contra o câncer e que para tanto, o melhor entendimento dos fatores envolvidos no controle dessa ambiguidade da resposta imunológica é fundamental.

Uma forma interessante de se compreender essa relação dinâmica existente entre o câncer e sistema imune é a hipótese da imunoedição. Essa hipótese consiste em três etapas: eliminação, equilíbrio e escape (Figura 3) (SCHREIBER et al., 2011). A fase de eliminação ocorre sob o trabalho coordenado do sistema imune inato e adaptativo a fim de detectar a presença de células transformadas malignamente (através da expressão de antígenos imunogênicos, por exemplo) e destruí-las antes de tornarem-se clinicamente aparentes. A fase de equilíbrio é a mais longa do processo de imunoedição (podendo estender-se através de toda a vida do indivíduo), e é a fase na qual o sistema imune adaptativo previne o desenvolvimento tumoral e também molda sua imunogenicidade. Nesta fase há uma pressão seletiva para permanência de células mais bem adaptadas ao seu

microambiente. Dessa forma, na fase final (escape), células tumorais que desenvolveram mecanismos para contornar o reconhecimento pelo sistema imune e/ou sua destruição emergem como tumores visíveis e de crescimento progressivo (DUNN et al., 2002; QUEZADA et al., 2011; SCHREIBER et al., 2011).

A etapa de escape é caracterizada pela expansão de células tumorais pouco imunogênicas que desenvolveram, em processos de seleção darwiniana, diferentes mecanismos para escapar do controle do sistema imune, tais como perda na expressão e apresentação de antígenos imunogênicos, resistência aos efeitos citotóxicos induzidos pelas células imunes e estabelecimento de um estado imunossuprimido no microambiente tumoral (SCHREIBER et al., 2011). A perda da capacidade de apresentar antígenos ocorre, por exemplo, através da diminuição da expressão de proteínas do complexo de apresentação de antígenos MHC e é frequentemente observada em tumores com superexpressão de HER2/neu, que em consequência disso apresentam um fenótipo menos imunogênico e resistência à formação de uma resposta imune antitumoral (OKITA et al., 2012).

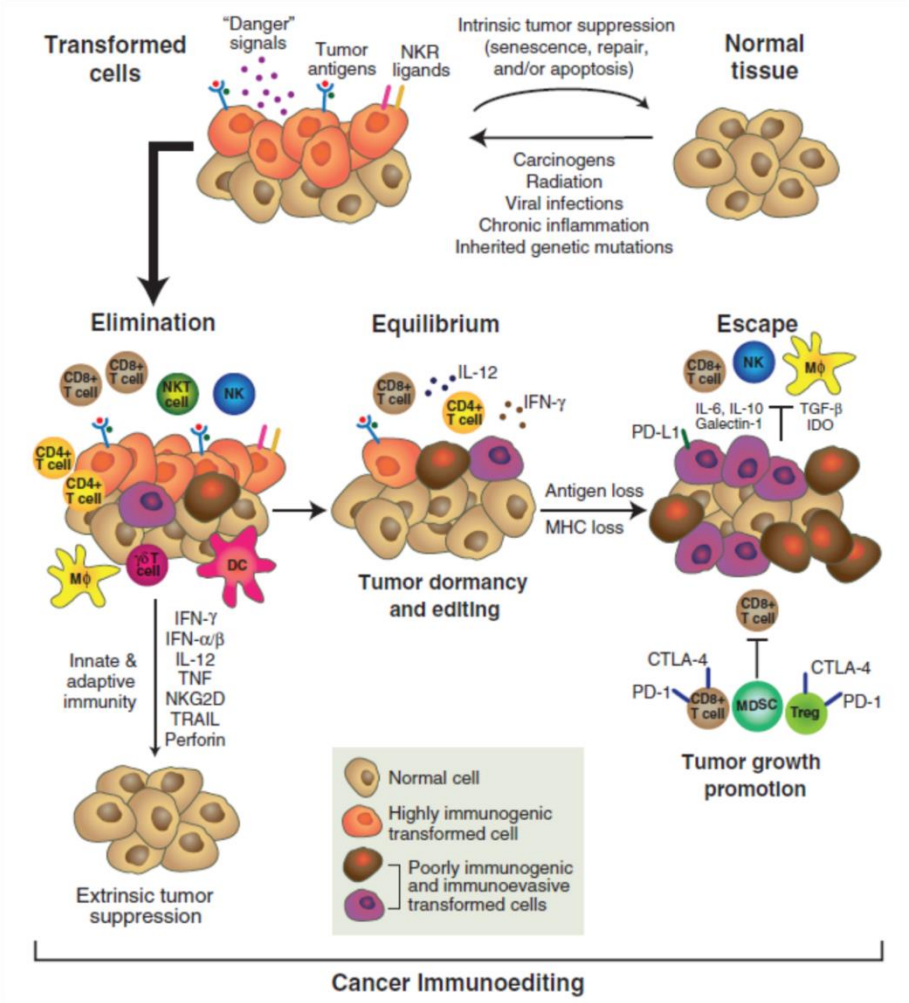


Figura 3. Ilustração do conceito de imunoedição. A imunoedição funciona como um mecanismo extrínseco de supressão tumoral que só é acionado após processo de transformação celular ter ocorrido e os mecanismos intrínsecos de supressão tumoral terem falhado. Em sua forma mais complexa, a imunoedição no câncer consiste em três fases sequenciais: eliminação, equilíbrio e escape (Figura: SCHREIBER et al., 2011).

Para geração de uma resposta imune antitumoral eficiente e tolerante a componentes próprios presentes em células normais, uma combinação de sinais de estímulo e inibição deve ser finamente regulada. Um dos mecanismos de regulação inibitória mais estudado nos últimos anos é a expressão do Receptor de Morte Programada-1 (PD-1, do inglês *Programmed Death 1*), presente em células ativadas (macrófagos e especialmente linfócitos T), que quando estimulado com seus ligantes

PD-L1 e PD-L2, expressos em células dendríticas, macrófagos ativados e células tumorais, induz sinais de anergia e tolerância (HENICK et al., 2014). A expressão de PD-L1 e PD-L2 por células tumorais é um exemplo clássico de mecanismo de evasão do sistema imune, e a inibição do eixo PD-1/PD-L1 é atualmente alvo terapêutico importante para certos tipos de tumores, tais como melanoma e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (SUNSHINE e TAUBE, 2015; TOPALIAN et al., 2012). Recentemente foi demonstrado que, por exemplo, sinais oncogênicos causados por mutações na via de EGFR em tumores de pulmão induzem expressão de PD-L1 e consequente escape da resposta imune mediada por células T (AKBAY et al., 2013).

Células tumorais são também capazes de evadir da resposta imune ao produzirem uma série de citocinas imunossupressivas, tais como Interleucina 10 (IL-10), fator de transformação tecidual Beta (TGF-β), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), galectina, ou indoleamina 2,3 – dioxigenase (IDO) e/ou pelo recrutamento de células imunes regulatórias como células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs) e linfócitos T reguladores (T-regs) que funcionam como efetoras da imunossupressão ao inibirem a atividade efetora de componentes da imunidade, como células T citotóxicas. Além disso, uma ampla variedade de citocinas e quimiocinas que recrutam células imunes ao sítio tumoral e frequentemente as polarizam a um fenótipo pró-tumoral são produzidas por células cancerosas (LEWIS e POLLARD, 2006; MANTOVANI et al., 2008).

Por exemplo, os macrófagos associados a tumores (TAM) são as células imunes mais frequentemente encontradas no microambiente tumoral. Esses TAMs apresentam fenótipo promotor do crescimento tumoral e foram descritos como peças

obrigatórias para indução de angiogênese, invasão e metástase (CONDEELIS e POLLARD, 2006). Macrófagos são células extremamente plásticas e podem ser polarizadas a um fenótipo pró-inflamatório (macrófagos classicamente ativados, ou simplesmente M1) ou antiinflamatório (macrófagos alternativamente ativados, ou M2), dependendo do estímulo recebido. Fatores como IL-4, IL-10 e IL-13 são estímulos de polarização M2, enquanto fatores microbianos e IFN-γ são clássicos ativadores de macrófagos M1 (GRIVENNIKOV et al., 2010). É sabido que fatores derivados de tumores geralmente promovem polarização de macrófagos para o fenótipo M2, com potencial imunossupressivo, inativador de resposta efetora mediada por células T e secretor de sinais pró-tumorais, como fatores de crescimento, invasão e angiogênese (MANTOVANI et al., 2002; SOLINAS et al., 2009). Na prática clínica, a presença de TAMs infiltrados em tumores sólidos está geralmente associada a um pior prognóstico, enquanto a presença de células T no infiltrado parece ser indicativa de melhor resposta terapêutica (PARMIANI, 2005).

Assim como macrófagos, os neutrófilos também apresentam efeito contrastante no crescimento tumoral, dependendo dos sinais microambientais (COLOMBO et al., 1991; KUANG et al., 2011). Células tumorais frequentemente produzem diversas quimiocinas inflamatórias, incluindo quimiocinas da família CXC atrativas de neutrófilos (MANTOVANI et al., 2011). Citocinas como IL-17, CXCL8/IL-8, IFN-γ, TNFα e CSF2, por exemplo, favorecem o recrutamento, ativação e sobrevivência de neutrófilos em sítios inflamatórios. De forma geral, células tumorais tendem a manter um microambiente imunossuprimido, com infiltrado composto predominantemente por macrófagos M2, linfócitos T-regs e MDSCs e com baixos números de linfócitos T citotóxicos (T-CD8^{+}) e células NKs, embora os mecanismos envolvidos nesse fenômeno permaneçam sob investigação.

Em tumores de mama, a presença de infiltrado linfocitário com alta razão $CD4^+/CD8^+$ e Th2/Th1 foi descrita como forte indicativo de baixo prognóstico clínico (KOHRT et al., 2005). Além disso, análise de expressão gênica demonstrou que tumores com grande infiltrado de linfócitos T-$CD8^+$ apresentam alta expressão de genes associados com respostas de Interferon do tipo 1, os quais são ativados por sensores da imunidade inata expressos em diversos tipos celulares e induzem montagem de imunidade adaptativa efetora (GAJEWSKI et al., 2013; GAJEWSKI, 2007).

Dessa forma, um melhor entendimento desse complexo *crosstalk* existente entre células tumorais e imunes e quais são os mecanismos regulatórios envolvidos é fundamental para um conhecimento mais sólido da biologia tumoral e para o desenvolvimento de novas e mais promissoras tecnologias para câncer.

1.6 Imunidade inata: receptores do tipo *Toll* e Interleucina 1

A imunidade inata é parte do sistema imunológico que compreende componentes celulares e não celulares com a tarefa de responder e defender de forma não específica a estímulos agressores contra o organismo hospedeiro, tais como infecções e dano celular. O sistema imune inato está presente em praticamente todos os organismos vegetais e animais, em contraste ao sistema imune adaptativo, o qual é encontrado somente em vertebrados (ALBERTS et al., 2002). Suas principais funções são prover resposta inicial de forma a controlar e eliminar agentes infecciosos, reconhecer produtos de dano ou células mortas para início de reparo tecidual, e orientar a resposta imune adaptativa para montagem de resposta específica e duradoura contra determinados tipos de micro-organismos.

Para tanto, mecanismos mediados por células e fatores solúveis são utilizados (ABBAS e LICHTMAN, 2012). Importantes componentes do sistema imune inato são leucócitos da família dos fagócitos, tais como macrófagos e neutrófilos, células dendríticas, células NKs, mastócitos, eosinófilos e basófilos (JANEWAY et al., 2001). Células dendríticas, por exemplo, são consideradas um *link* fundamental entre a imunidade inata e adaptativa. Estas células são capazes de reconhecer antígenos microbianos através da expressão de receptores de reconhecimento de padrão molecular, tais como receptores da família *Toll-like* (TLRs), que quando ativados desencadeiam sinais imunoestimuladores, indutores de fagocitose, processamento e apresentação desses antígenos a células T imaturas, que tem a capacidade de ativar uma resposta imune adaptativa (ALBERTS et al., 2002). No caso de tumores de mama, por exemplo, sabe-se que células dendríticas encontram-se reduzidas em número e disfuncionais (POCKAJ et al., 2004).

Receptores *Toll-like*, componentes essenciais na ativação da imunidade inata, são conservados evolutivamente e expressos por vários tipos celulares, tais como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células epiteliais e células tumorais (AKIRA et al., 2006; CHEN et al., 2008). TLRs reconhecem e interagem com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), presentes em componentes de bactérias, vírus, fungos e parasitas (RAKOFF-NAHOUM e MEDZHITOV, 2009; TAKEDA e AKIRA, 2004). Além disso, TLRs podem ser ativados por diferentes ligantes endógenos como HMGB1, HSP60, HSP70, fibrinogênio e fibronectina (MIDWOOD e PICCININI, 2010; RAKOFF-NAHOUM e MEDZHITOV, 2009). Até o momento 10 TLRs foram descritos em humanos e 13 em camundongos (GAY e GANGLOFF, 2007).

Receptores do tipo *Toll* apresentam um domínio intracelular em comum, chamado de *Toll*/IL-1 receptor (TIR) (TAKEDA e AKIRA, 2004). Embora apresentem diferentes ligantes, a maior parte dos TLRs sinaliza através da mesma via, dependente da proteína adaptadora MyD88. No entanto, alguns TLRs, como TLR3 e TLR4, também sinalizam através de vias independentes de MyD88 ao interagir com a proteína TRIF e ativar o fator de transcrição IRF3 (Interferon regulatory transcription fator 3), que induz a expressão de Inteferons do tipo 1 (KAWAI e AKIRA, 2010). Quando há ligação de um agonista em TLRs, uma cadeia de proteínas acessórias é recrutada ao complexo TIR. Em seguida, domínios TIR aproximam-se induzindo sinalização e ativação celular através de fatores de transcrição como NF-κB, via de sinalização chave em processos como sobrevivência celular, inflamação e imunidade (KARIN e GRETEN, 2005; MARTIN e WESCHE, 2002).

Receptores da família de Interleucina-1 (IL-1R) também apresentam domínio intracelular TIR, sinalizando pela mesma via que receptores do tipo *Toll*. A família de IL-1R inclui 10 membros, sendo que a maioria deles é composta de uma porção extracelular com três domínios Ig-*like,* um domínio transmembrana, além de um domínio TIR intracelular. A sinalização por vias dependentes ou independentes de MyD88 leva, da mesma forma que a sinalização por TLRs, a ativação de fatores de transcrição como NF-κB e IRFs, os quais regulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-12, por exemplo) e Interferons do tipo I (IFN) (WANG et al., 2014). IL-1 é uma família de citocinas abundante no microambiente tumoral, sendo produzida especialmente por células como neutrófilos, macrófagos e células tumorais. Sua produção afeta diferentes fases do processo de transformação celular,

tais como nas etapas de tumorigênse, progessão e invasão, bem como na interação entre as células malignas e sistema imune (GARLANDA et al., 2013).

Dessa forma, ambos IL-1Rs e TLRs, quando ativados, desencadeiam uma cascata de transdução de sinais com um potente desfecho pró-inflamatório, incluindo a ativação de NF-κB e secreção de citocinas imunoestimulatórias, tais como IFNs e TNFα, apresentando papel essencial na iniciação e amplificação da imunidade inata além da ativação e orientação da imunidade adaptativa (GARLANDA et al., 2009).

1.7 SIGIRR/IL-1R8: estrutura e função

A ativação de uma cascata de sinalização levando a produção de proteínas relacionadas à inflamação e imunidade por IL-1Rs e TLRs é finamente regulada, já que um descontrole ou ativação desregulada desses receptores pode gerar reações inflamatórias locais e sistêmicas potencialmente severas (GARLANDA et al., 2009). Por exemplo, IL-1Ra e IL-36 são polipeptídeos antagonistas de IL-1R1 e IL-1Rrp2, respectivamente (DINARELLO, 2009; TOWNE et al., 2004). Outros receptores *decoy* da superfamília de IL-1R, tal como IL-1R2, interagem com ligantes que não estão mais disponíveis para ligação com receptores que transduzem sinal ou formam complexos dominantes negativos não-sinalizadores com proteínas acessórias (AcP) (MANTOVANI et al., 2001). IRAK-M e MyD88s são reguladores negativos de sinalização por ILRs e TLRs que agem intracelularmente (JANSSENS et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2002).

O receptor transmembrana IL-1R8, previamente conhecido como SIGIRR ou TIR8, pertence à superfamília dos receptores de IL-1 e age como um *decoy* para ativação de sinais desencadeados por TLRs e IL-1Rs, regulando e sintonizando finamente a ativação desses receptores. IL-1R8 apresenta algumas peculiaridades estruturais em relação a outros membros da família, tais como os receptores IL-1R1 e IL-18R. Ele apresenta um único domínio Ig-*like* extracelular (diferentemente dos característicos três domínios dos outros membros da superfamília de IL-R), duas substituições em aminoácidos conservados no seu domínio TIR intracelular (Ser447 e Tyr536 substituídos por Cys222 e Leu305), e uma característica cauda intracelular longa de 95 aminoácidos, levando a uma transdução de sinal prejudicada (Figura 4) (GARLANDA et al., 2009; RIVA et al., 2012).

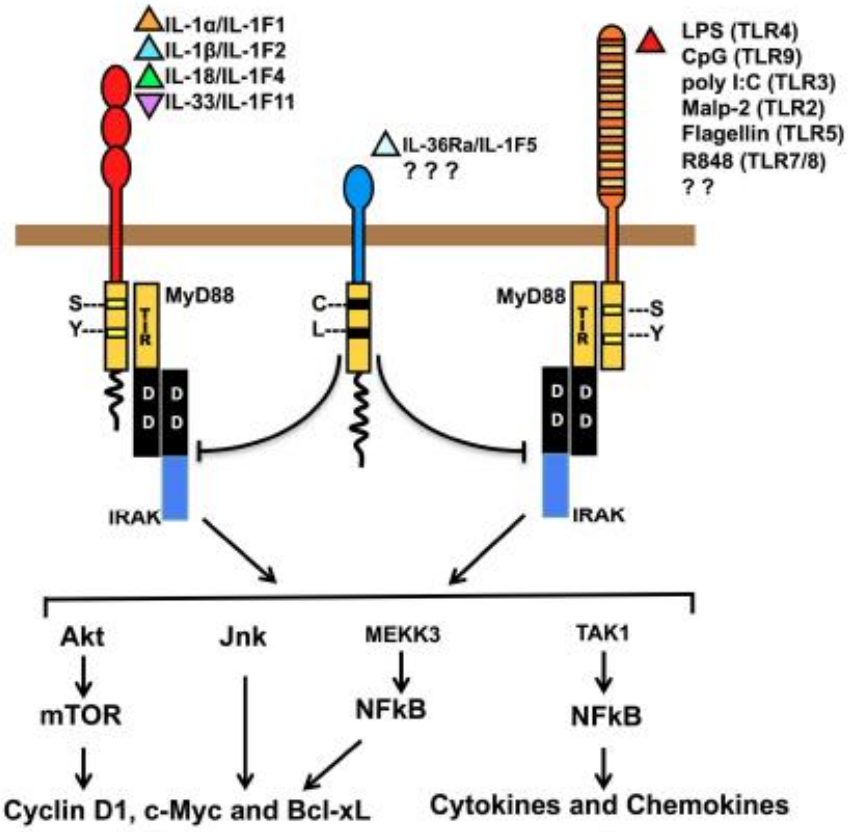


Figura 4. Ilustração do receptor regulatório SIGIRR/IL-1R8. IL-1R8 é um receptor composto por um domínio Ig extracellular único (aminoácidos 17-112), um domínio

transmembrana (aminoácidos 117-139), um domínio intracelular TIR conservado (aminoácidos 166-305), e uma cauda intracelular longa com 95 aminoácidos. Dois aminoácidos conservados (Ser, Tyr) no domínio TIR são substitituídos por Cys222 e Leu305 em IL-1R8, levando a uma ativação não convencional. IL-1R8 inibe sinalização por ILRs (IL-1R1, IL-18R, T1/ST2) e TLRs (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8, TLR9 e potencialmente outros) e ativação de NF-κB, AP-1 e IRFs (Figura: RIVA et al., 2012).

IL-1R8 é designado como um receptor órfão por razões atribuídas a sua estrutura única na superfamília, embora recentemente a citocina anti-inflamatória IL-37 foi demonstrada requerer IL-1R8 como co-receptor (LI et al., 2015; NOLD-PETRY et al., 2015). IL-1R8 modula negativamente a transdução de sinal ativada pelos receptores membros da família IL-1, tais como IL-1R1, IL-18R, ST2, e também diversos TLRs, tais como TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9, através do recrutamento de componentes adaptadores do complexo dos receptores que são fundamentais para a transdução de sinal, como IRAK e TRAF6 (BULEK et al., 2009; QIN et al., 2005; WALD et al., 2003). Foi também proposto que o domínio extracelular *Ig-like* de IL-1R8 interfere com a dimerização entre IL-1R e IL-1RAcp (RIVA et al., 2012). Experimentos de mutagênese revelaram que somente o domínio TIR de IL-1R8 é suficiente para regulação negativa de sinais via receptor TLR4 (QIN et al., 2005; WALD et al., 2003). Dessa forma, a expressão de IL-1R8 impede a ativação de fatores de transcrição como NF-κB, AP-1, JNK e IRF3 (QIN et al., 2005; WALD et al., 2003).

IL-1R8 apresenta sequência e padrão de expressão conservados entre vertebrados, desde galinhas até humanos (RIVA et al., 2009). Em particular, a sequência proteica de IL-1R8 em humanos e camundongos é 82% idêntica. IL-1R8 é

expresso de forma ubíqua em tecidos, em particular rim, fígado, trato digestório, órgãos linfoides e células de origem epitelial.

Em isquemia ou transplante renal, deficiência de IL-1R8 causa aumento em dado renal e rejeição severa contra o enxerto, associado com inflamação excessiva e amplificação da resposta imune adaptativa contra antígenos do doador (LECH et al., 2009; NORIS et al., 2009). Deficiência de IL-1R8 já foi também associada com suscetibilidade aumentada para o desenvolvimento de alergia e autoimunidade em diferentes modelos, incluindo lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica (LECH et al., 2008, 2010), artrite (DREXLER et al., 2010), encefalomielite autoimune experimental e psoríase (RUSSELL et al., 2013).

Em um modelo de câncer associado à colite, deficiência de IL-1R8 causa inflamação intestinal mais severa durante colite induzida por DSS e maior suscetibilidade a carcinogênese intestinal (GARLANDA et al., 2007; XIAO et al., 2007, 2010). Além disso, *knockout* de IL-1R8 levou a aparecimento mais precoce e severo de expansões de células B monoclonais em um modelo murino de leucemia linfóide crônica (BERTILACCIO et al., 2011). Esses achados coletivamente demonstram que IL-1R8 age como importante regulador de sensores da imunidade inata e da resposta inflamatória, com envolvimento em diferentes desordens patológicas. No entanto, seu papel como mediador da resposta imune em modelos tumorais como mama permanece inexplorado.

Em dados anteriores de nosso grupo, uma análise de expressão gênica global utilizando uma linhagem epitelial mamária humana imortalizada (HB4a) e sua variante transformada pela superexpressão do oncogene HER2 (HB4a – C5.2), mostrou IL-1R8 como um gene importantemente *up*-regulado na variante HB4a –

C5.2. Experimentos de PCR-array após estímulo com IL-1β e LPS relevaram que a linhagem transformada por HER2 expressa níveis significativamente menores de diferentes citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-8, TNFα e IFN-β1. Dada a importância de um microambiente inflamatório no processo tumorigênico e dos mecanismos de regulação da resposta imune exercido por células tumorais, uma investigação mais aprofundada sobre a função de IL-1R8 é crítica para melhor compreensão do seu papel na biologia de tumores de mama e seu envolvimento no *crosstalk* entre células tumorais e o sistema imune.

2.1. OBJETIVO GERAL

- O aumento na expressão de SIGIRR/IL-1R8 em tumores de mama interfere no *crosstalk* com células do sistema imune, por regular a expressão de fatores inflamatórios?

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão diferencial de IL-1R8 em tumores de mama e seu papel funcional em um modelo de transformação celular mediado por HER2, no contexto da ativação de vias e sinais associados com inflamação e imunidade;
- Investigar a influência da expressão de IL-1R8 em células de mama transformadas por HER2 na ativação e recrutamento de células do sistema imune *in vitro*;
- Determinar a relevância da expressão de IL-1R8 na evolução do crescimento tumoral em um modelo genético murino de tumorigênese de mama mediado por HER2 e sua relação com o infiltrado leucocitário e ativação da resposta imune.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares e cultura de células

A linhagem celular HB4a, obtida a partir da imortalização de células luminais de mama humanas com um vetor retroviral que expressa o antígeno T grande do vírus SV40 (HARRIS et al., 1999), e sua variante com superexpressão de ErbB2, HB4a – c5.2, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Michael O'Hare (Instituto Ludwig de Londres). As linhagens foram cultivadas usando meio RPMI-1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) complementado com 10% soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 5 μg/mL insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5 μg/mL hidrocortisona e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As linhagens silenciadas para expressão de IL-1R8 foram mantidas com 0.2 μg/mL puromicina (Promega, Madison, WI, USA). Para simplificar, os resultados obtidos com as células HB4a – c5.2 e transfectadas com vetor vazio foram agrupadas e chamadas de HB4a^{HER2+}, enquanto os resultados obtidos com dois clones silenciados para IL-1R8 por shRNA diferentes (63.2 e 7B13) foram apresentados como HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$. As linhagens de leucemia monocítica aguda humana (THP-1) e de célula natural killer humana (NKL) foram obtidas comercialmente da ATCC (Manassas, VA, USA) e foram cultivadas usando meio RPMI-1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) complementado com 10% soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL estreptomicina, e 200 U/mL de IL-2 humana recombinante (Biolegend, San Diego, CA, USA) ou 0.05 mM de 2-mercaptoetanol e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectivamente. As linhagens foram mantidas a 37ºC em uma

atmosfera úmida com 5% CO2 e testadas para a presença de contaminação com Mycoplasma.

3.2 Análise da expressão gênica *in silico* por bioinformática

Dados de expressão gênica de carcinoma invasivo de mama e informações clínicas foram baixadas do portal de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/). Todos os dados foram processados em fevereiro de 2014. O transcriptoma de 576 amostras foi sequenciado usando a plataforma Ilumina Hi-Seq 2000. Quantificação dos genes e transcritos foi gerada no *framework* SeqWare utilizando o RNASeqAlignmentBWA *workflow* e RPKM (*Reads per Kilobase per Million*) foi usado como medida do nível de expressão gênica. Inicialmente, nós utilizamos amostradas pareadas e não pareadas para comparar o nível de expressão de IL-1R8 entre amostras de tecidos normais e tumorais. Também utilizamos metadata para classificação clínica dos tumores para subdividir as amostras em Basal-like, HER2+, Luminal A e Luminal B. Para análise de sobrevida, utilizamos os dados públicos de expressão gênica por *microarray* e informações clínicas depositadas na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO) (GYÖRFFY et al., 2010). Para determinação do *cutoff* de expressão de IL-1R8, utilizamos uma ferramenta previamente descrita (MIHÁLY et al., 2013) que leva em consideração todos percentis entre os quartis baixos e altos e seleciona aquele *threshold* que melhor divide os grupos.

3.3 Análise de expressão protéica por *Western-blot*

Proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% desoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF e coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma–Aldrich, St. Louis,

MO, USA). O total de extrato protéico quantificado foi aplicado em gel de 10% poliacrilamida (SDS-PAGE), transferido para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) e incubados *overnight* com os anticorpos anti-mSIGIRR/IL-1R8 (ProSci, San Diego, CA, USA), anti-ErbB2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-pErbB2 (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), anti-pAKT (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), anti-ERK1/2 (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), anti-pERK1/2 (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), anti-IκB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-β-tubulina (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) ou anti-mVinculina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluídos em TBST e 5% leite desnatado. As membranas foram então incubadas com respectivos anticorpos secundários anti-rabbit e anti-mouse conjugados com HPRT (GE Healthcare, Cleveland, OH, USA) por 60 minutos a temperatura ambiente em TBST + 5% leite desnatado, sob constante agitação, com posterior detecção dos anticorpos ligados a membrana com o Kit ECL (GE Healthcare, Cleveland, OH, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Ensaio de ativação de NF-κB por retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)

O extrato de proteínas nucleares foi preparado conforme descrito anteriormente (FERREIRA et al., 2005). A sonda oligonucleotídica específica para região consenso de NF-κB (5'AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcada com [γ^{32}P]-ATP (atividade específica 3000 Ci/mmol) na presença de proteína T4 polinucleotídeo quinase (10 minutos, 37ºC). Nucleotídeos não incorporados foram

removidos em uma coluna Sephadex G25 (Amersham, Little Chalfont, England, UK). Em um volume total de 20μL, 4μg de extrato nuclear foi incubado com tampão de ligação ao gel de mobilidade eletroforética (10 mM HEPES pH 7.5; 50 mM KCl; 1.0 mM MgCl2; 0.5 mM EDTA pH 8.0; 0.5 mM DTT, 4% glicerol) e 1.0 μg poly(dI-dC).poly(dI-dC) por 20 minutos em temperatura ambiente. Cada amostra foi então incubada com 20,000– 50,000 cpm de sonda radioativa (30 minutos, temperatura ambiente). Complexos proteína-DNA foram aplicados em gel não-desnaturante 6% acrilamida:bisacrilamida (37.5:1.0) em tampão 0.25X Tris–borato/EDTA a 150 V por 1.5 hora a temperatura ambiente. O gel foi então secado a vácuo e exposto a filme XAR-5 (Kodak, Rochester, NY, USA) por 24-48 horas a -70ºC. Autoradiogramas foram escaneados e analisados através de densitometria.

3.5 Análise da expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real

Em experimentos visando a indução da secreção de citocinas, tratamos as células com 5ng/mL IL1β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) por 1 hora antes da extração de RNA. Em tratamento com Lapatinib (Tykerb®, Glaxo Smith Kline, Brentford, England, UK), tratamos as células com o composto pelos tempos e concentrações descritas nas legendas das figuras. O RNA total foi extraído utilizando Trizol (Life Technologies, New York, NY, USA), conforme instruções do fabricante. Após a extração do RNA, a concentração e qualidade do RNA foram analisadas utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Os RNAs foram tratados com DNAse para remover eventuais contaminações com DNA genômico. Foi preparado uma mistura contendo 2 μg de RNA, 1 μL de 10X Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1 μL 200U/mL DNAse

(Promega, Madison, WI, USA) e 1 μL de 40U/mL RNAseOut (Invitrogen, Waltham, MA, USA), com volume final de 10 μL completados com água DEPC. Essa mistura foi incubada a 37ºC por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 μL de Stop Solution (Promega, Madison, WI, USA) e incubada a reação por 10 minutos a 65ºC, com posterior armazenamento das amostras em -80ºC. A transcrição reversa foi realizada com 2 µg de RNA através do kit Superscript II (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme descrição do fabricante. O PCR quantitativo em tempo real foi realizado com utilização do equipamento 7300 Real-time PCR System e SYBR Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os níveis de expressão relativa foram calculados conforme descrito anteriormente (PFAFFL, 2001). A lista dos *primers* utilizados encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* das reações de PCR em tempo real.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
SIGIRR/IL-1R8	GTCTCAACGTGCTGCTCTGGTA	TCGTAGAGCTTCCCGTCGTTTA
ErbB2	CCCTCTGAGACTGATGGCTACG	GCCGAACATCTGGCTGGTT
IL-6	TGCAGATGAGTACAAAAGTCCTGT	GTGGTTATTGCATCTAGATTCTTTGC
IL-8	GCAGAGGGTTGTGGAGAAGTTT	TTGGATACCACAGAGAATGAATTTTT
TNFa	CTGGCCCAGGCAGTCAGAT	GGTTTGCTACAACATGGGCTACA
IFN-B1	GCAATTGAATGGGAGGCTTG	ATAGATGGTCAATGCGGCGT
CSF2	TGATGGCCAGCCACTACAAG	GGGTTGCACAGGAAGTTTCC
CSF3	CTCCAGGAGAAGCTGGCAGG	GGCCATTCCCAGTTCTTCCA
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

3.6 Preparação de meio-condicionado e quantificação de citocinas

Para a obtenção do meio-condicionado (CM), semeamos $4,5x10^5$ células em cada poço de placas de 6-well. No dia seguinte, tratamos as células com 5 ng/mL IL1β (L-1β recombinante humana, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) por 24 horas em meio RPMI suplementado com 1% de FBS. Após o tempo, coletamos o CM, centrifugamos a 12000 g por 10 minutos para remoção de debris celulares e armazenamos o meio em freezer -80ºC. Partindo do CM das células testadas, conforme descrito acima, diluímos as amostras 1:2 e seguimos o protocolo sugerido pelo fabricante do Kit CBA Flexset - IL-1β, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Brevemente, foi adicionada em tubo para citômetro a mistura de *beads* de captura de todas citocinas testadas, reagente de detecção PE e as amostras de CM diluídas ou os padrões fornecidos pelo fabricante. As amostras foram incubadas por 3h em temperatura ambiente protegidas da luz, e posteriormente, lavadas e centrifugadas a 200g por 5 minutos. Depois de removido os sobrenadantes, o precipitado contendo as beads foi ressuspendido com tampão de lavagem e as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA), conforme descrição do fabricante.

3.7 Ensaio de polarização de macrófagos *in vitro*

Para o ensaio foi utilizada a linhagem THP-1, diferenciada para macrófagos através do tratamento com 50 ng/mL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) por 48h. Para atingir um estado basal, o meio foi trocado após as 48h de tratamento com uso de meio sem PMA por mais 24 horas. Após a diferenciação, caracterizada pela expressão do marcador CD14 e morfologia típica, as células foram lavadas com

PBS 1X e cultivadas em DMEM sem soro com os respectivos tratamentos (30 ng/mL IL-4 e 25 ng/mL LPS) ou meios condicionados (preparados conforme descrito acima), diluídos 10x, por 24 horas. Logo após, as células foram coletadas das placas *multi-well* com uso de *cell scraper* e marcadas para os anticorpos anti-CD206 (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD86 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e anti-CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A análise foi realizada no FACScantoII (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.8 Ensaio de ativação de células NK

As células HB4a^{HER2+} e HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ foram semeadas em placas de 24 poços ($5x10^4$ células/poço) e deixadas aderirem por 24 horas em meio completo. Em seguida, o meio foi trocado e células NKL ($5x10^5$ células) foram adicionadas em meio completo. Células foram então co-cultivadas por 4 horas a 37ºC. Os sobrenadantes foram então coletados, centrifugados por 15 minutos a 12000g a 4ºC para remoção de debris celulares, e conservados a -80ºC para posterior análise da presença de IFN-γ por método de ELISA (R&D DuoSet ELISA Development System, Minneapolis, MN, USA), conforme especificações do kit.

3.9 Ensaios *in vivo* de crescimento tumoral

Camundongos C57BL/6 deficientes para IL-1R8 foram gerados como descrito previamente (GARLANDA et al., 2004). Esses camundongos foram cruzados com BALB/c MMTVneu (MULLER et al., 1988) para gerar C57BL/6-BALB/c IL-1R8$^{+/-}$ MMTVneu$^{+/-}$ como animais F1. Logo após, animais F2 foram gerados pelo

cruzamento de camundongos IL-1R8$^{+/-}$MMTVneu$^{+/-}$ machos e fêmeas para obtenção de animais selvagens para expressão de IL-1R8 (IL-1R8$^{+/+}$neu*)* e *knockouts* (IL-1R8$^{-/-}$neu). Fêmeas IL-1R8$^{+/+}$*neu* ou IL-1R8$^{-/-}$*neu* de F3 foram utilizados para todos os procedimentos experimentais. O genótipo de cada animal foi determinado através de PCR (Lista de primers, Tabela 3). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as leis italianas de cuidado animal e legislação ética, e foram aprovados pelas autoridades governamentais locais (*Ministero della Salute*). Todas as colônias foram mantidas em caixas ventiladas na estrutura de biotério livre de patógenos específicos do Istituto Clinico Humanitas em Milão, Itália. Animais F3 IL-1R8$^{+/+}$*neu* e IL-1R8$^{-/-}$*neu* foram divididos em dois grupos experimentais, compostos de animais sacrificados em um determinado tempo, 24 semanas de idade, e animais sacrificados assim que o seu tumor de maior tamanho chegasse a um volume de 500 mm^3. O volume tumoral foi determinado pela fórmula: V= 1⁄2 (D x d^2) (considerando D como maior diâmetro e d o menor diâmetro), somente de animais que desenvolveram tumores. Os *fat pads* mamários foram checados semanalmente para a presença de tumores, e, quando presentes, foram medidos utilizando um paquímetro.

Tabela 3. *Primers* das reações de genotipagem por PCR.

