UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

VANESSA GARCIA VILAS BOAS

IL-33 no Carcinoma Espinocelular de Pele

BAURU
2018

VANESSA GARCIA VILAS BOAS

IL-33 no Carcinoma Espinocelular de Pele

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Profª. Drª Ana Paula Campanelli

Versão corrigida

BAURU
2018

Vilas Boas, Vanessa Garcia

IL-33 no Carcinoma Espinocelular de Pele / Vanessa Garcia Vilas Boas. – Bauru, 2018.

87p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Profª. Drª. Ana Paula Campanelli

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

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 012/2017
Data: 25/09/2017

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se

(Cole a cópia de sua folha de aprovação aqui)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu padrinho de batismo, Eliziário Antônio Goulart, que se dedicou imensuravelmente em me proporcionar uma formação acadêmica.

Obrigada, tio Eli, por ter sido o melhor padrinho do mundo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**.

Aos meus pais, **Luiz Antônio Vilas Boas** e **Renata Garcia Lopes Vilas Boas**, por não medirem forças e sempre me incentivarem a buscar meus objetivos. A minha mamãe, por todos os conselhos e amparos ao longo desse processo, por acreditar em mim e me apoiar.

À minha Madrinha **Nilce Garcia Goulart**, por todo o incentivo na minha educação, desde a minha alfabetização até agora, na pós-graduação, você é a melhor madrinha que Deus poderia ter me enviado. E a Tia Bete, **Elizabete Pereira Garcia**, minha madrinha de coração, por também sempre me incentivar e apoiar, por me proporcionar a oportunidade de aprender outra língua.

Ao meu namorado, parceiro e amigo, **Mario Vitor Buzete Gardinal**, por ser tão compreensivo, por me ajudar a enfrentar todos os desafios nesse caminho e por sempre se preocupar em me manter feliz independente das situações. Obrigada por existir e por ter escolhido ser presente na minha vida!

À minha irmã **Nathália Garcia Vilas Boas** e minha prima **Bárbara de Melo Amorim**, por apesar da distância estarem sempre presentes e disponíveis.

À minha amiga e *roommate* **Camila Ferreira Rössler**, por ser tão especial e ter um coração tão enorme. Obrigada por me ouvir desabafar e extravasar meus sentimentos.

À família do Mario. **Mario Luiz Gardinal**, **Andrea Montanha Buzete Gardinal** e **Aline Buzete Gardinal**. Obrigada por todo o apoio. Quem dera todos pudessem ser acolhidos como foi acolhida por vocês.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profª Drª Ana Paula Campanelli**, pelos ensinamentos profissionais, acadêmicos e pessoais. Pelas correções e paciência ao me orientar. Por sentar na bancada comigo e me ensinar, com zelo e criteriosidade a realizar os procedimentos da melhor forma possível. Obrigada por ser uma profissional comprometida, pela oportunidade da realização deste trabalho e pela parceria nesta etapa da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres** por todos os conselhos e conversas descontraídas durante esses anos.

À **Profª Drª Maria Renata S. Nogueira** pelos ensinamentos e pela disponibilidade em me auxiliar com a análise dos resultados. Obrigada por ser tão gentil e solicita.

À **Profª Drª Thais Helena Gasparoto** pela paciência e dedicação em me ensinar a realização do ELISA. E pelos dias descontraídos que passamos juntas durante esse aprendizado.

Às melhores amigas que fiz nesse processo. **Nádia Ghinelli Amôr**, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais desde a iniciação científica, e por todos os momentos de altas risadas na padaria. E à **Graziela Perri**, pela parceria durante o desenvolvimento deste trabalho, pela ajuda nos dias longos de experimentos e pelos tantos cafés regados a muitas gargalhadas.

Às parceiras de laboratório. **Kamilla Paes de Siqueira** pela parceria nesses anos em todos os dias de biotério, pela ajuda nos experimentos e nos perrengues. A **Raissa Gabriele Cândido** por ter se mostrado tão solícita e disposta a ajudar. E a **Rose Primo** pelos bons momentos no dia-a-dia do laboratório.

Aos funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia. Ao **André Luís da Silva**, pela ajuda durante os experimentos e pelos momentos de alegria que me proporcionou no período do meu mestrado. À **Lívia Maria de Melo**, por todo auxílio no preparo dos materiais necessários para execução dos meus experimentos, pelos papos cabeça e pela amizade. À secretária da área de Microbiologia e Imunologia **Dalva Ribeiro de Oliveira**, pela disponibilidade em ajudar e pelos conselhos nos bate-papos no final do dia.

À funcionária do departamento de Patologia **Fátima Aparecida Silveira** pela disponibilidade em me ajudar.

Aos funcionários das Instalações de Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, **Luiz Carlos da Silva**, **Erasmo Gonçalves da Silva** e **Richard Nelson Guanaes Simões** pelo auxílio em garantir o bem-estar animal.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**.

À Comissão de Pós-Graduação da Área de Estomatolgia e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de sua coordenadora**, Profª. Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf**.

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

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de minha bolsa de mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro concedido (2014/06215-1).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (CNPq)**, pelo incentivo financeiro.

“Por isso vos digo, que tudo quanto pedirdes em oração, crede que recebereis, e assim será para convosco”

Marcos 11, 24

RESUMO

IL-33 participa em diversas doenças com funções pró-inflamatórias e protetoras, de acordo com o contexto do microambiente. Com relação a biologia tumoral, o papel de IL-33 ainda é controverso. Estudos demonstraram que IL-33 possui efeitos pró e anti-inflamatórios em diferentes modelos animais de câncer. A presença desta citocina no estroma favorece a imunossupressão pela ativação de células T reguladoras e células mieloides supressoras. IL-33 pode em outras situações promover a imunogenicidade e a resposta imune antitumoral de tipo 1 através das células T citotóxicas e células *Natural Killers*. Contudo o efeito preciso de IL-33 em diferentes tipos de câncer permanece incerto. Sendo assim, compreender o papel de IL-33 na imunobiologia do câncer, poderia direcionar esta citocina como um possível alvo em imunoterapias contra o câncer. Considerando, portanto, a pluralidade desta citocina no desenvolvimento de uma resposta imune, no presente estudo buscamos avaliar os efeitos do tratamento com anti-IL-33 em modelo experimental de carcinoma espinocelular de pele em camundongos BALB/c de linhagem selvagem. Ao final dos protocolos de indução e tratamento, a análise histopatológica revelou que o tratamento com anti-IL-33 levou a menor incidência de carcinoma espinocelular *in situ* e diminuição das atipias celulares e, consequentemente, do grau de displasia. O tratamento com anti-IL-33 levou a aumento nos percentuais de células B e diminuição nas percentagens de linfócitos T $CD4^+$, células dendríticas, células T_{REG} e macrófagos isolados do microambiente tumoral. Ademais, o tratamento com anti-IL-33 levou a aumento na percentagem de linfócitos T $CD4^+$ produtores de IFN-γ e menor percentagem de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ produtores de IL-4 nos linfonodos. Em camundongos submetidos ao tratamento, observou-se menor produção de TGF-β no microambiente tumoral, sem interferir de modo significativo com a produção de IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-17. Os nossos resultados indicam que o tratamento com anti-IL-33 poderia ser alvo de novos estudos em busca de estratégias terapêuticas para o carcinoma espinocelular de pele.

Palavras-chave: Interleucina-33; Carcinogênese química; anti-IL-33; Imunologia tumoral.

ABSTRACT

IL-33 in Squamous Cell Carcinoma

IL-33 participates in several diseases with pro-inflammatory and protective functions, according to the context of the microenvironment. Related to tumor biology, the role of IL-33 is still controversial. Studies have shown that IL-33 has pro and anti-inflammatory effects in different animal models of cancer. Its presence in the stromal and tumor serum increases the immunosuppression by the activation of regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells. On the other hand, the intracellular form in tumor cells promotes immunogenicity and the antitumor type 1 immune response through cytotoxic T cells and natural killer cells. However, the precise effect of IL-33 on cancer conditions remains uncertain. Thus, understanding its role in the immunobiology of cancer could target this cytokine as a marker in cancer immunotherapies. Considering, the range of IL-33 in the development of an immune response, this study aims to evaluate the effects of the anti-IL-33 treatment on wild type BALB/c mouse squamous cell carcinoma (SSCC) development. Histopathological analysis revealed that anti-IL-33 treatment decreased the dysplasia. In addition, anti-IL-33 treatment showed an increasing percentage of B cells and reduced the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes, dendritic cells, T_{REG} cells and macrophages in the tumor microenvironment. In the lymph node, anti-IL-33 treatment induced a shift towards the T_H1 type cytokine profile and reduced the percentage of IL-4 expressing $CD4^+$ and $CD8^+$ cells. Additionally, anti-IL-33 treatment showed a reduced TGF-β production in the tumor microenvironment, but with no changes to the IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-17 production. Taken together these results indicate that anti-IL-33 treatment could be the subject of further studies of therapeutic strategies for squamous cell carcinoma of the skin.

Key words: Interleukin-33; Chemical carcinogenesis; anti-IL-33 treatment; Tumor immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamento com anti-IL-33 diminui o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele..... 46

Figura 2. Tratamento com anti-IL-33 diminui o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele..... 47

Figura 3. Tratamento com anti-IL-33 altera o perfil de resposta imune em camundongos submetidos a carcinogênese química 50

Figura 4. Tratamento com anti-IL-33 interfere no perfil de células do infiltrado no microambiente tumoral.....52

Figura 5. Tratamento com anti-IL-33 altera perfil de respostas imune no microambiente tumoral em carcinoma espinocelular de pele..... 53

Figura 6. Tratamento com anti-IL-33 diminui TGF-β em amostras de camundongos submetidos à carcinogênese química..... 55

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AK .....*Actinic keratosis*, queratoses actínicas
APC .....*Allophycocyanin*, aloficocianina
APC .....*Antigen-present cell*, célula apresentadora de antígeno

B7-1 .....CD80
B7-2 .....CD86
BALB/c .....*Bagg albins C Mice*, camundongo bagg albino C

CC .....*C-C motif Chemokine*, quimicionas de motivo CC
CCB.....Carcinoma de células basais
CCL.....*C-C motif Chemokine Ligant*, ligante de quimiocinas de motivo CC
CD .....*Cluster of Differentiation*, agrupamentos de diferenciação
CEC.....Carcinoma espinocelular
CTLA-4.....*Cytotoxy T-lymphocyte Antigen 4*, antígeno de linfócito T citotóxico 4

DAMP .....*Damage associated molecular pattern*, padrão molecular associado ao dano
DC .....*Dendritc cell*, célula dentrítica
DMBA.....*7,12-Dimethylbenz(a)anthracene*, 7,12-dimetilbenzantraceno
DNA .....*Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

EGF.....E*pidermal growth factor*, fator de crescimento epidérmico
ELISA .....*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ensaio de imunoabsorção enzimática
EPV .....*Epstein-Barr virus*, Vírus Epstein-Barr

FACS.....*Fluorescence-activated cell sorter*, separação celular ativada por fluorescência
Fas CD95
FasL CD178
FITC.....*Fluorescein Isothiocyanate*, Isotiocianato de fluorescência
FL .....*Fluorescein*, fluorescência
FOB.....Faculdade de Odontologia de Bauru
FOXP3 .....*Factor forkhead box P3*, fator de transcrição FOXP3
FSC.....*Forward Scatter*, parâmetro de análise celular por tamanho

g .....*Grams*, gramas

h .....hora

H&E .....Hematoxilina e Eosina

HPV.....*Human Papillomavirus*, Vírus do Papiloma Humano

IgG .....*Immunoglobulin G*, imunoglobulina G

IL.....*Interleukin*, interleucina

ILC-2.....*Innate lymphoid cells 2*, células linfóides inatas 2

INCA.....Instituto Nacional do Câncer

IFN-γ .....*Interferon-gamma*, interferon-gama

iNOS.....*Inducible nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintetase induzível

I.P. .....Intraperitoneal

kg.....*Kilograms*, quilogramas

MAPK.....*Mitogen activated protein kinases*, proteíno-quinases ativadas por mitógeno

MDSC .....*Myeloid-derived suppressor cells*, células supressoras derivadas do mielóide

MHC .....*Major histocompatibility complex*, complexo principal de histocompatibilidade

MIF .....*Macrophage migration inhibitory factor*, fator de inibição de migração de macrófagos

mL .....*Mililiters*, mililitros

mm .....*Milimeters*, milímetros

mg.....*Miligrams*, miligramas

MMP .....*Metalloproteinases*, metaloproteinases

MSF.....*Migration-stimulating fator*, fator estimulador de migração

NF-HEV.....*Nuclear factor from high endothelial venule*, fator nuclear de vasos endoteliais altos

NF-Kb .....*Nuclear fator κappa B*, fator nuclear κappa B

NK .....*Natural killer cell,* célula matadora natural

NK/T .....*Natural killer T cell*, células T matadora natural

nm.....*Nanometers,* nanômetros

NO .....*Nitric oxide*, óxido nítrico

NOS .....*Nitric-oxide synthase*, óxido nitríco sintetase

OMS .....Organização Mundial da Saúde

p53 .....*Protein* 53, proteína 53

PD-1 .....*Programmed death 1*, morte celular programada 1

PD-L1 .....*Programmed death ligant 1*, ligante de morte celular programada 1

PD-L2 .....*Programmed death ligant 2*, ligante de morte celular programada 2

PE .....*Phycoerythrin*, ficoertitrina

PercP .....*Peridinin Chlorophyll Protein*, proteína clorofil peridina

pg .....*Picograms*, picrogramas

pH .....*Hidrogenionic Potential*, potencial hidrogeniônico

PMA .....*phorbol-12-myristate-13-acetate*, acetato miristato de forbol

RNA .....*Ribonucleic acid*, ácido ribonucleico

ROI .....*Reactive oxygen intermediates*, intermediários reativos de oxigênio

ROS .....*Reactive oxygen specie*, espécies reativas de oxigênio

rpm .....rotações por minuto

RPMI .....*Roswell Park Memorian Intitute Medium*, meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SD .....*Standart deviation*, desvio padrão

SEM .....*Standart Error of Mean*, erro padrão de média

SSC .....*Side Scatter*, parâmetro de análise celular por granularidade

sST2 .....*Soluble ST2*, ST2 solúvel

ST2 .....*Interleukine 33 receptor*, receptor de interleucina 33

ST2L .....*Transmembrane ST2*, ST2 transmembrana

ST2LV .....*Variant transmembrane ST2*, ST2 transmembrana variante

ST2V .....*Variant ST2,* ST2 variante

STAT3 .....*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, sinal de transdução e ativação de transcrição 3

