MARIANA BARBOSA DE SOUZA RIZZO

**O papel do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) na
modulação de macrófagos associados ao tumor em carcinoma
epidermoide da cavidade bucal**

**São Paulo
2019**

MARIANA BARBOSA DE SOUZA RIZZO

**O papel do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) na
modulação de macrófagos associados ao tumor em carcinoma
epidermoide da cavidade bucal**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Marcos Brasilino de
Carvalho

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rizzo, Mariana Barbosa de Sousa

O papel do fator inibitório da migração de
macrófagos (MIF) na modulação de macrófagos associados
ao tumor em carcinoma epidermoide da cavidade bucal
/ Mariana Barbosa de Sousa Rizzo. -- São Paulo,
2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Marcos Brasilino de Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias bucais 2.Carcinoma de
células escamosas 3.Imunologia 4.Macrófagos
5.Ativação de macrófagos 6.Citocinas 7.Fator inibidor
da migração de macrófagos

USP/FM/DBD-302/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à menina que carrega a melhor parte de mim e todo o meu amor: minha filha Isabella, meu sol, minha alegria, minha inspiração. Que você aprenda a fazer todas as coisas sempre com todo o seu coração filhinha.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me capacitar com os dons necessários para exercer com amor o trabalho para o qual Ele me escolheu, por nunca me abandonar e por sonhar para mim os sonhos mais lindos.

À Nossa Senhora, que estive e está sempre comigo nos momentos de dificuldade e também nos de alegria.

À minha filha, Isabella, que chegou no meio dessa jornada e iluminou como nunca antes a minha vida, por renovar minhas esperanças, me tornar uma pessoa melhor todos os dias, me completar e me fazer feliz.

Ao meu esposo, Adriel, meu melhor amigo, companheiro fiel e meu amor, pela disposição sem limites em fazer sempre o melhor para a nossa família.

À minha mãe, Cleusa, por uma vida inteira de dedicação e amor e por ser responsável por tudo de bom que existe em mim, mas especialmente por ter, neste tempo, cuidado da minha filha exatamente como eu cuidaria para que eu pudesse ter a tranquilidade necessária para terminar este trabalho.

Ao meu pai, Nelcino, por ter me proporcionado o necessário para seguir com os meus estudos, mesmo sem talvez conhecer a real importância disso e por se orgulhar dos meus passos, o que significa muito para mim.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Fabiano, meus exemplos desde que nasci, pelo apoio, incentivo e amor sem os quais eu não teria realizado nada na vida.

Aos meus sobrinhos, Leonardo, Henrique, Bernardo e Pietro, que só por existirem tornam minha vida mais leve e mais bonita.

Às minhas cunhadas, Letícia e Cristiani, pelo carinho, torcida e por acreditarem no melhor de mim.

À minha sogra, Roseli, por ter auxiliado no cuidado com a minha filha para que eu finalizasse este trabalho.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes nesse período, pelas palavras de carinho e incentivo.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo entusiasmo com cada etapa deste trabalho e principalmente pelos ensinamentos diários que certamente me tornaram melhor profissional e melhor ser humano.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, e à Prof. Dra. Luisa Lina Villa, pela oportunidade de pleitear uma titulação acadêmica pela Universidade de São Paulo.

Aos integrantes do Programa de Pós-graduação em Oncologia, professores, pesquisadores, secretárias, técnicos e colegas alunos, pelo auxílio sempre que necessário.

Ao Hospital Heliópolis e todos os seus funcionários e estagiários, pelo convívio, pela contribuição neste trabalho e em minha formação profissional.

Ao Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa do Dr. Fábio Daumas Nunes, por ceder gentilmente espaço, estrutura e auxílio técnico e científico para desenvolvimento de parte do presente trabalho.

À University of Louisville, pela estrutura cedida para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. Robert A. Mitchell, pela mentoria em todos esses anos, que muito me ensinou e ainda ensina, pela amizade e por todo o suporte e acolhimento que deu à mim e à minha família durante o tempo de estadia em Louisville.

À equipe do laboratório do Dr Robert A. Mitchell na University of Louisville, Beatriz Eugenia Rendon, Kim Eun Jung, Ashley Darlene Wise e Jordan Noe pela calorosa acolhida em Louisville, pelas horas agradáveis de trabalho no laboratório, pelo auxílio técnico e científico e pelo conhecimento compartilhado que muito acrescentou a este trabalho e à minha formação.

Aos membros da banca do exame de qualificação para o doutorado, Prof. Dra. Luisa Lina Villa, Dr. Fábio Daumas Nunes e Dr Gilberto de Castro Junior pelas oportunas e valiosas sugestões e críticas.