Nome do gene	Sequência (5'-3')
25/10N	ATCTTTCAGCCACTGCACTGA
PGK	CTGCTCTTTACTGAAGGCTC
NeuT Forward	GTAACACAGGCAGATGTAGGA
NeuT Reverse	ATCGGTGATGTCGGCGATAT
β-casein Forward	GATGTGCTCCAGGCTAAAGTT
β-casein Reverse	AGAAACGGAATGTTGTGGAGT

3.10 Experimentos de transplante de medula óssea e crescimento tumoral em animais quimeras

Camundongos IL-1R8$^{+/+}$*neu* ou IL-1R8$^{-/-}$*neu* de 3 semanas de idade foram irradiados letalmente com uma dose total de 900 cGy, para eliminação de células do compartimento hematopoiético presentes na medula óssea. Os animais foram então injetados no plexo retro-orbital com 5x10^{6} células nucleadas da medula óssea, previamente obtidos por lavagem de um fêmur recém dissecado de doadores IL-1R8+/+ ou IL-1R8-/-. Os camundongos recipientes receberam gentamicina (0.8 mg/mL na água de beber), iniciando 7 dias antes da irradiação e mantendo por mais 2 semanas. Camundongos foram então acompanhados até a 24ª semana de idade e a presença de tumores mamários foi verificada semanalmente.

3.11 Histopatologia e imunohistoquímica

Pelo menos 8 amostras de tecidos tumorais fixados, embebidos em parafina, foram analisados para cada condição. Secções consecutivas do meio do tecido foram utilizadas para exame histológico de cada animal. Os cortes para análise histopatológica foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e examinados cegamento por um patologista (M.N.). Secções de tecido embebido em parafina foram montados em lâminas Superfrost (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), desparafinados em xileno e reidratados em etanol. Peroxidase endógena foi bloqueada por 20 minutos em 90% de etanol contendo 2% de H2O2. Secções foram então pré-tratadas em forno microondas (2 ciclos de 3 minutos cada a 800 W, em 0.25 mM tampão EDTA). Sítios inespecíficos foram bloqueados com Rodent Block M (Biocare Medical, Concord, CA, USA) por 30 minutos, e tecidos foram incubados por

2 horas com anticorpos primários anti-CD45 (Rat anti-Mouse, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-IL-1R8 (Goat anti-mouse, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-CD3 (Rat anti-Human, AbD Serotec, Kidlington, England, UK), anti-F4/80 (Rat anti-Mouse, AbD Serotec, Kidlington, England, UK) e anti-Ki67 (Rabbit anti-Mouse, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), em PBS suplementado com albumina sérica bovina (1%) e NP40 (0.02%). Secções foram então lavadas com tampão de lavagem (PBS-/- + 0.05% Tween 20) e incubadas com sistema de detecção de dois passos Rat-on-mouse HRP-Polymer Kit (Biocare medical, Concord, CA, USA). Após lavagem, as amostras foram reveladas com DAB (3,30-diaminobenzidine) (Biocare medical, Concord, CA, USA) e contra-corados com Hematoxilina. A quantificação da positividade de marcação foi realizada utilizando um programa de análise de imagens (Olympus Dotslide, Olympus, Center Valley, PA, USA).

3.12 Quantificação de citocinas por *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)

Tumores coletados foram homogeneizados em 1 mL de PBS contendo inibidores de protease (Complete®-EDTA-free; Roche Diagnostics) e 1 mM PMSF, utilizando sistema rotor-estator. Os homegenizados foram então centrifugados a 14000 RPM por 30 minutos a 4ºC e os sobrenadantes armazenados a -80ºC para análise de citocinas. No soro, a presença de IL-6, IL-12, TNFα, VEGF e CCL2, e no homogenizado tumoral a presença de IL-1β, IL-10, IL-12, IFN-γ, VEGF, CSF2 e CCL2 foi medida pelo método de ELISA (R&D DuoSet ELISA Development System, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.13 Análise do infiltrado leucocitário tumoral por *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS)

A composição do infiltrado leucocitário tumoral foi determinada por citometria de fluxo, utilizando diferentes combinações dos seguintes anticorpos: CD45-BV605, CD11b-BV421; Ly6G-PE-CF594; Ly6C-FITC (Clone AL-21); F4/80-PECy7; CD11c-PE; CD3e-FITC; CD4-Alexa700; CD8-PE; CD19-APC-H7; CD49b(DX5)-APC e MHCII-PercpCy5.5 da BD Bioscience (San Jose, CA, USA), eBioscience (San Diego, CA, USA) ou BioLegend (San Diego, CA, USA). Viabilidade celular foi determinada por marcação com Aqua LIVE/Dead-405nm (Invitrogen, Waltham, MA, USA), considerando viáveis os eventos negativos. As amostras foram adquiridas e analisadas com uso de LSR Fortessa (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) e software BD FACSDiva (BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

3.14 Purificação de TAMs

Células $CD11b^+$ de tumores foram enriquecidas por *Magnetic activated cell sorting* (MACS) de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A pureza de células $CD11b^+$ foi de cerca de 90%, como determinado por FACS. Células $CD11b^+$ foram marcadas com LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para exclusão de células não-viáveis. Células $CD11b^+$ foram então pré-marcadas com FcBlock (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) e marcadas com CD11b-BV421; Ly6C-FITC; Ly6G-PE; MHCII- Percp-Cy5.5 e NK1.1-PE como descrito anteriormente (LAOUI et al., 2014) e purificadas em equipamento FACSAria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Anticorpos anti-NK1.1 e anti-Ly6G foram utilizados para excluir células NK e

granulócitos. A pureza das populações $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{-}NK1.1^{-}MHCII^{low}$ e $CD11b^{+}$ $Ly6G^{-}$ $Ly6C^{-}$ $NK1.1^{-}$ $MHCII^{high}$ foi > 98%. Células purificadas foram processadas para extração de mRNA.

3.15 Análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real em TAMs purificados

RNA total foi extraído utilizando reagente Trizol (Invitrogen, Waltham, MA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. RNA foi isolado utilizando RNeasy Min-elute RNA Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). O cDNA foi sintetizado utilizando 500ng do RNA total por transcrição reversa, pelo High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e o PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) em um equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Dados foram analisados pelo método D2CT e normalizados baseando-se na expressão de 18S de cada amostra, conforme descrito anteriormente (BONAVITA et al., 2015). Análise de todas as amostras foi realizada em triplicata. A sequência de *primers* utilizados segue: Chil3 (Ym1): forward 5´-TCT GGG TAC AAG ATC CCT GAA-3´, reverse 5´-TTT CTC CAG TGT AGC CAT CCT T-3´; IFNγ: forward 5´-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3´, reverse 5´-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3´; Il10: forward 5´-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3´, reverse 5´-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3´; Stab1: forward 5´-CCC TCC TTC TGC TCT GTG TC-3´, reverse 5´-CAA ACT TGG TGT GGA TGT CG-3´; Mcr1 (CD206): forward 5´-TGG CAT GTC CTG GAA TGA T-3´, reverse 5´-CAG GTG TGG GCT CAG GTA GT-3; TNFα: forward 5´-

AAGAGGCACTCCCCCAAAAG-3´, reverse 5´-CTTGGTGGTTTGCTACGACG-3´; 18s/18S: forward 5´-ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT-3´, reverse 5´- CCT TGG ATG TGG TAG CCG TTT-3´.

3.16 Análises estatísticas

Todos os valores mostrados foram expressos como média ± erro médio padrão (SEM). Testes T de Student pareados e não pareados foram utilizados como especificado na legenda das figuras. P-valor<0.05 foi considerado estatisticamente significativo. Para avaliar a correlação entre a expressão de IL-1R8 e ErbB2 aplicamos o teste de correlação de Pearson nos valores normalizados de expressão obtidos para cada amostra, utilizando como critério RPKM≤1100 para ErbB2. As análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. SIGIRR/IL-1R8 é um gene *up*-regulado em tumores de mama.

IL-1R8 foi identificado pelo nosso grupo como um transcrito diferencialmente expresso em um modelo de transformação celular mediado pela superexpressão do oncogene HER2/neu, quando o transcriptoma de ambas as linhagens foi analisado pelo método de *Massive parallel signature sequencing* (MPSS) (36 versus 4 tags per million, p-valor<0.001). A expressão diferencial de IL-1R8 foi confirmada por PCR quantitativo em tempo real e Western Blot, sendo verificado um aumento na expressão de 4-vezes (p-valor<0.01) em nível de mRNA e 2-vezes em nível de proteína na variante com superexpressão de HER2 (Figura 5A e B, respectivamente).

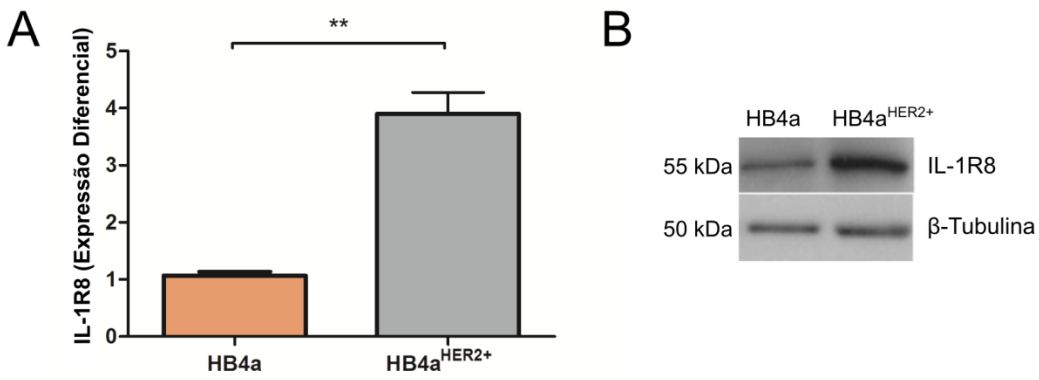


Figura 5. IL-1R8 é um gene "up-regulado" no modelo de transformação celular mediado pela superexpressão de ErbB2/HER2. (A) Expressão do mRNA de IL-1R8 determinado por qRT-PCR e (B) Expressão proteica de IL-1R8 determinada por Western-blot. Em (A) resultado representado como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, **p-valor<0.01.

Para validar a expressão diferencial de IL-1R8 em tumores mamários humanos, nós realizamos análises por bioinformática de dados públicos de RNA-seq

presentes no banco de dados do TCGA. Conforme vemos abaixo (Figura 6A), há um aumento significativo na expressão de IL-1R8 em amostras tumorais de mama (n=476) quando comparado com amostras de tecido normal de mama (n=100) (mediana 82.06 vs. 37.06 RPKM, respectivamente; Teste T de student com p-valor=$2.2x10^{-16}$). Interessantemente, verificamos também que IL-1R8 é um gene *up*-regulado em diferentes subtipos moleculares de câncer de mama, em especial nos subtipos HER2+ (p-valor=$7.2x10^{-8}$), luminais A (p-valor<$2.2x10^{-16}$) e B (p-valor<$2.2x10^{-16}$) (Figura 6B).

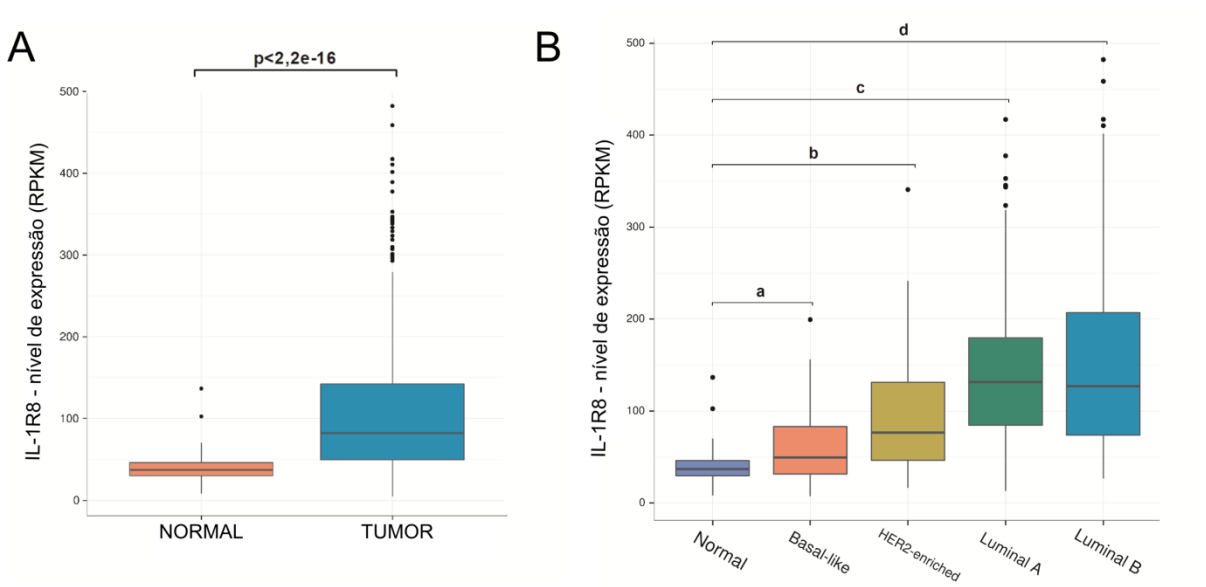


Figura 6. Expressão de IL-1R8 é "up-regulada" em tumores mamários em dados de RNAseq do TCGA. (A) Análise por bioinformática comparativa da expressão de IL-1R8 entre amostras normais (n=100) e tumorais (n=476) de tecido mamário em dados públicos do TCGA, p-valor<2.2e-16; **(B)** Análise por bioinformática comparativa da expressão de IL-1R8 entre amostras normais e diferentes subtipos moleculares de câncer de mama. a) p-valor=$1.133e^{-06}$, b) p-valor=$7.203e^{-08}$, c) p-valor<$2.2e^{-16}$, d) p-valor<$2.2e^{-16}$; **(A-B)** Teste T de Student não pareado. Dados mostrados são a mediana do grupo em RPKM ± variação interquartil.

Também notamos uma forte correlação entre a expressão gênica de IL-1R8 e ErbB2 tanto no tecido mamário normal como no tumoral (correlação de Pearson: 0.48, p-valor<$4.4x10^{-7}$ e correlação de Pearson: 0.42, p-valor<$2.2x10^{-16}$, respectivamente) (Figura 7).

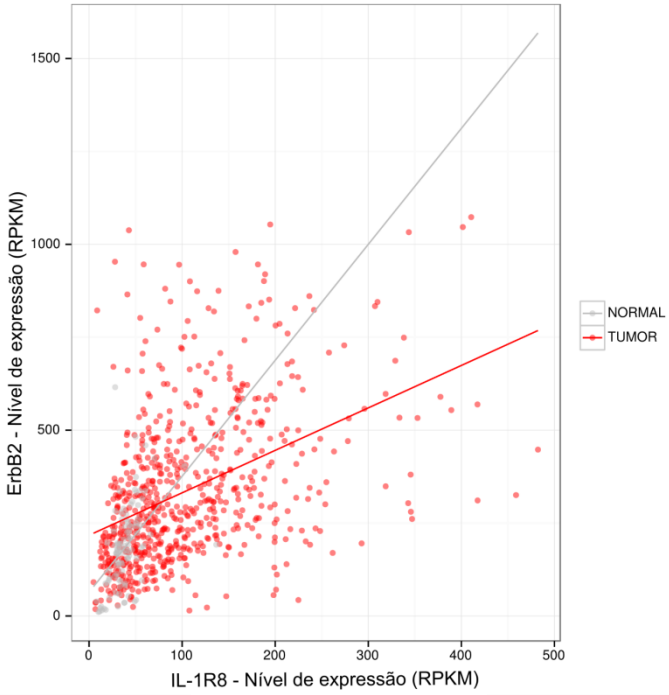


Figura 7. A expressão de IL-1R8 correlaciona-se com ErbB2 em amostras normais e tumorais mamárias do TCGA. Análise da correlação entre a expressão de IL-1R8 e ErbB2 em amostras normais (correlação de Pearson: 0.48, p-valor<$4.4x10^{-7}$) e tumorais de mama (correlação de Pearson: 0.42, p-valor<$2.2x10^{-16}$).

Posteriormente, decidimos avaliar se a expressão aumentada de IL-1R8 constitui um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama. Utilizamos uma ferramenta que acessa dados públicos de expressão gênica por *microarray* e informações clínicas depositadas na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO) (GYÖRFFY et al., 2010), e analisamos tumores de mama de diferentes graus

histológicos de forma a uma melhor compreensão da relevância da expressão de IL-1R8 em diferentes fases da evolução do crescimento tumoral.

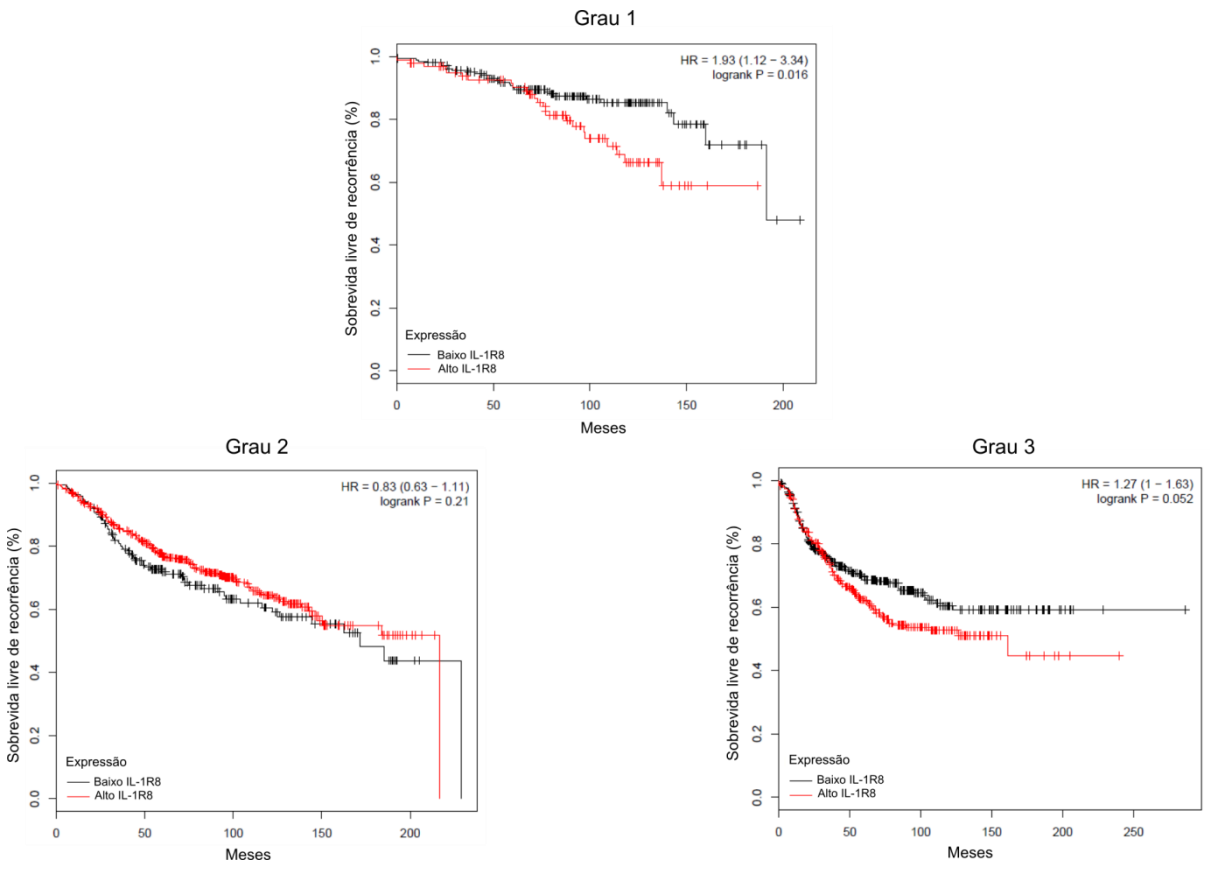


Figura 8. A expressão de IL-1R8 prediz sobrevida livre de recorrência em pacientes com câncer de mama de baixo grau. Curvas de sobrevida livre de recorrência em pacientes com diagnóstico de câncer de mama em diferentes graus histológicos conforme caracterização histopatológica. Dados foram analisados de acordo com GYÖRFFY et al., 2010.

Interessantemente, nós observamos que alta expressão de IL-1R8 está associada a um pior prognóstico, com a maior taxa de recorrência local da doença em tumores de mama de baixo grau histológico (p-valor=0.016) (Figura 8). Notavelmente, um estudo recente também apontou alta expressão de SIGIRR como fator preditivo de recorrência em tumores de próstata de baixo grau histológico (BAUMAN et al., 2015).

Em conjunto, esses dados indicam que IL-1R8 é um gene *up*-regulado na transformação de células epiteliais mamárias e sua alta expressão frequentemente encontrada em diferentes subtipos moleculares de câncer de mama. Observamos também que IL-1R8 é correlacionado com a expressão do oncogene HER2 e sua expressão funciona como fator prognóstico em tumores de mama de baixo grau.

4.2. O aumento na expressão de IL-1R8 não depende da atividade tirosina-quinase de HER2

Para melhor investigarmos a correlação observada entre a expressão de IL-1R8 e ErbB2, tratamos a linhagem HB4a – c5.2 com Lapatinib, um inibidor da atividade tirosina-quinase dos receptores ErbB1 e ErbB2, e verificamos o impacto do tratamento com o inibidor nos níveis de expressão gênica de IL-1R8. Realizamos tratamento com Lapatinib em diferentes tempos, desde tempos mais curtos (1h, 3h, 6h, 10h) até tempos mais longos (24h, 48h, 72h), mas não observamos diferença significativa na expressão de IL-1R8 (Figuras 9A e B). Também realizamos tratamento com diferentes concentrações de Lapatinib, mas não observamos diferença significativa nos níveis de expressão de IL-1R8 (Figura 9C). Utilizamos o gene E-caderina, o qual é conhecidamente modulado negativamente por vias de sinalização desencadeadas por ErbB2 (JENNDAHL et al, 2005), como controle do tratamento com Lapatinib. Conforme esperado, vimos que o tratamento com Lapatinib levou a um aumento na expressão de E-caderina, com pico em 24h de tratamento (Figura 9D).

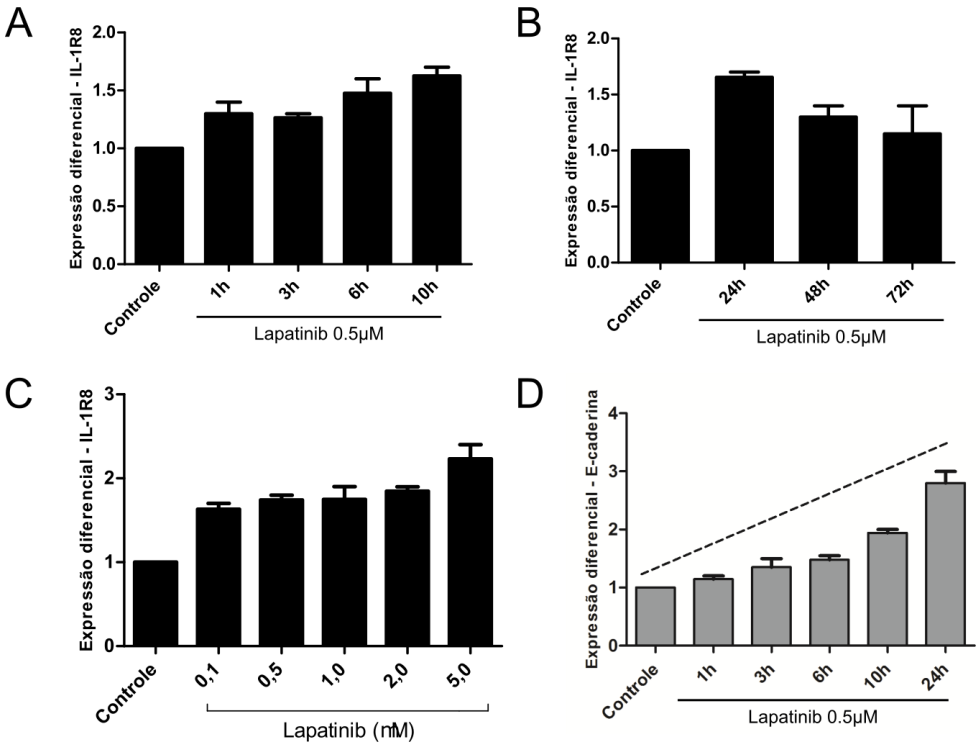


Figura 9. A expressão de IL-1R8 não é reduzida pelo tratamento com Lapatinib. A linhagem HB4a – c5.2 foi tratada em diferentes tempos (A) e (B) com Lapatinib a 0,5 μM e em diferentes concentrações (C), mas sem alteração na expressão de IL-1R8 visto por qPCR em tempo real. A modulação na expressão de E-caderina (D) foi utilizada como um controle (tracejado demostrando a tendência ao seu aumento). Resultados representados como média ± SEM.

Também como controle do tratamento avaliamos o estado de fosforilação das proteínas ErbB2, AKT e ERK1/2, sendo essas duas últimas parte de vias de sinalização importantes reguladas por ErbB2 (Figura 10). Observamos que o tratamento com Lapatinib leva a uma forte redução na fosforilação de ErbB2, AKT e ERK1/2.

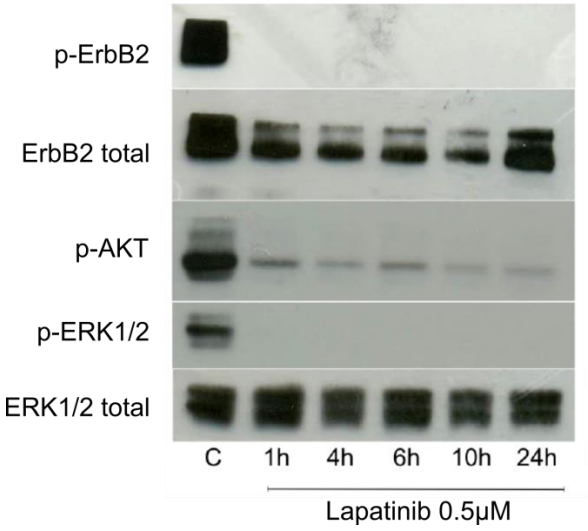


Figura 10. Controle da eficiência do tratamento com Lapatinib. Níveis de expressão das proteínas p-ErbB2, ErbB2 total, p-AKT, p-ERK1/2 e ERK1/2 total na linhagem HB4a – c5.2 após tratamento com Lapatinib a 0,5 μM em diferentes tempos.

Testamos também outras linhagens tumorais de mama que superexpressam ErbB2, tais como BT-474 e SKBR-3, quanto a expressão de IL-1R8 após tratamento com Lapatinib em diferentes tempos, e também não observamos nenhuma diferença significativa (Figura 11A). Como controle da eficiência do tratamento nessas linhagens, analisamos a fosforilação de ErbB2 e AKT após o tratamento com o inibidor e, como esperado, observamos uma forte redução nos níveis de fosforilação de ambas as proteínas (Figura 11B). Interessantemente, estudos prévios apontam um importante papel mediado por receptores da família EGFR independente de sua atividade tirosina-quinase (WEIHUA et al., 2008).

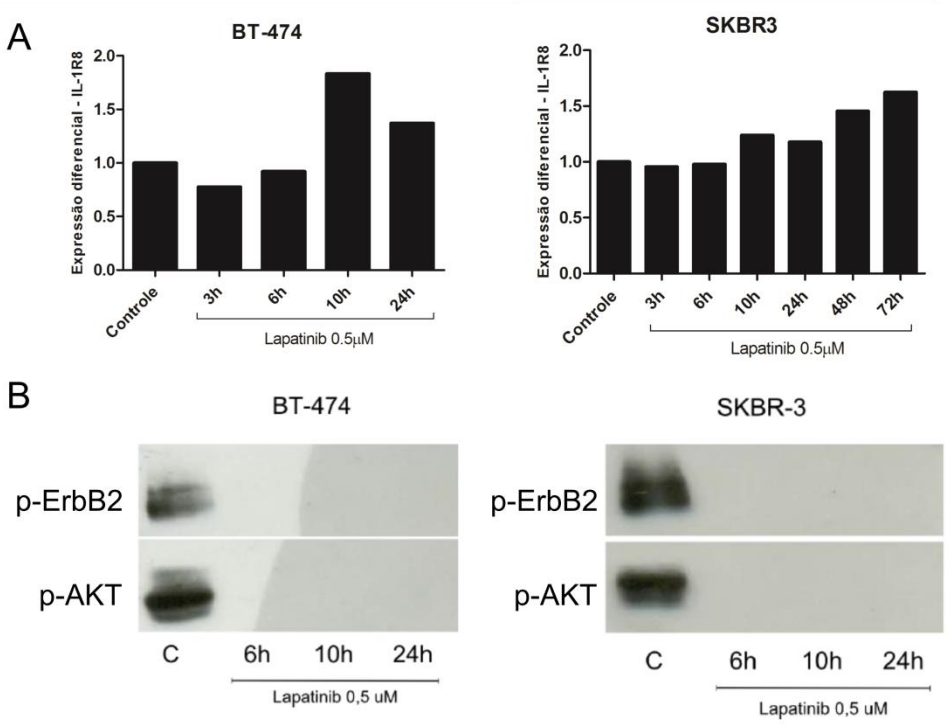


Figura 11. Tratamento com Lapatinib não reduz expressão de IL-1R8 em linhagens tumorais de mama. Testamos tratamento com Lapatinib 0.5μM em diferentes pontos de tempo nas linhagens BT-474 e SKBR-3. (A) Níveis de mRNA de IL-1R8 por qPCR em tempo real e (B) western-blot para níveis de proteína de p-ErbB2 e p-AKT como controle da eficiência do tratamento com Lapatinib.

O promotor proximal de IL-1R8 apresenta um sítio de ligação para o fator de transcrição SP1, o qual induz sua transcrição em níveis basais (KADOTA et al., 2010). Notavelmente, um aumento na expressão de SP1 dependente de HER2 já foi descrito em trabalhos anteriores (ALROY et al., 1999; HARARI e YARDEN, 2000). Verificamos que em nosso modelo celular de superexpressão de ErbB2 detectamos também um aumento significativo na expressão de SP1, o qual parece ser independente da atividade tirosina-quinase do receptor (Figura 12).

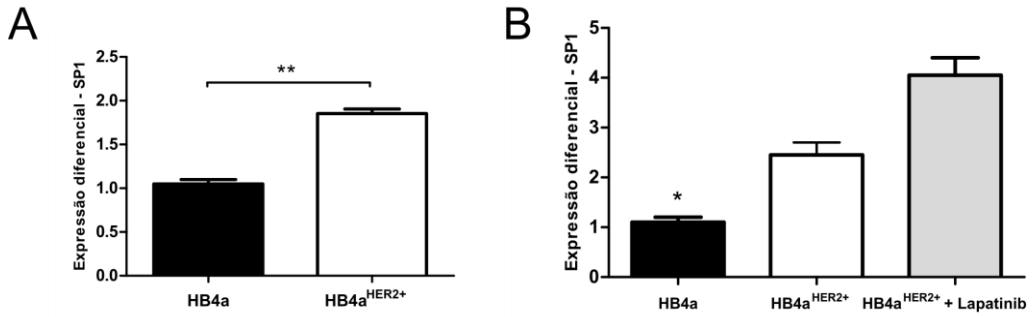


Figura 12. Aumento de expressão do fator de transcrição SP1 no modelo de transformação celular mediado por HER2 é independente da sua atividade tirosina-quinase. (A) Expressão diferencial de SP1 por qPCR em tempo real na linhagem HB4a e sua variante com superexpressão de HER2 e (B) Tratamento com Lapatinib 0.5 μM por 6h não reverte a expressão de SP1 na variante HB4a^{HER2+}. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de student com significância para p-valor<0.05* e <0.01**.

Em conjunto, esses dados revelam que a *up*-regulação de IL-1R8 observada na linhagem HB4a^{HER2+} é independente da atividade tirosina-quinase de HER2 e é possivelmente mediada pelo fator de transcrição SP1.

4.3. A expressão de IL-1R8 inibe a ativação de NF-κB e expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Em dados não publicados de nosso grupo, observamos que as células transformadas pela superexpressão de ErbB2 expressam menores níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNFα, CSF2 e IFN-β1, em relação a linhagem parental quando estimuladas com IL-1β. Para melhor explorar se IL-1R8 apresenta algum papel nesse efeito observado, geramos clones silenciados para IL-1R8 por shRNA a partir da variante HB4a – c5.2 (Figura 13).

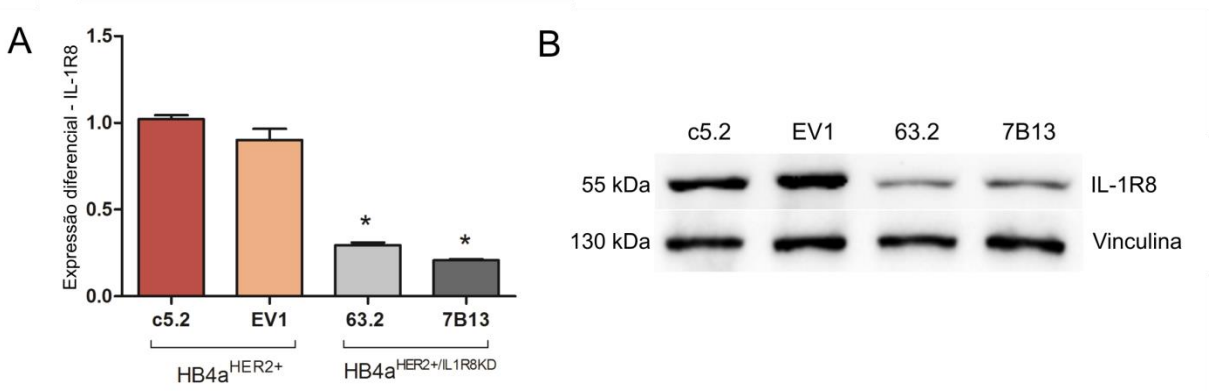


Figura 13. Silenciamento de IL-1R8 no modelo de transformação celular mediado pela superexpressão de ErbB2/HER2. (A) Expressão de mRNA por qPCR em tempo-real nos diferentes clones e (B) expressão proteica por western-blot. Os clones silenciados para IL-1R8, 63.2 e 7B13, são agrupados como $HB4a^{HER2+/IL1R8KD}$ e os clones controle, c5.2 e EV1, são agrupados como $HB4a^{HER2+}$. Em (A) resultado representado como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05.

Primeiramente, vimos que as células silenciadas para IL-1R8, as quais serão denominadas daqui em diante $HB4a^{HER2+/IL1R8KD}$, apresentam maior ativação do fator de transcrição NF-κB quando estimuladas com IL-1β em relação às células controle $HB4a^{HER2+}$.

O NF-κB é uma peça chave na indução de fatores associados a inflamação e imunidade, e com forte implicação na tumorigênese (BEN-NERIAH e KARIN, 2011). Em dados não publicados, havíamos visto que a degradação de IκBα, fator inibitório de NF-κB, é maior em células $HB4a^{HER2+/IL1R8KD}$ quando estimuladas com IL-1β, sugerindo uma maior ativação de NF-κB em células silenciadas para IL-1R8.

Aqui observamos, através de um experimento de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA), que os níveis nucleares de NF-κB são de fato significativamente maiores em células $HB4a^{HER2+/IL1R8KD}$ estimuladas com IL-1β (Figura 14).

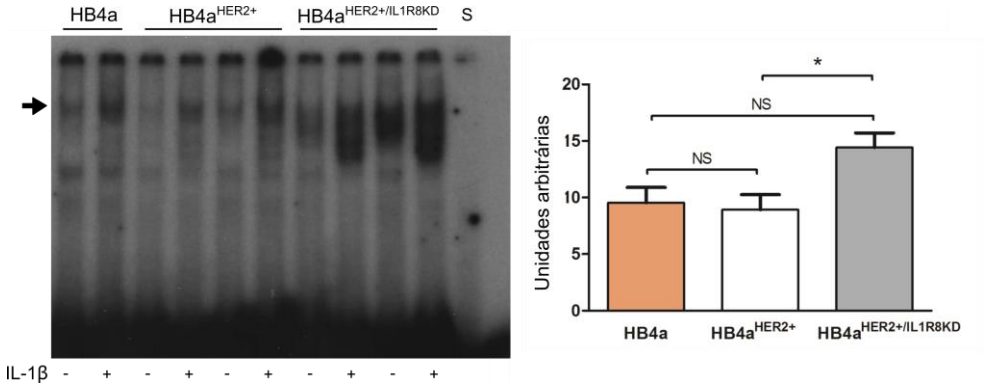


Figura 14. Silenciamento de IL-1R8 aumenta atividade do fator de transcrição NF-κB por ensaio de EMSA. Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) para NF-κB utilizando extrato nuclear de células HB4a, HB4a^{HER2+} e HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ estimuladas ou não com IL-1β 5 ng/mL por 24 horas. À esquerda: seta indica a posição do complexo NF-κB e S indica a sonda para NF-κB livre. Na figura à direita, uma análise densitométrica da intensidade das bandas. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student com significância para p-valor<0.05*.