T CD4$^+$ .....*Helper T lymphocite*, linfócito T auxiliar

T CD8$^+$ .....*Cytotoxic T lymphocite*, linfócito T citotóxico

TAM.....*Tumor-associated macrophage*, macrófagos associados ao tumor

TCR.....*T-cell receptor*, receptor de célula T

TGF-β .....*Tumor growth factor beta*, fator de crescimento tumoral beta

T_H .....*T helper lymphocite*, linfócitos T auxiliar

T_H1 .....*T helper lymphocite 1*, linfócitos T auxiliar 1

T_H2 .....*T helper lymphocite 2*, linfócitos T auxiliar 2

TIR.....*Toll-Interleukine-1 receptor*, receptor Toll/Interleucina-1

TNFα.....*Tumor necrosis factor alpha,* fator de necrose tumoral-alfa

TP53 .....*Tumor supressor gene 53*, gene supressor de tumor 53

T_{REG}.....*Regulatory T cell*, célula T reguladora

Tγδ.....*Gamma-delta T cell*, célula T gama-delta

USP.....Universidade de São Paulo

UV .....Ultravioleta

UV-A .....Ultravioleta de tipo A

UV-B .....Ultravioleta de tipo B

VEGF .....*Vascular-endothelial growth factor*, fator de crescimento endotelial vascular

v/v .....volume/volume

WT .....*Wild-type*, tipo selvagem

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
µg	Micrograms, microgramas
µL	Microliters, microlitros
µm	Micrometers, micrômetros
ºC	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA 21
2. PROPOSIÇÃO 33
3. MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1. Aspectos éticos 37
3.2. Animais 37
3.3. Carcinogênese química 37
3.4. Tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-33 37
3.5. Eutanásia e coleta de tecidos 40
3.6. Histopatologia 40
3.7. Isolamento de leucócitos da lesão 41
3.8. Isolamento de leucócitos dos linfonodos 41
3.9. Citometria de fluxo 41
3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas 42
3.11. Análise estatística 42
4. RESULTADOS 43
4.1. Tratamento com anti-IL-33 diminui o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele 44
4.2. Tratamento com anti-IL-33 altera o perfil de resposta imune em camundongos submetidos a carcinogênese química 48
4.3. Tratamento com anti-IL-33 interfere no perfil de células do infiltrado no microambiente tumoral 49
4.4. Tratamento com anti-IL-33 altera perfil de respostas imune no microambiente tumoral em carcinoma espinocelular de pele 51
4.5. Tratamento com anti-IL-33 diminui TGF-β em amostras de camundongos submetidos à carcinogênese química 54
5. DISCUSSÃO 57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 67
7. REFERÊNCIAS 71
8. ANEXO 85

1. Introdução e Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de pele, incluindo tumores de pele melanoma e não melanoma é o tipo de câncer que mais afeta a população caucasiana (APALLA et al., 2017). Todavia, o câncer de pele não melanoma é mais incidente que o melanoma e suas taxas de morbidade aumentaram nos últimos anos, se tornando um problema de saúde de pública (DIEPGEN; MAHLER, 2002). De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% dos casos de tumores malignos no país, com estimativa de 165.580 novos casos em 2018, sendo 85.170 homens e 80.410 mulheres (RIO DE JANEIRO, 2018). Os tipos mais comuns de câncer de pele não melanoma são o carcinoma de células basais (CCB) e o carcinoma espinocelular (CEC). Ainda, a incidência de câncer de pele não melanoma aumenta com a idade, sendo que 80% dos casos são observados em indivíduos acima dos 60 anos (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010). Em comparação ao carcinoma de células basais, o carcinoma de células escamosas, também conhecido como carcinoma espinocelular, apresenta maiores taxas de crescimento, desenvolvimento invasivo e metástase, sendo responsável por 75% das mortes por câncer de pele não melanoma, com índices de metástase variantes entre 0,1-9,9%. (ALAM; RATNER, 2001; LEITER; GARBE, 2008).

O carcinoma espinocelular é caracterizado pela proliferação atípica de células da camada espinhosa da epiderme, denominadas queratinócitos, e atinge principalmente regiões corpóreas comumente expostas a radiação solar, sendo a região de cabeça e pescoço correspondente a 55% dos casos (DIEPGEN; MAHLER, 2002). Tratando-se da região de cabeça e pescoço, existem ainda outros fatores que podem levar ao desenvolvimento de lesões tumorais, como por exemplo, histórico de tabagismo, etilismo, deficiências no suprimento de vitaminas e minerais e infecções virais por HPV (*Human Papillomavirus*) e EPV (*Epstein-Barr virus*) (DOTTO; RUSTGI, 2016). Além disso, a presença de lesões precursoras, como por exemplo, queratoses actínicas (AK), doença de Bowen e recorrência de câncer de pele não melanoma, podem levar ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele (MARCIL; STERN, 2000; RÖWERT-HUBER et al., 2007).

Sabe-se que o desenvolvimento da maioria dos canceres é influenciado por fatores de risco individuais, incluindo o ambiente, estilo de vida e fatores genéticos como predisposição genética e aquisição de mutações randomizadas (WODARZ; ZAUBER, 2015; WIDSCHWENDTER et al., 2018), e cerca de 90% dos cânceres são causados pela combinação de mutações somáticas e fatores ambientais, que desencadeiam ativações ou

inativações inapropriadas de genes específicos que levam à transformação neoplásica (ANAND et al., 2008).

Principal causa de surgimento de câncer de pele, a radiação ultravioleta (UV) causa mutações no gene supressor de tumores *TP53* e o oncogene *RAS*, em sua maioria no subtipo *Harvey-ras* (*Ha-ras*) (BOUKAMP, 2005). Contudo, mutações na proteína Ha-Ras são raras em carcinoma espinocelular de pele humano e 90% dos carcinomas espinocelulares humanos apresentam mutações na proteína p53 (BRASH, 2006; BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007; SCHWARZ; MÜNZEL; BRAEUNING, 2013). A exposição a raios ultravioleta do tipo B (UV-B) é mais mutagênica quando comparada a exposição à UV-A, por causar danos diretos ao DNA e RNA, porém ambas podem causar a inativação de *TP53*, levando a carcinogênese em cânceres de pele não melanoma (GIGLIA-MARI; SARASIN, 2003; RIDLEY et al., 2009). Em queratinócitos, a mutação na proteína p53 torna estas células resistentes a apoptose, possibilitando a expansão clonal (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010). Além dos fatores já descritos, a ativação da telomerase também é importante na patogênese de carcinoma espinocelular (BOLDRINI et al., 2003). Células neoplásicas que apresentam grande atividade de telomerase, não sofrem perda de regiões teloméricas durante a proliferação celular, conferindo assim a imortalização da célula tumoral (SHAY; WRIGHT, 1996).

Sabe-se ainda, que as mutações somáticas ocorrem e se acumulam a uma taxa significativamente maior nas células neoplásicas quando comparadas as células não alteradas e esta capacidade de acumular mutações é fundamental para o desenvolvimento do câncer (MARTINCORENA; CAMPEBELL, 2015). Tais mutações podem ser causadas por defeitos na regulação do ciclo celular, apoptose, vias específicas de reparo de DNA, ou DNA polimerase propensas a erros e podem ter sua origem em defeitos genéticos hereditários que tornam sujeitos propensos a cânceres específicos (AMBASTA, 2015). Desta forma, as células neoplásicas apresentam características específicas que as diferenciam das células não alteradas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a displasia epitelial é caracterizada pela presença de variações na estrutura das camadas que compõe o epitélio, denominadas distúrbios arquiteturais, somadas a variações morfológicas nos queratinócitos, denominadas atipias celulares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). A partir da observação destas características, é possível classificar o grau de displasia em lesões de baixo e alto risco (KUJAN et al., 2006) ou ainda em displasia discreta, moderada e intensa de acordo com o proposto pela OMS. É sugerido que a classificação da lesão seja estabelecida

pela caracterização do local onde são encontrados maiores números de distúrbios arquiteturais e atipias celulares (WARNAKULASURIYA, 2001), pois a exposição a fatores carcinogênicos, pode levar a formação de diversas lesões, inclusive com diferentes graus de displasia, em um mesmo tecido (WARNAKULASURIYA, 2001).

As alterações apresentadas por células neoplásicas podem gerar antígenos que são reconhecidos pelo sistema imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Células neoplásicas podem apresentar antígenos específicos, que não são expressos por células não alteradas, ou ainda, antígenos associados a tumores, que são encontrados em células não alteradas, entretanto as células neoplásicas possuem uma expressão exacerbada ou desregulada destes antígenos (COULIE et al., 2014). No entanto, existem tumores pouco imunogênicos, e o sistema imune do hospedeiro pode não os reconhecer ou atuar, o que favorece o desenvolvimento tumoral, corroborando com a teoria da imunoedição, compreendida em três fases: eliminação, equilíbrio e escape (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

A fase de eliminação está de acordo com a teoria da vigilância imunológica (BURNET, 1971). Nesta fase, as respostas imunes inata e adaptativa, conseguem detectar as células neoplásicas e destruí-las, antes que o tumor se torne clinicamente detectável (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Células *natural killers* (NK), NK/T, células T gamma-delta (Tγδ) e macrófagos são recrutadas para o local de desenvolvimento tumoral devido a angiogênese e o crescimento invasivo do tecido tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Entretanto, tumores possuem uma heterogeneidade de tipos celulares, com padrões variáveis de mutações genéticas, alterações epigenéticas e expressão gênica, mesmo dentro de grupos histologicamente homogêneos (FEINBERG et al., 2006). Sendo assim, as células malignas e pré-malignas podem resistir a fase de eliminação e entrar na fase de equilíbrio, na qual as células da resposta imune atuam contra as células neoplásicas, sendo capaz de controla-las, porém, não conseguindo eliminá-las totalmente (AGUIRRE-GHISO, 2007).

A fase de equilíbrio é a mais longa do processo de imunoedição e pode durar anos (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Considerando-se esta longa duração, a resposta do sistema imune contra os diferentes fenótipos de células neoplásicas pode levar a seleção de células com maior instabilidade genética e continuamente sujeitas a mutações, o que permite que estas células desenvolvam mecanismos que reduzam sua imunogenicidade, e as tornem resistentes a resposta imune (KOEBEL et al., 2007). Sendo assim, estes fenótipos poderão aumentar suas taxas de divisão e crescimento, levando a terceira fase, conhecida como fase de escape (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004)

No escape as células neoplásicas selecionadas na fase de equilíbrio podem se dividir, uma vez que passam por alterações que permitem não serem reconhecidas pelo sistema imune, como por exemplo, a perda da expressão de moléculas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês, *major histocompatibility complex*) e a não sensibilidade a Interferon-gama (IFN-γ do inglês, *Interferon-gamma*) ou por apresentarem falhas nos seus receptores de apoptose ou expressão de sinais anti-apoptóticos (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Desta forma, células neoplásicas podem escapar dos mecanismos que o sistema imune desenvolveu na fase de eliminação para combate-las, e podem ainda, direta ou indiretamente, impedir o desenvolvimento de resposta imune antitumoral pela produção de citocinas imunossupressoras, como por exemplo, interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento tumoral-beta (TGF-β do inglês, *tumor growth factor-beta*) ou pela ativação de células reguladoras (T_{REG} do inglês, *regulatory T cells*) (KHONG; RESTIFO, 2002).

Propõe-se que a infiltração de células imunes, possui papel fundamental na tumorigênese, de forma que o infiltrado inflamatório pode corresponder por até 50% da massa tumoral (MANTOVANI et al., 2008; SICA; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008). Estudos em diferentes tipos de tumores têm demonstrado que as neoplasias são infiltradas por população heterogênea de células do sistema imune, constituída de diferentes proporções de células NK, macrófagos, linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, e linfócitos B (AALTOMAA et al., 1992; CAMP et al., 1996). O perfil de células do sistema imune infiltradas no microambiente tumoral pode variar de acordo com o tecido ou órgão afetado, bem como pelo estágio de desenvolvimento tumoral (MANTOVANI et al., 2008; RUFFELL et al., 2012); e o infiltrado inflamatório peri ou intratumoral também pode, direta ou indiretamente, prover a produção de mediadores de crescimento, interleucinas e quimiocinas que estimulam a proliferação de células neoplásicas e de células presentes no estroma tumoral (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005).

No que concerne a imunidade inata, os macrófagos, denominados macrófagos associados ao tumor (TAMs do inglês, *tumor-associated macrophages*), são as principais células presentes no microambiente tumoral (NOY e POLLARD, 2014). A presença de macrófagos no microambiente tumoral é considerada um dos hallmarkers da inflamação associada ao tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011), e a maior densidade de macrófagos, na maioria dos tumores, está associada ao aumento da angiogênese, metástase e mal prognóstico (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002). Contudo, os macrófagos associados ao tumor também podem atuar em respostas anti-tumorais de acordo com os estímulos oferecidos pelo microambiente tumoral (SICA; MANTOVANI, 2012).

Os macrófagos associados ao tumor secretam uma variedade de mediadores pró-angiogênicos, como por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular-A e C (VEGF do inglês, *vascular endothelial growth factor*), metaloproteinases 1 e 7 (MMPs o inglês, *metalloproteinases*), IL-8 e o fator de crescimento epidérmico (EGF do inglês, *epidermal growth factor*) estimulando o aumento no número de vasos sanguíneos e linfáticos (MANTOVANI et al., 2002; MURDOCH; LEWIS, 2005; BINGLE et al., 2006; LIN et al., 2006; MURDOCH et al., 2008). Este processo de formação de novos vasos, favorece o crescimento tumoral, a migração de células neoplásicas para outros tecidos e a migração de células imunes para o tecido neoplásico (FOLKMAN, 2003; TENG et al., 2015). TAMs podem ainda favorecer a migração de células neoplásicas pela produção de osteonectina que aumenta a interação das células tumorais com a matrix extracelular (SANGALETTI et al., 2008); pela liberação de proteases que remodelam a matrix extracelular e liberam fatores de crescimento (LAOUI et al., 2011; QUAIL; JOYCE, 2013); e pela liberação de TGF-β que promove a transição epitélio mesenquimal das células tumorais (BONDE et al., 2012). Também, a produção de VEGF e fator estimulador de migração (MSF do inglês, *migration-stimulating factor*) por macrófagos, recruta monócitos para o microambiente tumoral (SOLINAS et al., 2010).

Os macrófagos presentes no tumor podem ainda expressar diversos receptores e produzirem citocinas, quimiocinas e enzimas que inibem a resposta antitumoral mediada por células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ (NOY; POLLARD, 2014). TAMs expressam PD-L1, PD-L2, ligantes de PD-1 (do inglês, *programmed death 1*) e B7-1 e B7-2, ligantes de CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4*), receptores altamente expressos nas células T efetoras, e a interação destas moléculas leva a inibição da atividade citotóxica das células T efetoras (LOKE; ALISSON, 2003; GREEWALD; LATCHMAN; SHARPE, 2002). Quanto as citocinas, TAMs secretam IL-10 e TGF-β, que modulam as funções das células T, uma vez que inibem a citotoxidade de células $CD8^+$ e/ou estimulam a expressão de FOXP3 (do inglês, *factor forkhead box protein P3*) em células $TCD4^+$, conferindo a estas um fenótipo de célula T reguladora (KRYCZEK et al., 2006). Além disso, IL-10 promove a inibição da diferenciação e maturação de células dendríticas, principais células apresentadoras de antígenos (VICARI; TRINCHIERI, 2004). TAMs secretam quimiocinas como CCL5, CCL20 e CCL22 que recrutam células T reguladoras para o microambiente tumoral (ADEEGBE; NISHIKAWA, 2013).

Os mecanismos de TAMs que envolvem enzimas estão correlacionados com a capacidade destas células de secretarem óxido nítrico sintetase (NOS do inglês, *Nitric-oxide*

synthase) e arginase de tipo I, que processam a L-arginase presente na cadeia TCR-ζ, do receptor de TCR, necessário para o desenvolvimento das funções efetoras das células T, impedindo sua re-expressão (RODRIGUEZ et al., 2004). Ainda, TAMs podem recrutar neutrófilos para o tecido neoplásico, que na presença de TGF-β desenvolvem uma resposta pró-tumoral, também pela expressão de arginases (FRIDLENDER; ALBELDA, 2012).