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL PELO APOIO FINANCEIRO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP pelo fomento ao presente trabalho através das concessões:

2015/02584-5: Bolsa de doutorado no país

2015/15170-4: Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior - BEPE

2015/03453-1: Projeto de Pesquisa Regular

EPÍGRAFE

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”*

(Ricardo Reis, Fernando Pessoa)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal.....	19
1.2. O Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF)	20
1.3. Microambiente tumoral e a inflamação associada ao câncer	23
1.4. Macrófagos associados ao tumor (TAM)	25
1.5. MIF como proteína moduladora da resposta imunológica no câncer.....	29
2. OBJETIVOS	32
2.1. Geral.....	32
2.2. Específico.....	32
3. MÉTODOS	33
3.1. Locais de estudo	33
3.2. Linhagens celulares	33
3.3. Geração de linhagem RAW 264.7 knockdown para o gene MIF.....	34
3.4. Amostras de sangue periférico humano.....	34
3.5. Geração de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico (sigla em inglês, MDM ϕ).....	34
3.6. Diferenciação da linhagem celular monocítica humana U937 em macrófagos	35
3.7. Animais	35
3.8. Geração de macrófagos derivados da medula óssea (sigla em inglês, BMDM ϕ)	36
3.9. Tratamentos e co-cultivo celular	36
3.10. Análise por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	37
3.11. Análise por Western Blotting	38
3.12. Análise Estatística	39
3.13. Aspectos éticos	40
4. RESULTADOS.....	41

4.1.	Alteração fenotípica de macrófagos induzida por células de CEC bucal em modelo murino.....	41
4.1.1.	Células de CECB promovem alteração fenotípica de macrófagos RAW 264.7 de maneira dependente da densidade celular e da expressão macrofágica da proteína MIF.....	41
4.1.2.	Alteração fenotípica de macrófagos RAW 264.7 dependente da expressão macrofágica mas não da expressão tumoral da proteína MIF.....	51
4.1.3.	IL4 e células SCCVII colaboram para a alteração fenotípica de macrófagos RAW 264.7.....	56
4.1.4.	Alteração fenotípica de BMDM ϕ dependente de ambas expressão macrofágica e expressão tumoral da proteína MIF.....	62
4.1.5.	IL4 e células SCCVII colaboram para a alteração fenotípica de BMDM ϕ	65
4.1.6.	Alteração fenotípica de BMDM ϕ dependente de expressão da proteína MIF não requer expressão do receptor CD74	68
4.2.	Alteração fenotípica de macrófagos induzida por células de CEC bucal em modelos humanos.....	69
4.2.1.	Linhagem celular humana de CECB altera o fenótipo de macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico humano.....	69
4.2.2.	Método de diferenciação de células da linhagem de monócitos humanos U937 altera a expressão basal de marcadores clássicos e alternativos.....	78
4.2.3.	Alterações no fenótipo de células U937 diferenciadas são induzidas por IL4 e por linhagens celulares de CECB e parcialmente dependentes da expressão da proteína MIF.....	80
5.	DISCUSSÃO	90
6.	CONCLUSÕES.....	104
	REFERÊNCIAS.....	105
	Apêndice A - Aprovação do Institutional Review Board – University of Louisville	
	Apêndice B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FMUSP	
	Apêndice C - Comprovante de publicação de artigo científico	

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Expressão de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP).....	42
Gráfico 2. Expressão de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF).....	43
Gráfico 3. Expressão de VEGF-A em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP).....	44
Gráfico 4. Expressão de VEGF-A em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF).	45
Gráfico 5. Expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP).....	46
Gráfico 6. Expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF).	47
Gráfico 7. Expressão de iNOS em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP).....	48
Gráfico 8. Expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF).	49
Gráfico 9. Expressão de CD206 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e pela inibição da expressão da proteína MIF (4-IPP).....	50
Gráfico 10. Expressão de CD206 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e pela inibição da expressão da proteína MIF (shRNA anti-MIF).....	51
Gráfico 11. Expressão de ARG1 induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF.....	52
Gráfico 12. Expressão de VEGF-A induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF.....	53
Gráfico 13. Expressão de COX-2 induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF.....	54