Além disso, observamos que a diminuição na expressão de diferentes citocinas pró-inflamatórias na variante com superexpressão de HER2, tais como IL-6, IL-8, TNFα, CSF2, CSF3 e IFN-β1, em relação à linhagem HB4a parental é revertida quando silenciamos IL-1R8 (Figura 15).

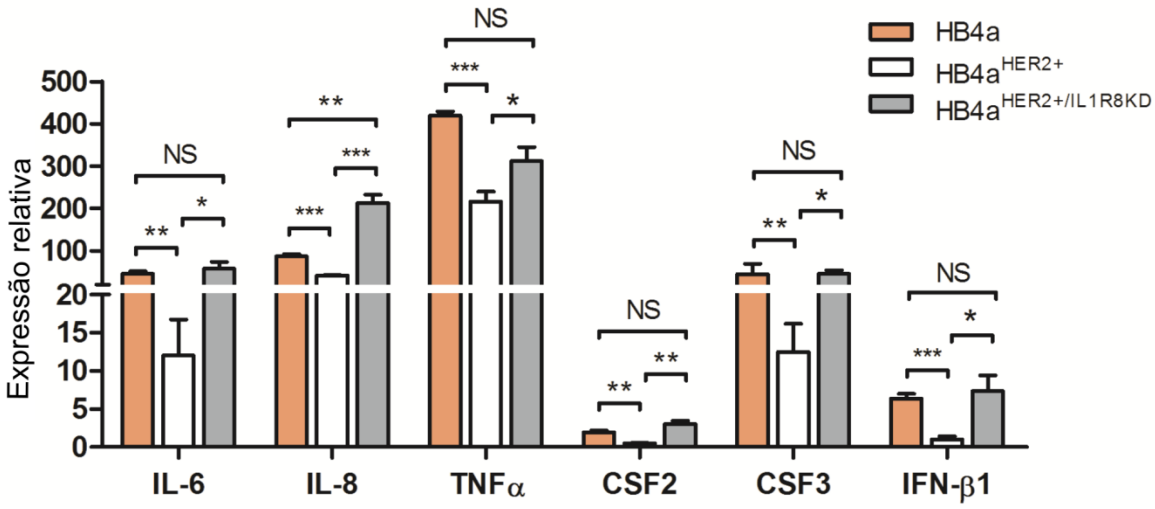


Figura 15. Silenciamento de IL-1R8 promove maior expressão de citocinas pró-inflamatórias. Expressão gênica de células tratadas com IL-1β 5 ng/mL por 1h, através de qPCR em tempo real. Expressão relativa a células não tratadas. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado; *p-valor<0.05, **p-valor,0.01, ***p-valor<0.001, NS: não significativo.

Também observamos em termos de expressão proteica, que células HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ estimuladas com IL-1β secretam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, CSF2 e CSF3, em relação às células HB4a^{HER2+} (Figura 16). Em conjunto, esses resultados indicam que a expressão de IL-1R8 regula negativamente a ativação da via de NF-κB e a expressão de diferentes citocinas pro-inflamatórias, em um modelo de transformação celular mediado por HER2.

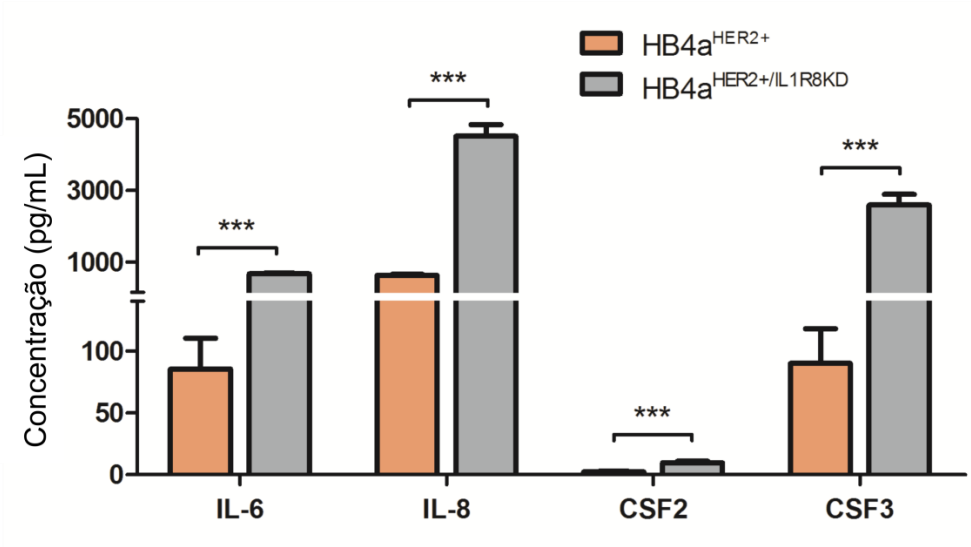


Figura 16. Silenciamento de IL-1R8 promove maior secreção de citocinas pró-inflamatórias. Níveis protéicos de citocinas no meio condicionado obtido de células tratadas com IL-1β 5 ng/mL por 24h, através de kit Flexset CBA (Cytometric Bead Array). Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, ***p-valor<0.001.

4.4. Expressão de IL-1R8 em células de mama transformadas pela superexpressão de HER2 modula a polarização de macrófagos e ativação de células NK *in vitro.*

Nós então decidimos avaliar se a expressão de IL-1R8 em nosso modelo de transformação celular, por regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, poderia interferir com a atividade de algumas células imunes em um sistema *in vitro*. Considerando a relevância da polarização da atividade de macrófagos no contexto de crescimento tumoral, nós decidimos investigar se a expressão de IL-1R8 em nosso modelo de transformação celular poderia potencialmente condicionar a polarização de macrófagos para um fenótipo M2. Tratamos monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos (STOSSI et al., 2012) com meio condicionado (CM) preparados a partir das células HB4a^{HER2+} e HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ estimuladas com IL-1β. Interessantemente, nós observamos que o tratamento com CMs derivados de células HB4a^{HER2+} induziu maior expressão do receptor de manose CD206, clássico marcador M2-*like*, e menor expressão do marcador de macrófagos M1-*like* CD86, proteína co-estimulatória de Linfócitos T, em relação ao tratamento com CM das células HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ (Intensidade média de fluorescência: 2551±43 vs. 1135±11, p-valor=0.034; 936.7±38 vs. 3157±472, p-valor=0.009) (Figura 17).

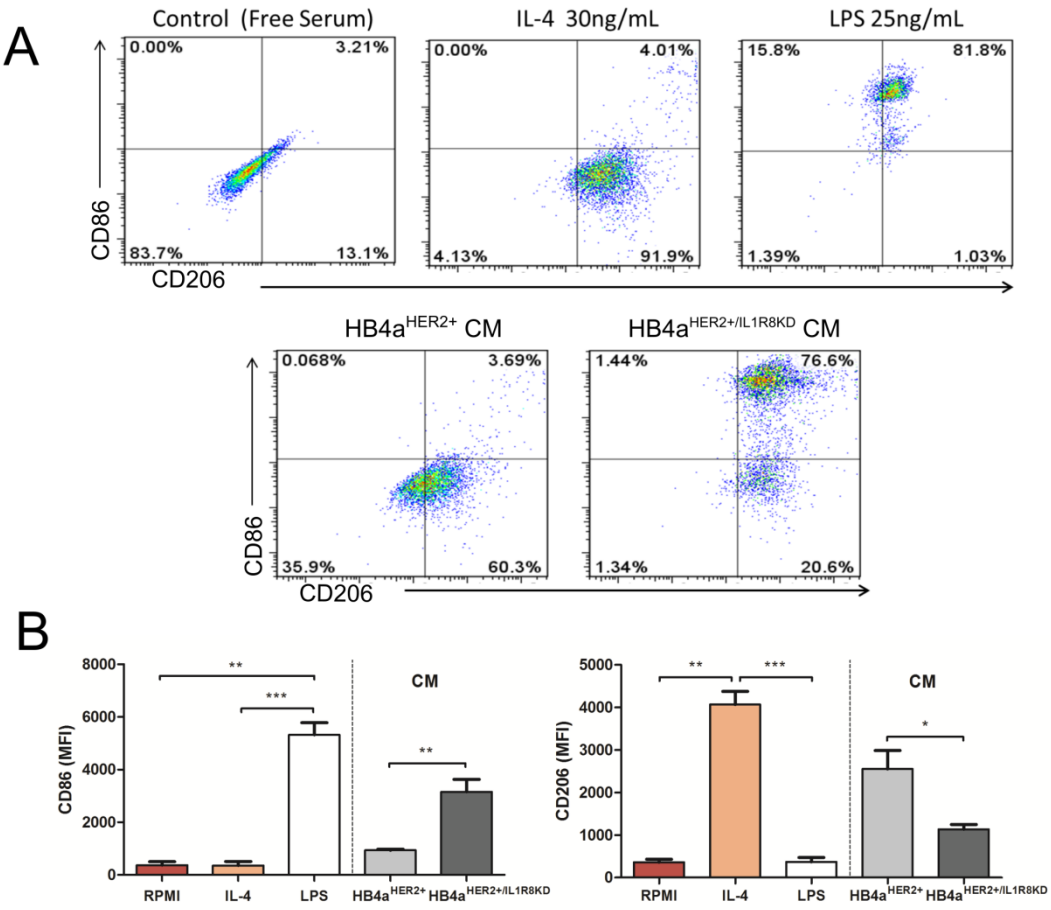


Figura 17. Macrófagos THP-1 são polarizados a fenótipo M1-*like in vitro* sob estímulo com meio condicionado de células transformadas de mama silenciadas para IL-1R8. (A) FACS *plots* representativos demonstrando populações expressando o marcador M1-*like* CD86 e marcador M2-*like* CD206 em macrófagos THP-1 sob tratamento por 24h com IL-4 30 ng/mL (controle M2), LPS 25 ng/mL (controle M1) ou CMs obtidos das células HB4a^{HER2+} e HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ estimuladas com IL-1β 5 ng/mL por 24h. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores CD86 e CD206. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado; *p-valor<0.05, **p-valor,0.01, ***p-valor<0.001.

Nós também investigamos se existe influência da expressão de IL-1R8 em células transformadas de mama na ativação de células NKs. Células NKs expressam constitutivamente uma maquinaria lítica capaz de matar células tumorais e representam papel importante no controle do crescimento tumoral e difusão metastática *in vivo* (ZAMAI et al., 2007). Realizamos um experimento de co-cultura das células NKL na presença de células HB4a^{HER2+} ou HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$, e sua ativação foi medida pela produção de IFN-γ, sinal crítico da resposta antitumoral mediada por células NK (GIRART et al., 2007). Menores níveis de IFN-γ foram detectados quando células NKL foram co-cultivadas com células HB4a^{HER2+} (31.8 ± 7.7), quando comparado com células HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ (65.9 ± 10.4, p-valor=0.03), indicando um importante papel da expressão tumoral de IL-1R8 na ativação de células NKs e modulação na sua secreção de IFN-γ (Figura 20). Em conjunto, esses resultados indicam que a expressão de IL-1R8 em células transformadas de mama é capaz de regular a polarização e ativação de células imunes *in vitro*.

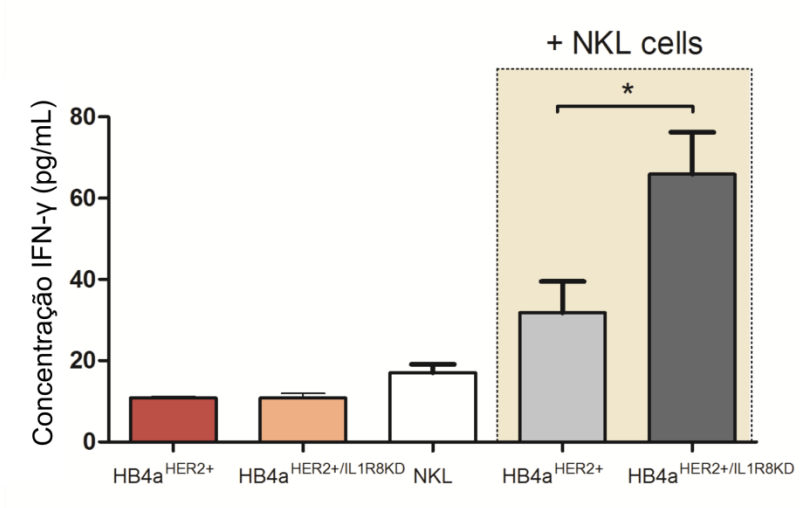


Figura 18. Atividade de células NK é aumentada em co-cultura com modelo de transformação celular silenciado para IL-1R8. Níveis de IFN-γ nos sobrenadantes de células NKL, HB4a^{HER2+} e HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$, cultivadas separadamente ou em co-cultura (fundo bege), determinado por método de ELISA. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado; *p-valor<0.05.

4.5. *Knockout* de IL-1R8 em um modelo transgênico MMTV-neu retarda o aparecimento e reduz a incidência, o volume tumoral e a disseminação metastática.

Para melhor investigarmos o papel de IL-1R8 na biologia de tumores mamários, nós realizamos o cruzamento de camundongos transgênicos que superexpressam o oncogene ErbB2/HER2 sob o controle transcricional do promotor viral de tumor mamário murino (MMTV-neu) com camundongos IL-1R8 knockout (KO). Esse modelo murino transgênico de adenocarcinoma mamário é particularmente pertinente por mimetizar diversas características agressivas e metastáticas de tumores de mama HER2+ (CAVALLO et al., 2006). Nós primeiramente caracterizamos por imunohistoquímica a expressão de IL-1R8 em tumores coletados desse modelo (Figura 19). Vimos também que IL-1R8 é expresso por células tumorais, pela sua co-expressão com o oncogene HER2, e não-tumorais (Figura 20).

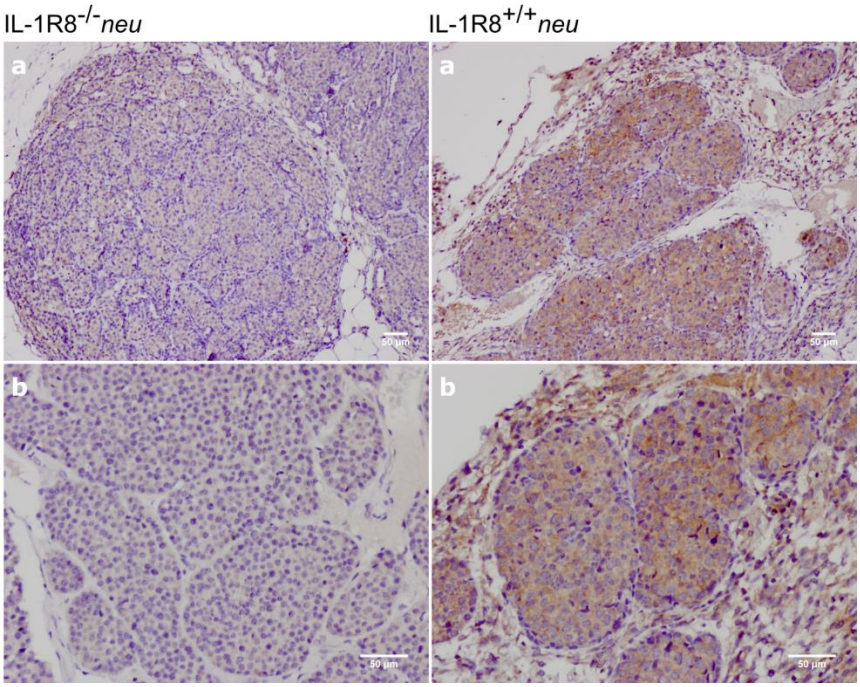


Figura 19. Expressão de IL-1R8 em tumores mamários do modelo MMTV-neu. Marcação de IL-1R8 por imunohistoquímica de amostras fixadas parafinizadas de tumores mamários de animais IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$neu. (a) Magnificação 10x, (b) 20x. Escala: 50 µM.

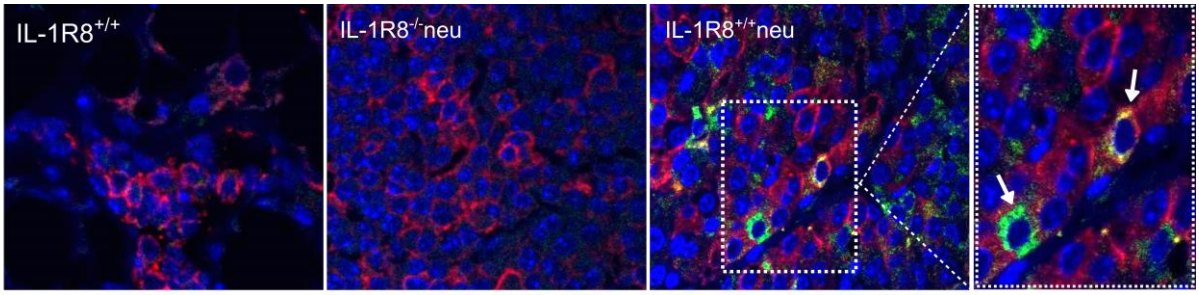


Figura 20. Co- expressão de IL-1R8 e HER2 em tumores mamários do modelo MMTV-neu. Marcação de IL-1R8 (verde) e HER2 (vermelho) por imunofluorescência em *fat pads* mamários coletados de animais IL-1R8+/+ selvagens, IL-1R8$^{-/-}$neu e IL-1R8$^{+/+}$neu. Imagem em detalhe indica áreas de co-expressão. Flecha à esquerda, expressão de IL-1R8 sem co-expressão e flecha à direita, IL-1R8 co-expresso com HER2. Magnificação: 60x.

Diferenças significativas na incidência e cinética de crescimento tumoral foram observadas entre os dois grupos de animais. Após 24 semanas de idade, mais de 95% dos animais selvagens para expressão de IL-1R8 (IL-1R8$^{+/+}$*neu)* (n=27) desenvolveram tumores mamários, enquanto quase 40% dos animais IL-1R8-KO (IL-1R8$^{-/-}$*neu*) (n=37) estavam livres de tumores (p-valor=0.0003) (Figura 21). Animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* desenvolveram tumores mamários mais precocemente (mediana de 20.5 semanas), comparado com 23 semanas no grupo IL-1R8$^{-/-}$*neu*.

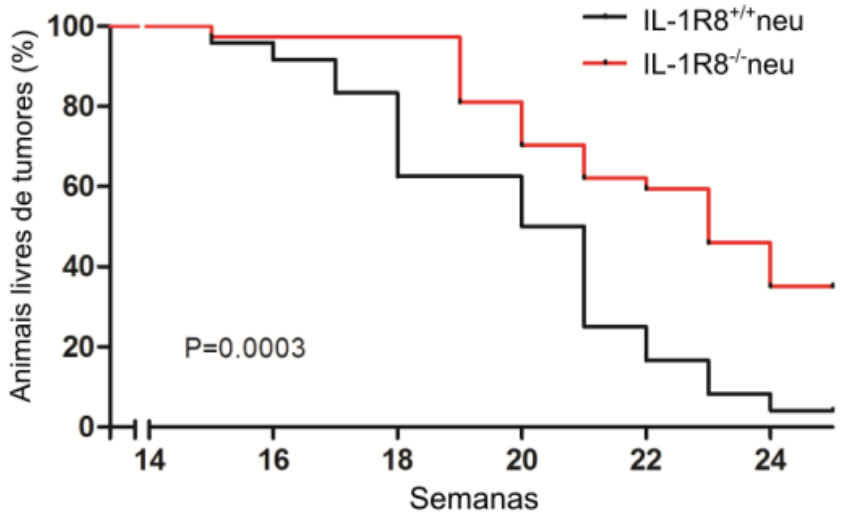


Figura 21. Deficiência de IL-1R8 retarda a incidência de tumores mamários. Análise por curva de Kaplan-Meier de animais livres de tumores nos grupos IL-1R8$^{+/+}$neu (n=27) e IL-1R8$^{-/-}$neu (n=37). Teste log-rank, p-valor=0.0003.

Além disso, o número médio de tumores mamários desenvolvidos por animal foi significativamente maior no grupo IL-1R8$^{+/+}$*neu*, quando comparados com animais IL-1R8$^{-/-}$*neu* ao longo do tempo. Animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* apresentaram cerca de 2 vezes mais tumores em comparação com animais IL-1R8$^{-/-}$*neu* na 24ª semana de idade (4 vs. 2 tumores/camundongo, p-valor=0.02) (Figura 22).

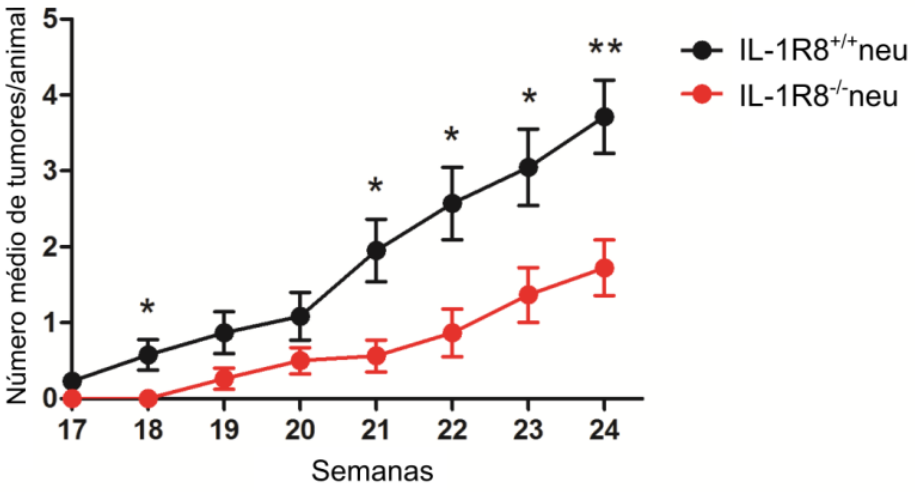


Figura 22. Deficiência de IL-1R8 reduz o número médio de tumores mamários por animal. Comparação entre grupos IL-1R8$^{+/+}$neu (n=27) e IL-1R8$^{-/-}$neu (n=37). Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05 e **p-valor<0.01.

Nós também observamos diferença significativa em termos de volume tumoral. Às 24 semanas de idade, o volume tumoral total de animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* era 3 vezes maior que de animais IL-1R8$^{-/-}$*neu* (p-valor=0.02) (Figura 23).

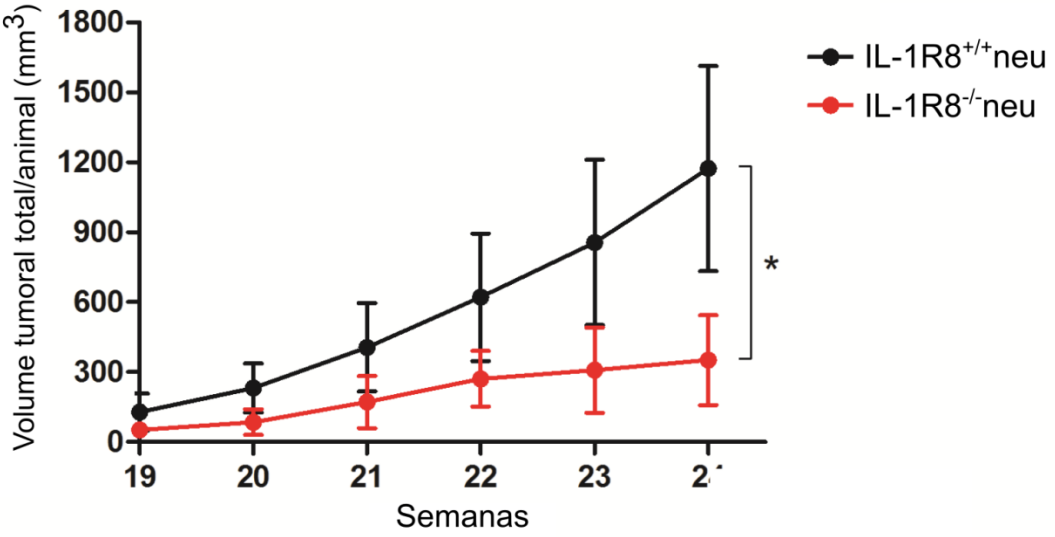


Figura 23. Deficiência de IL-1R8 reduz volume tumoral mamário total por animal. Comparação entre grupos IL-1R8$^{+/+}$neu (n=15) e IL-1R8$^{-/-}$neu (n=18). Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student pareado, *p-valor<0.024.

Finalmente, verificamos que animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* com cerca de 30 semanas de idade apresentavam maior número de lesões metastáticas pulmonares (p-valor=0.02) (Figura 24).

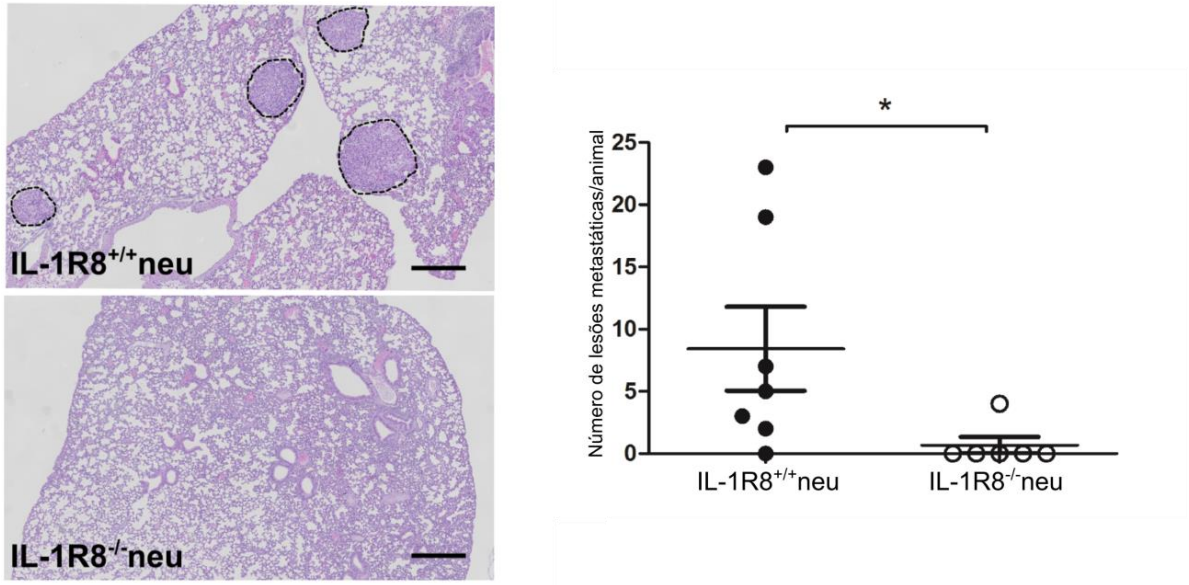


Figura 24. Deficiência de IL-1R8 reduz o número de metástases pulmonares. Número de lesões metastáticas pulmonares por animal na trigésima semana de idade. À esquerda, linha pontilhada revela regiões de lesão metastática. Escala: 50 µM. Resultados representados como média ± EM. Teste T de Student não pareado, *p-valor=0.024.

De forma a avaliar a importância relativa de células não-hematopoiéticas no fenótipo protegido que observamos em animais IL-1R8$^{-/-}$*neu,* nós geramos através de transplante de medula óssea camundongos quimeras. Animais IL-1R8$^{-/-}$*neu* foram irradiados e recompostos com medula óssea IL-1R8+/+ ou IL-1R8-/-. Notavelmente, comparação da cinética tumoral entre diferentes grupos revelou que o fenótipo protegido de animais IL-1R8$^{-/-}$*neu* não foi revertido quando sua medula óssea é IL-1R8+/+ (Figura 25).

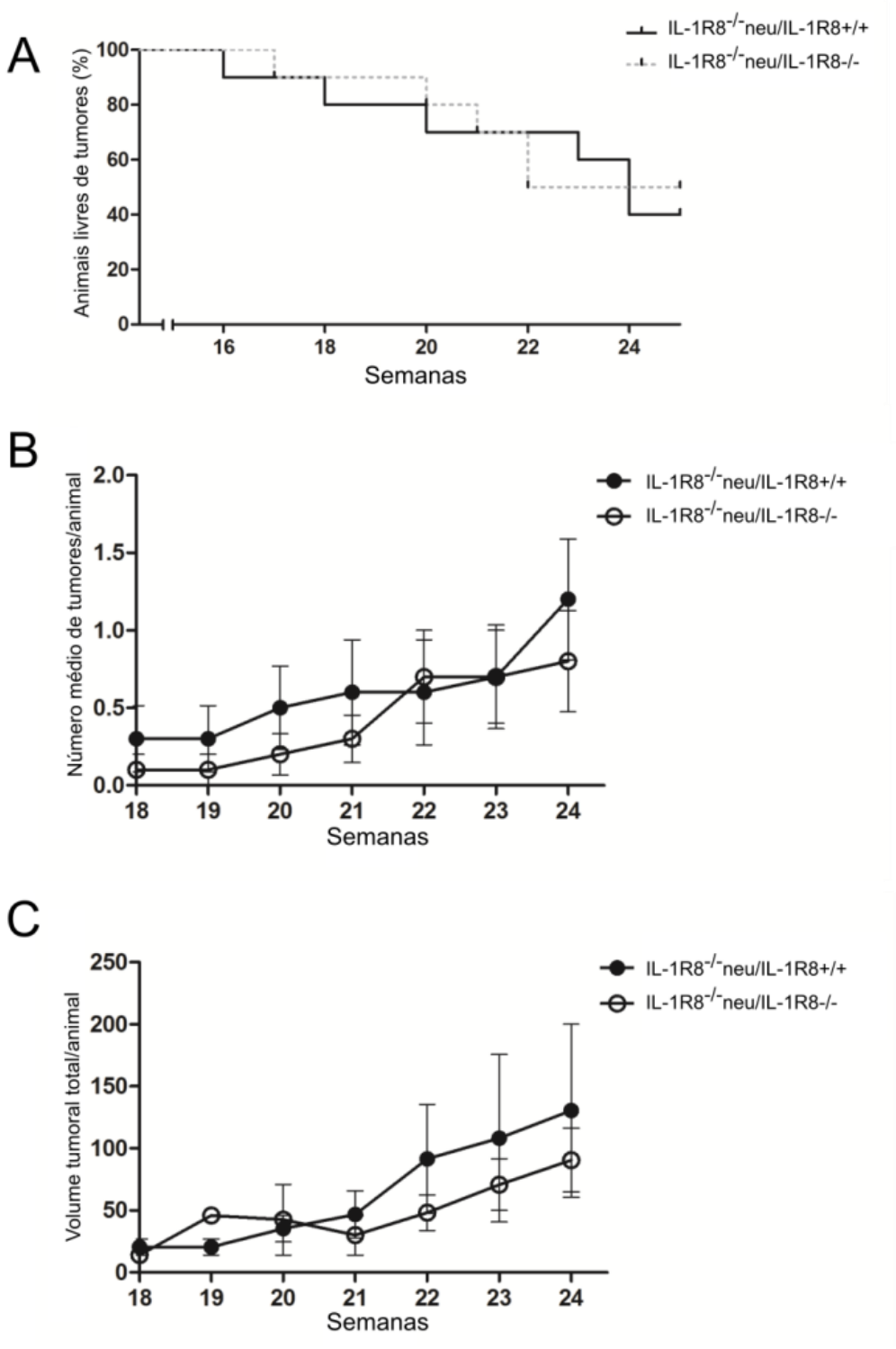


Figura 25. Cinética de crescimento tumoral de camundongos quimeras para medula óssea não é revertida em animais IL-1R8$^{-/-}$neu. Transplante de medula óssea IL-1R8+/+ não reverte o fenótipo protegido observado nos animais IL-1R8$^{-/-}$ neu. (A) Análise por curva de Kaplan-Meier de animais livres de tumores nos animais IL-1R8$^{-/-}$neu irradiados e transplantados com medula IL-1R8+/+ (n=10) ou IL-1R8-/- (n=10); (B) Número médio de tumores mamários por animal por tempo (semanas);

(C) Volume tumoral total por animal por tempo (semanas). Resultados representados como média ± SEM.

Além das diferenças na cinética de crescimento tumoral, carcinomas mamários de animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* e IL-1R8$^{-/-}$*neu* apresentaram diferentes características histopatológicas. No tempo de 24 semanas de idade, tumores de animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* apresentaram características de maior agressividade, tais como necrose tecidual e atipia celular, embora nenhuma diferença significativa foi vista em relação ao número de mitoses, quando comparado com tumores IL-1R8$^{-/-}$ *neu*. Além disso, 67% dos tumores IL-1R8$^{+/+}$*neu* apresentaram padrão de crescimento infiltrativo, enquanto 100% dos tumores IL-1R8$^{-/-}$*neu* apresentaram padrão do tipo expansivo (Figura 26, Tabela 4). Coletivamente, esses dados revelam que a expressão de IL-1R8 favorece a formação, progressão tumoral mamária e disseminação metastática.

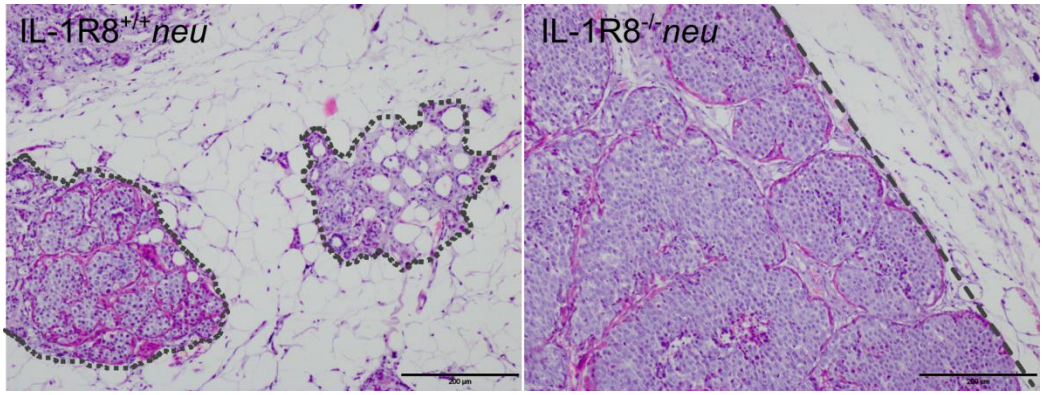


Figura 26. Análise histopatológica de tumores mamários coletados na 24ª semana. Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) de tumores mamários de 24 semanas de animais IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$neu revelam características de crescimento diferentes. Figura à esquerda, um padrão de crescimento infiltrativo (linha pontilhada) de tumores IL-1R8$^{+/+}$neu e à direita, padrão de crescimento expansivo (linha pontilhada) de tumores IL-1R8$^{-/-}$neu. Escala: 200 µM.

Tabela 4. Características histopatológicas de tumores mamários coletados na 24ª semana.

Características histopatológicas	IL-1R8$^{+/+}$neu (n=6)	IL-1R8$^{-/-}$neu (n=5)
Crescimento tumoral		
Expansivo, n (%)	2 (33.3%)	5 (100%)
Infiltrativo, n (%)	4 (66.6%)	0 (0%)
Necrose tecidual (%)	++ (16.7) + (83.3)	+ (60) No (40)
Atipia celular (%)	+++ (16.7) ++ (32.3) + (50)	++ (20) + (80)
Número de mitoses (por campo)	2.5±0.5^{NS}	1.2±0.5^{NS}

4.6. Deficiência de IL-1R8 promove o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral.

Como havíamos observado que a expressão de IL-1R8 por células tumorais de mama é relevante para a polarização e atividade de células imunes *in vitro*, nós decidimos avaliar o componente imunológico presente nos tumores mamários de animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* e IL-1R8$^{-/-}$*neu*. Tumores IL-1R8$^{+/+}$*neu* de animais com 24 semanas apresentaram maior infiltrado de leucócitos (células CD45^{+}, p-valor=0.02, Figura 27), mas a porcentagem de DCs (F4/80^{-}CD11c^{+}/CD45^{+}) e de células NK (CD3^{-}CD49b^{+}/CD45^{+}) era significativamente menor (p-valor=0.04 e p-valor=0.01, respectivamente, Figura 28). Por outro lado, o infiltrado de TAMs (células F4/80^{+}) era significativamente maior em tumores que expressam IL-1R8 (p-valor=0.009 e p-valor=0.03, Figuras 28 e 29).