Entretanto, conforme dito anteriormente, apesar da maior concentração de TAMs estar associada, na maioria dos canceres com a progressão tumoral, os macrófagos também podem, direta ou indiretamente, estimular uma resposta antitumoral (SICA; MANTOVANI, 2012). Isso ocorre porque macrófagos liberam fator de inibição de migração de macrófagos (MIF do inglês, *macrophage migration inhibitory factor*) que além de suprimir a migração de leucócitos para o microambiente tumoral, estimula diversas funções em macrófagos, como fagocitose, promoção de morte de células tumorais e liberação de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002). Além disso, a presença de IL-12 e IL-18 no microambiente tumoral promove a produção de IFN-γ e IL-2 por macrófagos, que estimulam a proliferação e a citotoxidade em células T e NK, além de promover a diferenciação de células T $CD4^+$ para o perfil T auxiliar do tipo 1 (T_H1 do inglês, *T Helper 1*) (TRINCHIERI, 1998; OSAKI et al., 1999). Ademais, na presença IFN-γ os macrófagos podem ter sua habilidade citotóxica aumentada de diversas formas, como por exemplo, pela produção de fator de TNF-α, IL-12 e IL-23; pela alta expressão de intermediários tóxicos como óxido nítrico (NO do inglês, *nitric oxide*) e intermediários reativos de oxigênio (ROI do inglês, *reactive oxygen intermediates*); e pelo aumento da expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, o que potencializa sua função de célula apresentadora de antígenos, favorecendo uma resposta antitumoral pela ativação de células T $CD4^+$ (MANTOVANI et al., 2004).

Adicionalmente, as células supressoras derivadas do mielóide (MDSCs do inglês, *Myeloid-derived suppressor cells*) estão relacionadas com uma resposta imune pró-tumoral (GABRILOVICH; OSTRAND-ROSENBERG; BRONTE, 2012). A maioria das MDSCs exibe morfologia de granulócitos e expressão aumentada de iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*) e arginase, que inibem a função das células T por meio de mecanismos como, liberação de NO e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês, *reactive oxygen species*).

Além disso, as MDSCs também produzem citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF-β (GABRILOVICH; OSTRAND-ROSENBERG; BRONTE, 2012). IL-10 restringe a apresentação de antígenos por suprimir a expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias

B7 (MOORE et al., 2001), e pela inibição da diferenciação e maturação de células dendríticas, principais células apresentadoras de antígenos (VICARI; TRINCHIERI, 2004). Com relação a TGF-β, sua presença no tumor pode estar correlacionada tanto com a supressão quanto com a promoção do desenvolvimento tumoral, uma vez que diversos tipos celulares presentes no microambiente tumoral respondem a TGF-β (BIERIE; MOSES, 2006b). Em câncer, TGF-β geralmente está associado a supressão nos estágios iniciais da tumorigênese e a promoção do desenvolvimento tumoral em fases tardias, onde está correlacionado com aumento de angiogênese, metástase e mal prognóstico (ASCOLANI; LIÒ, 2014; MEULMEESTER; TEN DIJKE, 2011).

O principal mecanismo de morte das células tumorais por vias específicas depende da ação de linfócitos T $CD8^+$. Estas células reconhecem e eliminam células malignas via moléculas MHC de classe I; secretam citocinas como IFN-γ; estimulam a imunidade adaptativa; e podem induzir a morte celular através da ligação de receptores de morte celular como o Fas/FasL, PD-1/PD-L1 e CTLA-4/CD28 (GORELIK; FLAVELL, 2001; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; LIEBERMAN, 2003).

Ademais, considera-se que o principal mecanismo da imunidade a tumores seja devido à resposta de células T (MANTOVANI et al., 2008). Células apresentadoras de antígenos (APCs do inglês, *antigen presenting cells*) ativam células T *naïve* residentes nos linfonodos pela apresentação de antígenos tumorais, levando a expansão clonal de células T efetoras, afim de gerar números suficientes de células maduras para eliminar as células neoplásicas (MELERO et al., 2014). Linfócitos T $CD4^+$ reconhecem antígenos tumorais e podem controlar o desenvolvimento tumoral (BRAUMÜLLER et al., 2013; TRAN et al., 2014). Estas células coordenam a resposta imune antitumoral através da produção de citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos T $CD8^+$ e induzem a ativação de células da imunidade inata como os macrófagos através da liberação de IFN-γ produzido por células T $CD4^+$ T_H1 (CASERTA; BORGER; ZAMOYSKA, 2012).

Interferon-γ é uma citocina que regula a diferenciação e a funções de diversos tipos de células, sendo apontada como ativadora de respostas imunes de perfil T_H1 e inibidor de T_H2 (AGNELLO et al., 2003). A presença de IFN-γ no tecido neoplásico pode, dentre outros efeitos, aumentar a expressão de MHC de classe I, tornando as células neoplásicas mais imunogênicas e favorecendo a apresentação de antígenos tumorais por células apresentadoras de antígenos. (ZAIDI; MERLINO, 2011). Contudo, caso a apresentação de

antígenos tumorais não seja acompanhada de sinais de maturação adequados, pode-se desenvolver a anergia de células T, ou ainda ativação de células T_{REG} (MELERO et al., 2014).

As células T reguladoras possuem papel crucial na manutenção da homeostase e na tolerância imunológica de todo o organismo, influenciando a atividade de outros tipos celulares, afim de evitar o desenvolvimento de respostas imunes que possam causar dano ao próprio (SHEVACH, 2004). Devido as suas características imunossupressoras as células T_{REG} estão associadas a inibição da resposta imune antitumoral (BERENDT; NORTH, 1980; MELERO et al., 2014). As células T_{REG} tem papel importante na supressão da imunidade contra antígenos tumorais específicos, uma vez que nos linfonodos inibem a iniciação do desenvolvimento de resposta imune por células T e, quando no microambiente tumoral, suprimem a função de células T efetoras específicas para os antígenos tumorais (ZOU, 2006).

Estas informações indicam que o microambiente tumoral, compreendido pelos componentes celulares e não celulares, tem papel importante em determinar a progressão do tumor (VALKENBURG; de GROOT; PIENTA, 2018). Considerando-se o carcinoma espinocelular, sabe-se que os queratinócitos secretam diversos mediadores inflamatórios, como, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que direcionam a migração e subsequente ativação dos leucócitos, muitos dos quais foram implicados como mediadores da progressão tumoral em câncer de pele (LUND et al., 2016). Após a descoberta da interleucina-33 (IL-33) como uma nova citocina pró-inflamatória (SCHMITZ et al., 2005; CAYROL; GIRARD, 2018), estudos apontaram que inflamação mediada por IL-33 tem papel no desenvolvimento de câncer, podendo tanto restringir como promover a tumorigênese (WASMER; KREBS, 2017).

Inicialmente, IL-33 foi descrita como um fator nuclear de vasos endoteliais altos (NF-HEV do inglês, *nuclear factor from high endothelial venules*) e atualmente sabe-se que é uma citocina pertencente à família IL-1 e ligante do receptor ST2 que está associada à cromatina (BAEKKEVOLD et al., 2003; CARRIERE et al., 2007). As principais fontes de IL-33 são células expostas ao microambiente, como células endoteliais e epiteliais e a sua expressão por queratinócitos, células da pele, sugerem que similarmente as IL1s, IL-33 desenvolve papéis importantes em respostas a injúrias e infecções (MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008).

Em condições de homeostase, IL-33 é uma molécula predominantemente nuclear, podendo ser considerada um padrão molecular associado ao dano (DAMP do inglês, *damage-associated molecular pattern*), devido a sua alta expressão em tecidos normais, sua atividade biológica de proteína e sua liberação para o ambiente extracelular após injurias mecânicas ou

morte de células necróticas (CAYROL; GIRARD, 2009; LÜTHI et al., 2009; TALABOT-AYER et al., 2009; PICHERY et al., 2012). O dano tecidual promove a liberação de IL-33 por células epiteliais, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013). Sob condições de morte celular e estresse, mediado por agentes infecciosos, IL-33 pode induzir uma resposta inflamatória excessiva causando danos colaterais locais ou sistêmicos (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016). Sendo assim, sugere-se que a localização intracelular de IL-33 foi selecionada e mantida durante o processo evolutivo para regular sua potente atividade pró-inflamatória (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016).

Quando em ambiente extracelular, IL-33 é uma citocina que exerce seu papel pela ativação de células das respostas imune inata e adaptativa, como por exemplo células linfoides inatas (ILC2), macrófagos e células T_H2 (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013), e estimula a produção de citocinas associadas como por exemplo, IL-4, IL-5 e IL-13 (GIRARD et al., 2007). Entretanto, dados da literatura evidenciam que a sinalização mediada pela ligação de IL-33 também pode influenciar e o padrão de resposta imune de T_H1 (LIEW; PITMAN; MCINNES, 2010).

O receptor ST2, considerado órfão até o descobrimento de IL-33 é pertencente a superfamília *Toll-like/ILReceptor*, por possuir uma sequência de receptor Toll/Interleucina-1 (TIR, do inglês *Toll-Interleukine-1 receptor*) característica de todos os receptores desta família e à subfamília *IL-1 receptor-like* e pela composição por 3 domínios de imunoglobulina na porção extracelular. Este receptor possui quatro diferentes isoformas, ST2 transmembrana (ST2L), ST2 solúvel (sST2), ST2 variante (ST2V) e ST2 transmembrana variante (ST2LV) (KAKKAR e LEE, 2008). ST2L é o receptor transmembrana *Toll-like receptor*, sua ligação à IL-33 resulta na ativação de Fator Nuclear κappa B (NF-κB do inglês, *nuclear fator-κappa B*) e proteíno-quinases ativadas por mitógeno (MAPK do inglês, *mitogen activated protein kinases*), levando a produção de citocinas associadas a resposta T_H2 (SCHMITZ et al, 2005). sST2, se apresenta como uma forma solúvel que perde a expressão da porção transmembrana e o motivo de TIR, e atenua respostas T_H2 (WERENSKIOLD, 1992). ST2V e ST2LV são formas variantes de ST2L. ST2V, perde o terceiro domínio de imunoglobulina, enquanto ST2LV perde a porção transmembrana (TOMINAGA et al., 1999; IWAHANA et al., 2004).

Contudo, importância da sinalização via IL-33/ST2L foi muito estudada em doenças alérgicas, como dermatites e asma, onde está associada com um padrão de resposta imune do tipo T_H2 (MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008; XU et al., 2008; PUSHPARAJ,

2009), e o estudo do papel de IL-33 na resposta imune antitumoral apenas recebeu atenção na última década (LU; YANG; WANG, 2016).

Estudos apontam esta via de sinalização como potencializadora de progressão tumoral e/ou metástase em alguns tipos de câncer, como por exemplo, câncer de colorretal, câncer estomacal, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de mama (ZHANG et al., 2012; HU et al., 2013; LIU et al. 2014; YU et al., 2015; AKIMOTO; TAKENAGA, 2018). Enquanto outros estudos apontam que sinalização IL-33/ST2 está associada com o desenvolvimento de respostas antitumorais em câncer associado a infecção por HPV, e mesmo em modelos experimentais de melanoma, câncer de mama e câncer colorretal (GAO et al., 2014; VILLARREAL et al., 2014; O'DONNELL et al., 2016). De acordo com a literatura, IL-33 apresenta esta dualidade no desenvolvimento de resposta imune anti-tumoral devido a expressão do seu receptor ST2L por diversas células do sistema imune (CAYROL; GIRARD, 2018).

Em relação ao câncer de cabeça e pescoço, as evidências indicam que expressão de IL-33 está associada ao comportamento invasivo deste tipo de tumor (CHEN, et al., 2013). Dados recentes do nosso grupo demonstraram que a via de sinalização IL-33/ST2 promove o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele, indicando que IL-33 poderia ser um alvo para o tratamento deste tipo de carcinoma (AMÔR et al., 2018). Ademais, o tratamento com anti-IL-33 foi considerado promissor em estudos sobre doenças como lúpus, renite alérgica e asma (LIU et al., 2009; KIM et al., 2012; LI, LIN e ZHENG, 2014) e a deleção da sinalização ST2, aumenta a resposta antitumoral em modelo murino de carcinoma de mama (JOVANOVIC et al., 2011). Entretanto pouco se sabe sobre o efeito deste tratamento no desenvolvimento de carcinoma espinocelular. Sendo assim, considerando o papel controverso de IL-33 no desenvolvimento da resposta imune, o presente estudo teve como objetivo descrever o efeito do bloqueio de IL-33 em carcinoma espinocelular quimicamente induzido em camundongos BALB/c.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do bloqueio de IL-33 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente em camundongos BALB/c. Desta forma, propõe-se:

1. Avaliar o desenvolvimento tumoral após o tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-33;
2. Avaliar a resposta imune desenvolvida ao final do protocolo de indução carcinogênica e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-33;
3. Fenotipar o perfil do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral em amostras de lesões de camundongos induzidos quimicamente ao carcinoma espinocelular.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos. Esta pesquisa obteve aprovação pela Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, sob o protocolo de pesquisa 012/2017 (ANEXO A) e foi garantido o bem-estar animal.

3.2. Animais. Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c, fêmeas, de 8 semanas, provenientes do Biotério Geral da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alocados, ao acaso, em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições apropriadas, com livre acesso à água e a uma dieta padrão de laboratório.

3.3. Carcinogênese química. A indução da carcinogênese química foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Moore et al. (1999). Este processo compreende duas fases, a fase de iniciação e a de promoção. Durante a fase de iniciação, o dorso dos camundongos era submetido a assepsia por álcool 70% v/v e à tricotomia com auxílio de lâmina de barbear. Em seguida, os camundongos recebiam aplicações de 25µg de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) diluídos em 100µL de acetona, e estas aplicações eram realizadas uma vez por semana, durante três semana. Na fase de promoção, os animais receberam 10µg de acetato miristato de forbol (PMA, *phorbol-12-myristate-13-acetate*) diluídos em 100µL acetona, três vezes por semana, pelo período de 20 semanas.

Durante todo o período experimental, os camundongos foram acompanhados para a análise macroscópica do desenvolvimento tumoral. As lesões tumorais foram classificadas como exofíticas devido a formação de protuberâncias verrucosas e em endofíticas devido a internalização das lesões na pele.

3.4. Tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-33. O tratamento com anti-IL-33 foi realizado com o intuito de analisar o efeito desta citocina no desenvolvimento de carcinoma espinocelular. O tratamento foi iniciado na décima sexta semana do protocolo de carcinogênese química, uma vez que 100% dos animais apresentaram lesões visíveis macroscopicamente. Com base no protocolo de tratamento, os camundongos foram divididos em grupos, como segue:

Grupo 1. Camundongos BALB/c que foram submetidos à carcinogênese química e tratados com anticorpo não relacionado, anti-IgG [3µg/500uL] (n = 10);

Grupo 2. Camundongos BALB/c que foram submetidos à carcinogênese química e tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-33 de camundongo [3µg/500uL] (n = 8).

O tratamento foi realizado por via intraperitoneal, uma vez por semana, durante quatro semanas. O anticorpo monoclonal anti-IL-33 de camundongo e o anticorpo anti-IgG de camundongo são provenientes da R&D Systems® (Minneapolis, MN, EUA).

3.5. Eutanásia e coleta de tecidos. Os animais sofreram eutanásia no período de 20 semanas após o início da aplicação do carcinógeno. A eutanásia foi realizada com o uso do barbitúrico Tiopental Sódico 2,5% (200mg/kg) por via intraperitoneal, associado com anestésico local (cloridrato de lidocaína na dosagem de 10 mg/kg), de acordo com as recomendações do Procedimento Operacional Padrão (POP - Eutanásia) da Seção de Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru. Após a confirmação do óbito, o tecido tumoral e órgãos (rim, baço, fígado, coração, pulmão e linfonodo), de cada camundongo, foram removidos cirurgicamente e armazenados em meio RPMI suplementado com soro bovino fetal (10%).