Gráfico 14. Expressão de iNOS induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF.....	55
Gráfico 15. Expressão de CD206 induzida por CECB e pela inibição da MIF em macrófagos RAW 264.7 depende parcialmente da expressão tumoral da MIF.....	56
Gráfico 16. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP)	58
Gráfico 17. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF)	59
Gráfico 18. Expressão de CD206 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é aumentada com a inibição da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP)	61
Gráfico 19. Expressão de CD206 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é aumentada com a inibição da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF)	62
Gráfico 20. Expressão de ARG1 em BMDM ϕ é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica e tumoral da proteína MIF.....	63
Gráfico 21. Expressão de VEGF-A em BMDM ϕ é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica e tumoral da proteína MIF.....	64
Gráfico 22. Expressão de CD206 em BMDM ϕ é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica mas não tumoral da proteína MIF.....	65
Gráfico 23. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDM ϕ é dependente da expressão macrofágica e tumoral da proteína MIF.....	66
Gráfico 24. Expressão de CD206 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDM ϕ não é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF.....	68
Gráfico 25. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDM ϕ não é dependente da expressão macrofágica de CD74.....	69
Gráficos 26 A-C. Expressão de CD206 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	71

Gráficos 27 A-C. Expressão de SERPINB2 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	72
Gráficos 28 A-C. Expressão de VEGF-A em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	73
Gráficos 29 A-C. Expressão de CD163 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	74
Gráficos 30 A-C. Expressão de IL10 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	75
Gráficos 31 A-C. Expressão de FOLR2 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	76
Gráficos 32 A-C. Expressão de COX-2 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.....	77
Gráficos 33 A-I. Expressão de marcadores de macrófagos tipo M1 e tipo M2 é alterada durante a diferenciação dos monócitos U937 em macrófagos.....	79
Gráficos 34 A-B. Expressão de IL10 é induzida por IL4 e parcialmente dependente da expressão macrofágica da proteína MIF em células U937 diferenciadas com PMA.....	81
Gráficos 35 A-B. Expressão de CD206 é induzida por IL4 e parcialmente dependente da expressão macrofágica da proteína MIF em células U937 diferenciadas com PMA.....	82
Gráficos 36 A-B. Expressão de EGR2 é induzida por IL4 em células U937 diferenciadas com PMA.....	83
Gráficos 37 A-B. Expressão de CD163 é inibida por IL4 em células U937 diferenciadas com PMA.....	84
Gráficos 38 A-B. Expressão de SERPINB2 é inibida por IL4 e induzida por SCC9 em células U937 diferenciadas com PMA.....	85
Gráficos 39 A-B. Expressão de COX2 é inibida por IL4 e induzida por SCC9 e SCC25 em células U937 diferenciadas com PMA.....	86
Gráficos 40 A-B. Expressão de VEGF-A é induzida por CECB em células U937 diferenciadas com PMA.....	87
Gráficos 41 A-B. Expressão de TNF α é inibida por IL4 e por SCC25 em células U937 diferenciadas com PMA.....	88

Gráficos 42 A-B. Expressão de IL1 β é inibida por IL4 e induzida por SCC9 em células U937 diferenciadas com PMA.....	89
---	----

RESUMO

Rizzo MBS. *O papel do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) na modulação de macrófagos associados ao tumor em carcinoma epidermoide da cavidade bucal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO. A inflamação está presente nas diferentes etapas da carcinogênese e da progressão da maioria das neoplasias malignas. A inflamação associada ao câncer, incluídos aqui os macrófagos associados ao tumor, assume mecanismos diversos dependendo do tipo e frequência de estímulos recebidos, podendo assim apresentar funções anti ou pró-tumorais. A proteína MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) exerce papel ativo na modulação da resposta imunológica tumoral e estudos têm demonstrado que pode induzir fenótipo imunossupressor e pró-tumoral em macrófagos situados no estroma de neoplasias malignas. Entretanto, esse fenômeno ainda é pouco compreendido nos tumores de cabeça e pescoço, particularmente em carcinoma epidermoide da cavidade bucal (CECB). **OBJETIVOS.** Esse estudo objetivou avaliar a modulação do fenótipo de macrófagos por células de CECB e o papel da proteína MIF nesse mecanismo. **MÉTODOS.** Nos modelos murinos, macrófagos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos derivados da medula-óssea de camundongos C57BL/6 WT, MIFKO ou CD74KO foram co-cultivados com células de câncer bucal SCCVII. Nos modelos humanos, macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de 3 doadores saudáveis e macrófagos derivados da linhagem de monócitos U937, foram co-cultivados com células de câncer bucal SCC9 e/ou SCC25. Quando desejado para o experimento, inibição da proteína MIF foi feita por tratamento com 4-IPP e o tratamento com IL-4 foi utilizado para induzir o perfil alternativo de macrófagos. O perfil fenotípico dos macrófagos foi avaliado por qRT-PCR e/ou WB. **RESULTADOS.** Nos modelos murinos estudados, CECB induziu a alteração fenotípica de macrófagos e esse efeito foi predominantemente dependente da expressão macrofágica da proteína MIF. IL4 e células de CECB