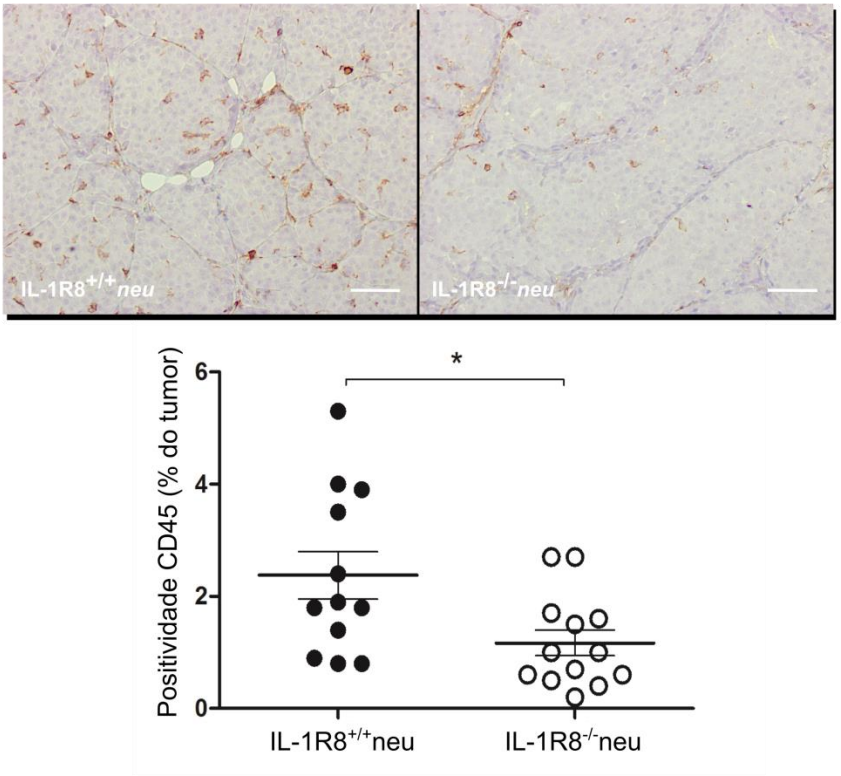


Figura 27. Quantificação de células CD45+ por imunohistoquímica em tumores mamários de animais na 24ª semana de idade. Quantificação como % da positividade media por tumor. Escala: 50 µM. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05.

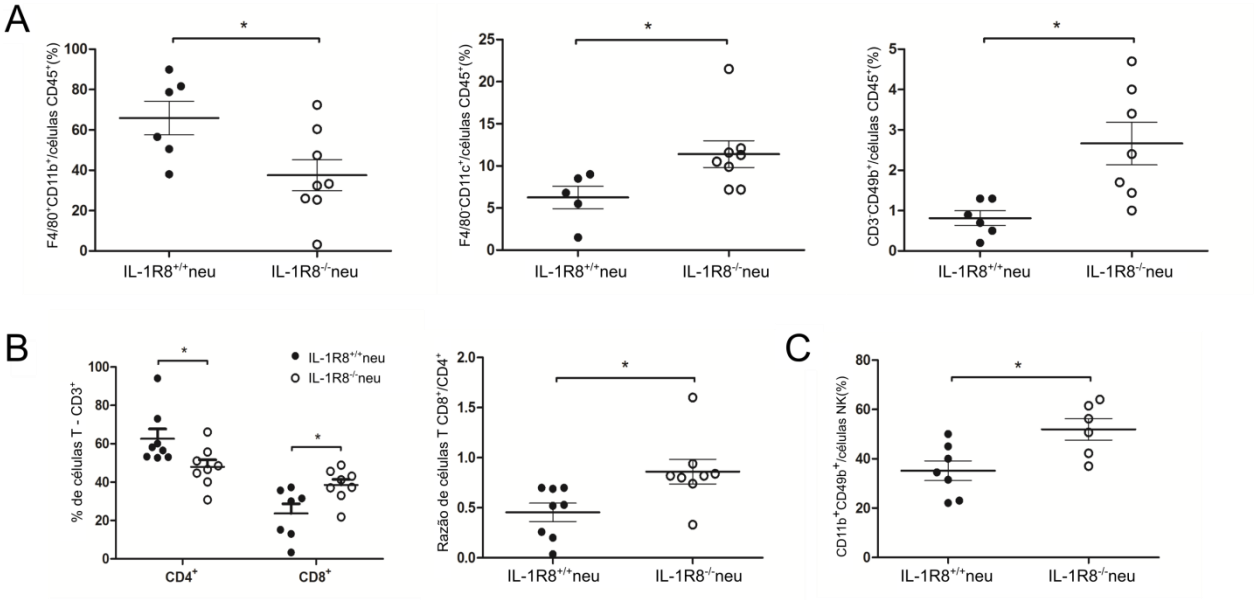


Figura 28. Deficiência de IL-1R8 altera o infiltrado leucocitário em tumores mamários de animais de 24 semanas. (A) Análise do infiltrado leucocitário mielóide em tumores mamários IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$neu por FACS. Macrófagos

($CD11b^+F4/80^+$), células dendríticas ($CD11b^+F4/80^-CD11c^+$), células NKs ($CD3^-CD49b^+$). Resultados representados como % de células $CD45^+$; (B) Análise por FACS da população de $CD4^+$ e $CD8^+$ de células T. Resultados representados como % de células $CD3^+$; (C) Análise por FACS da população madura de células NK ($CD11b^+CD49b^+$/Total de células NK). Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05.

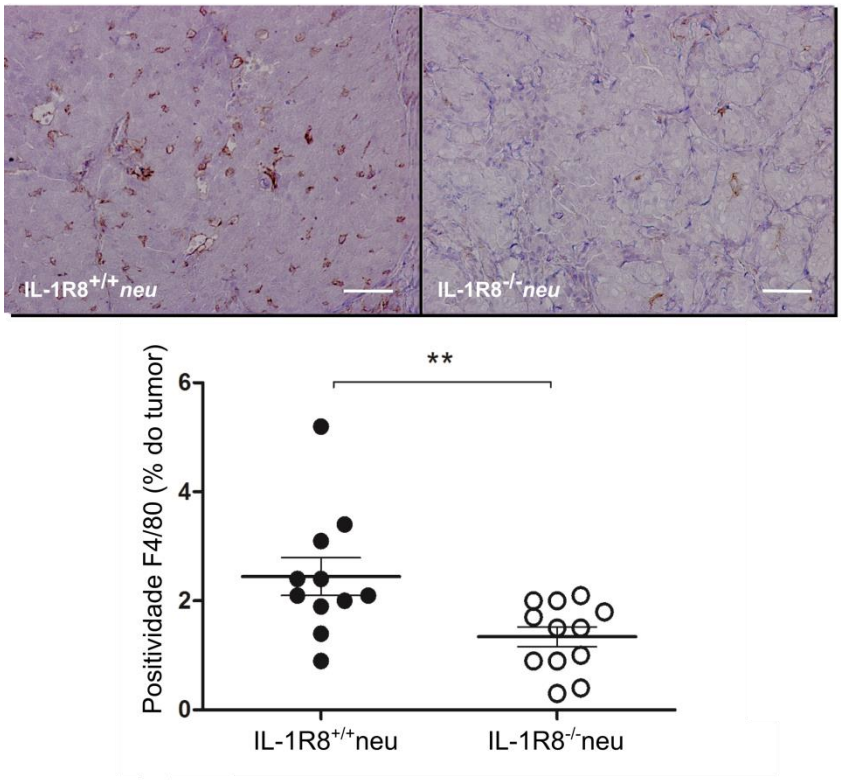


Figura 29. Quantificação de macrófagos (F4/80+) por imunohistoquímica em tumores mamários de animais na 24ª semana de idade. Quantificação como % da positividade media por tumor. Escala: 50 µM. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.01.

Notavelmente, uma menor porcentagem de células NK maduras ($CD11b^+$NK/total de células NK, p-valor=0.02) e uma maior porcentagem de macrófagos imaturos (monomacs) ($CD11b^+F4/80^+Ly6C^+$/macrófagos totais, p-valor=0.052) foi vista em tumores IL-1R8$^{+/+}$*neu,* embora o ultimo não tenha alcançado significância estatística (Figuras 28 e 30).

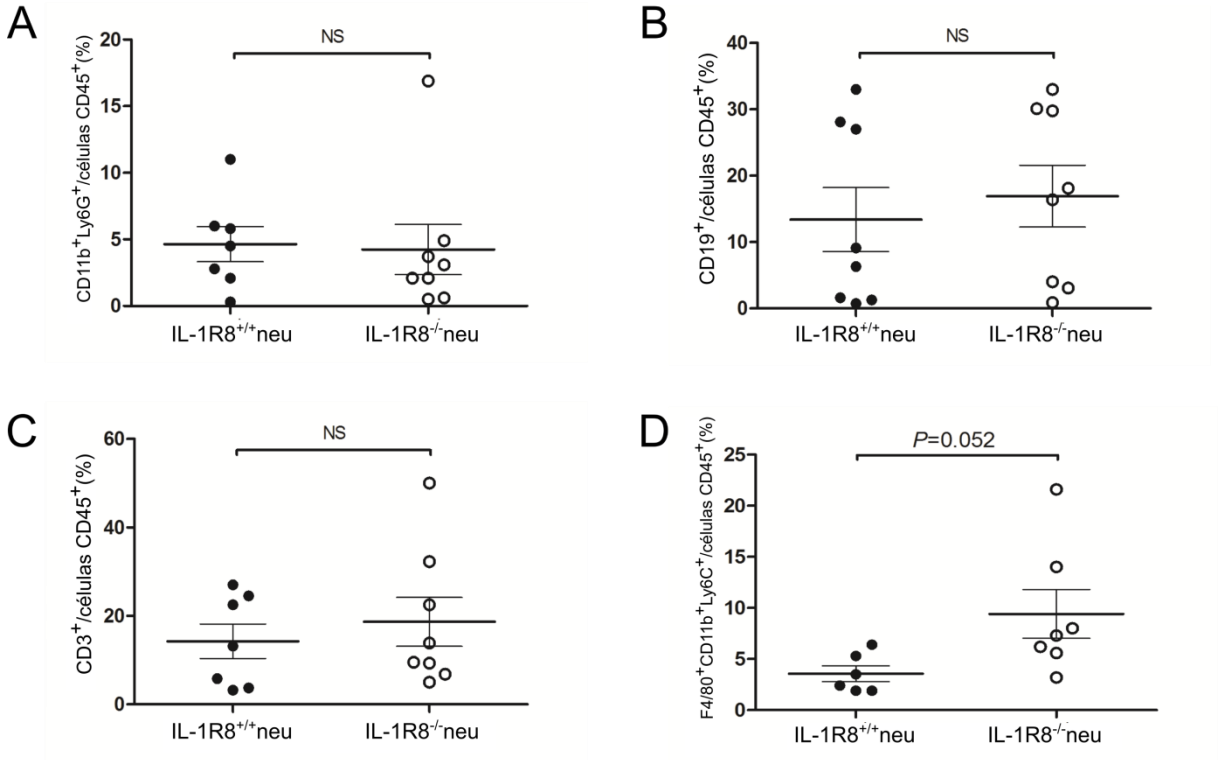


Figura 30. Análise do infiltrado leucocitário em tumores mamários de animais de 24 semanas por FACS – outras populações. Análise do infiltrado leucocitário mielóide em tumores mamários IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$neu por FACS. (A) Células polimorfonucleares (CD11b^{+}Ly6G^{+}); (B) Linfócitos B (CD19^{+}); (C) Linfócitos T (CD3^{+}); (D) Macrófagos imaturos (monomacs) (F4/80^{+}CD11b^{+}Ly6C^{+}). Resultados representados como % de células CD45^{+}. Resultados representados como média ± SEM. NS=não significativo.

Embora não tenhamos visto diferenças em infiltrado de PMNs (CD11b^{+}Ly6G^{+}/CD45^{+}), células B (CD19^{+}/CD45^{+}) ou T (CD3^{+}/CD45^{+}) (Figura 30), tumores expressando IL-1R8 apresentaram um infiltrado significativo maior de células T-CD4^{+} (p-valor=0.03) e menor de T-CD8^{+} (p-valor=0.02), com menor razão de células T CD8+/CD4+ (p-valor=0.02, Figura 28).

Além disso, tumores IL-1R8$^{+/+}$neu apresentaram maiores níveis intratumorais da citocina pró-inflamatória IL-1β e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (p-valor=0.002 e p-valor=0.03, respectivamente), mas menores níveis da

citocina imunoestimuladora IFN-γ (Figura 31). Não observamos diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-10, CCL2 e CSF-2 entre os grupos, embora uma tendência a maiores níveis de IL-12 foi observada no grupo IL-1R8$^{-/-}$ *neu* (p-valor=0.08). Não observamos também diferença significativa no infiltrado de células T (CD3+) ou de intensidade de coloração do marcador proliferativo Ki67 entre os grupos (Figura 32).

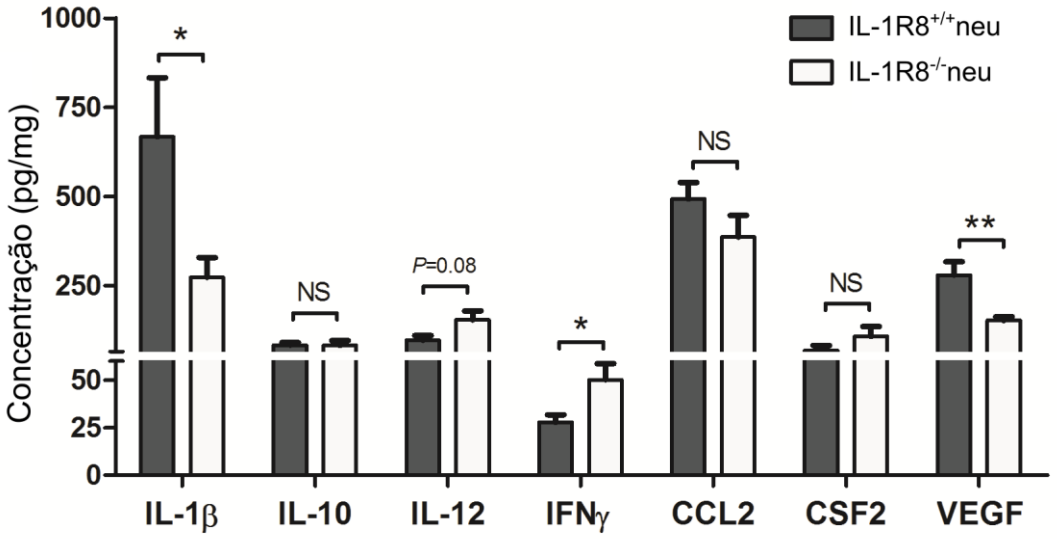


Figura 31. Expressão de IL-1R8 altera os níveis de citocinas intratumorais em tumores mamários coletados de animais na 24ª semana. Níveis proteicos de citocinas presentes em homogeneizado tumoral de animais IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$ neu por método de ELISA. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05, **p-valor<0.01.

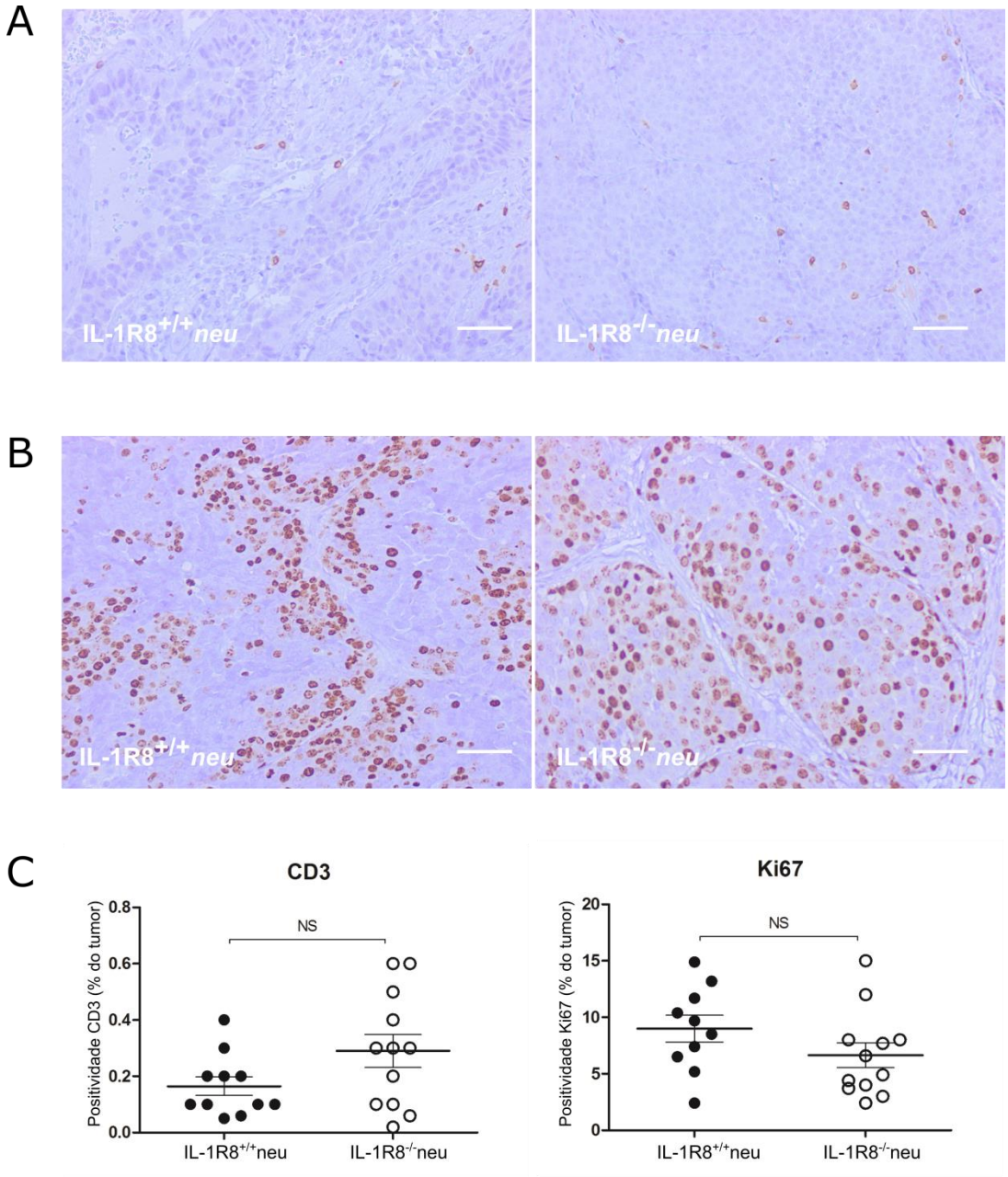


Figura 32. Quantificação de células CD3+ e Ki67 por imunohistoquímica em tumores mamários de animais na 24ª semana de idade. (A) Marcação de linfócitos (CD3+) e (B) marcador proliferativo Ki67 em tumores IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$neu. (C) Quantificação como % da positividade média por tumor. Escala: 50 µM. Resultados representados como média ± SEM.

De forma a determinar se essas diferenças observadas poderiam ser devido a tamanhos tumorais diferentes no tempo de 24 semanas, nós também analisamos o infiltrado leucocitário em tumores com diâmetros equivalentes (grupo *size-point*). O tempo médio para que animais IL-1R8$^{+/+}$*neu* desenvolvessem tumores com volume de 500 mm^3 foi 29 semanas, enquanto no grupo IL-1R8$^{-/-}$*neu* foi de 34 semanas (p-valor=0.003) (Figura 33).

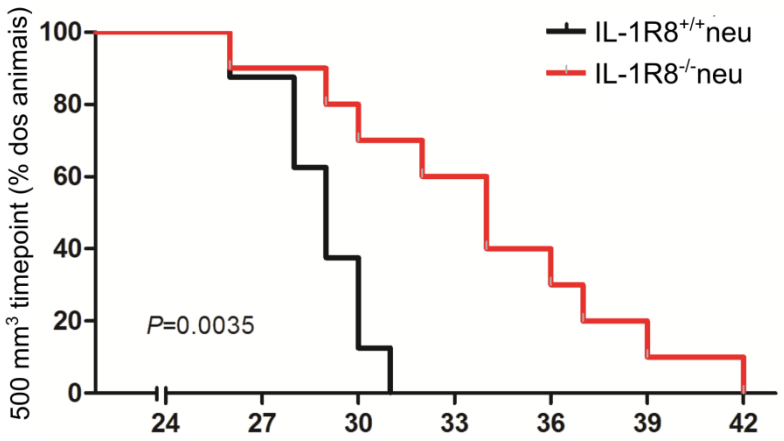


Figura 33. Incidência de tumores com 500 mm^3 de volume (grupo *size-point*). Análise por curva de Kaplan-Meier de animais desenvolvendo tumores com 500 mm^3 de volume nos grupos IL-1R8$^{+/+}$neu (n=8) e IL-1R8$^{-/-}$neu (n=10). Teste log-rank, p-valor=0.003.

Resultados similares foram observados em termos de infiltrado leucocitário em tumores mamários IL-1R8$^{-/-}$*neu* do grupo *size-point,* com maior infiltrado de células dendríticas, células T-CD8$^+$ e maior razão de células T CD8$^+$/CD4$^+$ (Figura 34A e B). Em contraste com os tumores coletados do grupo de 24 semanas, não vimos diferença significativa na porcentagem de infiltrado de TAMs ou células NK no grupo *size-point*, embora ainda vejamos uma maior população de células NK maduras no grupo IL-1R8$^{-/-}$*neu* (Figura 34C).

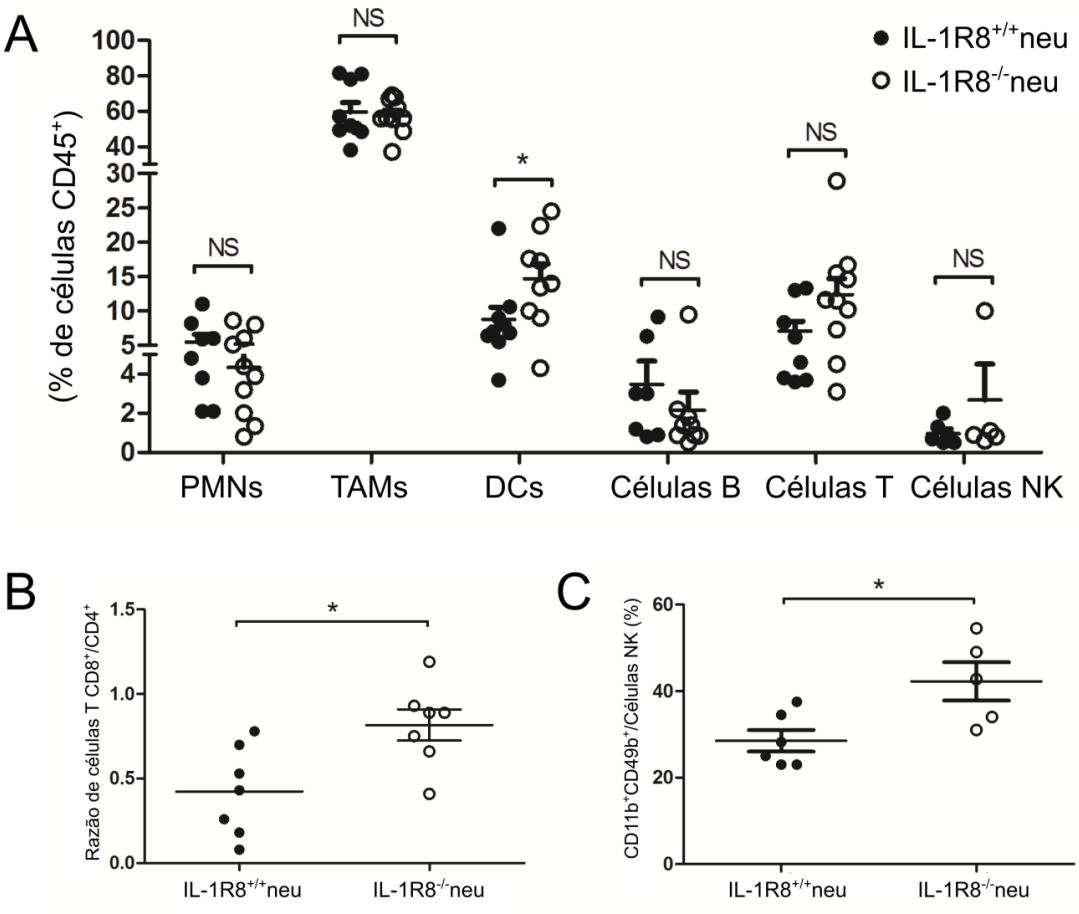


Figura 34. Deficiência de IL-1R8 altera o infiltrado leucocitário em tumores mamários de mesmo tamanho. (A) Análise por FACS do infiltrado leucocitário tumoral: PMNs ($CD11b^+Ly6G^+$), TAMs ($CD11b^+F4/80^+$), DCs ($CD11b^+F4/80^-CD11c^+$), Linfócitos B ($CD19^+$), Linfócitos T ($CD3^+$) e células NKs ($CD3^-CD49b^+$). Resultados representados como % de células $CD45^+$; (B) Razão de linfócitos T $CD8^+/CD4^+$; (C) População de células NKs maduras ($CD11b^+CD3^-CD49b^+/CD49b^+$). Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05.

Também vimos uma forte tendência a maior expressão de MHC Classe II, marcador de macrófagos M1, e a menor expressão do receptor de manose CD206, marcador de macrófagos M2 (p-valor=0.07 e p-valor=0.09, respectivamente) na população de macrófagos de tumores IL-1R8$^{-/-}$*neu* (Figura 35). Além disso, células dendríticas de ambos grupos apresentaram altos níveis de expressão de MHC

Classe II (~60% da população de células dendríticas infiltada em tumores), refletindo sua maturidade e potencial habilidade de estimular células T *naive* (Figura 35).

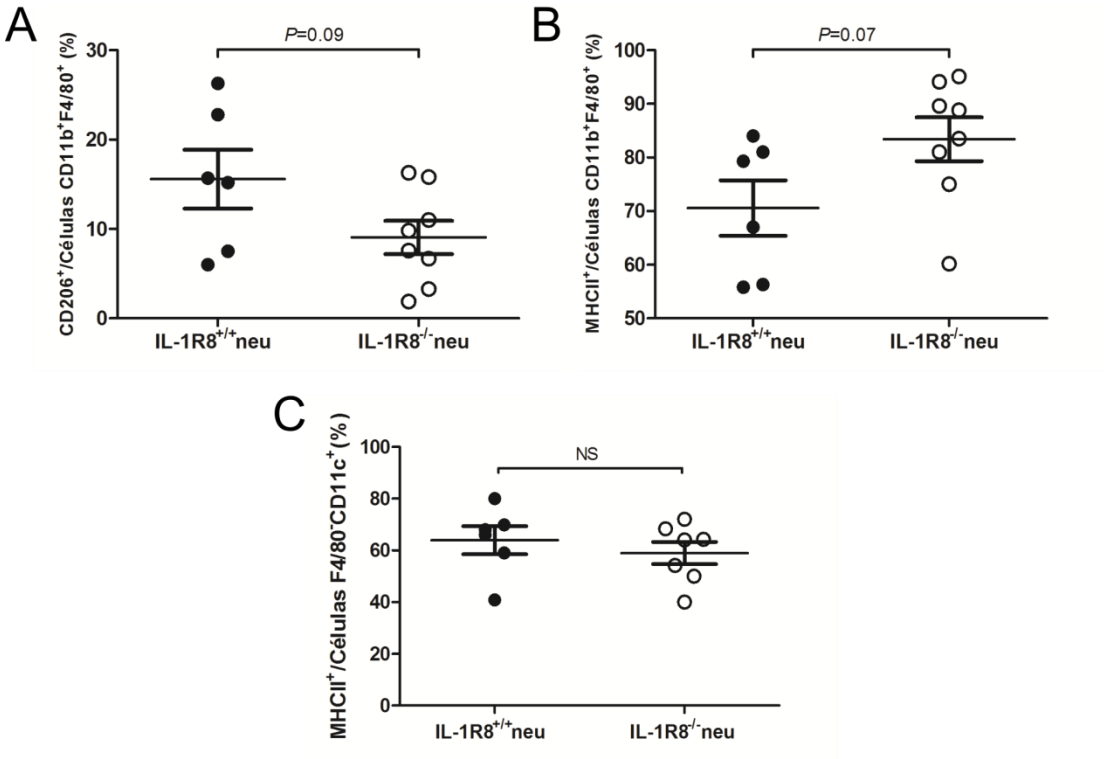


Figura 35. Expressão de marcadores de ativação em populações de células mielóides do infiltrado leucocitário tumoral. (A) População de TAMs ($CD11b^+F4/80^+$) expressando o marcador M2 CD206; (B) População de TAMs ($CD11b^+F4/80^+$)expressando o marcador M1 MHC Classe II; (C) População de células dendríticas ($F4/80^-CD11c^+$) expressando o marcador de ativação MHC Classe II. Resultados representados como média ± SEM. Teste T de Student não pareado.

Como nossos dados *in vitro* indicaram que a expressão de IL-1R8 em células tumorais de mama favorece a polarização de macrófagos para um perfil M2, nós decidimos avaliar o perfil de polarização de TAMs purificados de tumores mamários IL-1R8$^{+/+}$*neu* e IL-1R8$^{-/-}$*neu* do grupo *size-point.*

Após purificação de células $CD11b^+/Ly6G^-$, populações de macrófagos $MHCII^{high}$ ($CD11b^+/Ly6C^-/MHCII^{high}$) e $MHCII^{low}$ ($CD11b^+/Ly6C^-/MHCII^{low}$), e

monócitos (CD11b^{+}/Ly6C^{+}/MHCII^{-}) foram isolados com pureza >90% para analisarmos a expressão de marcadores M1 e M2, conforme descrito anteriormente (LAOUI et al., 2014). Observamos que macrófagos MHCII^{high} de tumores IL-1R8$^{+/+}$*neu* expressaram níveis significativamente maiores de marcadores M2-*like*, como CD206 (p-valor=0.02) e Ym1 (p-valor=0.03), e forte tendência a maiores níveis de TNFα (p-valor=0.06) e STAB1 (p-valor=0.07). Em adição, macrófagos MHCII^{low} de tumores IL-1R8$^{+/+}$*neu* também apresentaram maiores níveis de marcadores M2-*like,* tais como Ym1 (p-valor=0.04), IL-10 (p-valor=0.05) e TNFα (p-valor=0.04). Não obstante, monócitos IL-1R8$^{-/-}$*neu* apresentaram maior expressão do marcador CD206 (p-valor=0.03), previamente descrito como um gene mais expresso durante a diferenciação de monócitos para macrófagos (GENG et al., 1994) (Figura 39).

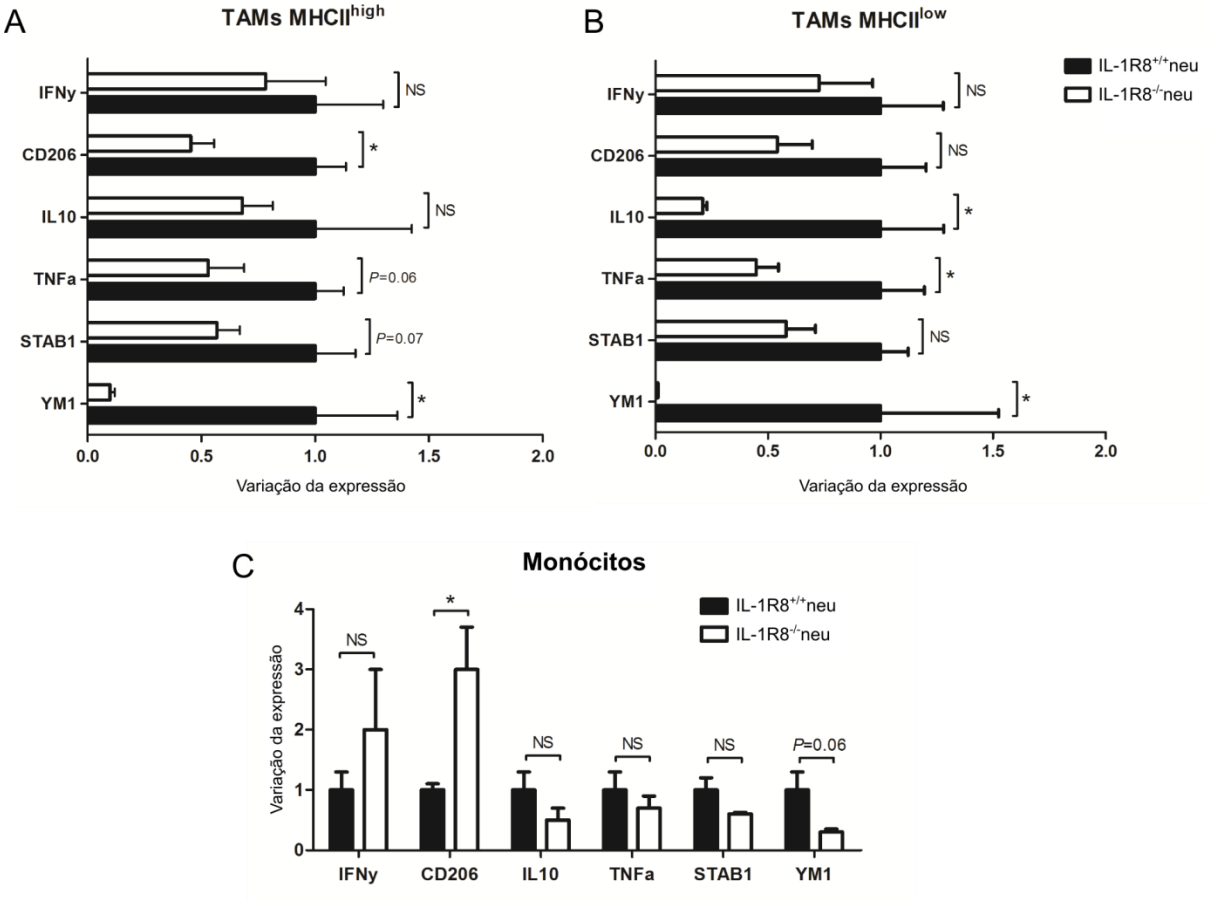


Figura 36. Deficiência de IL-1R8 altera a expressão de marcadores de polarização em monócitos e macrófagos purificados de tumores mamários. Análise por qPCR em tempo real de marcadores M1 e M2 selecionados para duas populações de TAMs, (A) MHC^{high} (B) MHC^{low}, e (C) monócitos purificados de tumores mamários IL-1R8$^{+/+}$neu (n=4) e IL-1R8$^{-/-}$neu (n=4). Dados de expressão são relativos à expressão de 18S, normalizados pelo grupo IL-1R8$^{+/+}$neu e expressos como média ± SEM. Teste T de Student não pareado, *p-valor<0.05, NS: não significativo.

Dessa forma, nossos resultados sugerem que a expressão de IL-1R8 no compartimento tumoral exerce papel crítico na manutenção de um microambiente inflamatório pró-tumoral e inibição do desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral. A perda de sua expressão promove polarização de macrófagos a um fenótipo M1 e maior infiltração de células imunes efetoras, como NKs e T-CD8^{+}.

5. DISCUSSÃO

Em tumores avançados, o balanço imune é fortemente inclinado a uma inflamação pró-tumoral e desregulação local da resposta imune inata e adaptativa (GRIVENNIKOV et al., 2010; LIN e KARIN, 2007). De forma geral, é a presença e abundância de diferentes citocinas do microambiente tumoral que determinam os estados de polarização e ativação de diferentes células imunes e para qual direção o balanço imune irá prevalecer: inflamação pró-tumoral ou imunidade antitumoral (LIN e KARIN, 2007; SMYTH et al., 2006). Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação envolvidos na inflamação associada ao câncer, bem como dos componentes implicados na desregulação da resposta imune em tumores, permite o desenvolvimento de novas terapias ou o aperfeiçoamento de tratamentos existentes.

Neste trabalho, nós identificamos o gene IL-1R8, crítico regulador negativo de receptores ILRs e TLRs, como um gene *up*-regulado em tumores de mama que age no ajuste fino da resposta inflamatória, impedindo a ativação de uma imunidade antitumoral. Nós inicialmente identificamos IL-1R8 em um modelo de transformação celular mediado pela superexpressão de HER2 (DOS SANTOS et al., 2006; HARRIS et al., 1999), através de uma análise de expressão gênica global. Nessa análise, verificamos IL-1R8 como um dos principais transcritos *up*-regulados na variante com superexpressão de HER2. Nós posteriormente validamos a expressão diferencial de IL-1R8 em uma grande quantidade de tumores primários de mama, através de uma análise de bioinformática usando dados públicos de expressão gênica do TCGA.

Além disso, identificamos IL-1R8 como um gene *up*-regulado não somente no subtipo molecular HER2+, mas também interessantemente presente nos subtipos

Luminal A e Luminal B. Esse dado sugere que sinais oncogênicos distintos podem induzir aumento na expressão de IL-1R8 em tumores de mama, e que esse pode ser um evento diretamente associado com o processo de transformação *per se*. Na realidade, a ativação de circuitos inflamatórios constitutivos é reportada durante o processo de transformação celular (ROKAVEC e LUO, 2012). Sinalização inflamatória anormal em células tumorais pode ser provocada por sinais inflamatórios extrínsecos do microambiente, mas também por fenômenos intrínsecos da célula tumoral (MANTOVANI et al., 2008). Dessa forma, mecanismos que são capazes de impedir inflamação local excessiva, ativação inapropriada de células imunes e/ou produção de citocinas pró-inflamatórias podem constituir importantes mecanismos de evasão da imunovigilância tumoral.