3.6. Histopatologia. Amostras de tecidos tumoral e de rim, baço, fígado, coração, pulmão e linfonodo foram fixadas em formalina, processadas de acordo com os procedimentos padrões para inclusão em parafina, cortadas a 5µm e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas por um patologista que não teve acesso à identificação das amostras e pelo autor do trabalho, em microscópio óptico nas objetivas de 10X, 40X e 100X.

As displasias foram graduadas de acordo com os critérios arquiteturais e citológicos propostos pela Organização Mundial da Saúde em 2005 em: displasia epitelial discreta, quando na presença alterações arquiteturais limitadas ao terço basal do epitélio, acompanhado de atipia citológica; displasia epitelial moderada, lesões com alterações arquiteturais se estendendo ao terço médio do epitélio, considerando-se que a análise do grau de atipia citológica pode aumentar o grau de displasia; e displasia epitelial intensa: presença de alterações arquiteturais em mais de dois terços do epitélio associadas a atipias citológicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). De acordo com a OMS são considerados distúrbios arquiteturais: a estratificação irregular das camadas do epitélio; a perda da polarização das células da camada basal; cristas epiteliais em forma de gota; aumento do número de mitoses; mitoses anormais nas camadas superiores; queratinização precoce de células individuais, ou seja, disqueratose; e queratinização no interior das cristas epiteliais. As

atipias celulares são: anisonucleose, caracterizada pela variação anormal no tamanho do núcleo celular; pleomorfismo nuclear, ou seja, variação no formato do núcleo; anisocitose, determinada pela variação anormal no tamanho da célula; pleomorfismo celular, ou seja, variação no formato celular; proporção núcleo-citoplasma aumentada; aumento no tamanho do núcleo; presença de mitoses atípicas; aumento no número e tamanho dos nucléolos; e hipercromatismo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). Adicionalmente, foram selecionados três campos aleatórios na região de interesse das lesões, visando a observação de células inflamatórias mononucleares. O infiltrado mononuclear de cada secção foi classificado quanto a intensidade em discreto, moderado ou intenso e de acordo com a localização em difuso, focal ou misto (MANZANO et al., 2010).

3.7. Isolamento de leucócitos do tecido tumoral. Para caracterização dos leucócitos presentes no microambiente tumoral, um fragmento das amostras de tecido tumoral sofreu a digestão enzimática pela incubação com 250µg/mL de colagenase, diluída em meio RPMI incompleto, por 40 minutos a 37°C. Após este período, a amostra foi processada usando Medimachine (BD PharMingen®), por 4 minutos. A contagem celular foi realizada sob microscopia de luz e as células utilizadas para a fenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo.

3.8. Isolamento de leucócitos dos linfonodos. Em capela de fluxo laminar, os linfonodos removidos cirurgicamente de animais submetidos a carcinogênese química foram processados manualmente com auxílio de pinça em meio RPMI completo. As células liberadas após o processo de maceração manual foram colhidas e lavadas duas vezes com RPMI, sendo centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos à 4ºC. A contagem celular foi realizada sob microscopia de luz e as células utilizadas para a fenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo.

3.9. Citometria de fluxo. A citometria de fluxo foi realizada com a finalidade de caracterizar o perfil do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral e fenotipar os leucócitos presentes nos linfonodos. Para tal, as células ($1x10^6$ células) isoladas como descrito previamente foram incubadas com soro de coelho por 60 minutos a 4ºC para o bloqueio de ligações inespecíficas. Posteriormente, dependendo do tipo de população de leucócitos a ser analisada, as células foram marcadas com anticorpos específicos conjugados a fluorescência (BD Bioscience®) e incubadas por 1h a 4ºC, ao abrigo da luz. Os anticorpos que foram

utilizados foram: CD3FITC (APA1/1), CD19PE (1D3), CD4PERCP (RM4-5), CD8APC (53-6.7), CD25PE (PC61), CD62LPE (DREG-56), CD69PE (H1.2F3), CD11CFITC (B-ly6), CD11BFITC (M1/70), LY6PE (AL-21), DCPE (33D1), IL-17PE (TC11-18H10), IL-4PE (11B11) IL-10FITC (JES5-16E3), IFN-γPE (B27), Para detecção de citocinas intracelulares foram utilizados anticorpos anti-IFN-γ (4S.B3), anti-IL-10 (JES3-19F1) e anti-TGF-β (14132). Como controle foram utilizados os isotipos de camundongos, cabra e/ou coelho. Após a incubação, as células foram lavadas, por duas vezes, a 1500rpm durante 10 minutos a 4ºC e a leitura realizada em FACS Callibur (BD Immunocytometry Systems®, Franklin Lakes, NJ). As análises foram realizadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SCC) e fluorescência (FL) pelo programa CELL Quest (BD Immunocytometry Systems®).

3.10. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas. A presença de IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17 e TGF-β no microambiente tumoral foi determinada por ELISA, utilizando-se kits comerciais (Kit Opteia®, BD Bioscience®) de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Rad®, EUA) a 450nm.

3.11. Análise estatística. Os resultados foram expressos como média ± SD e percentagem dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Instat (INSTAT software®, GraphPad, San Diego, CA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados com indicativo de significância.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Tratamento com anti-IL-33 diminui o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele.

Para análise do efeito de IL-33 na progressão do carcinoma espinocelular de pele, camundongos BALB/c foram submetidos ao protocolo de carcinogênese química. A partir da 15ª semana, 100% dos animais apresentavam lesões tumorais macroscopicamente visíveis (FIGURA 1A). Em decorrência do estabelecimento tumoral, a partir da 16ª semana os animais foram divididos em dois grupos, animais tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-33 (grupo anti-IL-33), e animais submetidos ao tratamento com anticorpo não relacionado anti-IgG (grupo controle) (FIGURA 1B). A partir da 17ª semana, que corresponde a segunda semana do tratamento, a incidência de lesões do tipo *papiloma-like* mostrou-se menor no grupo anti-IL-33 quando comparada ao grupo controle, apresentando relevância estatística na 19º semana (FIGURA 1C). A análise macroscópica demonstrou que após o início do tratamento com anti-IL-33 as lesões apresentaram menor intensidade na coloração em comparação ao grupo controle (FIGURA 1D à G). Ao final do período de carcinogênese, os animais do grupo anti-IL-33 apresentaram tanto lesões de perfil endofítico (50% dos animais) quanto lesões de caráter exofítico (50%) (FIGURA 1H). Enquanto que em animais do grupo controle observou-se o predomínio de lesões do perfil endofítico (70% dos animais) (FIGURA 1H). Esses resultados sugerem que o tratamento com anti-IL-33 levou a diferenças no desenvolvimento de lesões do tipo *papiloma-like* entre os grupos.

Afim de confirmar as possíveis diferenças quanto à progressão tumoral após o tratamento com anti-IL-33, realizamos a análise microscópica das lesões para avaliar as alterações histopatológicas. Inicialmente analisamos o grau de displasia, de acordo com o sistema de classificação de displasias epiteliais proposto pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). De acordo com esta gradação, a maioria das amostras de animais do grupo anti-IL-33 (50%) apresentou lesões com discreta displasia, enquanto a maioria das amostras do grupo controle (44,44%) apresentou lesões classificadas como carcinoma *in-situ* (FIGURA 2I). Adicionalmente, as análises das secções de H&E revelaram que os amostras de camundongos do grupo controle (animais tratados com anti-IgG) apresentaram lesões com intensa displasia (33,33%), enquanto que em amostras de camundongos submetidos ao tratamento com anticorpo anti-IL-33 não se observou este padrão de displasia (Figura 2I). Ainda, em amostras de camundongos tratados com anti-IL-33

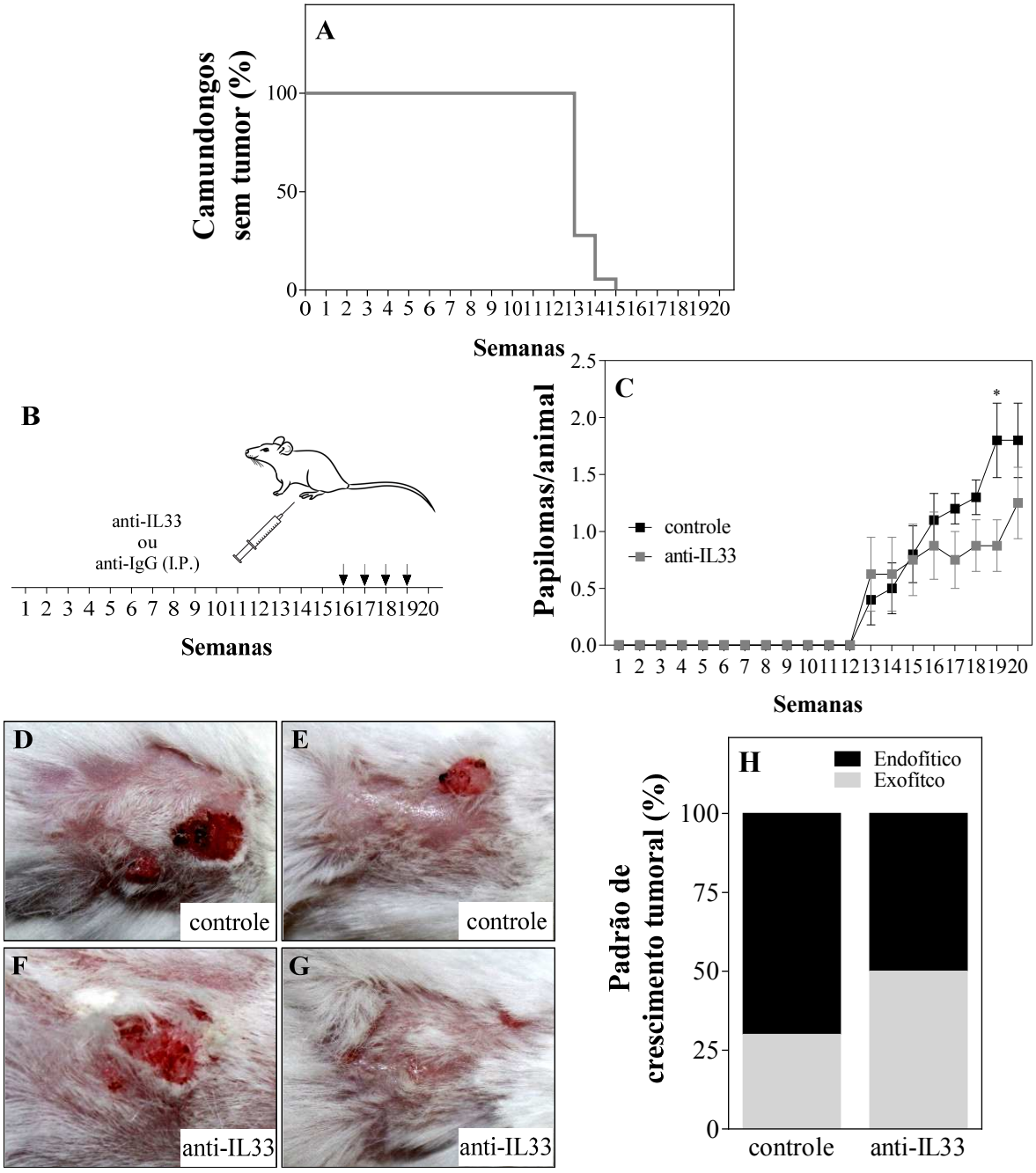

Figura 1. Tratamento com anti-IL-33 diminui o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele. Camundongos isogênicos BALB/c WT foram submetidos ao protocolo de carcinogênese química por 20 semanas **(A)** Representação gráfica da percentagem de animais com tumor ao longo do processo de indução carcinogênica. **(B)** Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento. Os animais foram tratados com isótopo de controle [3µg/500µl] (n=10) e anti-IL-33 (n=8) [3µg /500µl] nas semanas 16, 17, 18 e 19. **(C)** Representação gráfica da incidência de lesões *papiloma-like* ao longo dos períodos de indução carcinogênica e tratamento. As barras representam a média SEM. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA, onde *p<0,05. Fotomicrografias macroscópicas e sem escala de (**D** e **E**) lesões características do grupo controle e (**F** e **G**) do grupo anti-IL33. (**H**) Gráfico representativo dos padrões de lesões macroscópicas ao final de 20 semanas de indução carcinogênica.

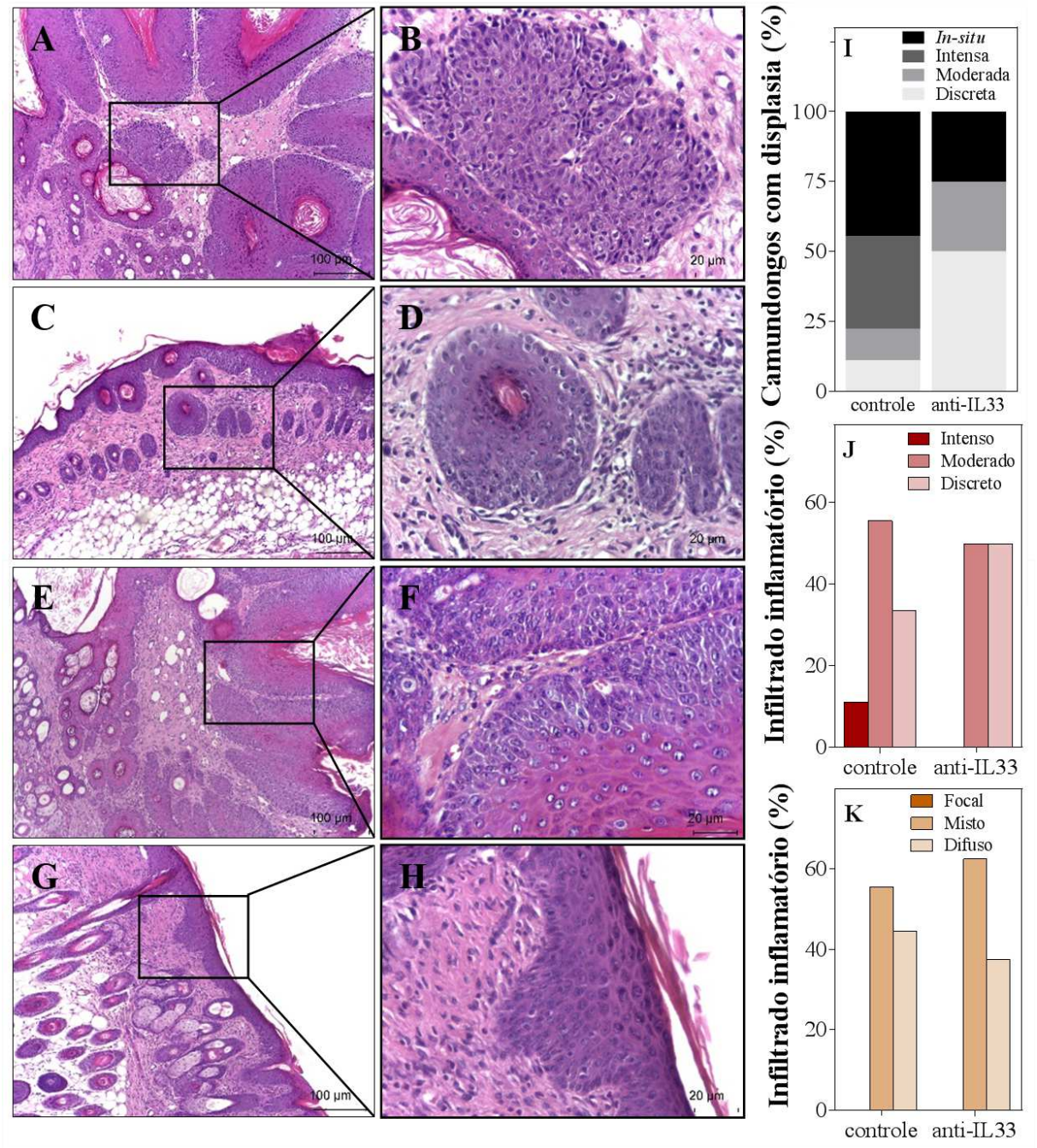

Figura 2. Tratamento com anti-IL-33 diminui o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele. Após o período de 20 semanas os animais foram eutanasiados e secções de amostras de tumor, de todos os camundongos, foram coradas com H&E. Fotomicrografias de secções representativas das lesões de pele de camundongos do grupo controle em aumentos de 10X (**A** e **C**) e 40X (**B** e **D**) e do grupo anti-IL-33 em aumento de 10X (**E** e **G**) e 40X (**F** e **H**). **(I)** Todas as secções foram pontuadas para avaliar o nível de displasia em discreta, moderada, intensa e carcinoma *in-situ*, de acordo com a classificação proposta pela OMS. **(J)** Representação gráfica da classificação do infiltrado mononuclear de cada secção, classificadas quanto a intensidade em discreto, moderado ou intenso e **(K)** de acordo com a localização em difuso, focal ou misto.

também foram observadas lesões caracterizadas como carcinoma *in-situ* (25%) e lesões que apresentaram displasia moderada (25%). A análise histopatológica revelou também menor frequência de alterações citológicas, como pleomorfismo e mitoses nas camadas superiores do epitélio, nas secções de amostras de camundongos do grupo anti-IL-33 em comparação aos animais do grupo controle (FIGURA 2). Além disso, as alterações arquiteturais foram menos evidentes nas amostras do grupo anti-IL-33 comparando-se com as amostras dos animais do grupo controle (FIGURA 2). Estes resultados demonstram que houve diferença no padrão de desenvolvimento das lesões tumorais em camundongos tratados com anti-IL-33 em comparação aos animais do grupo controle, indicando que o tratamento com anti-IL-33 diminui a incidência de CEC.