mostraram colaborar para a indução de níveis ainda mais altos de expressão de ARG1 por macrófagos e essa ativação também foi dependente da proteína MIF. Nos modelos humanos células de CECB foram capazes de induzir marcadores de fenótipo alternativo em macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico de diferentes indivíduos e também em macrófagos derivados de monócitos U937. A participação da proteína MIF na indução do fenótipo alternativo por CECB ou IL4 foi observada, mas não foi consistente entre os diferentes modelos humanos estudados. **CONCLUSÕES.** CECB induz a expressão de marcadores de fenótipo imunossupressor e pró-tumoral em macrófagos murinos e humanos. A proteína MIF mostrou participar da modulação de macrófagos por CECB, podendo ser um alvo potencial na inibição de macrófagos associados ao tumor como intervenção terapêutica para esta neoplasia.

Descritores: Neoplasias bucais; Carcinoma de células escamosas; Imunologia; Macrófagos; Ativação de macrófagos; Citocinas; Fator Inibidor da Migração de Macrófagos.

ABSTRACT

Rizzo MBS. *Role of the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the modulation of the tumor associated macrophages in oral squamous cell carcinoma* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION. Inflammation is present in the different stages of carcinogenesis and progression of most malignant neoplasms. Cancer-associated inflammation, including tumor-associated macrophages, plays different mechanisms depending on the type and frequency of stimuli received, and may thus display anti or tumor functions. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) plays an active role in the modulation of tumor immune response and prior studies have shown that it can induce immunosuppressive and pro-tumor phenotype in macrophages located in the stroma of malignant neoplasms. However, this phenomenon is still poorly understood in tumors of the head and neck, particularly oral squamous cell carcinoma (OSCC).

OBJECTIVES. The present study aimed to assess the modulation of macrophages phenotype by OSCC and the role of the MIF protein in this mechanism. **METHODS.** In murine models, RAW 264.7 macrophages and bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 WT, MIFKO or CD74KO mice were cocultured with SCCVII oral cancer cells. In human models, macrophages derived from peripheral blood monocytes from 3 healthy donors and macrophages derived from the U937 monocyte lineage were co-cultured with SCC9 and/or SCC25 oral cancer cells. When needed for the experiment, inhibition of MIF protein was done by treatment with 4-IPP and treatment with IL-4 was used to induce the alternate profile of macrophages. The phenotypic profile of macrophages was evaluated by qRT-PCR and/or WB. **RESULTS.** In the murine models studied, OSCC induced the phenotypic alteration of macrophages and this effect was predominantly dependent on the macrophagic expression of the MIF protein. OSCC and IL4 were shown to collaborate for the induction of even higher levels of ARG1 expression by macrophages and this

activation was also dependent on the MIF protein. In the human models, OSCC cells were able to induce markers of alternative phenotype in macrophages derived from peripheral blood monocytes from different individuals and also in macrophages derived from U937 monocytes. Participation of the MIF protein in the induction of the alternative phenotype by OSCC or IL4 was observed but was not consistent among the different human models studied.

CONCLUSIONS. OSCC induced the expression of immunosuppressive and pro-tumor phenotype markers in murine and human macrophages. MIF protein was found to participate in the modulation of macrophages by OSCC and may be a potential target in the inhibition of tumor-associated macrophages as a therapeutic intervention for this neoplasm.

Descriptors: Mouth neoplasms; Carcinoma, squamous cell; Immunology; Macrophages; Macrophage activation; Cytokines; Macrophage Migration-Inhibitory Factor.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Epidermoide da Cavidade Bucal

As neoplasias malignas mais frequentes originárias do epitélio de revestimento das vias aerodigestivas superiores são os carcinomas epidermoides ou carcinomas espinocelulares (CEC), representando mais de 90% de todos os tumores malignos desta região anatômica. Entre os diferentes sítios primários da cabeça e pescoço, a cavidade bucal é a localização mais frequentemente acometida no nosso meio.