Embora tenhamos visto uma correlação positiva entre a expressão de IL-1R8 e ErbB2 em amostras normais e tumorais de mama, não conseguimos identificar IL-1R8 como um gene diretamente regulado por vias de sinalização dependentes da atividade tirosina-quinase de HER2. É importante salientar que funções independentes da atividade tirosina-quinase já foram demostradas em receptores da família EGFR (WEIHUA et al., 2008), e também que o fator de transcrição SP1, que foi previamente mostrado interagir com a região promotora e induzir a expressão de IL-1R8 (KADOTA et al., 2010), pode ter envolvimento com a expressão diferencial de IL-1R8 observada no modelo HB4a – c5.2.

Notavelmente, também observamos que a alta expressão de IL-1R8 mostrou-se fator de pior prognóstico para recorrência local em pacientes com câncer de mama de baixo grau. Recentemente foi demonstrado que a expressão de IL-1R8 é fator associado com recorrência em tumores prostáticos de baixo grau (BAUMAN et

al., 2015) Esse interessante dado somado à identificação de IL-1R8 em um modelo de transformação celular pode revelar IL-1R8 como um gene mais expresso e atuante em etapas precoces da evolução tumoral.

Vimos, em concordância com estudos prévios, que o aumento na expressão de IL-1R8 em células transformadas de mama regula negativamente a ativação de NF-κB, fator de transcrição fundamental em processos de sobrevivência celular, inflamação e imunidade (KARIN e GRETEN, 2005; QIN et al., 2005; WALD et al., 2003). Além disso, a expressão de IL-1R8 atenua a expressão a secreção intrínseca de citocinas pró-inflamatórias após estímulo de receptores IL-1R, e que o silenciamento de IL-1R8 notavelmente recupera o nível de expressão dessas citocinas praticamente para o nível observado nas células parentais HB4a estimuladas com IL-1β. É importante salientar que algumas dessas citocinas diferencialmente expressas são envolvidas na polarização de macrófagos (CSF2, IFN-β1 e TNFα) e ativação de células NK (IFN-β1) (FLEETWOOD et al., 2009; SICA e MANTOVANI, 2012; SWANN et al., 2007).

A citocina pró-inflamatória IL-1 é abundante no microambiente tumoral, sendo produzida por diferentes células, como neutrófilos, macrófagos e células malignas (GARLANDA et al., 2013). A produção de IL-1 afeta diferentes fases do processo de malignização, como na iniciação, progressão e invasividade, além de interferir com o padrão de interação entre as células malignas e o sistema imune (GARLANDA et al., 2013).

Observamos também que a regulação na produção de fatores pró-inflamatórios exercido por IL-1R8 em células de mama transformadas influenciou significativamente a atividade de células imunes *in vitro*, como macrófagos e células

NKs. Quando cultivados com CM de células HB4a^{HER2+}, macrófagos polarizavam a um fenótipo M2-*like*, por outro lado expressavam maiores níveis de marcador M1-*like* quando cultivados em CM de células HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$. É atualmente de conhecimento geral que TAMs são geralmente polarizados a um fenótipo M2, o qual apresenta diversas funções pró-tumorais, ao secretar fatores promotores de sobrevivência, proliferação e disseminação (MANTOVANI et al., 2002; SOLINAS et al., 2009). Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias e imunoestimuladoras como CSF2, IFN e TNFα, cuja expressão observamos ser regulada negativamente por IL-1R8 em nosso modelo de transformação celular, bem como a sinalização de receptores *Toll-like* já foram descritos potencialmente polarizar macrófagos a um fenótipo M1 (SICA e MANTOVANI, 2012).

Nós também observamos níveis significativamente menores de IFN-γ, indutor chave de uma resposta imune do tipo 1 e que age diretamente em células tumorais (WANG et al., 2012), quando co-cultivamos células NK com células HB4a^{HER2+} em relação à co-cultura com células silenciadas para IL-1R8. Interferons do tipo I, tais como IFN-α/β, estimulam proliferação de células NK (BIRON et al., 1984), citotoxicidade mediada por células NK (SWANN et al., 2007, e secreção de IFN-γ por células NK (GIRART et al., 2007). De acordo com a hipótese da imunovigilância, células NK e linfócitos T-CD8+ são responsáveis pela morte de células tumorais no processo tumorigênico, enquanto células Th1 (pela produção de IFN-γ) e em alguns casos células Th17 (pela produção de IL-17A), tem papel importante no estímulo da imunidade citotóxica (DUNN et al., 2006; MARTIN-OROZCO et al., 2009).

Em conjunto, nossos dados *in vitro* sugerem um papel relevante de IL-1R8 na biologia de tumores de mama, pela mediação do *crosstalk* existente entre as células

imunes e células transformadas de mama ao regular o perfil de citocinas imunoestimulatórias secretadas por estímulo de vias de sinalização dependentes do domínio TIR.

De forma a melhor investigarmos o papel de IL-1R8 no contexto de formação e progressão tumoral, utilizamos o modelo murino transgênico de adenocarcinoma de mama mediado pela ativação do oncogene ErbB2/HER2, MMTV-neu, o qual reflete de forma mais fidedigna os mecanismos complexos de *crosstalk* existentes entre células tumorais e não-tumorais infiltrantes em diferentes etapas do crescimento tumoral (BANDINI et al., 2013). A progressão lenta, a ocorrência natural de invasão e metástase e a presença de uma interação duradora entre células tumorais, estroma e sistema imune, nos permite uma avaliação mais direta das contribuições relativas de mecanismos imunológicos na oncogênese mamária mediada por HER2 (CAVALLO et al., 2006). Embora a superexpressão de HER2 seja suficiente para promoção de lesões mamárias nesses animais, o ritmo de crescimento é significativamente influenciado por mecanismos de imunossupressão mediados por células tumorais (AMBROSINO et al., 2006; ROLLA et al., 2010).

Tumores mamários do modelo MMTV-neu apresentaram considerável expressão de IL-1R8 e sua depleção significativamente retardou a incidência e progressão tumoral. Tumores com expressão IL-1R8 eram maiores em volume em pontos de tempo distintos, e apresentaram características histopatológicas de maior agressividade, como necrose, atipia celular, bem como perfil de crescimento infiltrativo, o qual se correlaciona positivamente com o maior potencial metastático observado para animais desse grupo. No entanto, é importante salientar que não observamos diferenças em medidas da atividade proliferativa, como número de

mitoses por campo e positividade de Ki67, em tumores IL-1R8$^{+/+}$neu e IL-1R8$^{-/-}$neu, o que sugere que a expressão de IL-1R8 não exerce efeito direto na atividade proliferativa celular.

Nossos resultados estão em contraste com alguns estudos prévios sobre o papel de IL-1R8 em modelos de câncer associado à colite e leucemia linfocítica crônica (BERTILACCIO et al., 2011; GARLANDA et al., 2007; XIAO et al., 2007), e podem ser explicados por mecanismos moleculares distintos de tumorigênese, além de diferente componente inflamatório crônico associado com a carcinogênese mamária em detrimento ao crítico componente extrínseco de inflamação presente em tumores colorretais pela sua importante relação com a microbiota intestinal.

Notavelmente, o uso de animais quimeras para medula óssea revelou que o fenótipo protegido observado em animais IL-1R8$^{-/-}$*neu* não foi revertido quando transplantamos medula óssea de animais IL-1R8+/+. Dessa forma, nossos resultados demonstram que o componente não-hematopoiético, especialmente as células tumorais, parece ser um contribuidor importante para o fenótipo observado, já que componentes do estroma como fibroblastos e células endoteliais já foram mostrados não expressar IL-1R8 (WALD et al., 2003).

Células imunes efetoras podem suprimir o desenvolvimento tumoral por matar diretamente células cancerosas ou inibir seu crescimento. Na fase de equilíbrio da hipótese da imunoedição, há uma ativa seleção de células transformadas que são mais aptas a crescer em um hospedeiro imunocompetente ou capazes de estabelecer um microambiente imunossupressor (SMYTH et al., 2006). Em nosso estudo, observamos que tumores que expressam IL-1R8 haviam significativamente menor infiltração de células associadas com imunidade antitumoral, tais como

células dendríticas, células NKs e células T-CD8^{+}. Por outro lado, macrófagos imaturos e linfócitos T-CD4^{+} eram mais abundantes nesses tumores, indicando que a expressão de IL-1R8 pode promover o crescimento tumoral por “frear” ativação de resposta Th1 e infiltração de células linfoides protetivas.

O resultado de uma resposta imune contra o tumor é amplamente determinado pelo tipo de resposta montada, e uma resposta envolvendo células Th1, linfócitos T-CD8^{+} e células NKs é conhecida pela proteção contra a progressão tumoral em diferentes modelos (DENARDO e COUSSENS, 2007). De fato, já foi descrito que em câncer de mama, a presença de uma alta razão CD4^{+}/CD8^{+} e Th2/Th1 é forte indicativo de pior prognóstico (KOHRT et al., 2005). Células T-CD4^{+} em perfil Th2 são capazes de estimular a progressão da oncogênese mamária e metástase por educarem TAMs a produzirem fatores pró-angiogênicos e pró-metastáticos (DENARDO e COUSSENS, 2007). Em nosso modelo, observamos que tumores mamários IL-1R8$^{+/+}$*neu* apresentavam maior número de TAMs, os quais expressavam genes associados a um perfil M2-*like,* bem como uma maior razão CD4^{+}/CD8^{+}. A polarização diferencial da função dos TAMs pode ter sido um importante fator que contribuiu para a carcinogênese acelerada em animais IL-1R8$^{+/+}$*neu.*

Sabe-se que processos inflamatórios induzem a liberação de moléculas associadas a dano (DAMPs) de células em morte, tais como HMGB1 e ATP, que são capazes de ativar receptores TLR2, TLR4 e a via de inflamossomo para estimularem a produção de IL-1β por uma via dependente de MyD88, sendo um passo crítico para o desenvolvimento de uma imunidade adaptativa antitumoral (GHIRINGHELLI et al., 2009). A ativação de receptores TLR também causa regressão tumoral por

aumentar a permeabilidade vascular (GARAY et al., 2007) e por direta ou indiretamente recrutar leucócitos, resultando em lise tumoral mediada por células NKs e células T-CD8^{+}. Tumores com maior capacidade de responder a esses estímulos da imunidade inata apresentam um fenótipo conhecido como *T-cell inflammed,* pela maior expressão de genes de assinatura de Interferon e pela presença de células T e T-CD8^{+}, e são justamente aqueles tumores com melhor resposta a terapia e bom prognóstico (GAJEWSKI et al., 2013; WOO et al., 2015).

Além disso, foi previamente descrito que o silenciamento de TLR4 e TLR9 em tumores é associado com a progressão de tumores mamários e diminuição na resposta antitumoral mediada por células T dependente de IFN-γ (AHMED et al., 2012; TUOMELA et al., 2012; YUSUF et al., 2008). Dessa forma, a modulação da sinalização de receptores TLR e IL1R e resposta a sinais da imunidade inata deve desempenhar papel critico na tumorigênese mamária.

Esses dados em conjunto apontam para uma nova e interessante função desempenhada por IL-1R8 em câncer de mama, funcionando como um “freio” na inflamação tumoral e uma peça mecanística adicional desenvolvida por tumores para modificar o balanço imunológico a um perfil mais imunossupressor. O estudo de mecanismos de evasão do sistema imune expresso por células tumorais levou à identificação de proteínas como PD-L1/PD-1 e Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), que estão revolucionando o tratamento de diferentes tumores, em especial aqueles mais imunogênicos como melanoma e NSCLC. Dessa forma, acreditamos que nossos dados suportam IL-1R8 como um importante novo mecanismo de evasão e potencialmente um alvo imunoterapêutico em câncer de mama.

6. CONCLUSÕES

- A expressão de IL-1R8 é aumentada durante o processo de transformação celular mediado pela superexpressão de ErbB2/HER2 e também é observada em tumores primários de mama de diferentes subtipos moleculares;
- Maior expressão de IL-1R8 em tumores de mama de baixo grau histológico está associada a um pior prognóstico e a ocorrência de recidiva local da doença;
- A expressão de IL-1R8 é positivamente correlacionada com a expressão do oncogene ErbB2/HER2 em tecidos mamários normal e tumoral, mas o aumento na expressão de IL-1R8 parece não depender da atividade tirosina-quinase de HER2;
- A expressão de IL-1R8 em células transformadas por HER2 promove a inibição de NF-κB e menor expressão de diferentes citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, TNFα, CSF2, CSF3 e IFN-β1;
- As citocinas secretadas por células de mama transformadas por Her2 e que possuem expressão aumentada de IL-1R8 são capazes de polarizar macrófagos para um fenótipo M2-*like* e inibir a ativação de células NKs *in vitro*;
- Camundongo MMTV-neu deficientes para IL-1R8 apresentam um atraso no desenvolvimento e crescimento de tumores, e uma menor incidência de metástase pulmonar;
- O fenótipo “protegido” de animais deficientes para IL-1R8 não foi revertido quando animais são reconstituídos com componente hematopoiético

expressando IL-1R8, indicando um papel importante de células não imunes no fenótipo observado;

- Tumores que expressão IL-1R8 apresentam menor infiltrado de leucócitos associados com imunidade protetiva, tais como células dendríticas, NKs e linfócitos T $CD8^+$, menores níveis de IFN-γ e microambiente com menos sinais pró-inflamatórios, caracterizado pela presença de citocinas como VEGF, IL-1β e infiltrado de TAMs;
- TAMs purificados de tumores que expressam IL-1R8 apresentaram maior expressão de marcadores associados com perfil M2 de ativação;
- A deficiência de IL-1R8 no microambiente tumoral parece favorecer o equilíbrio imunológico em direção ao desenvolvimento de imunidade antitumoral, por afetar a produção de fatores solúveis e o *crosstalk* entre células tumorais e células imunes;
- A expressão de IL-1R8 pelas células tumorais revela-se como um novo mecanismo de escape da resposta imune que permite ajustar finamente a resposta a estímulos inflamatórios e a ativação de células imunes efetoras, e representa um promissor alvo terapêutico para tumores de mama.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. DE; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.

ABUL K. ABBAS, ANDREW H. H. LICHTMAN, S. P. **Cellular and Molecular Immunology**. [s.l: s.n.]. v. 7th editio

AHMED, A.; WANG, J. H.; REDMOND, H. P. Silencing of TLR4 Increases Tumor Progression and Lung Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer**. Annals of Surgical Oncology**, 2012.

AKBAY, E. A. et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1355–1363, 2013.

AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition**. [s.l: s.n.].

ALROY, I. et al. Neu differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of the Sp1 transcription factor. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 3, p. 1961–1972, 1999.

AMBROSINO, E. et al. Immunosurveillance of Erbb2 carcinogenesis in transgenic mice is concealed by a dominant regulatory T-cell self-tolerance. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7734–7740, 2006.

ASHIDA, A. et al. Expression profiling of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with definitive chemoradiotherapy: Clinical implications. **International Journal of Oncology**, v. 28, n. 6, p. 1345–1352, 2006.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease**. Cancer Cell**, 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539–45, 17 fev. 2001.

BANDINI, S. et al. Early onset and enhanced growth of autochthonous mammary carcinomas in C3-deficient Her2/neu transgenic mice. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 9, p. e26137, 2013.

BAUMAN, T. M. et al. SIGIRR/TIR8, an important regulator of TLR4 and IL-1R-mediated NF-kB activation, predicts biochemical recurrence after prostatectomy in low-grade prostate carcinomas. **Human Pathology**, jul. 2015.

BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 715–723, 2011.

BERTILACCIO, M. T. S. et al. Lack of TIR8 / SIGIRR triggers progression of chronic lymphocytic leukemia in mouse models. **Blood**, v. 118, n. 3, p. 660–669, 2011.

BIÈCHE, I.; LIDEREAU, R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 14, n. 4, p. 227–251, 1995.

BIRON, C. A.; SONNENFELD, G.; WELSH, R. M. Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo. **Journal of leukocyte biology**, v. 35, n. 1, p. 31–37, 1984.

BONAVITA, E. et al. PTX3 Is an Extrinsic Oncosuppressor Regulating Complement-Dependent Inflammation in Cancer. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 700–714, 2015.

BULEK, K. et al. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 2601–2609, 2009.

CAVALLO, F. et al. Vaccination for Treatment and Prevention of Cancer in Animal Models**. Advances in Immunology**, 2006.

CHARLES A JANEWAY, J. et al. **Immunobiology.** Garland Science, 2001.

CHEN, R. et al. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 225–233, 2008.

COLOMBO, M. P. et al. Granulocyte colony-stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 4, p. 889–897, 1991.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073–81, jul. 2009.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis**. Cell**, 2006.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 2002.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, 2006.

DENARDO, D. G. et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer cell**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 4 ago. 2009.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast cancer research : BCR**, v. 9, n. 4, p. 212, 2007.

DESANTIS, C. et al. Breast cancer statistics, 2011. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 6, p. 409–418, 2011.

DIERMEIER, S. et al. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. **Experimental Cell Research**, v. 304, n. 2, p. 604–619, 2005.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 519–550, 2009.

DOS SANTOS, M. L. et al. Transcriptome characterization of human mammary cell lines expressing different levels of ERBB2 by serial analysis of gene expression. **International Journal of Oncology**, v. 28, n. 6, p. 1441–1461, 2006.

DREXLER, S. K. et al. SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 8, p. 2249–2261, 2010.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 11, p. 836–848, 2006.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 315, n. 26, p. 1650–1659, 1986.

FABIO STOSSI, ZEYNEP MADAK-ERDOĞAN, AND B. S. K. Macrophage-Elicited Loss of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells via Involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 Genomic Locus. **Oncogene**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11.**

FERREIRA, Z. S. et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 3, p. 182–188, 2005.

FLEETWOOD, A. J. et al. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 2, p. 411–421, 2009.

GAJEWSKI, T. F. Failure at the effector phase: Immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, p. 5256–5261, 2007.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014–22, 2013.

GALON, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5795, p. 1960–1964, 2006.

GALON, J. et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer**. Journal of Translational Medicine**, v. 10:205, 2012.

GALON, J. et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. **Journal of Pathology**, v. 232, n. 2, p. 199–209, 2014.

GARAY, R. P. et al. Cancer relapse under chemotherapy: Why TLR2/4 receptor agonists can help. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, n. 1-3, p. 1–17, 2007.

GARLANDA, C. et al. Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3522–3526, 2004.

GARLANDA, C. et al. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6017–6021, 2007.

GARLANDA, C.; ANDERS, H. J.; MANTOVANI, A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization**. Trends in Immunology**, 2009.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, 2013.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 141–165, 2007.

GENG, Y.; KODAMA, T.; HANSSON, G. K. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. **Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association**, v. 14, n. 5, p. 798–806, 1994.

GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. **Nature medicine**, v. 15, n. 10, p. 1170–1178, 2009.

GIRART, M. V et al. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 6, p. 3472–3479, 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, Inflammation, and CancerCell**, 2010.

GYÖRFFY, B. et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 3, p. 725–731, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generationCell**, 2011.

HARARI, D.; YARDEN, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. **Oncogene**, v. 19, n. 53, p. 6102–14, 11 dez. 2000.

HARRIS, R. A. et al. New model of erbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. **International Journal of Cancer**, v. 80, n. 3, p. 477–484, 1999.

HENICK, B. S.; HERBST, R. S.; GOLDBERG, S. B. The PD-1 pathway as a therapeutic target to overcome immune escape mechanisms in cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 12, p. 0, 2014.

HUDIS, C. A. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. **NEJM**, 357(1), p. 39-51, 2007.

JANSSENS, S. et al. MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. **FEBS letters**, v. 548, n. 1-3, p. 103–107, 2003.

JENNDAHL, L. E.; ISAKSON, P.; BAECKSTRÖM, D. C-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is suppressed by cell-cell contact and initiated prior to E-cadherin downregulation. **International Journal of Oncology**, v. 27, n. 2, p. 439–448, 2005.

KADOTA, C. et al. Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation. **Clinical and experimental immunology**, v. 162, n. 2, p. 348–61, nov. 2010.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749–759, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 72, n. 13, p. 3125–3130, 2012.

KOBAYASHI, K. et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 191–202, 2002.

KOHRT, H. E. et al. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 9, p. 0904–0919, 2005.

KUANG, D. M. et al. Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 948–955, 2011.

LAOUI, D. et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. **Cancer Research**, v. 74, n. 1, p. 24–30, 2014.

LECH, M. et al. Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 8, p. 1879–1888, 2008.

LECH, M. et al. Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 6, p. 4109–4118, 2009.

LECH, M. et al. Lack of SIGIRR/TIR8 aggravates hydrocarbon oil-induced lupus nephritis. **Journal of Pathology**, v. 220, n. 5, p. 596–607, 2010.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. **Distinct role of macrophages in different tumor microenvironmentsCancer Research**, 2006.

LI, N.; GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. The Unholy Trinity: Inflammation, Cytokines, and STAT3 Shape The Cancer Microenvironment. **Cancer Cell**, 2011.

LI, S. et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 8, p. 201424626, 2015.

LIN, W.-W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.

MAHMOUD, S. M. A et al. Tumor-infiltrating CD8 + lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 1949–1955, 2011.

MANTOVANI, A. et al. Decoy receptors: A strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines**. Trends in Immunology**, 2001.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, 2002.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–44, 2008.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity**. Current Opinion in Immunology**, 2010.

MARTIN, M. U.; WESCHE, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1592, n. 3, p. 265–80, 11 nov. 2002.

MARTIN-OROZCO, N. et al. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 787–798, 2009.

MIDWOOD, K. S.; PICCININI, A. M. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators of Inflammation**, 2010.

MIHÁLY, Z. et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 140, n. 2, p. 219–232, 2013.

MULLER, W. J. et al. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. **Cell**, v. 54, n. 1, p. 105–115, 1988.

NOLD-PETRY, C. A et al. IL-37 requires the receptors IL-18Rα and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. **Nature Immunology**, v. 8, n. February 2014, 2015.

NORIS, M. et al. The Toll-IL-1R member Tir8/SIGIRR negatively regulates adaptive immunity against kidney grafts. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 7, p. 4249–60, 1 out. 2009.

OKITA, R. et al. HER2/HER3 signaling regulates NK cell-mediated cytotoxicity via MHC class I chain-related molecule A and B expression in human breast cancer cell lines. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 5, p. 2136–45, 2012.

PAGE, M. J. et al. Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12589–12594, 1999.

PAGÈS, F. et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 5944–5951, 2009.

PARMIANI, G. Tumor-Infiltrating T Cells — Friend or Foe of Neoplastic Cells? **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 2640–2641, 2005.

PAZ, W. A. et al. Quimioterapia neo-adjuvante no tratamento do câncer de mama operável. **Rev. bras. mastologia**, 2007.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PFAFFL, M. W.; PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

POCKAJ, B. A et al. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 11, n. 3, p. 328–339, 2004.

QIN, J. et al. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and Toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 25233–25241, 2005.

QUEZADA, S. A. et al. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: From tumor tolerance to eradication. **Immunological Reviews**, 2011.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 57–63, 2009.

RICHMOND, A. Chemokine modulation of the tumor microenvironment. **Pigment cell & melanoma research**, v. 23, n. 3, p. 312–3, jun. 2010.

RIVA, F. et al. The expression pattern of TIR8 is conserved among vertebrates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 131, n. 1-2, p. 44–49, 2009.

RIVA, F. et al. **TIR8/SIGIRR is an interleukin-1 receptor/toll like receptor Family member with regulatory functions in inflammation and immunityFrontiers in Immunology**, 2012.

ROKAVEC, M.; LUO, J.-L. The transient and constitutive inflammatory signaling in tumorigenesis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 14, p. 2587–8, 15 jul. 2012.

ROLLA, S. et al. Erbb2 DNA vaccine combined with regulatory T cell deletion enhances antibody response and reveals latent low-avidity T cells: potential and limits of its therapeutic efficacy. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 11, p. 6124–6132, 2010.

ROSKOSKI, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 79, p. 34–74, jan. 2014.

RUSSELL, S. E. et al. Toll IL-1R8/single Ig IL-1-related receptor regulates psoriasiform inflammation through direct inhibition of innate IL-17A expression by γδ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 6, p. 3337–46, 2013.

SATO, E. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian

cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 51, p. 18538–43, 20 dez. 2005.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, 2012.

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. **Advances in Immunology**, 2006.

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–1073, 2009.

SOUCEK, L. et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. **Nature medicine**, v. 13, n. 10, p. 1211–1218, 2007.

SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 447–458, 2004.

STAAF, J. et al. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 11, p. 1813–1820, 2010.

SUNSHINE, J.; TAUBE, J. M. PD-1/PD-L1 inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 23, p. 32–38, 2015.

SWANN, J. B. et al. Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 12, p. 7540–7549, 2007.

SWANN, J. B. et al. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 652–656, 2008.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. **TLR signaling pathwaysSeminars in Immunology**, 2004.

TIMMS, J. F. et al. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. **Oncogene**, v. 21, n. 43, p. 6573–6586, 2002.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443–54, 28 jun. 2012.

TOWNE, J. E. et al. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 14, p. 13677–88, 2 abr. 2004.

TUOMELA, J. et al. Low TLR9 expression defines an aggressive subtype of triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 2, p. 481–493, 2012.

VAN KEMPEN, L. C. L. T. et al. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **European journal of cell biology**, v. 82, n. 11, p. 539–548, 2003.

VAN ROOIJEN, J. M. et al. Immunotherapeutic options on the horizon in breast cancer treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, 18 set. 2015.

WALD, D. et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. **Nature immunology**, v. 4, n. 9, p. 920–927, 2003.

WANG, J. Q. et al. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 367, jan. 2014.

WANG, R. et al. Natural killer cell-produced IFN- and TNF- induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1**. Journal of Leukocyte Biology**, 2012.

WEIHUA, Z. et al. Survival of Cancer Cells Is Maintained by EGFR Independent of Its Kinase Activity. **Cancer Cell**, v. 13, n. 5, p. 385–393, 2008.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 1 nov. 2013.

WOO, S.-R.; CORRALES, L.; GAJEWSKI, T. F. The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 250–256, 2015.

XIAO, H. et al. The Toll-Interleukin-1 Receptor Member SIGIRR Regulates Colonic Epithelial Homeostasis, Inflammation, and Tumorigenesis. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 461–475, 2007.

XIAO, H. et al. Loss of single immunoglobulin interlukin-1 receptor-related molecule leads to enhanced colonic polyposis in Apcmin mice. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 574–585, 2010.

YAMAUCHI, H.; STEARNS, V.; HAYES, D. F. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 8, p. 2334–2356, 2001.

YUSUF, N. et al. Protective role of toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 615–622, 2008.

ZAMAI, L. et al. NK cells and cancer. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 7, p. 4011–4016, 2007.

LISTA DE ANEXOS

A) Manuscrito pronto para submissão:

"SIGIRR/IL-1R8 expression modulates cancer-associated inflammation and impairs antitumor immunity in breast cancer".

B) Artigo publicado - Oncotarget 2015:

"Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice.

C) Súmula curricular.

A) Manuscrito pronto para submissão:

SIGIRR/IL-1R8 expression modulates cancer-associated inflammation and impairs antitumor immunity in breast cancer

Luís Felipe I. Campesato[1,2,3], Ana Paula M. Silva[1], Luna Minute[4], Fabio C. Navarro[2,3], Rafael F. Zanin[5], Marina Marçola[6], Fabio Pasqualini[4], Matteo Massara[4], Martina Molgora[4], Pedro A. F. Galante[2], Nadia Polentarutti[4], Federica Riva[7], Erico T. Costa[1,2], Alberto Mantovani[8], Cecilia Galanda[4*], Anamaria A. Camargo[1,2*]

[1]Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, São Paulo, SP, Brazil.

[2]Centro de Oncologia Molecular – Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, SP, Brazil.

[3]Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

[4]Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Italy.

[5]Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

[6]Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

[7]Department of Veterinary Pathology, University of Milan, Milan, Italy.

[8]Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Italy; Humanitas University, Rozzano, Italy.

* Corresponding authors:

Anamaria A. Camargo, Ph.D.

Centro de Oncologia Molecular,

Hospital Sírio-Libanês

Rua Prof. Daher Cutait, 69

01308-060, São Paulo - SP - Brazil

Phone: +55 11 3155-3781

Fax: +55 11 3155-4220

E-mail: aacamargo@mochsl.org.br

Cecilia Garlanda, Ph.D.

Laboratory of Experimental Immunopathology,

Istituto Clinico Humanitas

Via Manzoni, 113

20089, Rozzano - Italy

Tel.: + 39 0282242445.

E-mail: cecilia.garlanda@humanitasresearch.it

Abstract

Tumor cells develop numerous strategies to fine-tune inflammation and avoid detection and eradication by the immune system. Identification of new players that regulate the cellular crosstalk within the tumor microenvironment and promote local immune dysregulation are critical to understand disease progression and to improve therapeutic strategies. Here, we demonstrate that SIGIRR/IL-1R8, a negative regulator of IL-1R and TLRs, is up-regulated in primary breast tumors and promotes tumor growth and metastasis by modulating cancer-related inflammation and impairing anti-tumor immunity. Higher levels of IL-1R8 expression were observed in $HER2^{+}$ and Luminal breast tumor subtypes and IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed mammary epithelial cells inhibited NF-κB activation and the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNFα, CSF2, CSF3, IFN-β1). Conditioned medium from HER2-transformed cells, but not from IL-1R8 knock-down variants, induced M2-macrophage polarization and inhibited natural-killer (NK) cell activation. IL-1R8 deficiency in a transgenic mouse model of breast tumorigenesis (MMTV-neu) significantly delayed tumor onset and reduced tumor incidence, burden and metastasis. No significant differences in tumor growth were observed when MMTV-neu/IL-$1R8^{-/-}$ mice were transplanted with bone marrow from MMTV-Neu/IL-$1R8^{+/+}$ animals, confirming an important role for IL-1R8 expression in non-hematopoietic cells during breast tumorigenesis. A lower infiltrate of mature NK cells, dendritic cells (DCs) and $CD8^{+}$ T cells but higher infiltrate of M2-macrophages and $CD4^{+}$ T cells were present in IL-1R8 expressing tumors. Collectively, our results indicate IL-1R8 expression as a novel tumor immune escape mechanism in breast cancer.

Introduction

During tumorigenesis cancer cells interact with the immune system and actively modify tumor microenvironment to subvert host response, inducing persistent inflammation and suppression of effector T cells (1, 2). This complex crosstalk has been already recognized as a hallmark of cancer development (3) and understanding the molecular pathways involved in the regulation of cancer-related inflammation and immune evasion could enable the development of new treatments or improve the efficacy of existing therapeutics.

In breast cancer, the most frequent malignant tumor of women in America (4), there is a growing body of evidence that tumor cells induce local immune dysregulation via suppression of innate and adaptive immunity and promotion of tumorigenic inflammation (5). Dendritic cells (DCs), which represent an essential link between the innate and adaptive immunity, are both reduced in number and are dysfunctional in breast tumors (6). In addition, it has been shown that overexpression of Human Epithelial Growth Factor-2 (EGFR2 or HER2) in breast tumor cells down-regulates the expression of different components of the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Antigen-Processing machinery and severely impair antigen presentation and recognition by $CD8^+$-T cells (7, 8). Finally, gene expression profiling of breast tumors demonstrated that the up-regulation of genes involved in interferon signaling, antigen presentation, and in the crosstalk between adaptive and innate immune responses is associated with a lower risk of tumor recurrence (9) and breast cancer patients with higher numbers of tumor-infiltrating lymphocytes have improved responses to neoadjuvant chemotherapy (10).

Interleukin-1 receptor 8 (IL-1R8), formerly known as SIGIRR or TIR8, is a member of the IL-1R–like (ILRs) and Toll-like receptors (TLRs) superfamily. ILRs and TLRs activation ignites a signal transduction cascade with potent pro-inflammatory outcomes, including the activation of NF-κB and the secretion of pro-inflammatory cytokines like Type I IFNs and TNFα, and therefore plays an important role in the initiation and amplification of innate immunity and in the orientation of adaptive immunity (11). IL-1R8 is expressed by epithelial cells and leucocytes and it's expression is detected in different tissues, including kidney, liver, lung, and lymphoid organs and in the digestive tract (12). IL-1R8 negatively regulates signaling from IL-1R1, IL-18R, ST2 and several TLRs, such as TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9. Although the anti-inflammatory cytokine IL-37 has recently been suggested to use IL-1R8 as a co-receptor (13, 14), IL-1R8 has been previously described as a decoy receptor for key components of the MyD88 signaling cascade, such as IRAK and TRAF6 and by interfering with ILRs dimerization through its Ig domain (15–17). IL-1R8 therefore act as a break for pro-inflammatory signals, and its expression has been proposed to be essential for tolerance to microbes and for regulating the detrimental effects of innate immunity in pathologic conditions such as sepsis, chronic inflammation and autoimmune diseases (18–21). In addition, IL-1R8-deficiency in mice causes more severe gut inflammation during dextran sulfate sodium (DSS) colitis (22, 23), increases susceptibility to colitis-associated colorectal cancer (23–25) and a more severe and earlier onset of monoclonal B cell expansions in a murine model of chronic lymphocytic leukemia (CLL) (26).

In this study, we show that IL-1R8 is up-regulated in breast tumors and promotes tumor growth and metastasis by tuning inflammation and impairing antitumor immunity. IL-1R8 up-regulation inhibits NF-κB activation, the production of

pro-inflammatory cytokines and shifts immune activation by inducing M2-macrophage polarization, and inhibiting infiltration and activation of NK cells and $CD8^+$-T cells in mammary tumors. Collectively, our results indicate that IL-1R8 expression represents an early tumor immune escape mechanism in breast tumors and support its putative role as a new target for cancer immunotherapy.

Results

IL-1R8 is up-regulated in HER2-transformed breast cells and in primary breast tumors.

We identified IL-1R8 as an up-regulated gene in HER2-transformed breast cells. This model consists of a parental, non-transformed, conditionally immortalized human mammary luminal epithelial cell (HB4a), and its HER2 overexpressing variant (HB4a-C5.2, designated $HB4a^{HER2+}$ for the purpose of this work), stably transfected with full-length HER2 cDNA under the control of the MMTV-LTR promoter and SV40 polyadenylation signal (27). Transcriptional changes associated with HER2-overexpression in this cell model were investigated using Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS). Reliable MPSS tags (5'GATCATAGGGACAGCGG3') assigned to IL-1R8 were more frequently found in the $HB4a^{HER2+}$ library when compared to the HB4a library, indicating that IL-1R8 is up-regulated in the $HB4a^{HER2+}$ variant (36 tpm versus 4 tpm, $P<0.001$). IL-1R8 differential expression in the $HB4a^{HER2+}$ variant was confirmed both at the mRNA and protein level. A 4-fold ($P<0.01$) induction at IL-1R8 mRNA expression level and a 2-fold induction at protein level were observed in $HB4a^{HER2+}$ cells when compared to HB4a (Figure 1A and B).

IL-1R8 up-regulation was also observed in primary breast tumors. By analyzing The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNA-seq expression data from 476 primary breast tumors, we observed that IL-1R8 expression is significantly higher in primary breast tumors compared to normal breast tissue (Median 82 vs. 37 RPKM, $P<2.2e^{-16}$) and higher levels of IL-1R8 expression were observed among $HER2^{+}$ (76.7 RPKM), Luminal A (131.5 RPKM) and Luminal B (127 RPKM) breast tumor subtypes (Figure 1C and D, respectively).

These data indicate that IL-1R8 expression is up-regulated during breast epithelial cell transformation and that IL-1R8 up-regulation is frequently found across all breast cancer subtypes, but particularly in primary HER2^{+} and Luminal breast cancers.

IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells inhibits NF-κB activation and expression of pro-inflammatory cytokines.

NF-κB activation and production of pro-inflammatory cytokines are important endpoints of ILRs and TLRs signaling (28). Gene transfer experiments have shown that IL-1R8 up-regulation inhibits NF-κB activation and production of pro-inflammatory cytokines in HeLa and hepG2 cells after exposure to IL-1 and TLR ligands (28). Therefore, to address the role of IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed cells, HB4a and HB4a^{HER2+} cells were treated with IL-1β and IκBα degradation and NF-κB activation were analyzed by Western blot and EMSA, respectively. IκB degradation was observed shortly after IL-1β treatment in both cell lines, however it was less pronounced in HB4a^{HER2+} cells compared to HB4a cells (Figure 2A). To verify if the observed differences in IκBα degradation were due to IL-1R8 up-regulation in HB4a^{HER2+} cells, we generated HB4a^{HER2+} cell variants stably expressing IL-1R8 shRNAs (HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$) (Figure 2B). After IL-1R8 knock-down, differences in IκBα degradation observed between HB4a and HB4a^{HER2+} disappeared (Figure 2A) and NF-κB activation was enhanced in HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ cells compared to HB4a^{HER2+} cells (Figure 2C).