Em seguida foi realizada a análise da presença e localização das células inflamatórias no microambiente tumoral, através da observação de cortes seriados em microscopia óptica. Em amostras do grupo tratado com anti-IL-33, observou-se a presença de infiltrado inflamatório de moderado a discreto e notou-se a presença de um infiltrado inflamatório misto na maioria das amostras (FIGURA 2J e K). As amostras do grupo controle apresentaram infiltrado inflamatório de intenso a discreto, com maioria classificado como moderado (55,55%) (FIGURA 2J). Quanto a localização as amostras do grupo controle apresentaram infiltrado predominantemente misto (FIGURA 2K). Esses dados sugerem não haver diferenças significativas quanto a intensidade e a localização do infiltrado inflamatório entre os grupos estudados.

4.2. Tratamento com anti-IL-33 altera o perfil de resposta imune em camundongos submetidos a carcinogênese química.

Atualmente, sabe-se que IL-33 pode modular a o infiltrado inflamatório tumoral para restringir ou promover a tumorigênese em diversos modelos tumorais (WASMER; KREBS, 2017). Portanto, para avaliar os efeitos do tratamento com anti-IL-33 no desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral, analisamos a percentagem de linfócitos presentes nos linfonodos de drenagem das lesões tumorais de camundongos submetidos a carcinogenese química. Não se observou diferenças quanto a quantidade das populações celulares isoladas dos linfonodos dos animais dos diferentes grupos (dados não apresentados).

Sabe-se que células T $CD4^+$ podem estar correlacionadas com respostas anti e pró-tumorais de acordo com seu perfil de ativação e expressão de citocinas

(GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Desta forma, buscamos caracterizar os perfis de produção de citocinas de linfócitos T $CD4^+$ nos linfonodos. De acordo com os resultados, a percentagem de células $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ foi significativamente maior em amostras de camundongos do grupo anti-IL-33 em comparação aos animais do grupo controle (FIGURA 3A). A percentagem de células $CD4^+IL\text{-}4^+$ e $CD4^+IL\text{-}10^+$ foi maior no nas amostras de camundongos do grupo tratado com anti-IL-33 em relação ao grupo controle (FIGURA 3B e C), contudo apenas a produção de IL-4 apresentou relevância estatística (FIGURA 3B). Ainda a marcação revelou um pequeno aumento, sem diferenças estatísticas, na percentagem de células $TCD4^+IL\text{-}17^+$ no grupo tratado com anti-IL-33 quando comparado ao grupo controle (FIGURA 3D).

Adicionalmente, linfócitos T $CD8^+$ ou linfócitos T citotóxicos foram apontados como possíveis promotores de carcinoma espinocelular quimicamente induzido (ROBERTS et al., 2007). Contudo, os linfócitos T $CD8^+$ são considerados umas das principais células constituintes da resposta imune antitumoral (MANTOVANI et al., 2008). Desta forma, buscamos analisar o perfil de citocinas produzidos por linfócitos T $CD8^+$ nos linfonodos a fim de estabelecer a produção de citocinas por estas células. Os resultados demonstraram que a percentagem de células $CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ similar entre as amostras do grupo tratado com anti-IL-33 e grupo controle (FIGURA 3A), não havendo diferença estatística significativa. Quanto a percentagem de células $CD8^+IL\text{-}4^+$, as amostras do grupo tratado com anti-IL-33 apresentaram percentagem significativamente menor em relação ao grupo controle (FIGURA 3B), entretanto os resultados não revelaram diferença significativa entre os grupos em relação as células $CD8^+IL\text{-}10^+$ (FIGURA 3C). A percentagem de células $CD8^+IL\text{-}17^+$ foi similar entre as amostras do grupo tratado com anti-IL-33 e grupo controle (FIGURA 3D). Estes dados apontam que o tratamento com anti-IL-33 desempenha papel na modulação da resposta imune antitumoral em camundongos.

4.3. Tratamento com anti-IL-33 interfere no perfil de células do infiltrado leucocitário no microambiente tumoral

Considerando os dados conflitantes na literatura, buscamos avaliar se o tratamento com anti-IL-33 influencia o perfil de células imunes presentes no microambiente tumoral em carcinoma espinocelular.

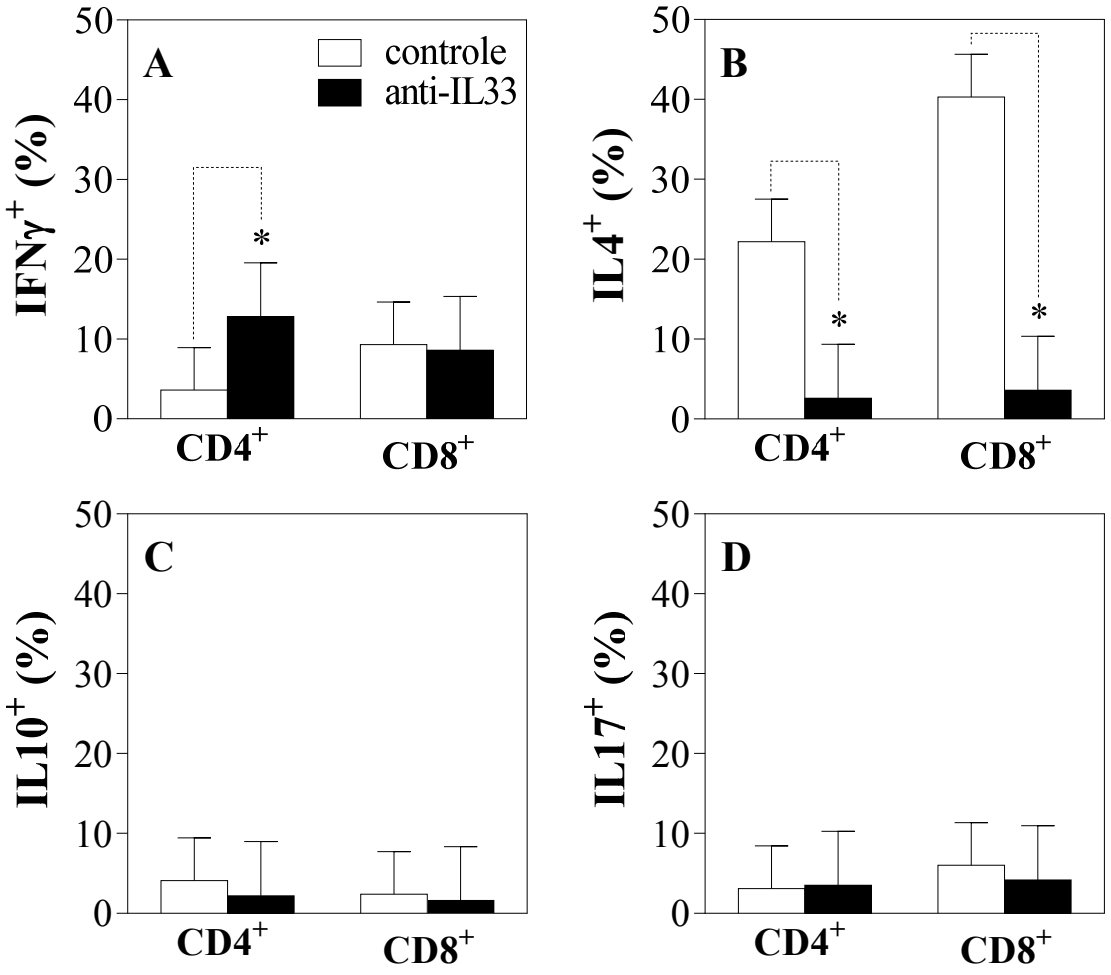

Figura 3. Tratamento com anti-IL-33 altera o perfil de resposta imune em camundongos submetidos a carcinogênese química. A percentagem de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ **(A)** IFN-γ^+, **(B)** IL-4^+, **(C)** IL-10^+ e **(D)** IL-17^+ presentes linfonodos de camundongos induzidos a carcinogênese química foi determinada por citometria de fluxo. As barras representam a média ± SD. Os resultados foram avaliados pelo teste t Student, onde *$p<0,05$;

Com relação as células $CD4^+$, os resultados evidenciaram menor percentagem destas células em amostras do grupo tratado com anti-IL-33 em relação ao grupo controle ($p<0.05$) (FIGURA 4A). Os resultados evidenciaram ainda, uma tendência a aumento na percentagem de células $CD8^+$ em amostras do grupo tratado com anti-IL-33, em comparação ao grupo controle, entretanto sem significância estatística (FIGURA 4B). Ainda com relação a população de linfócitos, os resultados evidenciaram maior percentagem de linfócitos B, células marcadas positivamente para CD19, em amostras do grupo tratado com anti-IL-33 em relação ao grupo controle (FIGURA 4C). Em relação às células T reguladoras ($CD25^+$), os resultados evidenciaram menor percentagem desta célula em amostras do grupo tratado com grupo anti-IL-33, em comparação ao grupo controle ($P<0,0002$) (FIGURA 4D).

Em relação as populações de células de origem mieloide, os resultados evidenciaram menor percentual de células dendríticas nas amostras do grupo tratado com anti-IL-33 em relação ao grupo controle (FIGURA 4E). Por fim, a percentagem de macrófagos presentes no microambiente tumoral foi significativamente menor nas amostras do grupo tratado com anti-IL-33 em comparação aos animais do grupo controle (FIGURA 4F). Estes dados sugerem que o tratamento com anti-IL-33 interfere com o infiltrado inflamatório no microambiente tumoral levando a uma diminuição na população de macrófagos, células dendríticas, células T_{REG} e células T $CD4^+$.

4.4. Tratamento com anti-IL-33 altera perfil de respostas imune no microambiente tumoral em carcinoma espinocelular de pele.

Após a carcinogênese e o tratamento, a percentagem de células $TCD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ foi significativamente maior nas amostras de animais do grupo anti-IL-33 em comparação ao grupo controle (FIGURA 5A). Todavia, os resultados revelaram que a percentagem de células $TCD4^+IL\text{-}4^+$ e $TCD4^+IL\text{-}10^+$, também foi significativamente maior nas amostras do grupo tratado com anti-IL-33 em comparação as amostras do grupo controle (FIGURA 5B e C).

A percentagem de células T $CD4^+$ $IL\text{-}17^+$ foi significativamente menor em amostras de animais tratados com anti-IL-33, em comparação ao grupo controle (FIGURA 5D).

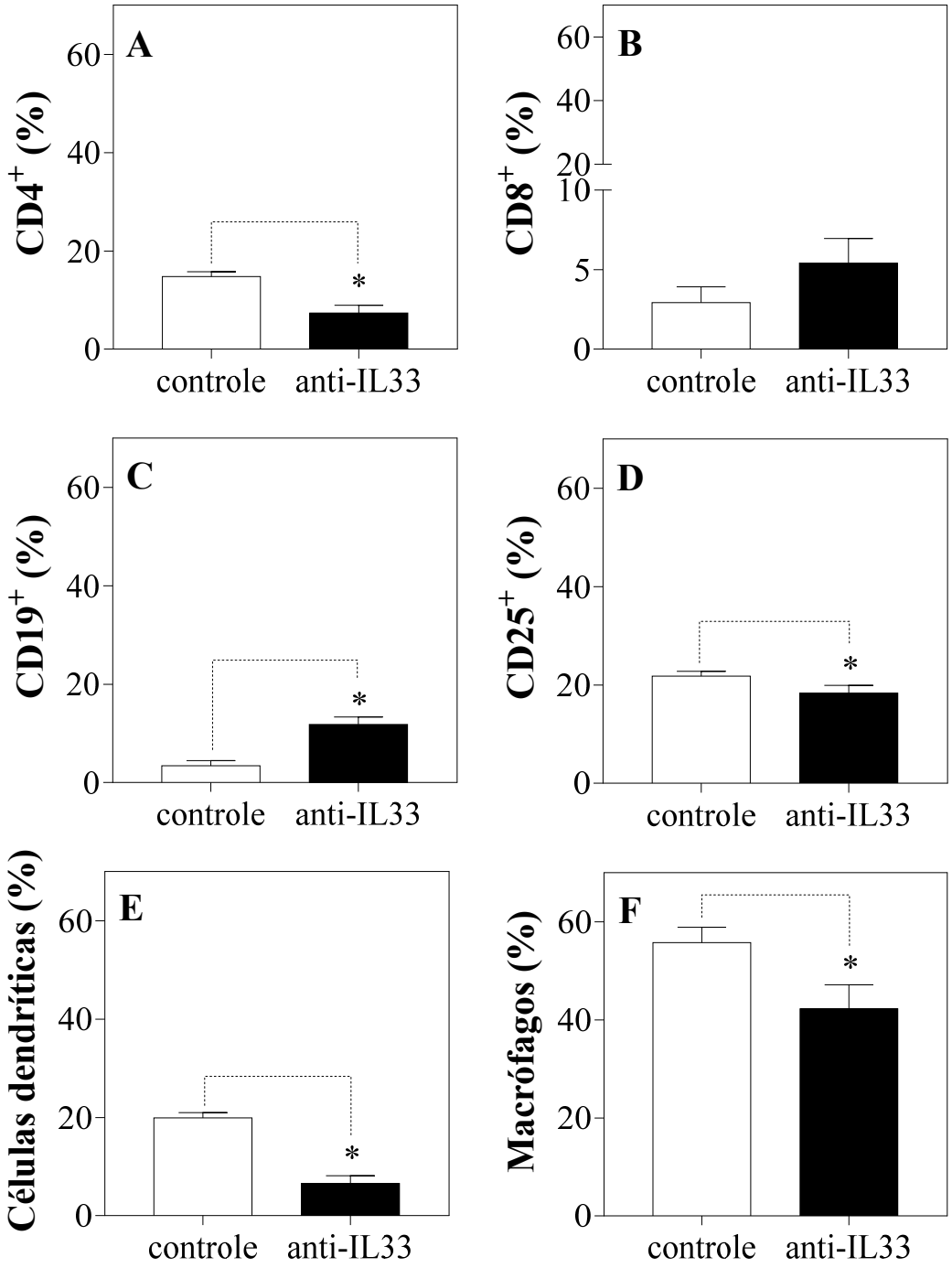

Figura 4. Tratamento com anti-IL-33 interfere no perfil de células do infiltrado no microambiente tumoral. A percentagem de leucócitos presentes nas lesões tumorais foi determinada por citometria de fluxo. Gráficos representativos da percentagem de células **(A)** $TCD4^+$ **(B)** $TCD8^+$ **(C)** $CD19^+$ **(D)** $CD25^+$ **(E)** células dendríticas e **(F)** macrófagos. As barras representam a média ± SD. Os resultados foram avaliados pelo teste t Student, onde *$p<0,05$.