O câncer de boca é a 18ª neoplasia maligna em incidência no mundo acometendo a população geral, constituindo aproximadamente 2% de todos os casos de câncer. Em 2018 foram estimados 354.864 novos casos e 177.384 mortes por câncer de cavidade oral no mundo.¹

No Brasil, país da América do Sul com a mais alta incidência de câncer de boca e orofaringe, o câncer bucal é a 5ª neoplasia mais frequente entre os homens, a 12ª entre as mulheres e as estimativas para cada ano do biênio 2018-2019 eram de 11.200 novos casos entre os homens e 3500 entre as mulheres, totalizando 14.700 novos casos.^{2,3}

Os principais fatores de risco para o carcinoma bucal são o consumo de tabaco e álcool e diversos outros fatores têm sido também associados, como o risco genético, uso de betel, fumo de *cannabis* e de *khat*, uso medicinal de nicotina, ingestão de mate quente, infecção por HIV, uso de enxaguantes bucais contendo álcool, má higiene bucal e, inclusive, baixas condições socioeconômicas.⁴⁻⁹

Os tumores da cavidade bucal podem ser diagnosticados precocemente devido à acessibilidade pela inspeção visual, mas apesar disso, a maioria desses tumores é diagnosticada em estágios avançados, o que contribui para as baixas taxas de sobrevida global. A taxa de sobrevida em 5 anos chega a 75% quando o diagnóstico é realizado precocemente, enquanto com o diagnóstico tardio cai para 20%.¹⁰⁻¹²

Algumas variáveis clínicas e histopatológicas têm sido estudadas e propostas como marcadores de prognóstico em câncer da cavidade bucal e podem auxiliar na predição da resposta ao tratamento e da evolução da doença. Variáveis como padrão de crescimento endofítico, maior espessura e profundidade de invasão, padrão de invasão, presença de infiltração vascular linfática, presença de invasão perineural, invasão muscular, comprometimento das margens cirúrgicas por tumor, presença de metástase linfonodal e menor idade ao diagnóstico têm sido associadas ao pior prognóstico do câncer bucal. Também o estadiamento patológico, que considera a classificação pTNM, fornece dados mais precisos para avaliar o prognóstico do paciente com câncer.¹³⁻¹⁸

1.2. O Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF)

O Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória, com ação relacionada à progressão tumoral e que induz o aumento de produção e secreção de outras citocinas pró-inflamatórias tais como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α), interleucinas e Interferon- γ (IFN- γ).¹⁹

A MIF foi primeiramente identificada por Bloom, Bennett (1966) e David (1966) em estudos de hipersensibilidade tipo tardia como substância inibidora da migração randômica de macrófagos peritoneais normais, derivada de células T ativadas, mas relatos recentes mostram que a MIF é secretada também pela hipófise anterior, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais de vários órgãos, incluindo pulmão, rim e fígado. O gene localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.2) codifica o Fator Inibitório da Migração de Macrófagos, uma proteína não glicosilada, composta por 115 aminoácidos e com peso molecular de 12,5 kDa, que em sua forma ativa aparece como uma molécula homotrimérica.²⁰⁻²⁴ Quando localizada no citoplasma da célula normal a MIF contribui para a sobrevivência, o ciclo celular e a regulação da homeostase. A MIF endógena ou localizada no citoplasma por endocitose tem como um de seus ligantes a proteína Jab1 (*c-Jun activation domain-binding protein-1*) e essa interação estabiliza p27, aumentando o controle do ciclo celular.^{23,25-28}

No sistema imune, a MIF regula a resposta inata e adquirida, aumenta a fagocitose, inibe o efeito anti-inflamatório de glicocorticoides e induz a produção de outras citocinas inflamatórias, como a Interleucina-1 β (IL1 β), a Interleucina-6 (IL6), a Interleucina-2 (IL-2), o IFN- γ e o TNF α . O papel da proteína MIF como mediador do sistema imune já foi relatado na resposta hospedeira ao choque endotóxico e em doenças inflamatórias, incluindo glomerulonefrites, arteriosclerose, artrite reumatoide, diabetes tipo I e tipo II, asma, fibrose cística, colite, esclerose múltipla, psoríase e lúpus eritematoso sistêmico.^{23,26,29,30}

Além da Jab1, a MIF tem como parceira de ligação intracelular a proteína P53, com papel bem estabelecido na regulação do ciclo celular. O principal receptor de superfície celular da MIF é o CD74, uma cadeia invariante do peptídeo HLA classe II, mas a MIF também pode se ligar aos receptores de quimiocina CXCR4 (em inglês, *C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), CXCR2 (em inglês, *C-X-C Motif Chemokine Receptor 2*) e CXCR7 (em inglês, *C-X-C Motif Chemokine Receptor 7*).³¹⁻³⁴

A expressão da proteína MIF aparece aumentada em diversos tipos de câncer e sua ação na progressão tumoral sugere papel como marcador prognóstico.^{23,28,35-40}