We next analyzed gene-expression of different pro-inflammatory cytokines in HB4a and HB4a^{HER2+} cells after stimulus with IL-1β. Shortly after stimulus, an increase in IL-6, IL-8, CSF2, CSF3, IFN-β1 and TNFα expression was observed in both cell lines, although the induction of these inflammatory mediators was significantly lower in HB4a^{HER2+}cells compared to HB4a cells. Notably, IL-1R8 knockdown in HB4a^{HER2+} cells rescued the expression of these different cytokines after IL-1β stimulus to the same levels observed in parental HB4a cells (Figure 2D).

Altogether, these results indicate that IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells inhibits NF-κB activation and expression of pro-inflammatory cytokines.

IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells skews macrophage polarization and inhibits NK cell activation.

Since we observed that IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells can negatively modulate the expression of pro-inflammatory cytokines, we next decided to investigate if IL1-R8 expression in HER2-transformed breast cells could participate in the crosstalk between tumor and immune effector cells with well stablished roles in tumorigenesis present in the tumor microenvironment (29, 30).

Macrophages represent the major component of the leukocyte infiltrate and are critical effectors cells in innate immunity and T-cell mediated immune response. Tumor associated macrophages (TAMs) have generally an anti-inflammatory M2-phenotype with pro-tumoral properties which is mainly determined by the local cytokine environment (31). To investigate if IL1-R8 up-regulation in HER2-

transformed breast cells could induce M2-macrophage polarization, THP-1 macrophage-like cells (32) were cultured in the presence of conditioned medium from IL-1β stimulated HB4a^{HER2+} and HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ cells. THP-1 macrophage-like cells cultured with conditioned medium from HB4a^{HER2+} expressed significantly higher levels of the mannose receptor M2-like marker CD206 (Mean Fluorescence Intensity 2551±43 vs. 1135±11, *P*=0.034) and a lower levels of the T-cell co-stimulatory M1-like marker CD86 (936.7±38 vs. 3157±472, *P*=0.009) when compared to HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ cells (Figure 3A and B), indicating that IL-1R8 up-regulation in HB4a^{HER2+} cells can skew macrophage polarization towards an M2-phenotype.

NK cells also represent important players in the control of tumor growth and metastasis. They constitutively express a lytic machinery able to kill target cells independently from antigen presentation (30). To investigate whether IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells could modulate NK cell activation, NKL cell line was cultured in the presence of either HB4a^{HER2+} or HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ cells and IFN-γ levels in the culture supernatant was used to indirectly measure NK activation. Lower IFN-γ levels were detected in supernatants of NKL cells co-cultured with HB4a^{HER2+} compared to HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ (31.8 ± 7.7 vs 65.9 ± 10.4, *P*=0.03), indicating an important role for tumor's IL-1R8 expression in the activation of NK cells and modulation of IFN-γ production (Figure 3C).

Collectively, these results indicate that IL-1R8 up-regulation in HER2-trasnformed breast cells is capable of regulating the polarization and activation of innate immune cells *in vitro*.

IL-1R8 deficiency in a transgenic MMTV-neu mouse model delays tumor onset and reduces tumor burden and metastasis.

To further investigate the role of IL-1R8 in breast tumor development, we bred IL-1R8 knock-out mice (IL-1R8$^{-/-}$) onto a transgenic mouse model of spontaneous breast tumorigenesis mediated by HER2/neu oncogene (MMTV-neu) to generate MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ animals. The presence and absence of IL-1R8 expression in mammary tumors from MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice, respectively, was confirmed by immunohistochemistry (IHC) and its co-localization with HER2 expression by immunofluorescence (Figure 4A and S1).

Significant differences in tumor incidence, onset and burden were observed between the two groups of animals. As shown in Figure 4B, at week 24, 60% of the animals in the MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ group developed breast tumors compared to 95% in the group of MMTV-neu/IL-1R8-WT mice (P=0.0003). MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice also presented later tumor onset compared to MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice (23 weeks on average vs. 20.5 weeks on average). In addition, the average number of mammary tumors per animal was significantly lower in the MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ group compared to the MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$. At week 24, MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice displayed on average 2 tumors per animal compared to 4 tumors per animal in age-matched MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice (Figure 4C). Moreover, at week 24, tumors from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice were 3 times smaller than tumors from MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice (P=0.02) (Figure 4D). Finally, at week 30, the number of metastatic lesions in the lungs of MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice was significantly lower compared to MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ animals (0.7 versus 8.4 lesions/animal, P=0.03) (Figure 4E).

Bone marrow chimeras were then used to assess the relative importance of IL-1R8 expression in hematopoietic and non-hematopoietic (including tumor) cells in the “protection” against tumor growth observed in MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice. No significant differences in tumor incidence, onset and burden were observed when MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice were transplanted with bone marrow from MMTV-Neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice, confirming an important role for IL-1R8 expression in non-hematopietic cells during breast tumorigenesis (Figure S2).

Besides the observed differences in tumor incidence, onset and burden, tumors from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice and MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice displayed different histopathological characteristics. At week 24, tumors from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice displayed less aggressive features, such as tissue necrosis and cellular atypia, while no statistical difference was observed in the number of mitosis per field when compared to MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ tumors. Furthermore, MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ tumors exhibited an expansive growth pattern while MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ were significantly more invasive and infiltrative (Table S1 and Figure 4F). Collectively, our results reveal that IL-1R8 expression in breast tumor cells favors tumor formation, progression and metastatic dissemination.

IL-1R8 deficiency in a transgenic MMTV-neu mouse model attenuates local inflammation and promotes antitumor immunity.

Since we observed that IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells skews the polarization and activity of immune cells *in vitro*, we next analyzed tumor leukocyte infiltrate from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice collected at week 24. The total number of tumor-infiltrating leukocytes (CD45^{+} cells) was higher in IL-1R8 expressing tumors compared to tumors from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ (P=0.02,

Figure 5A) mice, but the percentage of DC (F4/80$^-$CD11c$^+$/CD45$^+$ cells) and NK cells (CD3$^-$CD49b$^+$/CD45$^+$ cells) was significantly lower compared to MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ tumors (*P*=0.04, Figure 5C). Conversely, the percentage of TAMs (CD11b$^+$F4/80$^+$/CD45$^+$ cells) was significantly higher in IL-1R8 expressing tumors (Figures 5B and 5C, *P*=0.009 and *P*=0.03). Noteworthy, a lower percentage of mature NK cells (CD11b$^+$ cells/NK cells, *P*=0.02) and a higher percentage of immature macrophages (CD11b$^+$F4/80$^+$Ly6C$^+$ cells/Macrophages) was observed in IL-1R8 expressing tumors, although the later difference did not reach statistical significance (*P*=0.052) (Figures 5E and S3D, respectively).

Although no differences were observed in the percentage of infiltrating polymorphonuclear cells (PMN) (CD11b$^+$Ly6G$^+$ cells), B-lymphocytes (CD19$^+$ cells) or T-lymphocytes (CD3$^+$ cells) between MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ tumors (Figure S3A-C), IL-1R8 expressing tumors presented a significantly higher infiltrate of CD4$^+$ T cells (*P*=0.03) and lower infiltrate of CD8$^+$ T cells in CD3+ cells (*P*=0.02), with a lower CD8$^+$/CD4$^+$ T cell ratio (*P*=0.02, Figure 5D). Accordingly, at week 24, breast tumors from IL-1R8 expressing tumors presented higher intratumoral levels of IL-1β (*P*=0.02) and of the pro-angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF, *P*=0.003), while significantly lower levels of IFN-γ (*P*=0.04, Figure 6A). Lower levels of IL-12 were also observed in tissue homogenates from IL-1R8 expressing tumors compared to homogenates from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ tumors, but the observed differences were not statistically significant (*P*=0.08).

Similar results were obtained when leukocyte infiltrate analysis was performed in tumors with equivalent sizes (tumor volume of 500mm^3 - size-point group). The average time for MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice to develop a 500 mm^3 tumor was 34

weeks compared to 29 weeks for MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice (*P*=0.003, Figure S5A). A lower percentage of DCs and CD8^{+}/CD4^{+} T cell ratio was observed in IL-1R8 expressing tumors (*P*<0.05, Figures S5B-C). However, in contrast to tumors at week 24, we did not observe statistically significant differences in the percentage of infiltrating TAMs or NK cells between both groups, although a smaller population of mature NK cells (CD11b^{+}NK cell /total NK cells) was still present in IL-1R8 expressing tumors (*P*=0.02, Figure S4D).

Since in our *in vitro* cell model we demonstrated that IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells skews macrophage polarization towards an M2-phenotype, we therefore decided to characterize the phenotype of TAMs in MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ tumors from the size-point groups. After purification of CD11b^{+}/Ly6G^{-} cells, MHCII^{high} (CD11b^{+}/Ly6C^{-}/MHCII^{high}) and MHCII^{low} (CD11b^{+}/Ly6C^{-}/MHCII^{low}) macrophages and monocytes (CD11b^{+}/Ly6C^{+}/MHCII^{-}) were sorted to >98% purity to analyze the expression of M1 and M2-like markers as described (33). As shown in Figure 6B and S6, MHCII^{high} and MHCII^{low} macrophages and monocytes from IL-1R8 expressing tumors displayed higher levels of M2-like markers (CD206, Ym1, TNFα, STAB1, IL-10) in comparison to macrophages and monocytes from MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ tumors.

Altogether, these results suggest that IL-1R8 expression in tumor cells plays a critical role in the maintenance of a local pro-tumoral inflammatory environment and is associated with inhibition of Type I immune response and infiltration of protective lymphoid cells.

Discussion

In advanced tumors the immune balance is largely tilted towards pro-tumor inflammation and local dysregulation of the adaptive immune response (34). It is the presence and abundance of different cytokines in tumor microenvironment that determine the polarization and activation state of different immune cells and dictate in which direction the immune balance is skewed and whether cancer-promoting inflammation or antitumor immunity will prevail (35, 36). Here we demonstrate for the first time that IL-1R8, a critical modulator of innate immune sensors, is up-regulated in breast tumors and, by modulating NF-κB activation and the expression of pro-inflammatory cytokines in tumor microenvironment, acts as a fine-tuner of cancer associated inflammation and impairs the activation of an antitumor immune response.

Using a mammary epithelial cell model, we demonstrated that IL-1R8 is up-regulated in a HER2-mediated cell transformation. In addition, IL-1R8 differential expression in primary breast tumors was confirmed using public gene expression data and higher levels of IL-1R8 expression were observed in $HER2^{+}$ and notably in Luminal A and B subtypes. This result suggests that distinct oncogenic signals may induce up-regulation of IL-1R8 expression and it may be an event associated with cell transformation process *per se*. Indeed, induction of an constitutively activated inflammatory signaling circuit is known to be formed during cell transformation process (37). Both abnormal and constitutive inflammatory signaling in cancer cells may not only be provoked by extrinsic inflammatory signals from the tumor microenvironment, but can also occur in a cancer cell-intrinsic fashion (1). Therefore, mechanisms to dampen excessive local inflammation, inappropriate activation of

immune cells and/or production of pro-inflammatory cytokines may play a role as tumor immune evasion mechanisms.

We also demonstrated that IL-1R8 up-regulation in HER2-transformed breast cells negatively modulates NF-κB activity, a major transcription factor involved with cell survival, inflammation and immunity (38), and inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines, including some involved in macrophage polarization (CSF2, IFN-β1 and TNFα) and NK cell activation (IFN-α/β) (39–41). Indeed, we observed that cytokines expressed by HER2-transformed breast cells can skew macrophage polarization towards an M2-phenotype and inhibit NK cell activation *in vitro*.

IL-1R8 role during breast tumor development and progression was further analyzed using a transgenic mouse model of spontaneous breast tumorigenesis mediated by HER2/neu oncogene. Although HER2 overexpression is sufficient to drive mammary lesions in these transgenic animals, the pace of tumor progression is known to be significantly influenced by tumor-elicited mechanisms of immunosuppression (43, 44). We showed that IL-1R8 expressing mammary tumors grew faster and were more metastatic, displaying more aggressive features, such as tissue necrosis, cellular atypia and an invasive growth pattern. Notably, the "protected" phenotype observed in MMTV-neu/IL-1R8-KO mice was not reversed when these mice were transplanted with bone marrow from MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ animals, confirming an important role played by IL-1R8 expression in non-hematopoietic cells during breast tumorigenesis, likely tumor cells since other components of tumor stroma such as fibroblasts and endothelial cells have been shown to not express IL-1R8 (15). Our results are in contrast with previous studies on the role of IL-1R8 in colitis-associated cancer and chronic lymphocytic leukemia (24,

26), and may be explained by… (the distinct mechanisms of tumorigenesis among these tumor models and distinct chronic inflammatory component associated with mammary carcinogenesis).

The outcome of an immune response towards a tumor is largely determined by the type of immune response elicited and a tumor-directed immune response, involving cytolytic $CD8^+$ T cells, Th1 cells and NK cells, is known to protect against tumor development and progression (45). In the present study, a lower leukocyte infiltrate known to be associated with antitumor immunity were observed in IL-1R8 expressing tumors, including mature NK cells, DCs and $CD8^+$-T cells. Conversely, immature macrophages and $CD4^+$- T cells were more abundant in these tumors compared to IL-1R8-deficient tumors, indicating that IL-1R8 expression in tumor cells can promote tumor growth by shifting Type I immune response and infiltration of protective lymphoid cells. Indeed, it has been described that in breast cancer, the presence of tumor infiltrating lymphocytes with high $CD4^+/CD8^+$ and Th2/Th1 ratio is indicative of poor prognosis (46). We also observed that macrophages in IL-1R8 expressing tumors showed enhanced expression of molecules associated with M2-phenotype. TAMs usually acquire a skewed M2-like phenotype oriented to tumor promotion and it has been reported that Th2 $CD4^+$ T cells promote breast tumor progression and metastasis by educating TAMs to produce pro-angiogenic and pro-metastatic factors (45). Therefore M2-macrophage polarization induced by IL-1R8 expressing tumors may also account for enhanced tumor growth and metastasis observed in MMTV-Neu/IL-1R8$^{+/+}$ mice.

Major mechanisms known to actively promote tumor growth include the inhibition of tumor antigen–specific T cells by intratumoral T-regulatory cells, a shift

from an antitumorigenic Th1 immune response to a pro-tumorigenic Th2 immune response, and the production of soluble factors by tumor cells that directly inhibit dendritic and T-cell function. Release of danger signals (DAMPs) from dying cells, such as HMGB1 and nucleotides, which together are able to activate TLR4 and the inflammasome to stimulate production of IL-1β via Myd88-dependent pathway, also exert a critical step for adaptive anti-tumor immunity (47). TLR activation may also cause tumors to regress by increasing vascular permeability (48) and by directly or indirectly recruiting leukocytes, resulting in tumour lysis by NK and cytotoxic T-cells. In addition, it has been previously described that silencing of TLR4 and TLR9 in tumors are associated with mammary tumor progression and decreased activation of IFN-γ-dependent antitumor T-cell responses (49–51). In this context, our findings reveal an important tumor-promoting function for IL-1R8, a critical break for TLR and ILR stimulus, in breast tumors by supporting cancer associated inflammation and impairing anti-tumor immunity. IL-1R8 expression by tumor cells can thus be considered a novel tumor immune escape mechanism acting during early stages of immune evasion. Strategies to block IL-1R8 activity can potentially be exploited as a novel immunotherapy strategy in breast cancer.

Methods

Cell lines

The human epithelial mammary cell line HB4a and its variant HB4a – C5.2 were gently donated by Dr. MJ O'Hare (Institute of Cancer Research, Sutton, UK) and cultured using RPMI medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 5 μg/mL insuline (Sigma-Aldrich Co.), 5 μg/mL hydrocortisone and 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich Co.). The human natural killer cell line (NKL) and the human leukocytic monocyte cell line (THP-1) were obtained by ATCC (Manassas, VA, USA) and were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), and 200 U/mL of human recombinant IL-2 (Biolegend, San Diego, CA, USA) or 0.05 mM 2-mercaptoethanol and 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich Co.), respectively. Cells were kept at 37ºC in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Generation of IL-1R8-knockdown cells

HB4a-C5.2 cells were transfected with shRNA for SIGIRR/IL-1R8 (5´-GGAGAUAAACGACGGGAAGCUCUAC-3´ and 3´-CACCUCUAUUUGCUGCCCUUCGAGAUG-5´) or the empy vector, TrifectaTM Kit (IDT – Integrated DNA Technologies), using Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) with a reverse transfection protocol and clones were selected with 2 ug/mL Puromycin (Promega). For the sake of simplicity, results obtained for the wild-type cells and cells transfected with a control shRNA vector (EV1) were grouped throughout the text and presented as the $HB4a^{HER2+}$, whereas results obtained for

two independent IL-1R8-shRNA clones (63.2 and 7B13) were grouped and presented as HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$.

Immunoblot analysis

Proteins were extracted using lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF and cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Quantified total protein extracts were resolved on a 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide electrophoresis gel, transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) and probed with antibody anti-mSIGIRR/IL-1R8 Ab (ProSci, San Diego, CA, USA), anti-IκB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) anti-β-tubulin (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) or anti-mVinculin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibodies overnight in 0.1% Tween-20 with 5% milk. Membranes were incubated for 60 min at room temperature in 0.1% Tween-20 with the secondary HRPT-conjugated antibody (GE Healthcare, Cleveland, OH, USA). Reactive proteins were visualized with the ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Cleveland, OH, USA) according to the manufacturer's recommendations. The nuclear protein extract and the Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for NF-kB was performed as previously described (52).

***In silico* analysis of gene expression**

The Cancer Genome Atlas (TCGA) breast invasive carcinoma expression data, clinical information and tumor classification were downloaded from TCGA Data Portal (https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/). All data was processed on February 2014. The transcriptome of 576 samples was sequenced using Illumina TruSeq Kit libraries

and Ilumina Hi-Seq 2000 platform. Gene and transcript quantification was generated in the by SeqWare framework using the RNASeqAlignmentBWA workflow and gene RPKM was used as a measurement of gene expression level. Initially, we used matched and unmatched samples to compare the expression level of IL-1R8 across tumoral and normal tissue. We calculated the significant differences of expression level distribution using Student's t-test. We also used metadata of clinical classification of tumors to subdivide tumoral samples in Basal-like, HER2-amplification, Luminal A and Luminal B. Again, to test the significance of the difference of transcription level between these groups, we used Student's t-test.

Gene expression analysis

Total RNA was extracted using Trizol (Life Technologies, New York, NY, USA). Reverse transcription (RT) was carried out with 2 µg DNA-free total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies). Quantitative PCR (qRT-PCR) was performed using a 7300 Real-time PCR System and SYBR Green (Life Technologies). Relative expression levels were calculated as described (53). The list of primers used is found in **Table S2**.

Supplemental Information

Supplemental material includes Extended Methods, six figures, and three tables.

References

1. Mantovani A et al. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454(7203):436–44.

2. Elinav E et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. [Internet]. *Nat. Rev. Cancer* 2013;13(11):759–71.

3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144(5):646–674.

4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014 [Internet]. *Atlanta Am. Cancer Soc.* [published online ahead of print: 2014];http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf. cited

5. Ernst B, Anderson KS. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer [Internet]. *Curr. Oncol. Rep.* 2015;17(2):5.

6. Pockaj B a et al. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2004;11(3):328–339.

7. Vertuani S et al. HER-2/neu mediated down-regulation of MHC class i antigen processing prevents CTL-mediated tumor recognition upon DNA vaccination in HLA-A2 transgenic mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009;58(5):653–664.

8. Herrmann F et al. HER-2 / neu-Mediated Regulation of Components of the MHC Class I Antigen-Processing Pathway HER-2 / neu-Mediated Regulation of Components of the MHC Class I Antigen-Processing Pathway2004;(Cmv):215–220.

9. Ascierto ML et al. A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients [Internet]. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131(3):871–880.

10. Denkert C et al. *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. 2010:

11. Garlanda C, Anders HJ, Mantovani A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol.* 2009;30(9):439–446.

12. Polentarutti N et al. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur. Cytokine Netw.* 2003;14(4):211–218.

13. Li S et al. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8 [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015;112(8):201424626.

14. Nold-Petry C a et al. IL-37 requires the receptors IL-18Rα and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction [Internet]. *Nat. Immunol.* 2015;8(February 2014). doi:10.1038/ni.3103

15. Wald D et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling.. *Nat. Immunol.* 2003;4(9):920–927.

16. Qin J, Qian Y, Yao J, Grace C, Li X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and Toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2005;280(26):25233–25241.

17. Bulek K et al. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response.. *J. Immunol.* 2009;182(5):2601–2609.

18. Blok DC et al. Single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule impairs host defense during pneumonia and sepsis caused by Streptococcus pneumoniae.. *J. Innate Immun.* 2013;542–552.

19. Drexler SK et al. SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2249–2261.

20. Maciej Lech, Veronika Skuginna, Onkar P. Kulkarni, Jing Gong, Tiandi Wei, Robert W. Stark, Cecilia Garlanda, Alberto Mantovani HJA. Lack of SIGIRR/TIR8 aggravates hydrocarbon oil-induced lupus nephritis. *J. Pathol.* 2010;220(2):114–125.

21. Lech M et al. Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens.. *J. Exp. Med.* 2008;205(8):1879–1888.

22. Garlanda C et al. Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(10):3522–3526.

23. Xiao H et al. The Toll-Interleukin-1 Receptor Member SIGIRR Regulates Colonic Epithelial Homeostasis, Inflammation, and Tumorigenesis. *Immunity* 2007;26(4):461–475.

24. Garlanda C et al. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res.* 2007;67(13):6017–6021.

25. Xiao H et al. Loss of single immunoglobulin interlukin-1 receptor-related molecule leads to enhanced colonic polyposis in Apcmin mice. *Gastroenterology* 2010;139(2):574–585.

26. Bertilaccio MTS et al. Lack of TIR8 / SIGIRR triggers progression of chronic lymphocytic leukemia in mouse models. *Blood* 2011;118(3):660–669.

27. Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. New model of erbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. *Int. J. Cancer* 1999;80(3):477–484.

28. Dunne A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. [Internet]. *Sci. STKE* 2003;2003(171):re3.

29. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006;124(2):263–266.

30. Zamai L et al. NK cells and cancer.. *J. Immunol.* 2007;178(7):4011–4016.

31. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):315–322.

32. Fabio Stossi, Zeynep Madak-Erdoğan and BSK. Macrophage-Elicited Loss of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells via Involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 Genomic Locus. *Oncogene* 2012;29(6):997–1003.

33. Laoui D et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res.* 2014;74(1):24–30.

34. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 2011;140(6):883–899.

35. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 2007;117(5):1175–1183.

36. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Adv. Immunol.* 2006;90:1–50.

37. Rokavec M, Luo J-L. The transient and constitutive inflammatory signaling in tumorigenesis. [Internet]. *Cell Cycle* 2012;11(14):2587–8.

38. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker.. *Nat. Immunol.* 2011;12(8):715–723.

39. Swann JB et al. Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function.. *J. Immunol.* 2007;178(12):7540–7549.

40. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 2012;122(3):787–795.

41. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton J a. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling.. *J. Leukoc. Biol.* 2009;86(2):411–421.

42. Bandini S et al. Early onset and enhanced growth of autochthonous mammary carcinomas in C3-deficient Her2/neu transgenic mice. [Internet]. *Oncoimmunology* 2013;2(9):e26137.

43. Ambrosino E et al. Immunosurveillance of Erbb2 carcinogenesis in transgenic mice is concealed by a dominant regulatory T-cell self-tolerance. *Cancer Res.* 2006;66(15):7734–7740.

44. Rolla S et al. Erbb2 DNA vaccine combined with regulatory T cell deletion enhances antibody response and reveals latent low-avidity T cells: potential and limits of its therapeutic efficacy.. *J. Immunol.* 2010;184(11):6124–6132.

45. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression.. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):212.

46. Kohrt HE et al. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005;2(9):0904–0919.

47. Ghiringhelli F et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors.. *Nat. Med.* 2009;15(10):1170–1178.

48. Garay RP et al. Cancer relapse under chemotherapy: Why TLR2/4 receptor agonists can help. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;563(1-3):1–17.

49. Yusuf N et al. Protective role of toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer Res.* 2008;68(2):615–622.

50. Tuomela J et al. Low TLR9 expression defines an aggressive subtype of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012;135(2):481–493.

51. Ahmed A, Wang JH, Redmond HP. Silencing of TLR4 Increases Tumor Progression and Lung Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2012; doi:10.1245/s10434-012-2595-9

52. Ferreira ZS et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J. Pineal Res.* 2005;38(3):182–188.

53. Pfaffl MW, Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. [Internet]. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.

Figure legends.

Figure 1. IL-1R8 expression is up-regulated in a HER2-transformed breast cell model and in different breast tumors subtypes. (A) IL-1R8 mRNA expression by qRT-PCR and **(B)** protein expression by western-blot in HB4a and HB4a^{HER2+} epithelial mammary cell lines (n = 3). ***P*<0.01, unpaired Student's t test. **(C)** RNAseq bioinformatics analysis of IL-1R8 expression between normal (n=100) and tumoral (n=476) mammary tissue using public data from The Cancer Genome Atlas (TCGA). *P*<2.2e-16, unpaired Student's t test. **(D)** RNAseq bioinformatics analysis of IL-1R8 expression between normal mammary tissue and different molecular subtypes of breast cancer from TCGA data. a) P=1.133e^{-06}, b) P= 7.203e^{-08}, c) P< 2.2e^{-16}, d) P< 2.2e^{-16}, unpaired Student's t test. **(C-D)** Data is shown as the group median value in RPKM ± interquartile range.

Figure 2. IL-1R8 knockdown promotes higher NF-κB activation and expression of pro-inflammatory cytokines. (A) IκBα protein levels by Western-blot in HB4a, HB4a^{HER2+} and HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ cells stimulated with 5 ng/mL of IL-1β for 15 minutes. **(B)** IL-1R8 protein expression by western-blot (upper part) and mRNA expression by qRT-PCR (lower part) in IL-1R8-Knockdown clones. Control cells HB4a-c5.2 and Empty-vector were grouped as HB4a^{HER2+} and IL-1R8-shRNA knockdown clones 63.2 and 7B13 were grouped as HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$. **(C)** Electromobility shift assay (EMSA) for NF-κB of nuclear extracts of cells treated or not with IL-1β 5 ng/mL for 24 hours. Arrow indicates the position of NF-κB complex; In the middle, a representative image of HB4a^{HER2+} (EV1 cell line) and HB4a$^{HER2+/IL1R8KD}$ (63.2 cell line). On the right side of the image is a densitometry analysis of band intensity. **(D)** Cytokines expression of cells treated with IL-1β 5 ng/mL for 1 hour by qRT-PCR. Expression relative to non-treated cells. **(A-D)** Representative results of 3 independent experiments are shown (n = 3). Statistical analysis: unpaired Student's t test *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, NS: not significant.

Figure 3. IL-1R8 knockdown in HER2-transformed cells promotes a differential activation of leukocytes *in vitro*. (A) Representative FACS plots showing M1-marker CD86 and M2-marker CD206 expression in THP-1 macrophage-like cells under treatment with IL-4 (30 ng/mL), LPS (25 ng/mL) or $HB4a^{HER2+}$ and $HB4a^{HER2+/IL1R8KD}$ CM for 24 hours. **(B)** CD86 and CD206 mean fluorescence intensity (MFI). **(C)** IFN-γ levels in the supernatants of NKL cells, $HB4a^{HER2+}$ or $HB4a^{HER2+/IL1R8KD}$ transformed breast cells cultured separately or in co-culture with NKL cells (beige background), determined by ELISA; (A-D) Representative results of 3 independent experiments are shown (n = 3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, unpaired Student's t test.

Figure 4. IL-1R8-deficiency delays tumor development and reduces tumor burden in a transgenic MMTV-neu animal model. (A) Staining of IL-1R8 in mammary tumors from MMTV-neu mice by IHC; a) Magnification 10x, b) 20x. Scale bar: 50 µM; **(B)** Kaplan–Meier analysis of tumor-free survival of MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ (n=27) and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ (n=37). Log-rank test, *P*=0.0003. **(C)** Average number of mammary tumors per mouse over time (weeks). **P*<0.05 and ***P*<0.01, unpaired Student's t test. **(D)** Average total tumor volume per mouse over time (weeks). **P*=0.024, paired Student's t test. **(E)** Number of lung metastatic lesions per mouse at 30 weeks of age. On the left, dotted line reveals regions of metastatic lesions. Scale bar: 50 µM. **P*=0.024, unpaired Student's t test. **(F)** Hematoxylin and eosin (HE) staining of mammary tumors from 24-weeks old mice revealing distinct growth features. Left image: MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ infiltrative growth pattern (dotted line) and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ expansive growth pattern (dotted line). Scale bar: 200 µM.

Figure 5. IL-1R8-deficiency promotes a protective tumor immune infiltrate in MMTV-neu mice. (A) IHC analysis of leukocytes ($CD45^+$) and **(B)** macrophage ($F4/80^+$) infiltration in MMTV-neu/IL-$1R8^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-$1R8^{-/-}$ mammary tumors. Quantification as % of mean positivity per tumor. Scale bar: 50 µM. **(C)** Leukocyte infiltrate analysis by FACS. Macrophages ($CD11b^+F4/80^+$), DCs ($CD11b^+F4/80^-CD11c^+$), Natural-Killer cells ($CD3^-CD49b^+$). Results represented as % of $CD45^+$ cells. **(D)** FACS analysis of $CD4^+$ and $CD8^+$ population of T-cells. Results represented as % of CD3+ cells. **(E)** FACS analysis of mature NK cell population ($CD11b^+CD49b^+$/Total NK cells). **(A-E)** *P<0.05 and **P<0.01, unpaired Student's t test.

Figure 6. IL-1R8 expression regulates cancer-related inflammation and the polarization of TAMs. (A) Protein levels of intratumoral cytokines in tumor homogenates from MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice by ELISA. **(B)** Analysis by qRT-PCR of selected M1 and M2 markers of two populations of tumor-associated macrophages (TAMs), MHC^{high} and MHC^{low}, infiltrating mammary tumors in MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ (n=4) and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ (n=4) mice (mean ± SEM). Data were relative to 18S expression and normalized versus the mean of wild-type and expressed as mean ± SEM. Statistical analysis: *P<0.05, **P<0.01, unpaired Student's t test.

Figura 1.

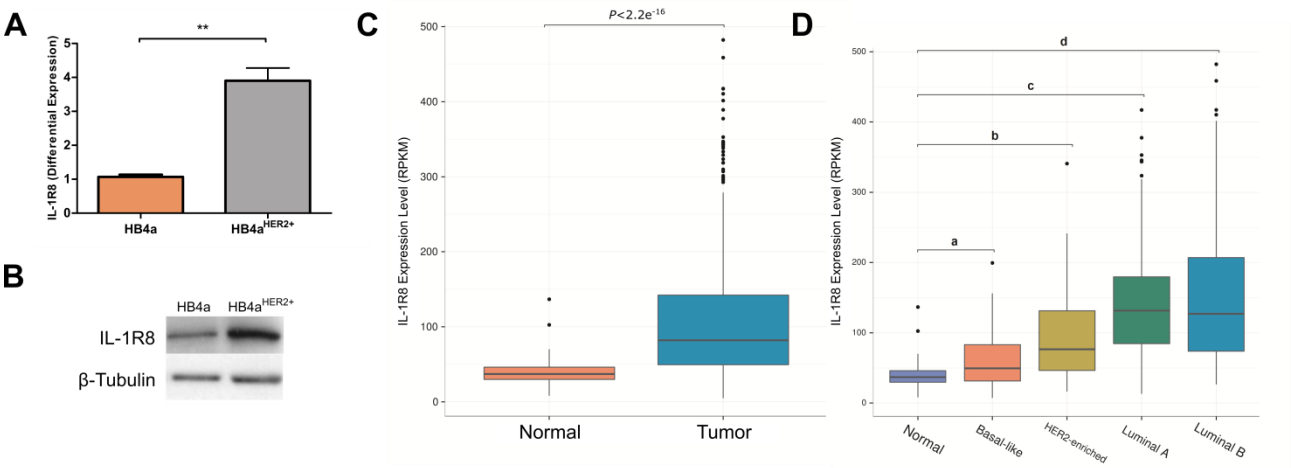

A
**
IL-1R8 (Differential Expression)
HB4a
HB4a^HER2+
B
HB4a
HB4a^HER2+
IL-1R8
β-Tubulin
C
P<2.2e-16
IL-1R8 Expression Level (RPKM)
Normal
Tumor
D
d
c
b
a
IL-1R8 Expression Level (RPKM)
Normal
Basal-like
HER2-enriched
Luminal A
Luminal B

Figura 2.

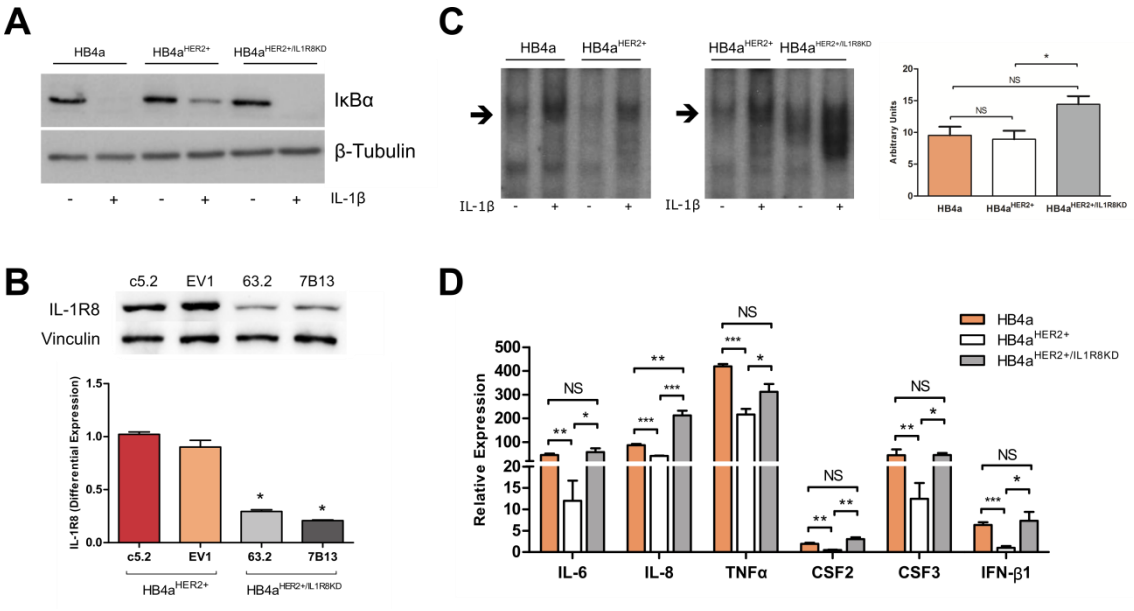

A
HB4a
HB4a HER2+
HB4a HER2+/IL1R8KD
IκBα
β-Tubulin
IL-1β
C
HB4a
HB4a HER2+
HB4a HER2+
HB4a HER2+/IL1R8KD
IL-1β
Arbitrary Units
NS
B
c5.2
EV1
63.2
7B13
IL-1R8
Vinculin
IL-1R8 (Differential Expression)
HB4a HER2+
HB4a HER2+/IL1R8KD
D
HB4a
HB4a HER2+
HB4a HER2+/IL1R8KD
Relative Expression
IL-6
IL-8
TNFα
CSF2
CSF3
IFN-β1

Figura 3.