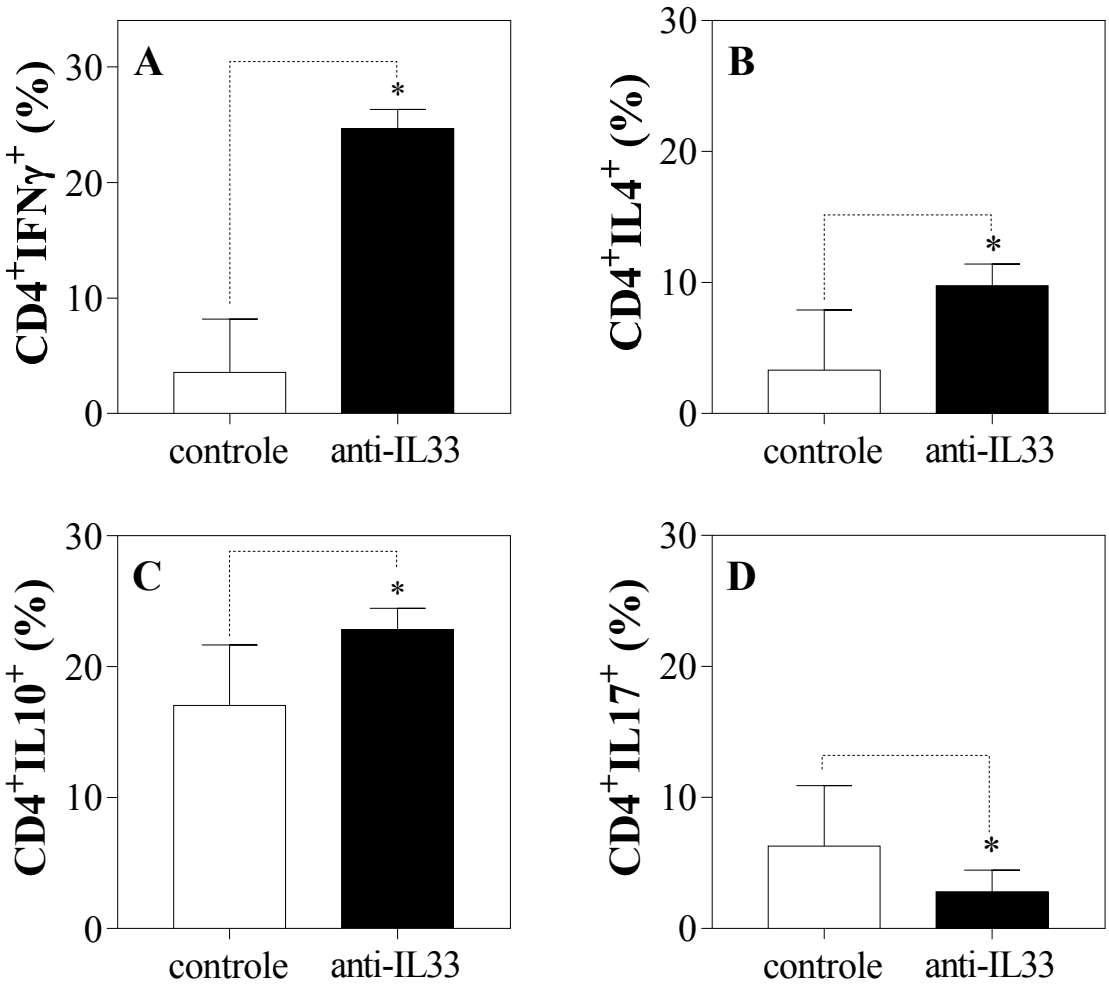

Figura 5. Tratamento com anti-IL-33 altera perfil de respostas imune no microambiente tumoral em carcinoma espinocelular de pele. A percentagem de células **(A)** $TCD4^+IFN\gamma^+$ **(B)** $TCD4^+IL4^+$ **(C)** $TCD4^+IL10^+$ e **(D)** $TCD4^+IL17^+$ presentes nas lesões tumorais foi determinada por citometria de fluxo. As barras representam a média ± SD. Os resultados foram avaliados pelo teste t Student, onde *$p<0,05$.

4.5. Tratamento com anti-IL-33 diminui TGF-β em amostras de camundongos submetidos à carcinogênese química.

Por fim, sabe-se que as citocinas presentes no microambiente tumoral podem modular o fenótipo de ativação das células imunes recrutadas (SALLUSTO, 2016). Sendo assim, analisamos o perfil de citocinas presentes no microambiente tumoral. De acordo com os resultados a presença de IFN-γ foi maior nas amostras do grupo controle em comparação com as amostras do grupo anti-IL-33, entretanto não houve diferença estatística (FIGURA 6A). Comparando-se os níveis de IL-4, IL-10 e IL-17 também não foram observadas diferenças estatísticas na presença destas citocinas no microambiente tumoral entre os grupos (FIGURAS 6B, C e D). Entretanto, os níveis de TGF-β foram significativamente menores nas amostras do grupo tratado com anti-IL-33 em comparação as amostras do grupo controle (FIGURA 6E), sugerindo que o tratamento com anti-IL-33 diminui a produção de TGF-β no microambiente tumoral em carcinoma espinocelular de pele.

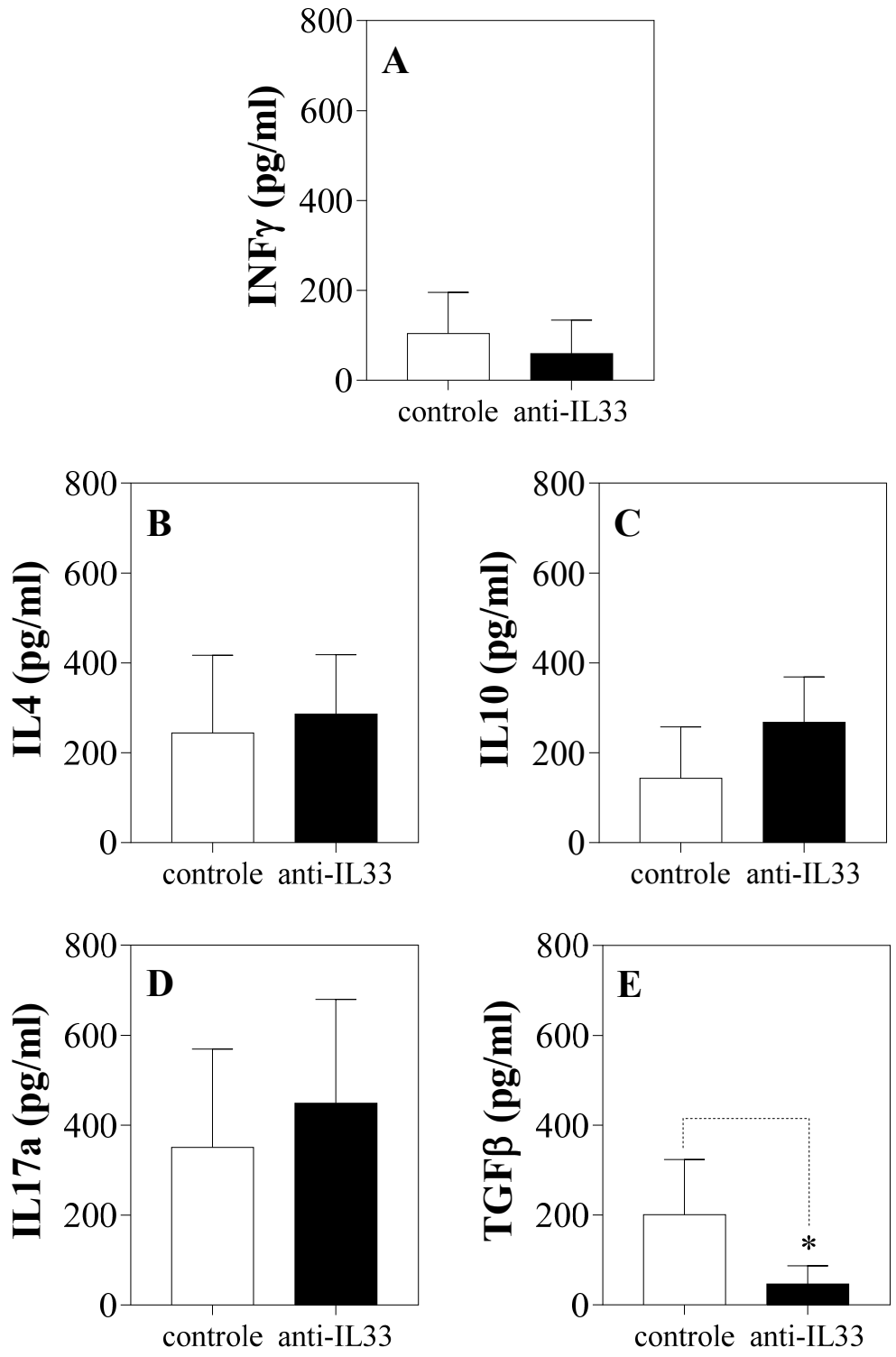

Figura 6. Tratamento com anti-IL-33 diminui TGF-β em amostras de camundongos submetidos à carcinogênese química. Os níveis de **(A)** IFN-γ **(B)** IL-4 **(C)** IL-10 **(D)** IL-17a e **(E)** TGF-β foram medidos em sobrenadantes de amostras tumorais utilizando ELISA. As barras representam a média ± SD. Os resultados foram avaliados pelo teste t Student, onde *p<0,05.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

IL-33 é uma molécula que exerce dupla função, em sua forma extracelular atua como citocina e, quando nuclear, como fator de transcrição (CARRIERE et al., 2007). Ademais, IL-33 é considerada um padrão molecular associado ao dano (DAMP) e desempenha papeis importantes em funções fisiológicas e patológicas, como reparo tecidual, alergia, doenças autoimunes, infecções e câncer (LU; YANG; WANG, 2016). As funções biológicas de IL-33 incluem a manutenção da homeostase, melhorar as respostas imunes T_H1 e T_H2, e mediar a fibrose durante a inflamação crônica (MOLOFSKY; SAVAG; LOCKSLEY, 2015). IL-33 exerce estas diversas funções através da ligação com seu receptor, ST2, que é expresso em diversos tipos celulares, incluindo células T_{REG}, ILC2s, células mielóides, células NK, células dendríticas, basófilos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, células T_H2, células T_H1 e células T $CD8^+$ (CAYROL; GIRARD, 2018). IL-33 participa em diversas doenças com funções pró-inflamatórias e protetoras, de acordo com o contexto do microambiente. Contudo, o papel de IL-33 na biologia tumoral ainda é controverso. Dados experimentais obtidos de diferentes estudos em modelos tumorais experimentais evidenciam resultados conflitantes, nos quais IL-33 apresenta tanto efeitos pró quanto anti-inflamatórios (LIEW; PITMAN; MCINNES, 2010). Sabe-se que a expressão de IL-33 por células tumorais aumentaria a imunogenicidade e promoveria a resposta imune antitumoral através de células T $CD8^+$ e células NK, enquanto a presença de IL-33 no estroma facilitaria a supressão tumoral pela ativação de células T_{REG} e células mieloides supressoras (MDSC). Com base nessas informações, compreender o papel de IL-33 na imunobiologia do câncer, poderia direcionar esta citocina como um possível alvo para imunoterapia contra o câncer. Contudo o conhecimento sobre o efeito de IL-33 no câncer permanece incerto. Portanto, considerando-se a possível dualidade de IL-33, promovendo respostas anti e pró-tumorais em diferentes modelos tumorais, buscamos avaliar os efeitos do bloqueio de IL-33 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele.

Em nosso estudo, utilizamos quatro injeções de 3μg de anticorpo monoclonal anti-IL-33 por animal, com uma semana de intervalo e não observamos diferenças na sobrevida e no peso entre animais tratados e não tratados. No entanto, foram observadas diferenças quanto ao número de lesões *papiloma-like* entre os animais tratados e não tratados. Similar aos resultados observados, em modelo experimental de câncer de colorretal, no qual foi realizado o tratamento com anti-IL-33 e observou-se a diminuição do tamanho e do número de tumores (YAMADA et al., 2015). Adicionalmente, a inoculação de sST2, regulador negativo de IL-33,

também diminui o desenvolvimento e metástase neste modelo (AKIMOTO et al., 2016). Outro estudo aponta que o tratamento com anti-IL-33 reduz a inflamação e melhora a eficácia da quimioterapia em modelo de câncer de colorretal (GUABIRABA et al., 2014). Estes dados indicam que o tratamento com anti-IL-33 pode alterar o padrão de desenvolvimento em carcinoma espinocelular.

Sabendo-se da diferença no padrão de desenvolvimento das lesões tumorais entre os grupos, analisamos o perfil de displasias das amostras de animais tratados e não tratados com anti-IL-33. Os resultados da gradação das lesões de acordo com a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005), demonstraram que o tratamento com anti-IL-33 resultou em menor grau de displasia, corroborando com as hipóteses de que a presença de IL-33 no microambiente tumoral pode estar associada a um desenvolvimento tumoral mais rápido e agressivo em determinados modelos tumorais (WASMER; KREBS, 2017). Estes dados sugerem que a presença de IL-33 no microambiente tumoral aumenta a progressão tumoral, uma vez que os animais submetidos ao tratamento com anti-IL-33, que tiveram esta interleucina bloqueada, apresentaram maior percentagem de lesões com discreta displasia epitelial quando comparados aos animais do grupo controle que permaneceram com IL-33 funcional. Não foram apresentadas diferenças relevantes quanto a quantidade e localização do infiltrado inflamatório entre os grupos. Todavia, considerando-se as afirmações da literatura que IL-33 atua na ativação de diversas células imunes (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013; CAYROL; GIRARD, 2018), analisou-se o perfil de respostas imunes geradas em ambos os grupos.

A análise da resposta imunológica gerada nos linfonodos de drenagem das lesões, apontou que a presença de IL-33 estimula a diferenciação de células T $CD4^{+}IL\text{-}4^{+}$ e $TCD8^{+}IL\text{-}4^{+}$. Isso foi demonstrado pela maior presença destes fenótipos celulares em amostras de animais do grupo controle. Linfócitos T $CD4^{+}IL\text{-}4^{+}$ foram apontados como promotores indiretos de invasão e metástase, em modelo murino de adenocarcinoma de mama, por regularem o aumento de macrófagos no microambiente tumoral (DeNARDO et al., 2009). Corroborando com este dado, os resultados encontrados neste estudo, sugerem que linfócitos $CD4^{+}IL\text{-}4^{+}$ poderiam estar associados a uma maior gradação tumoral em camundongos induzidos quimicamente a carcinoma espinocelular de pele.