Alguns mecanismos de ação da MIF como citocina de mediação autócrina e parácrina têm sugerido sua possível relação com a origem e desenvolvimento das doenças neoplásicas.^{36,41,42}

Numerosos estudos têm sugerido o papel da MIF na angiogênese, progressão do ciclo celular e proliferação, inibição da apoptose e da lise por células *Natural Killer* (NK), sobrevivência celular, migração e metástase.^{26,27,33,34,42-48}

Como observado em estudo *in vitro*, o silenciamento da MIF por siRNA (em inglês, *small interfering RNA*) foi capaz de reduzir a proliferação e migração celular em linhagens de câncer de ovário (TOV-21G, HO-8910, HO-8910PM).²⁷

Alguns dos mecanismos pelos quais a MIF induz a progressão tumoral estão associados às vias PI3K/AKT (em inglês, *Phosphoinositide 3-Kinase/protein kinase B*), Rb/E2F (em inglês, *Retinoblastoma/Early-region-2 transcriptionfactor*), ERK/MAPK (em inglês, *Extracellular signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase*) e à inibição do receptor NKG2D (em inglês, *Natural Killer cell receptor G2D*).^{26,33,34,42,44-48}

Em estudo realizado por Hudson e colaboradores a MIF foi capaz de inibir a atividade da proteína P53 (em inglês, *tumor suppressor protein 53*) *in vitro*, o que sugere uma relação entre inflamação e tumorigênese bem como entre proliferação celular e progressão tumoral.⁴⁹

A proteína MIF parece estar associada à ativação da via dependente de Rho e seus efetores Integrina $\beta 1$ e FAK (em inglês, *Focal Adhesion Kinase*), com papel conhecido na formação de fibras de estresse e adesão focal, mecanismos importantes para a migração e invasão celular. Além disso, induzindo a expressão de Vimentina e inibindo a expressão de E-caderina, a MIF estaria relacionada ao processo de transição epitélio-mesenquimal, associado ao fenótipo celular invasivo.^{48,50}

A associação entre MIF e hipóxia já foi relatada, tendo sido reportado que maiores níveis de mRNA de MIF são induzidos por hipóxia em linhagens celulares de carcinoma epidermoide humano. E que quando está superexpressa no tumor, a MIF pode aumentar a estabilização da HIF-1 α (em inglês, *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) induzida por hipóxia e, subsequentemente, as respostas angiogênica, metabólica, do ciclo celular e metastática.^{34,51}

MIF e DDT (em inglês, *D-Dopachrome tautomerase*), homólogo estrutural e funcional da MIF, em células normais ativam AMPK (em inglês, *AMP-activated protein kinase*), proteína com função supressora de tumor. Em câncer de pulmão não-pequenas células, porém, MIF e DDT por meio de CD74 inibiram a função de AMPK mesmo em estado desbalanceado de nutrientes, permitindo a manutenção do ciclo e sobrevivência celular.⁵²

Todos esses estudos mostrando interações da MIF com vias de sinalização e proteínas com papel já estabelecido nas funções celulares relacionadas à progressão tumoral, suportam a provável importância da MIF no prognóstico de diferentes tipos neoplásicos.

Liu et al. (2018) estudando pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago observaram que a proteína MIF está significativamente relacionada com o desenvolvimento de linfonodos metastáticos, com estágios avançados da doença e com a sobrevida. Destacam que ela constitui uma relação importante entre a inflamação crônica e tumorigênese, mas que apesar da evidência de que a

superexpressão da mesma esteja implicada no desenvolvimento e progressão de múltiplos tumores, o mecanismo molecular subjacente permanece obscuro.⁵³

Em CEC da cavidade bucal, um estudo anterior realizado em nosso laboratório encontrou expressão elevada da proteína MIF e seu receptor CD74 no tumor em relação à margem cirúrgica livre de neoplasia. No mesmo estudo, alta expressão tumoral da MIF foi associada à presença de embolização tumoral nos vasos linfáticos, mas não houve correlação com outros fatores prognósticos.⁵⁴