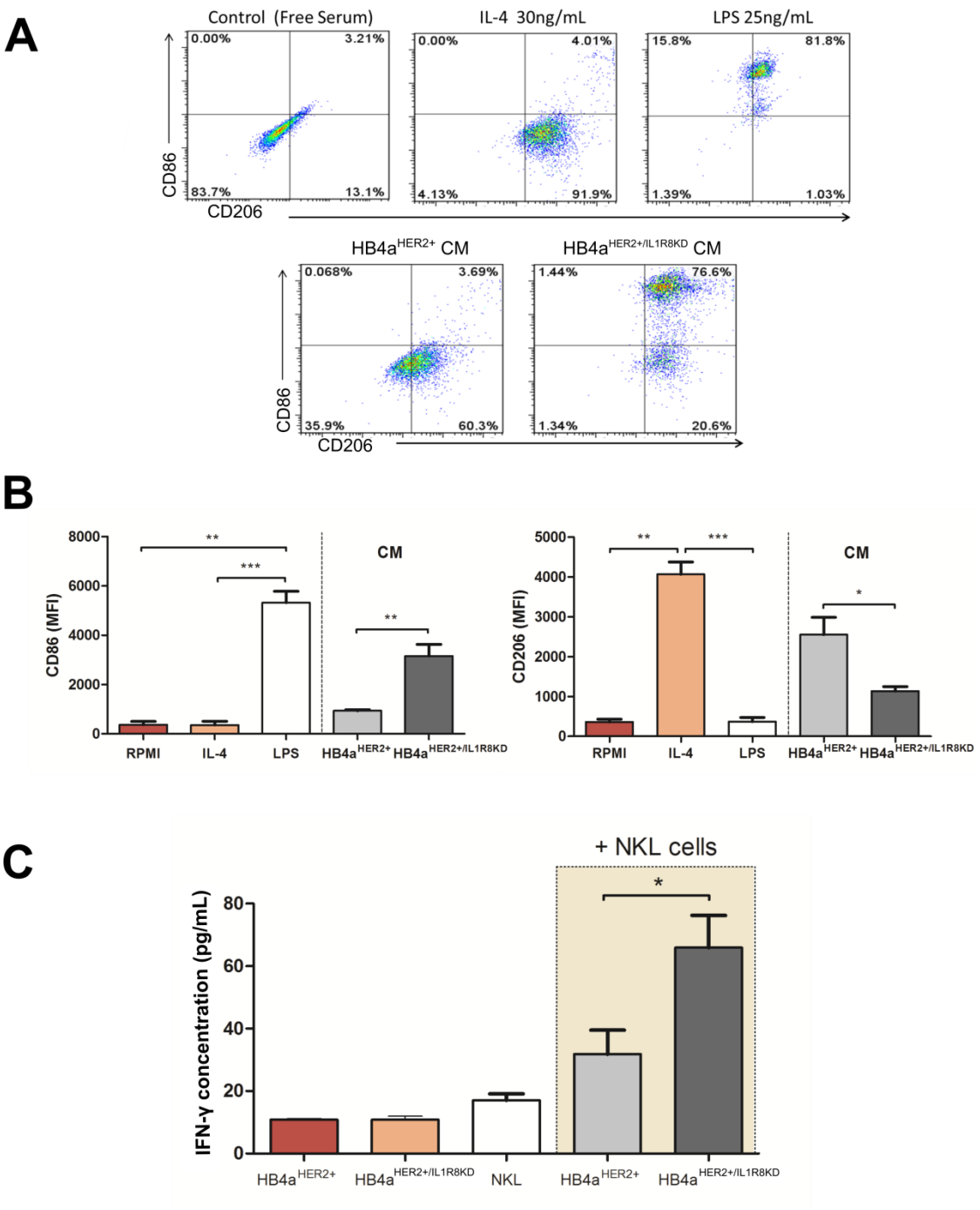

A
Control (Free Serum)
IL-4 30ng/mL
LPS 25ng/mL
0.00%
3.21%
83.7%
13.1%
0.00%
4.01%
4.13%
91.9%
15.8%
81.8%
1.39%
1.03%
CD86
CD206
HB4a HER2+ CM
HB4a HER2+/IL1R8KD CM
0.068%
3.69%
35.9%
60.3%
1.44%
76.6%
1.34%
20.6%
B
CD86 (MFI)
CM
RPMI
IL-4
LPS
HB4a HER2+
HB4a HER2+/IL1R8KD
CD206 (MFI)
C
+ NKL cells
IFN-γ concentration (pg/mL)
NKL

Figura 4.

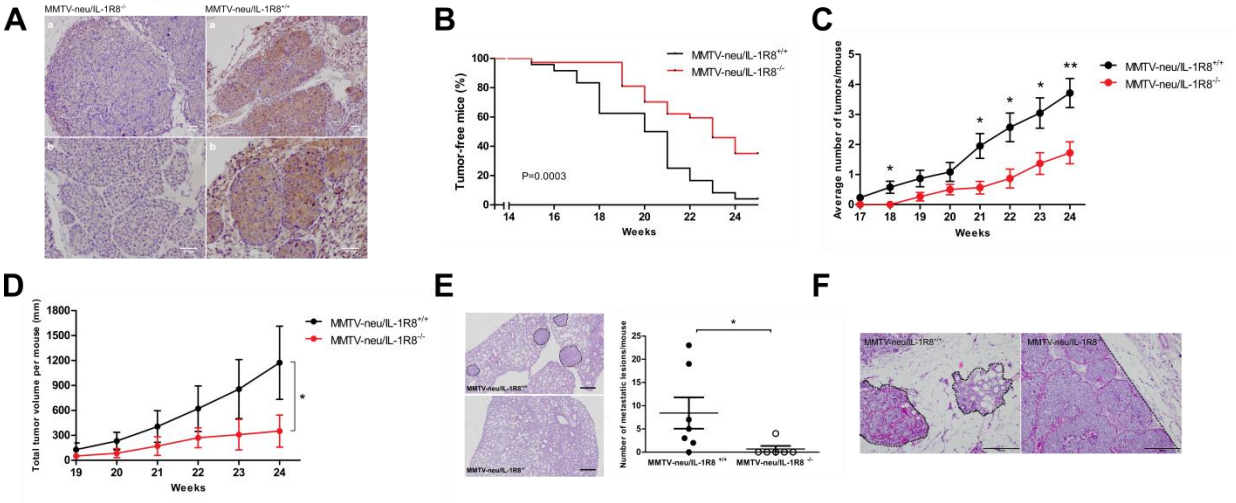

A
MMTV-neu/IL-1R8-/-
MMTV-neu/IL-1R8+/+
B
Tumor-free mice (%)
P=0.0003
Weeks
MMTV-neu/IL-1R8+/+
MMTV-neu/IL-1R8-/-
C
Average number of tumors/mouse
Weeks
MMTV-neu/IL-1R8+/+
MMTV-neu/IL-1R8-/-
D
Total tumor volume per mouse (mm)
Weeks
MMTV-neu/IL-1R8+/+
MMTV-neu/IL-1R8-/-
E
Number of metastatic lesions/mouse
MMTV-neu/IL-1R8 +/+
MMTV-neu/IL-1R8 -/-
F

Figura 5.

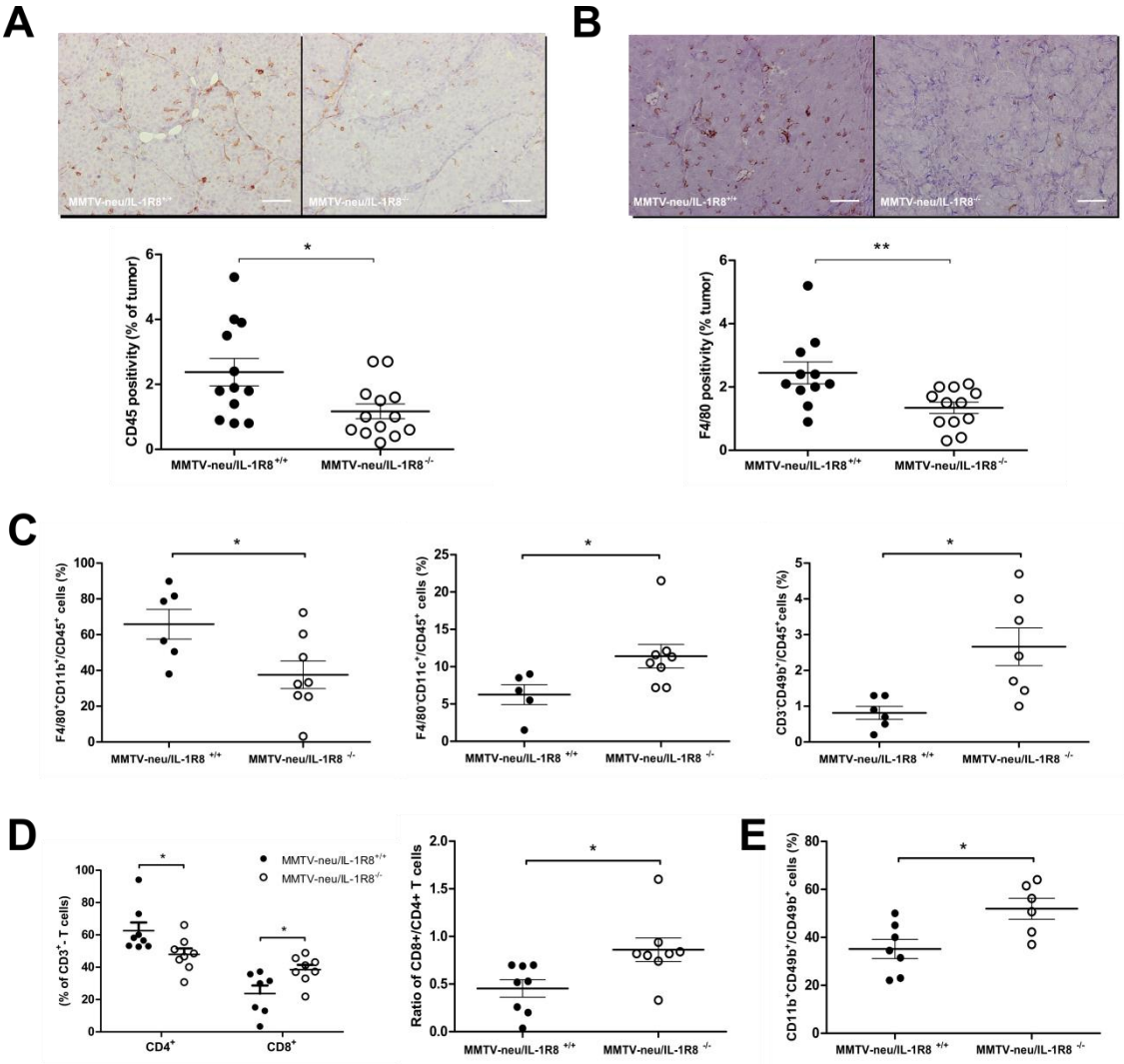
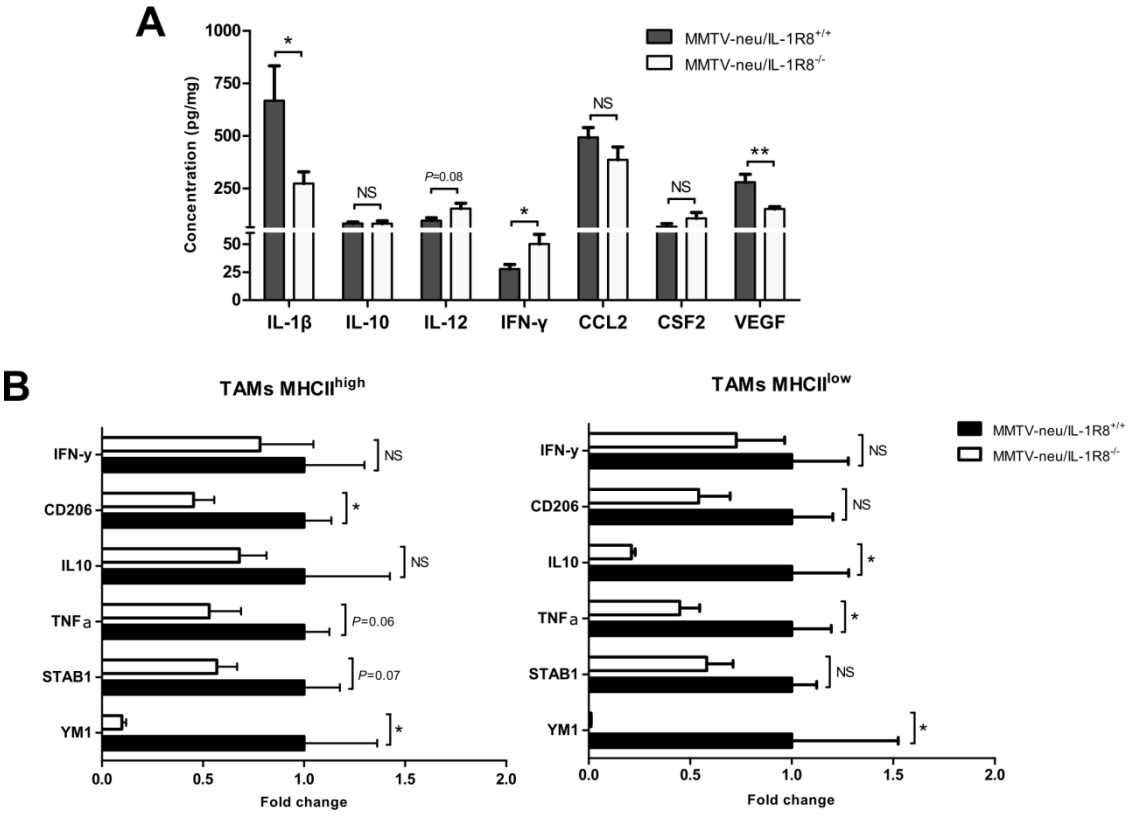

A
MMTV-neu/IL-1R8+/+
MMTV-neu/IL-1R8-/-
CD45 positivity (% of tumor)
B
F4/80 positivity (% tumor)
C
F4/80+CD11b+/CD45+ cells (%)
F4/80+CD11c+/CD45+ cells (%)
CD3-CD49b+/CD45+ cells (%)
D
(% of CD3+ T cells)
CD4+
CD8+
Ratio of CD8+/CD4+ T cells
E
CD11b+CD49b+/CD49b+ cells (%)

Figura 6.


A
Concentration (pg/mg)
1000
750
500
250
50
25
0
MMTV-neu/IL-1R8+/+
MMTV-neu/IL-1R8-/-
*
NS
P=0.08
*
NS
NS
**
IL-1β
IL-10
IL-12
IFN-γ
CCL2
CSF2
VEGF
B
TAMs MHCIIhigh
TAMs MHCIIlow
IFN-γ
CD206
IL10
TNFa
STAB1
YM1
NS
*
NS
P=0.06
P=0.07
*
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Fold change

Supplemental Material

SIGIRR/IL-1R8 expression modulates cancer-associated inflammation and impairs antitumor immunity in breast cancer

Luis Felipe I. Campesato, Ana Paula M. Silva, Luna Minute, Fabio C. Navarro, Rafael F. Zanin, Marina Marçola, Fabio Pasqualini, Matteo Massara, Martina Molgora, Pedro A.F. Galante, Nadia Polentarutti, Federica Riva, Erico T. Costa, Alberto Mantovani, Cecilia Galanda, Anamaria A. Camargo

Table of contents

Extended Methods. **pg. 2**

Table S1. Mammary tumors histopathological features **pg. 8**

Table S2. List of primers for gene-expression analysis **pg. 9**

Table S3. List of primers for mouse genotyping **pg. 10**

Figure S2. Bone-marrow chimera MMTV-neu mice - tumor kinetics **pg. 11**

Figure S3. FACS analysis of mammary tumors: time-point groups **pg. 12**

Figure S4. IHC analysis of CD3+ and Ki67 **pg. 13**

Figure S5. FACS analysis of mammary tumors: size-point groups **pg. 14**

Figure S6. Markers of polarization in tumor-associated monocytes **pg. 15**

Extended Methods

Preparation of conditioned-medium and co-culture experiments

Cells were seeded (4 x 10^5 cells/well) in 6-well plates and treated with 5 ng/mL of IL-1β (Recombinant Human IL-1β - R&D Systems) in RPMI supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS). After a period of 24h, the medium was collected, centrifuged at 12000 x g at 4ºC to remove cell debris and stored at -80ºC until use. For the macrophage polarization assay, the human monocytic cell line THP-1 was differentiated to macrophage-like cells as previously described (29). Cells were then cultured for 24h with the respective treatments diluted in RPMI medium 10x, LPS 25 ng/mL (M1-like control) and IL-4 30 ng/mL (M2-like control). Cells were then stained with anti-CD206 (eBioscience), anti-CD86 (BD Biosciences), anti-CD14 (BD Biosciences) and analyzed using FACScantoII (BD Biosciences). For the co-culture assay with NK cells, the human transformed mammary cell lines were seeded in 24-well plates (5x10^4 cells/well) and were allowed to adhere to the plate for 24h. Medium was changed and NKL cells (5 x 10^5 cells per well) were added in their complete medium. Cells were co-cultured for 4 h at 37°C. Cell supernatants were then collected, centrifuged for 15 min at 12000 G at 4ºC to remove cell debris and kept at -80ºC for further analysis of IFN-γ secretion by ELISA.

Animals

C57BL/6 IL1-R8-deficient mice were generated as previously described (78). These mice were crossed with BALB/c MMTV-neu mice (79) in order to generate C57BL/6-BALB/c MMTV-neu$^{+/-}$/IL-1R8$^{+/-}$ as F1. Afterwards, F2 was generated by crossing males and females MMTV-neu$^{+/-}$/IL-1R8$^{+/-}$ mice, in order to obtain MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice. Females MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ or MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ from F3 were used for all experimental procedures. Genotype of each mouse was determined by PCR (Table S3). All experimental procedures were performed according to the Italian animal care and ethics legislation and had been approved by the local government authorities (Ministero della Salute). All colonies were housed and bred in the SPF animal facility of Humanitas Clinical and Research Center in individually ventilated cages. F3 MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice were divided in two experimental groups composed by mice sacrificed at 24 weeks of age, and mice sacrificed once their biggest mammary tumors reached 500 mm^3 of tumor volume. Tumor volume was determined by the formula: $V= 1/2 (D \times d^2)$ (considering D the larger diameter and d the minor diameter) only in tumor-bearing animals. Mammary fat pads were checked weekly for the presence of tumors and, when present, measured using a caliper.

Histopathology and Immunohistochemistry

At least eight samples from PFA-fixed, paraffin-embedded mouse tumor tissues were analyzed for each condition. Consecutive sections from the middle of the tissue were used for histological examination in each mouse. Sections for histological analysis were stained with Haematoxylin-Eosin (H&E) and examined blindly by a pathologist (M.N.). Paraffin-embedded tissue sections were mounted on Super-frost slides, dewaxed in xylene and rehydrated in ethanol. Endogenous

peroxidase was blocked for 20 min in 90% ethanol containing 2% H2O2. Sections were then pretreated in a microwave oven (two cycles for 3 min each at 800 W, in 0.25 mM EDTA buffer). Unspecific sites were blocked with Rodent Block M (Biocare Medical) 30 min and tissues were incubated for two hours with affinity-purified anti-CD45 (Rat anti-Mouse, R&D Systems), anti-IL-1R8 (Goat anti-mouse, R&D Systems), anti-CD3 (Rat anti-Human, AbD Serotec), anti-F4/80 (Rat anti-Mouse, AbD Serotec) and anti-Ki67 (Rabbit anti-Mouse, Cell Signaling) primary antibodies in PBS supplemented with BSA (1%) and NP40 (0.02%). Sections were then washed with washing buffer (PBS-/- + 0,05% Tween 20) and incubated with two-step detection system Rat-on-Mouse HRP-Polymer Kit (Biocare medical). After washing, slides were developed with DAB (3,30-diaminobenzidine) (Biocare Medical) and counterstained with Hematoxilyn. Tissue slides were then analysed using a computer-aided image analysis software (Olympus Dotslide).

ELISA

Tumors were homogenized in 1ml PBS^{2+} containing protease inhibitors (Complete®-EDTA-free; Roche Diagnostics) and PMSF (1mM). Tissue homogenates were centrifuged at 14000 rpm for 30 min at 4°C and supernatants were stored at -80°C for cytokine analysis. The presence of IL-1β, IL-10, IL-12, IFN-γ, VEGF, CSF2 and CCL2 were measured by ELISA (R&D DuoSet ELISA Development System) according to manufacturer's instructions.

FACS analysis

The composition of tumor infiltrate was determined by flow cytometry using different combinations of the following antibodies: CD45-BV605, CD11b-BV421; Ly6G-PE-CF594; Ly6C-FITC (Clone AL-21); F4/80-PECy7; CD11c-PE; CD3e-FITC;

CD4-Alexa700; CD8-PE; CD19-APC-H7; CD49b(DX5)-APC and MHCII-PercpCy5.5 from BD Bioscience, eBioscience or BioLegend. Cell viability was determined by Aqua LIVE/Dead-405 nm staining (Invitrogen), negative cells were considered viable. Cells were analyzed on LSR Fortessa (BD Bioscience).

Purification of Tumor-associated Macrophages (TAMs)

$CD11b^+$ cells from tumors were MACS enriched according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Purity of CD11b+ cells was about 90% as determined by FACS. CD11b+ cells were stained with LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) to exclude non-viable cells. CD11b+ cells were then prestained with FcBlock and stained with CD11b-BV421; Ly6C-FITC; Ly6G-PE; MHCII- Percp-Cy5.5 and NK1.1-PE as described (Laoui et al., 2014) and sorted on a FACSAria cell sorter (BD Bioscience). Antibodies anti-NK1.1 and anti-Ly6G were used to exclude NK cells and granulocytes. Purity of sorted $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^-NK1.1^-MHCII^{low}$ and $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^-NK1.1^-MHCII^{high}$ was $\geq$ 98%. Resulting cells were processed for mRNA extraction.

Quantitative PCR of purified TAMs

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. RNA was further purified using RNeasy Min-elute RNA isolation kit (QIAGEN). cDNA was synthesized using 500 ng of total RNA by reverse transcription using High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems) and quantitative real-time PCR was performed using the SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life technologies). Data were analyzed with the D2CT method and normalized based on 18S expression

determined in the same sample. Analysis of all samples was performed in triplicate. Primers were designed according to the published sequences and listed as follows: Chil3 (Ym1): forward 5´-TCT GGG TAC AAG ATC CCT GAA-3´, reverse 5´-TTT CTC CAG TGT AGC CAT CCT T-3´; IFN-γ: forward 5´-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3´, reverse 5´-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3´; Il10: forward 5´-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3´, reverse 5´-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3´; Stab1: forward 5´-CCC TCC TTC TGC TCT GTG TC-3´, reverse 5´-CAA ACT TGG TGT GGA TGT CG-3´; Mcr1 (CD206): forward 5´-TGG CAT GTC CTG GAA TGA T-3´, reverse 5´-CAG GTG TGG GCT CAG GTA GT-3; TNFα: forward 5´-AAGAGGCACTCCCCCAAAAG-3´, reverse 5´-CTTGGTGGTTTGCTACGACG-3´; 18s/18S: forward 5´-ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT-3´, reverse 5´- CCT TGG ATG TGG TAG CCG TTT-3´.

Generation of Bone Marrow Chimeras

3-weeks old MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mice were lethally irradiated with a total dose of 900 cGy. Mice were then injected in the retro-orbital plexus with 5x10^{6} nucleated bone marrow cells obtained by flushing of the cavity of a freshly dissected femur from IL-1R8$^{+/+}$ or IL-1R8$^{-/-}$ donors. Recipient mice received gentamycin (0.8 mg/ml in drinking water) starting 7 days before irradiation and maintained during 2 weeks. Mice were then followed until 24 weeks of age and the presence of mammary tumors was assessed weekly.

Statistical analysis

All values were expressed as mean ± SEM. Unpaired Student's t test and paired Student's t test were used as specified. $P<0.05$ was considered significant. Statistics were calculated with GraphPad Prism version 5, GraphPad Software.

Table S1. Mammary tumors histopathological features**.**

Histopathological features	MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$(n=6)	MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ (n=5)
Tumor growth *Expansive, n (%)*	2 (33.3%)	5 (100%)
Infiltrative, n (%)	4 (66.6%)	0 (0%)
Tissue necrosis (%)	++ (16.7) + (83.3)	+ (60) No (40)
Cellular atypia (%)	+++ (16.7) ++ (32.3) + (50)	++ (20) + (80)
Number of mitosis (per field)	2.5±0.5^{NS}	1.2±0.5^{NS}

Table S2. List of primers for gene-expression analysis.

Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
SIGIRR/IL-1R8	GTCTCAACGTGCTGCTCTGGTA	TCGTAGAGCTTCCCGTCGTTTA
IL-6	TGCAGATGAGTACAAAAGTCCTGT	GTGGTTATTGCATCTAGATTCTTTGC
IL-8	GCAGAGGGTTGTGGAGAAGTTT	TTGGATACCACAGAGAATGAATTTTT
TNFα	CTGGCCCAGGCAGTCAGAT	GGTTTGCTACAACATGGGCTACA
IFN-β1	GCAATTGAATGGGAGGCTTG	ATAGATGGTCAATGCGGCGT
CSF2	TGATGGCCAGCCACTACAAG	GGGTTGCACAGGAAGTTTCC
CSF3	CTCCAGGAGAAGCTGGCAGG	GGCCATTCCCAGTTCTTCCA
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Table S3. List of primers for mouse genotyping.

Gene name	Sequence (5'-3')
25/10N	ATCTTTCAGCCACTGCACTGA
PGK	CTGCTCTTTACTGAAGGCTC
NeuT Forward	GTAACACAGGCAGATGTAGGA
NeuT Reverse	ATCGGTGATGTCGGCGATAT
β-casein Forward	GATGTGCTCCAGGCTAAAGTT
β-casein Reverse	AGAAACGGAATGTTGTGGAGT

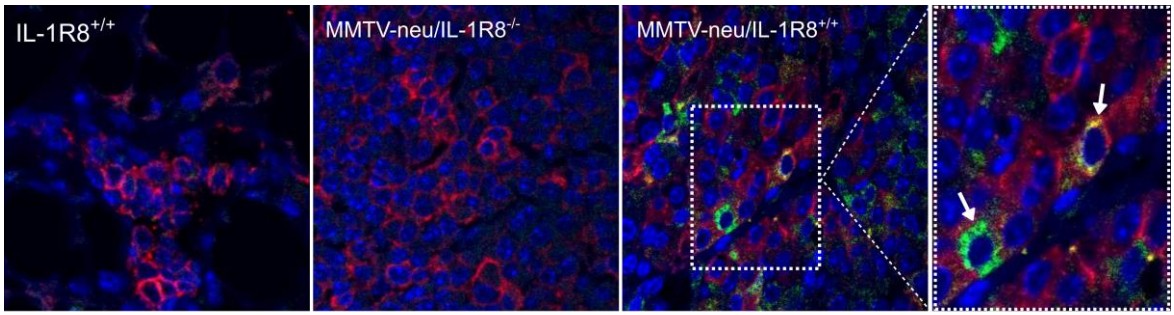


Figure S1. Co-localization of IL-1R8 and HER2 in MMTV-neu mammary tumors. Immunofluorescence staining of IL-1R8 (green) and HER2/neu (red) in IL-1R8$^{+/+}$ mammary fat pads, MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ mammary tumors. Image in detail indicates area of co-localization. Left arrow: IL-1R8 in a non-tumoral cell; Right arrow: IL-1R8 co-localized with HER2/neu. Magnification 60X.

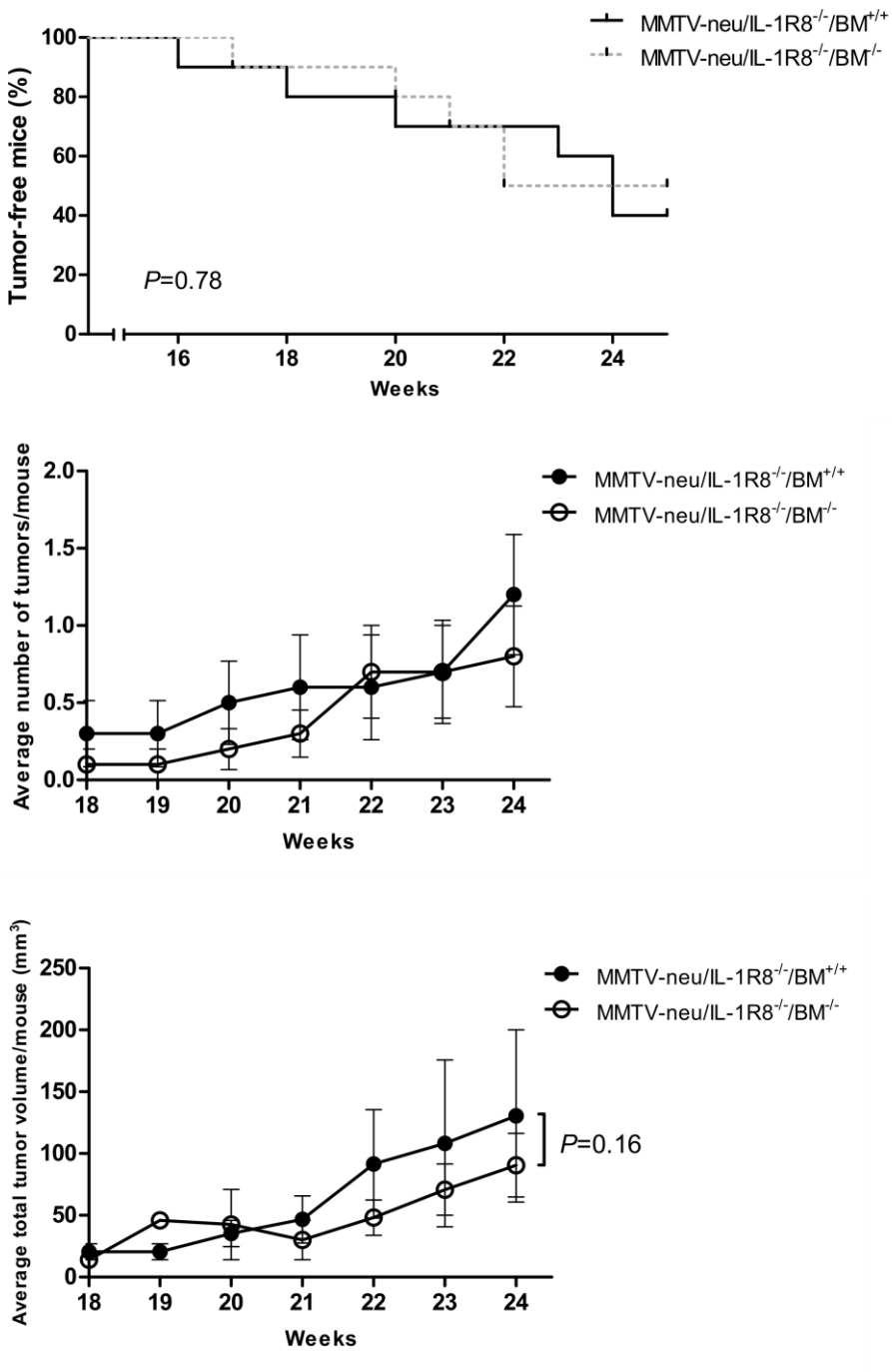


Figure S2. Bone-marrow chimera MMTV-neu mice - tumor kinetics. Transplant of IL1-R8+/+ bone-marrow cells does not revert protected MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ phenotype. **(A)** Kaplan–Meier analysis of tumor-free survival of irradiated MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ transplanted with IL1-R8+/+ (n=10) or IL1-R8-/- (n=10) BM. Log-rank test, *P*=0.78. **(B)** Average number of mammary tumors per mouse over time (weeks); **(C)** Average total tumor volume per mouse over time (weeks). (B and C), Unpaired or paired Student's t test, respectively.

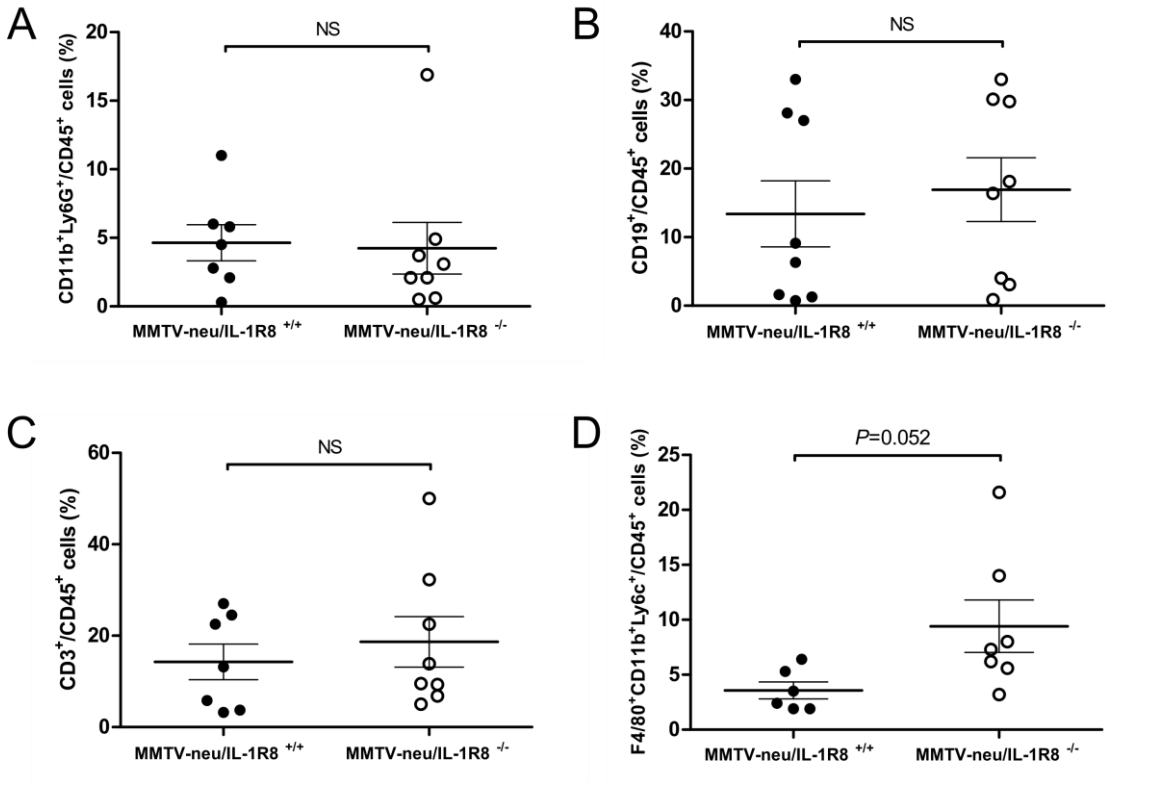


Figure S3. FACS analysis of mammary tumors: time-point. FACS Analysis of the leukocyte infiltrate of MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mammary tumors at 24 weeks. **(A)** Polymorphonuclear cells (CD11b^{+}Ly6G^{+}); **(B)** B-Cells (CD19^{+}); **(C)** T-Cells (CD3^{+}); **(D)** immature macrophages (F4/80^{+}CD11b^{+}Ly6C^{+}). Results represented as % of CD45^{+} cells. NS=not significant. Statistical analysis: unpaired Student's t test.

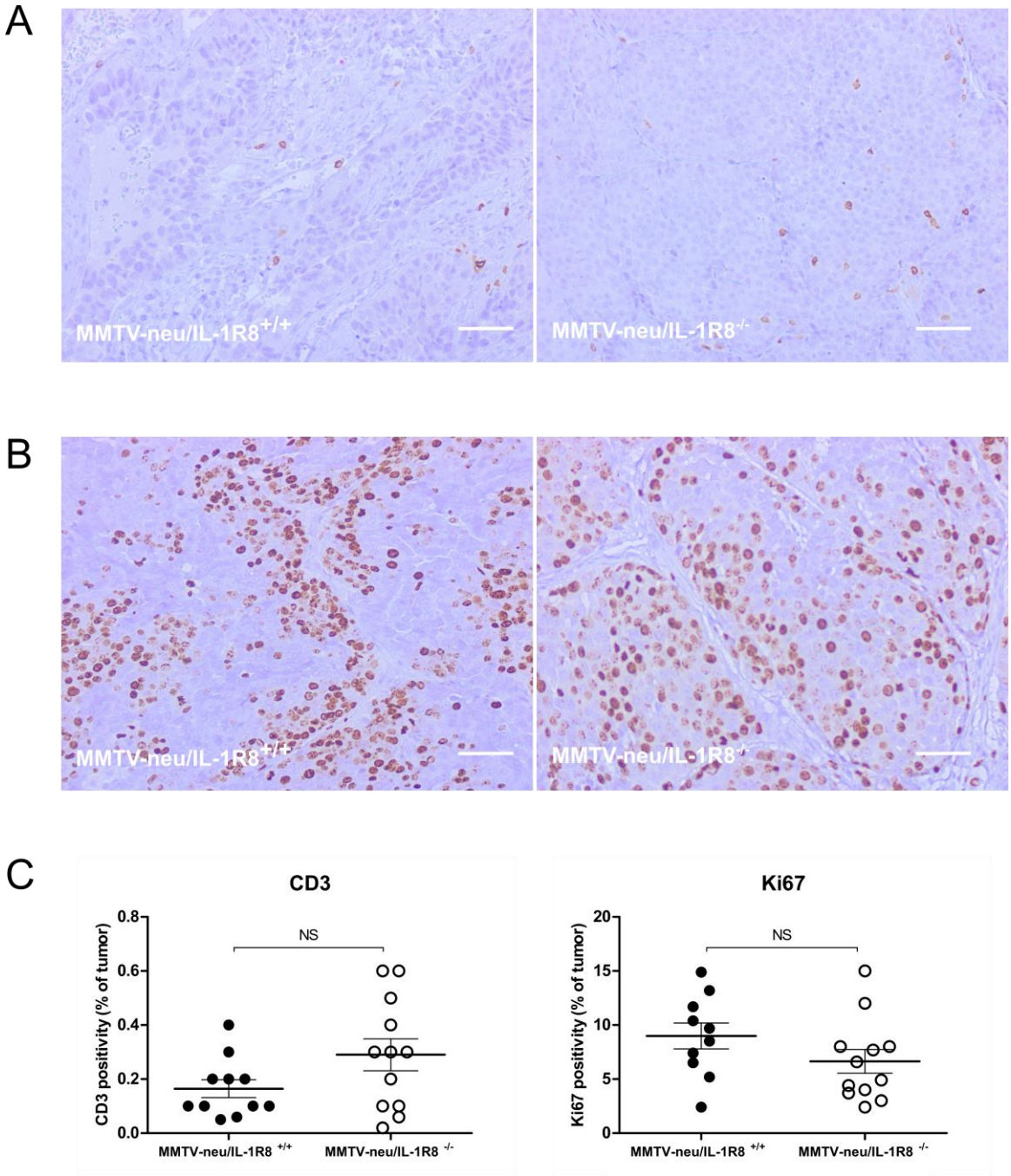


Figure S4. IHC analysis of CD3$^+$ and Ki67$^+$ cells. Immunohistochemistry analysis of **(A)** lymphocytes (CD3$^+$); **(B)** proliferative rate (Ki67) in MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mammary tumors. Scale bar: 50 µM; **(C)** Quantification of positivity per tumor (%). Statistical analysis: unpaired Student's t test.