Além disso, a percentagem de células $CD4^{+}IFN\gamma^{+}$ foi significativamente maior nos animais tratados com anti-IL-33, sugerindo que a presença de IL-33 poderia suprimir a ativação deste fenótipo celular. Dados indicam que a estimulação de células T $CD4^{+}$ com IL-33 diminui a produção de IFN-γ por estas células (SCHMITZ et al., 2005). Sabendo que as

células T $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ estão associadas a resposta imune antitumoral, por estimularem a diferenciação de células T $CD8^+$ e macrófagos com perfil antitumoral (CASERTA; BORGER; ZAMOYSKA, 2012), o tratamento com anti-IL-33 em carcinoma espinocelular, estimularia a diferenciação de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ e inibiria a ativação de células $TCD4^+$ produtoras de IL-4 favorecendo, desta forma, uma resposta imune protetora antitumoral.

Além da resposta imune gerada nos linfonodos, sabe-se que a presença de células imunes no microambiente tumoral está direta ou indiretamente correlacionada com a regressão ou com a progressão tumoral (MANTOVANI et al., 2008). Sendo assim, buscamos identificar as principais células constituintes do infiltrado inflamatório nas amostras tumorais de animais tratados anti-IL-33. Os resultados demonstraram que o perfil de leucócitos infiltrados no microambiente tumoral apresentou-se diferente entre os grupos. Os animais tratados com anti-IL-33 apresentaram valores percentuais maiores de células B e menores de linfócitos T $CD4^+$, células dendríticas, células T_{REG} e macrófagos em comparação ao grupo controle. Ainda, não foram observadas diferenças nas percentagens de linfócitos $CD8^+$ entre os grupos. Esses dados sugerem que IL-33 influencia na composição celular do infiltrado inflamatório.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com anti-IL-33 estaria associado a uma menor percentagem de células T $CD4^+$ acumuladas no microambiente tumoral. De acordo com a literatura, a presença de células T $CD4^+$ pode estar associada as respostas imunes anti ou pró-tumoral, dependendo do seu perfil de ativação (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Em carcinoma induzido quimicamente, a deficiência de células $TCD4^+$ foi associada a uma diminuição no desenvolvimento tumoral (GIRARD et al., 2004). Ainda, comparando-se modelos experimentais de carcinomas de pele e cervical, a deficiência de células $TCD4^+$ está associada a um melhor prognóstico em modelo de pele e maior desenvolvimento tumoral em carcinoma cervical (DANIEL et al., 2003; DANIEL et al., 2005). Nossos resultados sugerem que a menor percentagem de T $CD4^+$ poderia associada ao menor grau de displasia observado após o tratamento com anti-IL-33. Ainda, ausência de diferença entre a expressão de células T $CD8^+$ sugere que IL-33 não possui papel na ativação, migração ou polarização destas células.

Adicionalmente, o tratamento com anti-IL-33 aumentou a percentagem de células B no microambiente tumoral. A presença de células B tem sido associada tanto com a regressão tumoral, por produzir anticorpos tumor específicos, quanto com a promoção tumoral por promover imunossupressão pela produção de citocinas e anticorpos

(GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Células B podem promover metástase, em modelo murino de câncer de mama metastático, pela conversão de células T efetoras em células T reguladoras (OLKHANUD et al., 2011). Os resultados do nosso estudo sugerem que o bloqueio de IL-33 possui papel no desenvolvimento da resposta antitumoral, uma vez que foi observada uma menor percentagem de células B no grupo controle, e estes por sua vez apresentaram lesões tumorais mais severas em comparação ao grupo de tratamento com anti-IL-33. Ainda sobre as células B, dados recentes indicam a presença de células B reguladoras (BREG) e B efetoras (OLEINIKA et al., 2018). As células B reguladoras atuam na imunotolerância, pela produção de IL-10 e TGF-β e expressão de PD-L1 (TIAN et al., 2001; MAURI e BOSMA, 2012; KHAN et al., 2015). Enquanto as células B efetoras atuam na imunidade antitumoral pela habilidade de induzir a apoptose de células tumorais por meio da sinalização de Fas/Fas-ligante (TAO et al., 2015). Sendo assim, poderíamos especular que a ausencia de IL-33 colaboraria para o recrutamento de células B para o microambiente tumoral, e que estas células apresentam um perfil efetor. Entretanto, novos estudos são necessários para estabelecer o fenótipo das células B detectadas em amostras de camundongos tratados com anti-IL-33.

Considerando-se as células dendríticas, os resultados do presente estudo evidenciaram que o tratamento com anti-IL-33 levou a um menor acúmulo de células dendríticas no microambiente tumoral. A presença destas células geralmente está associada com a apresentação de antígenos e desenvolvimento de respostas antitumorais (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003; DHODAPKAR; DHODAPKAR; PALUCKA, 2008). Entretanto, quando residentes na epiderme, poderiam facilitar o dano ao DNA em carcinoma espinocelular e consequentemente o crescimento tumoral (MODI et al., 2012). Assim, os resultados indicariam que a presença de IL-33 aumentaria a densidade de células dendríticas no microambiente tumoral, e poderia estar associada a um mal prognóstico em carcinoma espinocelular de pele.

Ademais, o tratamento com anti-IL-33 resultou em um menor acúmulo de macrófagos e células T_{REG} no microambiente tumoral. Um estudo anterior do nosso grupo, aponta que a presença de T_{REG} em pacientes com carcinoma espinocelular está associada a um mal prognóstico (GASPAROTO et al., 2010). Sabe-se, ainda, que a maior presença de macrófagos e T_{REG} no microambiente tumoral está correlacionada com uma maior progressão tumoral na maioria dos canceres estudados, uma vez que estas células inibem a atividade de células T efetoras pela liberação de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF-β (ZOU, 2006; NOY; POLLARD, 2014).

A liberação de IL-10 estimula repostas anti-inflamatórias, suprime a proliferação de células $CD4^+$ e a expressão de citocinas de perfil T_H1, principalmente IFN-γ (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989). Também, IL-10 restringe a apresentação de antígenos por suprimir a expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias B7 (MOORE et al., 2001). Entretanto, os nossos resultados não evidenciaram diferença na produção de IL-10 entre os grupos.

Quanto a liberação de TGF-β, as análises demonstraram que o tratamento com anti-IL-33 diminuiu a produção desta citocina. De acordo com a literatura, TGF-β correlaciona-se tanto com a supressão quanto com a promoção do desenvolvimento tumoral, dependendo do estágio do tumor, uma vez que atua em diversos tipos celulares presentes no microambiente tumoral (BIERIE; MOSES, 2006a). Quando em estágios avançados da tumorigênese, TGF-β estimula a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ em células T reguladoras, inibindo assim a citotoxidade de linfócitos T $CD8^+$ (KRYCZEK et al., 2006). Adicionalmente, a presença de TGF-β em estágios avançados do tumor, pode levar ao aumento da progressão tumoral e a conversão de lesões *papiloma-like* em lesões malignas (BIERIE; MOSES, 2006b). Além disso, a sinalização mediada por TGF-β é uma importante via de regulação da transição epitélio-mesenquimal e de metástase, e níveis elevados de TGF-β estão frequentemente associados a um mau prognóstico (YANG; WEINBERG, 2008). Considerando-se ainda que TGF-β atua em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação e migração (MEULMEESTER; TEN DIJKE, 2011), a diminuição desta citocina no microambiente tumoral pode ter levado a menor irregularidade na estratificação das camadas do epitélio observada nas amostras de lesões tumorais de camundongos submetidos ao tratamento com anti-IL-33. Sendo assim, podemos sugerir que a menor gradação tumoral nos animais submetidos ao tratamento com anti-IL-33 poderia estar também associada a menor produção de TGF-β no microambiente tumoral.

Com relação aos macrófagos, sabe-se que densidades elevadas de TAMs geralmente são associadas a um mal prognóstico na maioria dos canceres, porque podem promover a imunossupressão e facilitar a progressão tumoral por meio de vários mecanismos como, por exemplo, inflamação, remodelação de matriz, angiogênese, disseminação e invasão das células tumorais (FUJIWARA et al., 2011). Além disso, de acordo com a literatura, os macrófagos presentes no microambiente tumoral podem produzir citocinas e fatores de crescimento, que estimulam o crescimento de células epiteliais (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Juntas, estas evidências poderiam justificar o maior crescimento tumoral nos

animais do grupo controle, uma vez que estes apresentaram maiores percentagens de macrófagos e células T_{REG} infiltradas no microambiente tumoral.

Conforme discutido anteriormente, nossos resultados demonstraram que a presença de IL-33 no microambiente tumoral favorece a ativação de células $TCD4^+$. Foi observado aumento significativo nas na percentagem de células $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$, $CD4^+IL\text{-}4^+$ e $CD4^+IL\text{-}10^+$ nos animais submetidos ao tratamento com anti-IL-33 em comparação ao grupo controle, corroborando com a literatura, na qual diz-se que as respostas anti e pró-tumoral podem coexistir em um mesmo tumor sólido (BUI; SCHREIBER, 2007). Voltando a atenção para as células T $CD4^+$, sabe-se que podem ser moduladas de acordo com as citocinas a que são expostas no microambiente tumoral em tumores sólidos, podendo atuar tanto na resposta imune antitumoral quanto na resposta imune pró-tumoral (LIN; KARIN, 2007; SWANN; SMYTH, 2007). Células $TCD4^+$ podem ser diferenciadas em diversos subtipos, que foram analisados neste estudo de acordo com a expressão de marcadores de superfície e citocinas intracelulares. Sendo assim, analisou-se o perfil de produção de citocinas destas células no microambiente tumoral. Os resultados desta análise evidenciaram que tratamento com anti-IL-33 no microambiente tumoral poderia influenciar o perfil de respostas imunes desenvolvidas. IL-33 foi primeiramente apontada por ser uma citocina que induz T_H2 (MILLER, 2011), de forma a justificar o aumento de células de perfil T *helper* 1, após o tratamento com anti-IL-33. Contudo houve também aumento na resposta imune de perfil T_H2 nos animais tratados com anti-IL-33 em comparação ao grupo controle. Com isso, a maior incidência de resposta imune T_H1 nos animais do grupo controle, que possuíam a sinalização de IL-33 ativa, entra em acordo com o estudo que diz que IL-33 possui caráter antitumoral por estimular a diferenciação de células T $CD8^+$ e células NK em melanoma B16 e câncer de mama metastático (GAO et al., 2015). No entanto, a presença de ambas as respostas, de forma equivalente no microambiente tumoral, pode ser justificada por outros fatores presentes na literatura. Sabe-se que as células T $CD4^+$ ativadas e diferenciadas nos linfonodos podem ter seus perfis modulados em microambientes inflamatórios (SALLUSTO, 2016). A presença de citocinas e quimiocinas no microambiente tumoral, pode modular o fenótipo de ativação das células imunes, de forma a estimular uma resposta imune anti ou pró-tumoral (SMYTH; DUNN; SCHREIBER, 2006; LIN; KARIN, 2007). De acordo com esta hipótese, as células previamente diferenciadas nos linfonodos poderiam ter sido expostas a quimiocinas e citocinas no microambiente tumoral, de forma a serem moduladas e terem seus perfis de produção de citocinas e quimiocinas alterados em prol do estímulo recebido no microambiente tumoral. Ainda, IL-33 é capaz de modular diversas células imunes, alterando

seus perfis de produção de citocinas e quimiocinas (CAYROL; GIRARD, 2018). Por exemplo, IL-33 estimula a produção de IFN-γ por células T $CD8^+$ e células NK (GARLANDA; DINARELO; MANTOVANI, 2013), o que poderia favorecer a presença de células T_H1 no microambiente. Além disso, a liberação de IL-33 estimula o recrutamento e ou ativação de células T_H2, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e ILC2 (CAYROL; GIRARD, 2014), desta forma o bloqueio desta citocina pelo tratamento, poderia ter influenciado no perfil de células ativadas ou recrutadas para o microambiente tumoral. Sendo assim, apesar do desenvolvimento de uma reposta imune predominantemente T_H1 nos linfonodos, poderia não ter ocorrido a migração celular em igual proporção, devido ao perfil de quimiocinas produzidas no microambiente tumoral. Estes resultados sugerem que o tratamento com anti-IL-33 pode influenciar o desenvolvimento de respostas imunes no microambiente tumoral. Contudo são necessários mais estudos para elucidar a relação de quimiocinas produzidas no microambiente tumoral e seu possível papel no recrutamento e ou modulação da resposta imune anti-tumoral.

6. Considerações finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento com anti-IL-33 levou a menor incidência de carcinoma espinocelular in situ e a diminuição das atipias celulares.

O tratamento com anti-IL-33 levou a aumento nas percentagens de células B e diminuição nas percentagens de linfócitos T $CD4^+$, células dendríticas, células T_{REG} e macrófagos, e a menor produção de TGF-β no microambiente tumoral.

O tratamento com anti-IL-33 levou a aumento na percentagem de linfócitos T $CD4^+$ produtores de IFN-γ e menor percentagem de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ produtores de IL-4 nos linfonodos.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, et al. Prognostic factors after 5 years follow-up in female breast cancer. Oncology. 1992; 49(2): 93-8.

Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Imunidade tumoral. In: Imunologia Celular e Molecular. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. P. 389-405.

Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. Front Immunol. 2013 Jul 11; 4: 190. doi: 10.3389/fimmu.2013.00190.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. J Clin Immunol 2003; 23: 147–61.

Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nat Rev Cancer. 2007 Nov; 7(11): 834-46.

Akimoto M, Maruyama R, Takamaru H, Ochiya T, Takenaga K. Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment. Nat Commun. 2016 Nov 24; 7: 13589. doi: 10.1038/ncomms13589.

Akimoto M, Takenaga K. Role of the IL-33/ST2L axis in colorectal cancer progression. Cell Immunol. In press 2018 Jan 9. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.12.014.

Alam M, Ratner D.Cutaneous squamous-cell carcinoma. N Engl J Med. 2001 Mar 29; 344(13): 975-83.

Ambasta RK. Molecular signalling saga in tumour biology. J Tumor 2015; 3: 309–13.

Amôr NG, de Oliveira CE, Gasparoto TH, Vilas Boas VG, Perri G, Kaneno R, et al. ST2/IL-33 signaling promotes malignant development of experimental squamous cell carcinoma by decreasing NK cells cytotoxicity and modulating the intratumoral cell infiltrate. Oncotarget. 2018 Jul 20; 9(56): 30894-30904. doi: 10.18632/oncotarget.25768.

Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm Res. 2008 Sep; 25(9): 2097-116. doi: 10.1007/s11095-008-9661-9.

Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. Dermatol Ther (Heidelb). 2017 Jan; 7(Suppl 1): 5-19. doi: 10.1007/s13555-016-0165-y.

Ascolani G, Liò P. Modeling TGF-β in early stages of cancer tissue dynamics. PLoS One. 2014 Feb 20; 9(2): e88533. doi: 10.1371/journal.pone.0088533.

Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am J Pathol. 2003 Jul; 163(1): 69-79.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Cancer Cell. 2005 Mar; 7(3): 211-7.

Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Nov 1; 224(3): 241-8.

Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumour immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumour. J. Exp. Med. 1980; 151: 69–80.

Bierie B, Moses HL. TGF-beta and cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Feb-Apr; 17(1-2): 29-40.

Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGF-beta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer. 2006 Jul; 6(7): 506-20.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies, J Pathol. 2002 Mar; 196(3): 254-65.

Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed MW, Brown, NJ. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. Br. J. Cancer 2006; 94: 101–107.

Boldrini L, Loggini B, Gisfredi S, Zucconi Y, Di Quirico D, Biondi R, et al. Evaluation of telomerase in non-melanoma skin cancer. Int J Mol Med. 2003 May; 11(5): 607-11.

Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. BMC Cancer. 2012 Jan 24; 12:35. doi: 10.1186/1471-2407-12-35.

Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? Carcinogenesis. 2005 Oct; 26(10): 1657-67. doi: 10.1093/carcin/bgi123.

Brash DE. Roles of transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. Br. J. Dermatol 2006; 154 Suppl 1: 8-10.

Braumüller H, Wieder T, Brenner E, Aßmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature. 2013 Feb 21; 494(7437): 361-5. doi: 10.1038/nature11824.

Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr Opin Immunol. 2007 Apr; 19(2): 203-8.

Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. Transplant Rev. 1971; 7: 3-25.

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

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

Cayrol C, Girard JP. The IL1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 2; 106(22): 9021-6. doi: 10.1073/pnas.0812690106.

Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. Curr Opin Immunol. 2014 Dec; 31: 31-7. doi: 10.1016/j.coi.2014.09.004.

Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. Immunol Rev. 2018 Jan; 281(1): 154-168. doi: 10.1111/imr.12619.

Chen SF, Nieh S, Jao SW, Wu MZ, Liu CL, Chang YC, et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. J Pathol. 2013 Oct; 231(2): 180-9. doi: 10.1002/path.4226.

Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2014 Feb; 14(2): 135-46. doi: 10.1038/nrc3670.

Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, Dehne K, Coussens LM, Hanahan D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by $CD4^+$ T cells. J Exp Med. 2003 Apr 21; 197(8): 1017-28.

Daniel D, Chiu C, Giraudo E, Inoue M, Mizzen LA, Chu NR, et al. CD4+ T cell-mediated antigen-specific immunotherapy in a mouse model of cervical cancer. Cancer Res. 2005 Mar 1; 65(5): 2018-25.

DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. Cancer Cell. 2009 Aug 4; 16(2): 91-102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.

Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. Cell Death Differ. 2008 Jan; 15(1): 39-50.

Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. Br J Dermatol. 2002 Apr; 146 Suppl 61: 1-6.

Dotto GP, Rustgi AK. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. Cancer Cell. 2016 May 9; 29(5): 622-637. doi: 10.1016/j.ccell.2016.04.004.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol. 2004; 22: 329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer. 2004 Feb; 4(2): 143-53. doi: 10.1038/nrc1279.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. T_H2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by T_H1 clones. J Exp Med. 1989 Dec 1; 170(6): 2081-95.

Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med. 2003 Nov; 3(7): 643-51.

Fridlender ZG, Albelda SM, Tumor-associated neutrophils:friend or foe? Carcinogenesis 2012; 33: 949–955.

Fujiwara T, Fukushi J, Yamamoto S, Matsumoto Y, Setsu N, Oda Y, et al. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. Am J Pathol. 2011; 179(3): 1157-70.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinatedregulation of myeloid cells by tumours. Nat. Rev. Immunol. 2012; 12: 253–268. doi: 10.1038/nri3175

Gao X, Wang X, Yang Q, Zhao X, Wen W, Li G, et al. Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. J Immunol. 2015 Jan 1; 194(1): 438-45. doi: 10.4049/jimmunol.1401344.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. Immunity. 2013 Dec 12; 39(6): 1003-18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.

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

Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. Hum Mutat. 2003 Mar; 21(3): 217-28. doi: 10.1002/humu.10179

Girardi M, Oppenheim D, Glusac EJ, Filler R, Balmain A, Tigelaar RE, et al. Characterizing the protective component of the alphabeta T cell response to transplantable squamous cell carcinoma. J Invest Dermatol. 2004 Mar; 122(3): 699-706.

Girard JP. A direct inhibitor of HMGB1 cytokine. Chem Biol. 2007 Apr; 14(4): 345-7.

Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockage of transforming growth factor-beta signaling in T cells. Nat Med. 2001; 07(10): 1118-22.

Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. Curr Opin Immunol. 2002 Jun; 14(3): 391-6.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010 Mar 19; 140(6): 883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

Guabiraba R, Besnard AG, Menezes GB, Secher T, Jabir MS, Amaral SS et al. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. Mucosal Immunol. 2014 Sep; 7(5): 1079-93. doi: 10.1038/mi.2013.124.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7; 100(1): 57-70.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell. 2012 Mar 20; 21(3): 309-22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.

Hu LA, Fu Y, Zhang DN, Zhang J. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non- small cell lung cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2013; 14(4): 2563-6.

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

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

Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. Immunity. 2013 Feb 21; 38(2): 209-23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.003.

Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. Nat Rev Drug Discov. 2008 Oct; 7(10): 827-40. doi: 10.1038/nrd2660.

Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. Nat Commun. 2015 Jan 22; 6:5997. doi: 10.1038/ncomms6997.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. Nat Immunol. 2002 Nov; 3(11):999-1005.

Kim YH, Yang TY, Park CS, Ahn SH, Son BK, Kim JH, et al. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. Allergy. 2012 Feb; 67(2): 183-90. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02735.x.

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature. 2007 Dec 6; 450(7171): 903-7.

Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp xMed 2006; 203(4): 871–81.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. Oral Oncol. 2006 Nov; 42(10): 987-93.

Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. Int J Dev Biol. 2011; 55(7-9): 861-7. doi: 10.1387/ijdb.113371dl.

Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. Adv Exp Med Biol. 2008; 624: 89-103. doi: 10.1007/978-0-387-77574-6_8.

Li P, Lin W, Zheng X. IL-33 neutralization suppresses lupus disease in lupus-prone mice. Inflammation. 2014 Jun; 37(3): 824-32. doi: 10.1007/s10753-013-9802-0.

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

Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. Nat Rev Immunol. 2016 Nov; 16(11): 676-689. doi: 10.1038/nri.2016.95.

Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL1 family. Nat Rev Immunol. 2010 Feb; 10(2): 103-10.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest. 2007 May; 117(5): 1175-83.

Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. 2006 Dec 1; 66(23): 11238-46.

Liu X, Li M, Wu Y, Zhou Y, Zeng L, Huang T. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Aug 14; 386(1): 181-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.008.

Liu X, Zhu L, Lu X, Bian H, Wu X, Yang W. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Oct 24; 453(3): 486-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.106.

Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by T_H1 and T_H2 cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Apr 29; 100(9): 5336-41.

Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. J Mol Med (Berl). 2016; (5): 535-43.

Lund AW, Medler TR, Leachman SA, Coussens LM. Lymphatic Vessels, Inflammation, and Immunity in Skin Cancer.Cancer Discov. 2016 Jan; 6(1): 22-35. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0023.

Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. Immunity. 2009 Jul 17; 31(1): 84-98. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.007.

Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. Lancet. 2010 Feb 20; 375(9715): 673-85. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61196-X.

Mantovani A, Sozzani S, Locati, M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002 Nov; 23(11): 549-55

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M.. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004 Dec; 25(12): 677-86.doi: 10.1016/j.it.2004.09.015

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature. 2008 Jul 24; 454(7203): 436-44. doi: 10.1038/nature07205.

Manzano AC, Altemani A, Martins AS, Negro AD, Tincani JA. Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório leucocitário em biópsia de carcinoma espinocelular da língua e soalho oral e sua aplicação prognóstica. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço. 2010; 39(4): 270-6.

Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. Arch Dermatol. 2000 Dec; 136(12): 1524-30.

Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. Science. 2015 Sep 25; 349(6255): 1483-9. doi: 10.1126/science.aab4082.

Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. Annu Rev Immunol. 2012;30:221-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934.

Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, Huber C, Parmiani G, Scholl S, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. Nat Rev Clin Oncol. 2014 Sep; 11(9): 509-24. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.111.

Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF-β in cancer. J Pathol. 2011 Jan; 223(2): 205-18. doi: 10.1002/path.2785.

Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. J Inflamm (Lond). 2011 Aug 26; 8(1): 22. doi: 10.1186/1476-9255-8-22.

Modi BG, Neustadter J, Binda E, Lewis J, Filler RB, Roberts SJ, et al. Langerhans cells facilitate epithelial DNA damage and squamous cell carcinoma. Science. 2012 Jan 6; 335(6064): 104-8. doi: 10.1126/science.1211600.

Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. Immunity. 2015 Jun 16; 42(6): 1005-19. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.006.

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

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

Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel ‘alarmin’?. PLoS One. 2008 Oct 6; 3(10): e3331. doi: 10.1371/journal.pone.0003331.

Murdoch C, Lewis CE. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. Int. J Cancer 2005 Dec 10; 117(5): 701-8 .

Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer Aug; 8(8): 618-31. doi: 10.1038/nrc2444.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. Immunity. 2014 Jul 17; 41(1): 49-61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.

O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MW, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. Cancer Treat Rev. 2017 Jan; 52: 71-81. doi:10.1016/j.ctrv.2016.11.007.

Oleinika K, Rosser EC, Matei DE, Nistala K, Bosma A, Drozdov I, et al. CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. Nat Commun. 2018 Feb 15; 9(1): 684. doi: 10.1038/s41467-018-02911-y.

Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting $CD4^+$ T cells to T-regulatory cells. Cancer Res. 2011 May 15; 71(10): 3505-15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4316.

Organização Mundial da Saúde (Ed.). Pathology and genetics of head and neck tumours. Lion: Iarc Press, 2005. 430 p. (World Health Organization classification of tumours).

Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). Gene Ther. 1999 May;6(5):808-15.

Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, Girard JP. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. J Immunol. 2012 Apr 1;188(7):3488-95. doi: 10.4049/jimmunol.1101977.

Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 16;106(24):9773-8. doi: 10.1073/pnas.0901206106..

Quail DF, Joyce JA.Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med. 2013 Nov;19(11):1423-37. doi: 10.1038/nm.3394.

Ridley AJ, Whiteside JR, McMillan TJ, Allinson SL. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. Int J Radiat Biol. 2009 Mar; 85(3): 177-95. doi: 10.1080/09553000902740150.

RIO DE JANEIRO. INCA Instituto Nacional do Câncer. Tipos de cancer: Pele não melanoma. 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma>. Acesso em: 9 abr. 2018.

Roberts SJ, Ng BY, Filler RB, Lewis J, Glusac EJ, Hayday AC, et al. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Apr 17; 104(16): 6770-5.

Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, et al. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. J Immunol. 2003 Aug 1; 171(3): 1232-9.

Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. Br J Dermatol. 2007 May; 156 Suppl 3: 8-12.

Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2012 Feb 21; 109(8): 2796-801. doi: 10.1073/pnas.1104303108.

Sallusto F. Heterogeneity of Human $CD4^{(+)}$ T Cells Against Microbes. Annu Rev Immunol. 2016 May 20; 34: 317-34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112056.

Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, et al. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. Cancer Res. 2008 Nov 1; 68(21): 9050-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1327.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. Immunity. 2005 Nov; 23(5): 479-90.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 2011 Mar 25; 331(6024): 1565-70. doi: 10.1126/science.1203486.

Schwarz M, Münzel PA, Braeuning A. Non-melanoma skin cancer in mouse and man. Arch Toxicol. 2013 May; 87(5): 783-98. doi: 10.1007/s00204-012-0998-9.

Shay JW, Wright WE. The reactivation of telomerase activity in cancer progression. Trends Genet. 1996 Apr; 12(4): 129-31.

Shevach EM. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. Nat Med. 2004 Sep; 10(9): 900-1.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. 2012 Mar; 122(3): 787-95. doi: 10.1172/JCI59643.

Sica, A, Allavena, P, Mantovani, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. Cancer Lett. 2008 Aug 28; 267(2): 204-15. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.028.

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.

Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, et al. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. J. Immunol. 2010 Jul 1; 185(1): 642-52. doi: 10.4049/jimmunol.1000413

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 685-711.

Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. J Clin Invest. 2007 May; (5): 1137-46.

Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. J Biol Chem. 2009 Jul 17; 284(29): 19420-6. doi: 10.1074/jbc.M901744200.

Tao H, Lu L, Xia Y, Dai F, Wang Y, Bao Y, et al. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. Eur J Immunol. 2015 Apr; 45(4): 999-1009. doi: 10.1002/eji.201444625.

Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. J Clin Invest. 2015 Sep; 125(9): 3338-46. doi: 10.1172/JCI80004.

Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate T_H1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol. 2001 Jul 15; 167(2): 1081-9.

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

Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. Science. 2014 May 9; 344(6184): 641-5. doi: 10.1126/science.1251102.

Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. Adv Immunol. 1998; 70: 83-243.

Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Jun; 15(6): 366-381. doi: 10.1038/s41571-018-0007-1.

Vicari AP, Trinchieri G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? Immunol Rev 2004; 202: 223–36.

Villarreal DO, Wise MC, Walters JN, Reuschel EL, Choi MJ, Obeng-Adjei N, et al, Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. Cancer Res. 2014 Mar 15; 74(6): 1789-800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2729.

Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. J Pathol. 2001 Jul; 194(3): 294-7.

Wasmer MH, Krebs P. The Role of IL-33-Dependent Inflammation in the Tumor Microenvironment. Front Immunol. 2017 Jan 9; 7: 682. doi: 10.3389/fimmu.2016.00682.

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

Widschwendter M, Jones A, Evans I, Reisel D, Dillner J, Sundström K, et al. Epigenome-based cancer risk prediction: rationale, opportunities and challenges. Nat Rev Clin Oncol. 2018 May; 15(5): 292-309. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.30.

Wodarz, D e Zauber, AG. Cancer: risk factors and random chances. Nature. 2015 Jan 29; 517(7536): 563-4. doi: 10.1038/517563a.

Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 5; 105(31): 10913-8. doi: 10.1073/pnas.0801898105.

Yamada D, Rizvi S, Razumilava N, Bronk SF, Davila JI, Champion MD, et al. IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. Hepatology. 2015 May; 61(5): 1627-42. doi: 10.1002/hep.27687.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell. 2008 Jun; 14(6): 818-29. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.

Yu XX, Hu Z, Shen X, Dong LY, Zhou WZ, Hu WH. IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. Dig Dis Sci. 2015 May; 60(5): 1265-72. doi: 10.1007/s10620-014-3463-1.

Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon-γ in cancer. Clin Cancer Res. 2011 Oct 1; 17(19): 6118-24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0482.

Zhang P, Liu XK, Chu Z, Ye JC, Li KL, Zhuang WL. Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. J Int Med Res. 2012; 40(5): 1654-61.

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

Zou W Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006 Apr; 6(4): 295-307. doi: 10.1038/nri1806.

8. Anexo

ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 012/2017.

Bauru, 25 de setembro de 2017.

Senhora Professora,

Informamos que Projeto de Pesquisa denominado ***"L33 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular"*** tendo Vossa Senhoria como Pesquisadora Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi analisado e considerado APROVADO em reunião ordinária da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), realizada no dia 22 de setembro de 2017.

Vigência do projeto:	*Outubro/2017 a Junho/2018*
Espécie/Linhagem:	*Camundongo BALB/c Wild Type (WT)*
Nº de animais:	*64*
Peso/Idade	*20g-23g / 6-8 semanas*
Sexo:	*Fêmeas*
Origem:	*Bioterio Central do Campus USP de Ribeirão Preto* *Biotério Central do Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru-SP*

Esta CEEPA solicita que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Cássia Maria Fischer Rubira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profa. Dra. Ana Paula Campanelli
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: ceepa@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
http://www.fob.usp.br