1.3. Microambiente tumoral e a inflamação associada ao câncer

O carcinoma epidermoide é um tecido complexo, formado por células epiteliais malignas e um estroma circundante constituído de células mesenquimais e da matriz extracelular, conhecido como microambiente tumoral. Esse microambiente é modulado pela interação com as células neoplásicas e sofre modificações à medida que o câncer progride, contribuindo significativamente para a aquisição de habilidades essenciais para o desenvolvimento tumoral. O microambiente tumoral é composto por diversos tipos celulares, como fibroblastos, fibroblastos associados ao carcinoma (CAFs), miofibroblastos, células musculares, células endoteliais, pericitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T e B, células NK, macrófagos e células dendríticas. A rede de sinalização formada nesse ambiente é capaz de fornecer fatores de crescimento e citocinas ao tumor, promover a neoangiogênese e induzir o potencial de migração e invasão da célula tumoral. Então, as neoplasias sólidas compõem uma doença tecidual e sistêmica, muito mais que uma doença celular e isso deve ser considerado na busca do controle efetivo do câncer.⁵⁵

Células e citocinas inflamatórias são abundantes e importantes componentes do estroma de quase todos os tumores sólidos. Hanahan e Weinberg no artigo publicado em 2011 incluíram a inflamação dentre as características permissivas que contribuem para a aquisição de capacidades essenciais pela célula tumoral. Tumores também tendem a surgir em sítios de inflamação crônica, como sugerido por Rudolf Virchow já em 1863, quando observou a infiltração de tecidos neoplásicos por leucócitos.⁵⁶

A relação causal entre inflamação e câncer vem sendo confirmada por numerosas observações epidemiológicas de associação entre condições inflamatórias crônicas e o desenvolvimento de tumores, além da redução do risco de câncer nos indivíduos em uso contínuo de medicamentos anti-inflamatórios. As células e moléculas que compõem o sistema imunológico geralmente apresentam papel antitumoral nas fases iniciais da carcinogênese e são responsáveis pela eliminação ou imunoedição dos tumores. Nos estágios posteriores do desenvolvimento tumoral, as células e moléculas imunológicas passam a compor o microambiente tumoral, infiltram tecidos neoplásicos e, modulados pelo tumor, podem assumir papel pró-tumoral. Então, parece que a resposta imunológica aguda é capaz de provocar a regressão tumoral, mas que as condições de inflamação crônica que antecedem a carcinogênese ou que surgem posteriormente à imunoedição do tumor, têm papel pró-neoplásico.⁵⁷⁻⁶²

Algumas condições infecciosas e inflamatórias têm sido associadas também à gênese do CEC de cabeça e pescoço e, especificamente, da cavidade bucal como a presença de placa bacteriana, infecção por HPV, periodontite e trauma crônico. Embora essas associações ainda precisem ser melhor exploradas, os principais fatores de risco para este tipo de neoplasia, uso contínuo de tabaco e álcool, também ativam cronicamente vias e mecanismos inflamatórios. Além disso, estudos têm demonstrado que CEC da cavidade bucal, assim como tantos outros tipos de neoplasia, apresentam na maior parte dos casos um intenso infiltrado inflamatório no microambiente tumoral constituído principalmente por linfócitos e macrófagos.^{63,64}

A inflamação associada ao câncer é acompanhada por mecanismos de imunossupressão que neutralizam a ação antitumoral das células imunológicas presentes no microambiente tumoral. As vias de imunossupressão mais exploradas atualmente para o tratamento de neoplasias diversas, são as vias dos *checkpoints* imunológicos CTLA-4 e PDL1/PD1.

O CTLA-4 (em inglês, *T - lymphocyte antigen - 4*) é uma molécula receptora expressa na membrana de linfócitos T CD8, CD4, principalmente linfócitos T reguladores, e células NK, que compete com sua molécula homóloga CD28 pela ligação com B7, expressa na membrana de células apresentadoras de antígenos (APCs). A interação de CTLA-4, no linfócito T, com B7, nas APCs, produz uma

ligação forte entre o MHCII, nas APCs, e o TCR (em inglês, *T-cell receptor*), levando à redução da proliferação, sobrevivência e produção de citocinas por linfócitos T. A molécula PD1 (*programmed cell death protein 1 receptor*) é expressa na membrana de linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B, células dendríticas, monócitos, mastócitos e macrófagos, e a interação com seus ligantes PDL1 (*programmed death ligand 1*) e PDL2 (*programmed death ligand 2*) na membrana de APCs, linfócitos T CD4, células de tecidos não linfoides e células tumorais, também inibe a resposta imunológica mediada por células T. Essas vias de checkpoint imunológico são utilizadas por muitas neoplasias malignas como mecanismos de evasão tumoral à resposta imunológica de célula T antígeno específica e, portanto, o bloqueio das mesmas por diferentes estratégias de imunoterapia pode reverter a imunossupressão e potencializar a resposta imune antitumoral.⁶⁵⁻⁶⁷