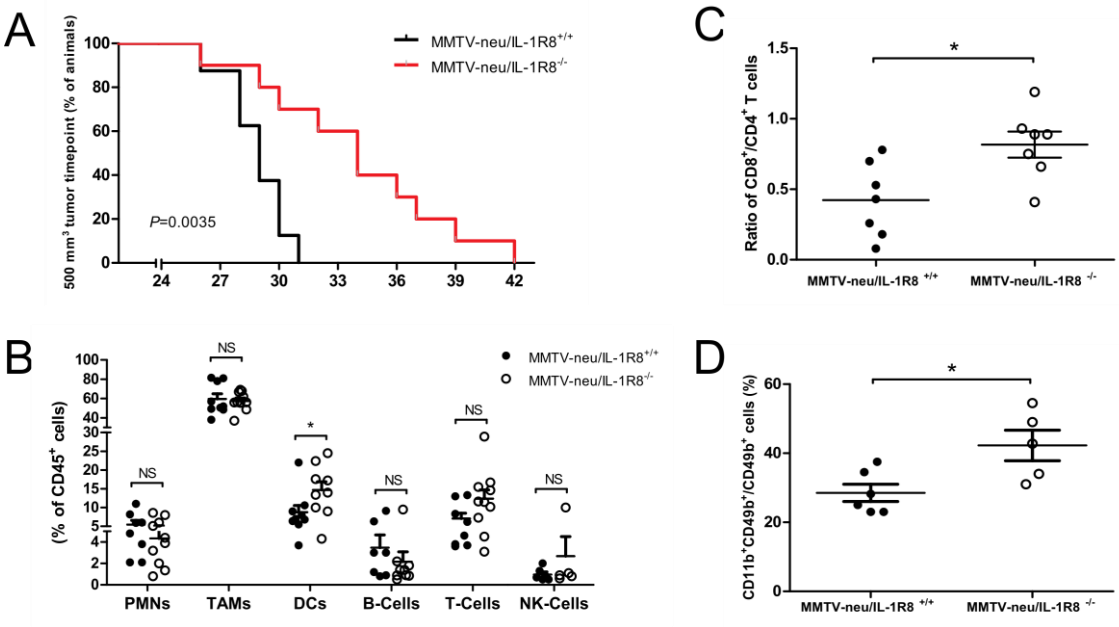


Figure S5. FACS analysis of mammary tumors: size-point. FACS Analysis of the leukocyte infiltrate of MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mammary tumors at 24 weeks. **(A)** Kaplan–Meier analysis of the incidence of tumors reaching 500 mm^3 as tumor volume from the size-point group in MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ (n=8) and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ (n=10) mice. *P*=0.0035, Log-rank test; **(B)** FACS analysis of different tumor-infiltrating leukocytes: PMNs (CD11b$^+$Ly6G$^+$), TAMs (CD11b$^+$F4/80$^+$), DCs (CD11b$^+$F4/80$^-$CD11c$^+$), B-Cells (CD19$^+$), T-Cells (CD3$^+$) and NK cells (CD3$^-$CD49b$^+$). Results represented as % CD45$^+$ cells; **(C)** Ratio of CD8$^+$/CD4$^+$ T cells; **(D)** Mature NK cells population (CD11b$^+$CD3$^-$ CD49b$^+$/CD49b$^+$ cells); Statistical analysis: unpaired Student's t test, *P<0.05.

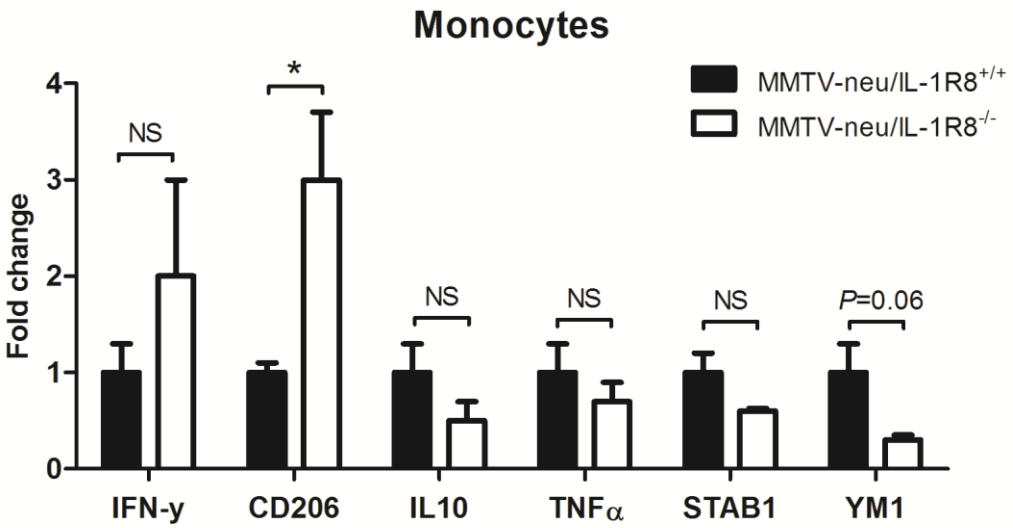


Figure S6. Markers of polarization in tumor-associated monocytes. Analysis of selected M1 and M2-markers in sorted tumor-associated monocytes from MMTV-neu/IL-1R8$^{+/+}$ and MMTV-neu/IL-1R8$^{-/-}$ mammary tumors (mean ± SEM) by qRT-PCR. Data is relative to 18S expression and normalized versus the mean of wild-type and expressed as mean ± SEM. Statistical analysis: *P<0.05, unpaired Student's t test.

B) Artigo publicado - Oncotarget 2015:

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Advance Publications 2015

Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice

Luís Felipe Campesato[1,2,3], Romualdo Barroso-Sousa[2], Leandro Jimenez[1,2], Bruna R. Correa[2], Jorge Sabbaga[2], Paulo M. Hoff[2], Luiz F. L. Reis[2], Pedro Alexandre F. Galante[2] and Anamaria A. Camargo[1,2]

[1] Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, Brazil

[2] Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil

[3] Departmento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to: *Anamaria A. Camargo,* ***email:*** *aacamargo@mochsl.org.br*

Keywords: cancer-gene panels, mutational load, PD-1 blockade, immunotherapy, response prediction

Received: *August 04, 2015* ***Accepted:*** *September 04, 2015* ***Published:*** *October 01, 2015*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Cancer gene panels (CGPs) are already used in clinical practice to match tumor's genetic profile with available targeted therapies. We aimed to determine if CGPs could also be applied to estimate tumor mutational load and predict clinical benefit to PD-1 and CTLA-4 checkpoint blockade therapy. Whole-exome sequencing (WES) mutation data obtained from melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC) patients published by Snyder et al. 2014 and Rizvi et al. 2015, respectively, were used to select nonsynonymous somatic mutations occurring in genes included in the Foundation Medicine Panel (FM-CGP) and in our own Institutional Panel (HSL-CGP). CGP-mutational load was calculated for each patient using both panels and was associated with clinical outcomes as defined and reported in the original articles. Higher CGP-mutational load was observed in NSCLC patients presenting durable clinical benefit (DCB) to PD-1 blockade (FM-CGP *P*=0.03, HSL-CGP *P*=0.01). We also observed that 69% of patients with high CGP-mutational load experienced DCB to PD-1 blockade, as compared to 20% of patients with low CGP-mutational load (FM-CGP and HSL-CGP *P*=0.01). Noteworthy, predictive accuracy of CGP-mutational load for DCB was not statistically different from that estimated by WES sequencing (*P*=0.73). Moreover, a high CGP-mutational load was significantly associated with progression-free survival (PFS) in patients treated with PD-1 blockade (FM-CGP *P*=0.005, HR 0.27, 95% IC 0.105 to 0.669; HSL-CGP *P*=0.008, HR 0.29, 95% IC 0.116 to 0.719). Similar associations between CGP-mutational load and clinical benefit to CTLA-4 blockade were not observed. In summary, our data reveals that CGPs can be used to estimate mutational load and to predict clinical benefit to PD-1 blockade, with similar accuracy to that reported using WES.

INTRODUCTION

Checkpoint blockade immunotherapy, which targets regulatory pathways in T-cells to enhance antitumor immune responses, is revolutionizing cancer treatment. Three monoclonal antibodies directed to two different immune checkpoint molecules - CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) and PD-1 (programmed death receptor 1) – have now been approved by the U.S. Food and Drug Administration for treatment of melanoma and NSCLC patients [1,2]. Although significant and durable response rates have been reported, clinical benefit of these inhibitors has been limited to a subset of patients and has not been observed in all tumor types [3,4], highlighting the

need for identification of predictive biomarkers for patient stratification and selection.

Human tumors typically harbor different types of somatic mutations, including nonsynonymous mutations that alter amino acid residues of a protein. Altered amino acid residues resulting from nonsynonymous mutations can create new T-cell epitopes (neoepitopes) from a previously self-peptide [5-7], serving as neoantigens capable of eliciting an antitumor immune response. Neoantigen formation is thus a probabilistic event, where each nonsynonymous mutation increases the chances of immunogenic neoantigen formation. Therefore, tumor mutational load, defined as the number of nonsynonymous mutations in the tumor, could be used as a predictive marker for checkpoint blockade immunotherapy. Indeed, emerging data suggest that recognition of such neoantigens is a major factor in the activity of immunotherapies. In addition, tumor mutational load estimated by WES has proven to be directly associated with clinical benefit to immune checkpoint blockade [8-10].

In a recent report, Snyder et al [8] showed that tumor mutational load, estimated by WES, was higher in melanoma patients presenting long-term clinical benefit to CTLA-4 blockade when compared to patients with minimal or no clinical benefit. In addition, they observed that a high mutational load was significantly correlated with improved overall survival (OS) in a discovery cohort and with a non-significant trend towards improved OS in the validation cohort. Rizvi et al [9] also reported a significant association between tumor mutational load, estimated by WES, and DCB in NSCLC patients treated with PD-1 blockade. A significant direct association between high mutational load and PFS was also reported. In addition, associations between high mutational load, DCB and PFS were reproduced in an independent validation cohort [9]. Finally, Le et al [10] analyzed 41 patients with progressive metastatic carcinomas with mismatch repair deficiency (MRD) or mismatch repair proficiency (MRP) treated with PD-1 blockade. MRD tumors have 10 to 100 times more somatic mutations than MRP tumors and these tumors frequently contain prominent lymphocyte infiltrates, indicating an active immune response [11,12]. Objective response rates and PFS were significantly higher in patients with MRD colorectal tumors and MRD non-colorectal tumors. Together, these studies demonstrated that a high tumor mutational load, estimated by WES, may be used to predict response to immune checkpoint blockade therapy.

However, WES is not yet routinely available in the clinical practice, due to its high cost and time-consuming analysis. On the other hand, cancer-gene panels (CGPs) composed by ~300-600 well-characterized cancer-related genes are now commonly used in the clinics to match tumor's genetic profile with available targeted therapies. By analyzing matched tumor-normal DNA, CGPs can accurately filter rare germline variants and enable unambiguous identification of somatic mutations in therapeutically relevant cancer-genes in a single assay at a reasonable cost and timeframe [13,14]. Therefore, in the present study we sought to determine if CGPs could be used to accurately estimate mutational load and to predict response to immune checkpoint blockade, without the need of tumor WES.

RESULTS

CGP-mutational load is associated with clinical benefit to PD-1 blockade therapy in NSCLC patients

Whole-exome sequencing (WES) mutation data obtained from melanoma [8] and non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [9] were used to select nonsynonymous somatic mutations occurring in genes included in the Foundation Medicine Panel (FM-CGP, Table S1) and in our own Institutional Panel (HSL-CGP, Table S2). Mutational load estimated using either one of the two panels was significantly associated with DCB in NSLC patients treated with PD-1 blockade. The median number of nonsynonymous somatic mutations calculated using FM-CGP was 9 and 5 for tumors from patients with DCB and NDB, respectively (Mann-Whitney $P = 0.03$, Figure 1A and Table S3). For the HSL-CGP, the median number of nonsynonymous somatic mutations was 18.5 and 8 for tumors from patients with DCB and NDB, respectively (Mann-Whitney $P = 0.01$, Figure 1B and Table S4).

Patients were then grouped, according to their number of nonsynonymous somatic mutations, in a high (≥7 for FM-CGP and ≥13 for HSL-CGP) and a low CGP-mutational load group (<7 for FM-CGP and <13 for HSL-CGP). DCB rates and PFS were significantly greater in patients with a high CGP-mutational load. We observed that 69% of patients with high CGP-mutational load, determined by either one of the two panels, presented DCB. In contrast, DCB was observed in only 20% of patients with low CGP-mutational load (Fisher's exact test $P = 0.01$ for FM-CGP and HSL-CGP, Table 1). Noteworthy, predictive accuracy of CGPs-mutational load for DCB was not statistically different to that estimated by WES sequencing ($P = 0.73$, Figure 1C). All three ROC curves presented similar AUC, sensitivity and specificity (Table 2). Finally, a high mutational load calculated by both CGPs was also significantly associated with PFS (median PFS 14.5 versus 3.4 months, Log-rank $P = 0.005$, HR 0.27, 95% IC 0.105 to 0.669 for the FM-CGP and median PFS 14.5 versus 3.4 months, Log-rank $P = 0.008$, HR 0.29, 95% IC 0.116 to 0.719 for the HSL-CGP, Figure 1D-E).

Table 1: CGP-mutational load is associated with clinical benefit to PD-1 blockade in NSCLC patients.

Cancer-Gene Panel	CGP Mutational Load	Cutoff	n	Median mutations/sample (interquartile range)	Number of DCB patients n (%)	Fisher's Exact *P*	Median PFS (months)	Log-Rank *P*	HR for PFS (95% CI)
FM-Panel	High load	**7** mutations	16	10.5 (8.7-20.5)	11 (68.8)	0.01	14.5	0.005	0.265 (0.105 to 0.669)
	Low load		15	4 (2-5)	3 (20)		3.4		
HSL-Panel	High load	**13** mutations	16	21 (14.5-29.7)	11 (68.8)	0.01	14.5	0.008	0.288 (0.116 to 0.719)
	Low load		15	7 (4-8)	3 (20)		3.4		

CGP-mutational load is not associated with clinical benefit to CTLA-4 blockade therapy in melanoma patients

We did not observe a significant association between FM and HSL-CGP-mutational loads and DCB in melanoma patients treated with CTLA-4 blockade. The median number of nonsynonymous somatic mutations calculated using the FM-CGP was 6 for tumors from patients with DCB and with minimal or no clinical benefit (Mann-Whitney $P = 0.37$, Figure 2A and Table S5). Meanwhile, the HSL-CGP median number of nonsynonymous somatic mutations was 15 and 9 for tumors from patients with DCB and minimal or no clinical benefit, respectively (Mann-Whitney $P = 0.24$, Figure 2B and Table S6).

Patients were again grouped according to the number of mutations in a high and a low CGP-mutational load group. Subsequently, DCB rates and OS were determined for both groups. Durable clinical benefit rates were not associated with mutational load estimated

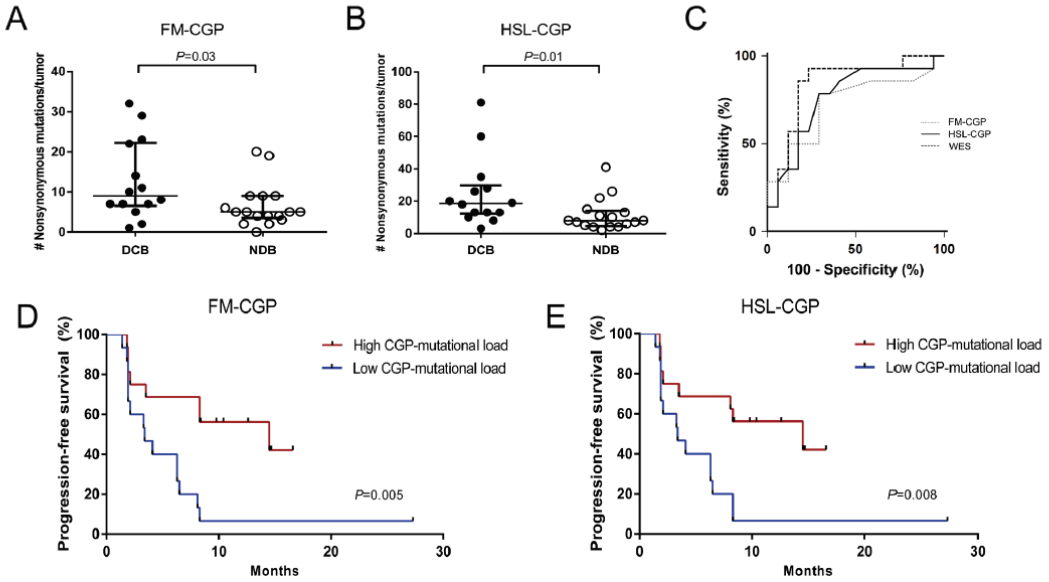


Figure 1: CGPs-mutational load is significantly associated with clinical benefit of anti-PD-1 therapy in NSCLCs. A. FM-CGP mutational load in patients with DCB ($n = 14$) compared to those with NDB (n = 17) (median 9 versus 5, Mann-Whitney $P = 0.03$). **B.** HSL-CGP mutational load in patients with DCB ($n = 14$) compared to those with NDB ($n = 17$) (median 18.5 versus 8, Mann-Whitney $P = 0.01$). **C.** Receiver operation characteristic analysis (ROC) curves using FM-CGP, HSL-CGP and WES as predictors of DCB ($P = 0.73$). **D.** PFS in tumors with high CGP-mutational load ($n = 16$) compared to those with low CGP mutational load ($n = 15$) in FM-CGP (HR 0.26, 95% CI 0.10-0.67, Log-rank $P = 0.005$). **E.** PFS in tumors with high CGP-mutational load ($n = 16$) compared to those with low CGP mutational load ($n = 15$) in HSL-CGP (HR 0.29, 95% CI 0.11-0.72, Log-rank $P = 0.008$). In **A.** and **B.**, median and interquartile ranges of nonsynonymous mutations for each panel are shown, with individual values for each tumor shown with dots.

Table 2: Comparison of ROC curves.

Gene Panel	AUC	Median number of mutations	Sensitivity (%)	Specificity (%)	*P*-value
FM-CGP	0.73	7	78.6	70.6	0.02
HSL-CGP	0.76	13	78.6	70.6	0.004
WES	0.84	190	85.7	76.6	0.0001

Comparison between ROC Curves was carried out as previously reported by Delong et al, 1988 [21].
Pairwise comparison: FM-CGP vs. HSL-CGP, *P*=0.79; FM-CGP vs. WES, *P*=0.44; HSL-CGP vs. WES, *P*=0.57.

using both FM-CGP (Fisher's exact test $P = 0.80$, Table S7) and HSL-CGP (Fisher's exact test $P = 1.00$, Table S7). Moreover, no differences in OS were observed for patients in the high and low CGP-mutational load groups, irrespectively of the panel used (Figure 2C-2D).

DISCUSSION

The catalogue of cancer types therapeutically manageable with immune checkpoint blockade therapy is growing at an astonishing pace. However, less than half of all patients respond to these treatments [3,4]. Identification of predictive biomarkers for patient stratification is a

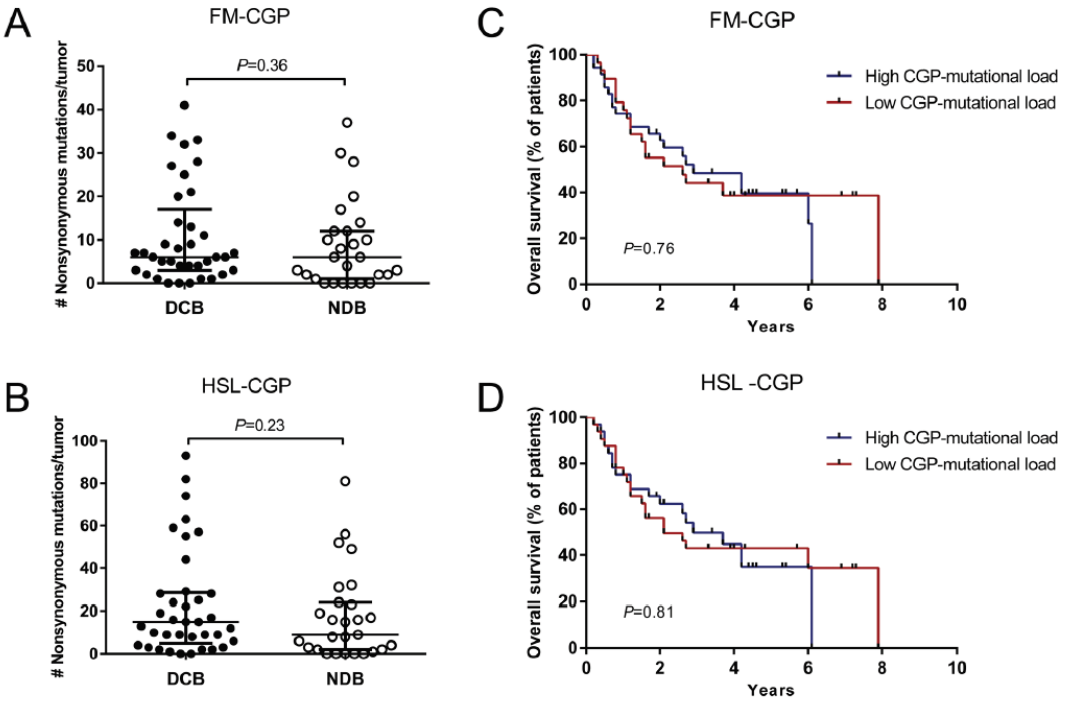


Figure 2: CGPs-mutational load is not associated with clinical benefit of anti-CTLA-4 therapy in Melanomas. A. FM-CGP mutational load in patients with DCB ($n = 37$) compared to those with NDB ($n = 27$) (median 6, Mann-Whitney $P = 0.36$). **B.** HSL-CGP mutational load in patients with DCB ($n = 37$) compared to those with NDB ($n = 27$) (median 15 versus 8.5, Mann-Whitney $P = 0.23$). **C.** PFS in tumors with high CGP-mutational load ($n = 30$) compared to those with low nonsynonymous burden ($n = 34$) in FM-CGP (HR 1.10, 95% CI 0.57-2.11, Log-rank $P = 0.76$). **D.** PFS in tumors with higher nonsynonymous mutation burden ($n = 29$) compared to those with low CGP mutational load ($n = 35$) in HSL-CGP (HR 1.08, 95% CI 0.57-2.05, Log-rank $P = 0.81$). In **A.** and **B.**, median and interquartile ranges of nonsynonymous mutations for each panel are shown as horizontal lines, with individual values for each tumor shown as dots.

pressing issue, since it would minimize unnecessary exposure of patients to potentially life-threatening immune-related toxicities, as well as reduce the financial costs imposed on health systems by expensive drugs.

Some studies have established partial correlations between outcomes with CTLA-4 blockade and peripheral-blood lymphocyte count, markers of T-cell activation, an "inflammatory" tumor microenvironment and maintenance of high-frequency T-cell receptor clonotypes precluding their utilization in clinics [15-17]. Other studies have reported that pre-treatment programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression in tumor biopsy directly correlate with response to anti-PD-1 therapies, but many tumors scored as PD-L1 positive do not respond, while some responses occur in PD-L1-negative tumors [18-20]. These controversial results probably reflect the sum of technical issues related to immunohistochemistry staining and scoring system, as well as to biologic issues related to PD-L1 expression on other cells present in the tumor microenvironment, including infiltrating myeloid cells.

Recent studies, however, demonstrated that tumors with a high load of nonsynonymous somatic mutations determined by WES are more likely to respond to checkpoint blockade immunotherapy, as in theory these tumors would have a higher diversity of neoantigens that could trigger an immune response when the CTLA-4/PD-1 inhibition is bypassed [8-10]. Nevertheless, WES and neoantigen identification is not yet a routine in the clinical practice and more straightforward and affordable approaches to estimate tumor mutational load and predict response to checkpoint blockade are needed.

Here, we demonstrated that the association between mutational load and clinical benefit to PD-1 blockade is also observed when CGPs are used to estimate mutation burden. Noteworthy, predictive accuracy is apparently lost when smaller CGPs (<150 cancer-genes) are used to estimate mutational loads, indicating that comprehensive gene panels, composed of >300 cancer-genes, should be employed (Figure S1, Table S8-10). Most importantly, we demonstrated that comprehensive CGPs can be used to predict response to PD-1 blockade in clinics with similar accuracy to results reported by Rizvi and colleagues [9].

Our analysis does not support a similar use for cancer-gene panels in the prediction of response to CTLA-4. This result, however, is not totally unexpected since blockade of CTLA-4 and PD-1 receptors present distinct mechanisms of action and the association between mutational load and clinical benefit also seems to be weaker for CTLA-4 blockade when compared to PD-1 blockade, as previously reported [8]. Although Snyder and colleagues have observed a significant association between mutational load and overall survival in the discovery cohort, a similar result was not reproduced in the validation cohort, indicating that mutational load alone is not sufficient to predict clinical benefit to CTLA-4 blockade.

Even though all these studies are limited by the small number of patients analyzed, our results are encouraging, considering the broader therapeutic activity of PD-1 blockade alone or its use in combination with other therapies. Since CGPs are already routinely used in many cancer centers to guide therapeutic choices, our findings will certainly accelerate the validation and the implementation of mutational load estimates as a clinically useful predictive marker, further extending the current benefits of immune checkpoint blockade.

MATERIALS AND METHODS

Study design

We downloaded WES mutation data from melanoma and NSCLC patients published by Snyder et al [8] and Rizvi et al [9], respectively, and selected nonsynonymous somatic mutations occurring in genes included in the Foundation Medicine Panel (FM-CGP; Table S1), as well as in a CGP developed at our own Institution (HSL-CGP; Table S2). In both original studies matched normal DNA, extracted from peripheral blood, was used to filter germline variants and to enable unambiguous identification of somatic mutations. Next, we calculated the CGP-mutational load for each patient enrolled in these two studies using just mutated genes present in FM and HSL CGPs. CGP-mutational loads were then associated with clinical outcomes as defined and reported in the original articles [8, 9]. Patients included in discovery and validation cohorts in the original articles were grouped in a single larger cohort to increase the statistical power of our analysis.

Statistical analysis

NSCLC patients with partial or stable response lasting >6 months were classified as DCB, according to the original article [9]. For the purpose of this manuscript, melanoma patients presenting radiographic evidence of freedom from disease or evidence of a stable or decreased volume of disease for >6 months (described as long-term benefit patients in the original article [8]) were also classified as DCB. Mann-Whitney test was used to compare CGP-mutational loads between groups of patients with DCB and NDB (no durable benefit). Patients were then divided in a high CGP-mutational load group (defined as those equal or above the median mutational load of the cohort) and low CGP-mutational load group (defined as those below the median mutational load of the cohort). The proportion of patients with DCB and NDB in each group was compared using Fisher's exact test. Log-rank test was used to compare Kaplan-Meier survival curves for each group. All these statistical analyses were performed

using GraphPad Prism v.6 (Graphpad Prism Software, San Diego, CA). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to discriminate DCB and NDB patients. The area under the curve (AUC), sensitivity and specificity for each CGP and WES were determined using MedCalc software (version 15.6.1). Comparison between AUC values was carried out according to Delong et al [21] using STATA software (version 13.0).

GRANT SUPPORT

This study was financed by Ludwig Institute for Cancer Research and Hospital Sírio-Libanês. This study was financed by Ludwig Institute for Cancer Research, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP and Hospital Sírio-Libanês.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shin DS, Ribas A: The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? Curr. Opin. Immunol. 2015; 33: 23-35.
2. Sunshine J, Taube JM: PD-1/PD-L1 inhibitors. Curr. Opin. Pharmacol. 2015; 23: 32-38.
3. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, et al.: Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. N. Engl. J. Med. 2012; 366: 2455-2465.
4. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow M a, Rizvi N a, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon R-A, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg S a, et al.: Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N. Engl. J. Med. 2013; 369: 122-33.
5. Noguchi Y, Chen YT, Old LJ: A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994; 91: 3171-3175.
6. Monach PA, Meredith SC, Siegel CT, Schreiber H: A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. Immunity. 1995; 2: 45-59.
7. Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC, Siegel CT, Shabanowitz J, Skipper JC, Engelhard VH, Hunt DF, Schreiber H: The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. J. Exp. Med. 1997; 185: 695-705.
8. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh L a, Postow M a, Wong P, Ho TS, Hollmann TJ, Bruggeman C, Kannan K, et al.: Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. N. Engl. J. Med. 2014; 371: 2189-2199.
9. Rizvi N a., Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira a. L, et al.: Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Science (80-.). 2015; 348: 124-129.
10. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, et al.: PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N. Engl. J. Med. 2015; 372: 2509-20.
11. Guidoboni M, Gafà R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, Del Tin L, Macrì E, Lanza G, Boiocchi M, Dolcetti R: Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. Am. J. Pathol. 2001; 159: 297-304.
12. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT: Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. Cancer. 2001; 91: 2417-2422.
13. Jones S, Anagnostou V, Lytle K, Parpart-Li S, Nesselbush M, Riley DR, Shukla M, Chesnick B, Kadan M, Papp E, Galens KG, Murphy D, Zhang T, et al.: Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. Sci. Transl. Med. 2015; 7: 283ra53-283ra53.
14. Cheng DT, Mitchell T, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, Chandramohan R, Liu ZY, Won HH, Scott SN, Brannon AR, O'Reilly C, Sadowska J, et al.: MSK-IMPACT: A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. J. Mol. Diagn. 2015; 17: 251-264.
15. Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, Chapman PB, Schwartz GK, Allison JP, Wolchok JD: Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. Cancer. 2010; 116: 1767-1775.
16. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, Alaparthy S, Berman D, Jure-Kunkel M, Siemers NO, Jackson JR, Shahabi V: An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. Cancer Immunol. Immunother. 2012; 61: 1019-1031.
17. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, Fong L: Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. Sci. Transl. Med. 2014; 6: 238ra70.
18. Garon EB, Gandhi L, Rizvi N, Hui R, Balmanoukian a S, Patnaik a, Eder JP, Blumenshein GR, Aggarwal C, Soria J-C, Ahn M a, Gubens M a, Ramalingam SS, et al.: Lba43Antitumor Activity of Pembrolizumab (Pembro; Mk-3475) and Correlation With Programmed Death Ligand 1 (Pd-L1) Expression in a Pooled Analysis of Patients (Pts) With Advanced Non-Small Cell Lung Carcinoma (Nsclc). Ann. Oncol. 2014; 25: 3475.

19. Taube JM, Klein AP, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, Chen L, Pardoll DM, Topalian SL, Anders R a: Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin. Cancer Res. 2014; 20: 5064-74.
20. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, et al.: Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N. Engl. J. Med. 2015; 373: 23-34.
21. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL: Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. Biometrics. 1988; 44: 837-845.

C) Súmula curricular.

Dados pessoais

Nome: Luís Felipe Ingrassia Campesato

E-mail: *lfcampesato@mochsl.org.br and campesato2298@gmail.com*

Local e data de nascimento: Porto Alegre/RS – Brasil, 19/01/1987.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2012 – 2015 **Doutorado em Bioquímica,** Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Título da tese: *"Investigação do papel de SIGIRR/IL-1R8 no crosstalk entre células tumorais e o infiltrado leucocitário".* Orientadora: Dr. Anamaria Aranha Camargo (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo).

Doutorado sanduíche (2014-2015) no Humanitas Research Hospital, em Milão – Itália, sob a supervisão da Dra. Cecilia Garlanda e Dr. Alberto Mantovani.

2008 – 2010 **Mestrado em Bioquímica,** Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil. Título da dissertação: "O s*ilenciamento da Ecto-5`-nucleotidase/CD73 altera a progressão de gliomas".* Orientadora: Dra. Ana Maria O. Battastini (Departamento de Bioquímica /UFRGS).

2004 – 2007 **Bacharel em Biomedicina,** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brasil. Ênfase em imunologia e biologia molecular.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Jun/2011 – Dez/2011 **Pesquisa e Desenvolvimento,** *FK Biotec SA*, Porto Alegre/RS – Brasil. Produção e desenvolvimento de anticorpos mono e policlonais, e condução de projetos em solução ambiental.

Set/2010 – Abr/2011 **Estágio em Genômica e Proteômica do Câncer,** no laboratório do Dr. Luiz Zerbini, no *International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB*), Cidade do Cabo/África do Sul. Desenvolvimento do projeto: "Inhibition of Axl receptor as a novel therapy target in cancer".

Ago/2006 – Dez/2007 **Trainee no laboratório de Genética Forense,** Instituto Geral de Perícias/RS, Brasil. Detecção de vestígios humanos em evidências criminais e extração de RNA/DNA para análises de sequenciamento e genotipagem.

Jan/2005 – Jul/2006 **Iniciação científica** no laboratório da Dr. Claudia Rhoden, *UFCSPA*, Brazil. Desenvolvimento do projeto: "Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats".

PUBLICAÇÕES

- **Campesato LF,** Silva APM, Minute L, Navarro FC, Lepique AP, Riva F, Costa ET, Mantovani A, Garlanda C, Camargo AA. IL-1R8 deficiency protects against breast tumor progression by eliciting antitumor immunity. Manuscript in preparation, 2015.
- **Campesato LF,** Sousa RB, Correa BR, Jimenez JL, Hoff PM, Sabbaga J, Galante PA, Camargo AA. Comprehensive *cancer-gene panels can estimate mutation load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice.* Manuscript accepted, Oncotarget 2015.
- Moura RP, **Campesato LF,** Silva APM, Carvalho A, Lima WC, Carraro DM, Brentani HP, Werneck I, Soares F, Parmigiani RB, Costa ET, Camargo AA. *NDRG4 gene silencing is associated with a metastatic phenotype and the development of distant metastases in breast cancer.* Manuscript in preparation, 2015.
- Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, **Campesato LF**, Filho AZ, Moreira JC, Morrone FB, Sévigny J, Schetinger MR, de Souza Wyse AT, Battastini AM. *Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase.* PLoS One, (2):e31205, 2012.
- Braganhol E, Zanin RF, Bernardi A, Bergamin LS, Cappellari AR, **Campesato LF**, Morrone FB, Campos MM, Calixto JB, Edelweiss MI, Wink MR, Sévigny J, Robson SC, Battastini AM. *Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury.* Purinergic Signal, Jun;8(2):235-43, 2012.
- Zanin RF, **Campesato LF**, Braganhol E, Schetinger MR, Wyse AT, Battastini AM. *Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets.* Thromb Res, Mar;125(3):e87-92, 2010;

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

2015) **Cell Symposia: Cancer, Inflammation and Immunity**: "SIGIRR/TIR8 is highly expressed in HER-2 overexpressing breast tumors and is a novel regulator of antitumoral immunity".

2014) **Summer School in Immunology – British Society of Immunology (BSI)**: “Investigation of the role of SIGIRR/TIR8, a new upregulated gene in HER2-positive breast tumors, and its association with the immune response”.

2014) **3rd conference of translational medicine on pathogenesis and therapy of immune-mediated diseases**: “The role of SIGIRR/TIR8, a novel upregulated gene in HER2-positive breast tumors, and its association with the immune response”.

2013) **15th International congress of Immunology**: “SIGIRR as a novel HER2-Regulated gene in breast tumors”.

2012) **INTERSECTIONS - International Cooperative Cancer Symposium**: “SIGIRR as a novel HER2-Regulated gene in breast tumor and its association with the immune response”.

2012) **Immuno 2012 - XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology**: “The role of SIGIRR in the tumor and immune system crosstalk”.

- Mais de 20 apresentações selecionadas em formato de pôster e três apresentações orais em congressos nacionais e internacionais.

BOLSAS/PREMIAÇÕES

2014 – 2015 Bolsa de doutorado sanduíche – BEPE/FAPESP;

2012 – atual Bolsa de doutorado regular - FAPESP;

2008 – 2010 Bolsa de mestrado - CNPq;

2008 Apresentação oral - Young investigators: Michael Jamra Award, FeSBE;

2005 – 2006 Bolsa de iniciação científica - FAPERGS.