Os muitos ensaios clínicos já concluídos e em andamento principalmente em melanoma e câncer de pulmão, mas também em câncer de cabeça e pescoço, mostram que os inibidores de *checkpoint* imune são capazes de, em parte dos casos, gerar resposta completa, parcial ou manter o câncer estável. Entretanto, apenas uma fração de pacientes com câncer se beneficia dos inibidores de checkpoint e estes podem provocar efeitos adversos severos relacionados ao sistema imunológico. O desenvolvimento de marcadores preditivos para diferenciar pacientes respondedores e não respondedores propiciará uma seleção mais precisa dos pacientes indicados para imunoterapia com inibidores de checkpoint imunológico.^{68,69}

A inflamação associada ao CEC da cavidade bucal (CECB), composta por células e fatores solúveis, é ainda pouco compreendida e, por sua ação no suporte da progressão tumoral e na imunossupressão associada ao câncer, pode constituir um alvo potencial de terapia.

1.4. Macrófagos associados ao tumor (TAM)

Os macrófagos são células mononucleares que na homeostase têm funções relacionadas ao remodelamento e desenvolvimento tecidual por meio de fagocitose, produção de fatores de crescimento, angiogênicos e de degradação da matriz

extracelular. Além disso, possuem funções relacionadas à defesa contra patógenos, através da fagocitose, apresentação de antígenos via MHC II (Complexo principal de histocompatibilidade classe II), produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), RNS (espécies reativas de nitrogênio) e citocinas inflamatórias.⁷⁰

Os macrófagos são diferenciados no tecido a partir do recrutamento de monócitos circulantes no sangue que têm origem na medula óssea, derivados de progenitores mieloides. No tecido, os macrófagos apresentam ampla diversidade fenotípica, morfológica e funcional em resposta a sinais do microambiente onde estão localizados.^{70,71}

Sob estímulos de IFN- γ e LPS (em inglês, *lipopolysaccharide*) os macrófagos são polarizados para um perfil clássico denominado M1, que por meio de ativação da via NFkB induzem a produção de IL-12 (em inglês, *Interleukin 12*), IL-23 (em inglês, *Interleukin 23*), TNF α , ROS, iNOS (em inglês, *inducible nitric oxide synthase*), CXCL9 (em inglês, *Chemokine C-X-C motif ligand 9*) e CXCL10 (em inglês, *Chemokine C-X-C motif ligand 9*). Esse subtipo de macrófagos ativado por sinais Th1, também atrai células do tipo Th1 para o microambiente tumoral, sendo então pró-inflamatório e citotóxico. Macrófagos polarizados para um perfil alternativo M2 sob estímulo de fatores Th2 como IL4 (em inglês, *Interleukin 4*), IL-2 (em inglês, *Interleukin 2*), IL-33 (em inglês, *Interleukin 33*), e IL-13 (em inglês, *Interleukin 13*), participam da resposta Th2 na eliminação de parasitas, promovem o remodelamento tecidual, possuem funções imunoreguladoras e atenuam a inflamação aguda, principalmente por ativação da via STAT6 (em inglês, *signal transducer and activator of transcription 6*) e consequente produção de IL-10 (em inglês, *Interleukin 10*), IL-1decoyR (em inglês, *Interleukin 1 decoyR*), IL-1RA (em inglês, *Interleukin-1 receptor antagonist*).⁷¹

Os macrófagos recrutados, diferenciados e localizados no tecido neoplásico são chamados macrófagos associados ao tumor (TAMs). Quando no tecido sob inflamação crônica, macrófagos pró-inflamatórios liberam fatores inflamatórios como ROS e RNS capazes de induzir mutações no DNA das células locais e assim contribuem para a transformação maligna. Nos tumores já estabelecidos, TAMs são, dependendo do estágio de desenvolvimento tumoral, predominantemente do tipo M2, com ação pró-neoplásica.⁷⁰

É importante esclarecer, entretanto, que a nomenclatura M1 e M2 para os macrófagos faz referência à nomenclatura em uso para as respostas Th1 e Th2, mas que existem numerosos fenótipos intermediários entre M1 e M2, com funções variadas e também intermediárias entre esses dois extremos. Então atualmente considera-se que M2 são os macrófagos ativados por IL-4 ou IL-13 e que o universo de outros fenótipos macrofágicos associados ao tumor que compartilham as funções de promoção neoplásica e de supressão da imunidade inata e adaptativa deve ser nomeados macrófagos tipo M2.⁷²

Os macrófagos associados ao tumor tipo M2 são relacionados ao aumento da angiogênese pela liberação de fatores como IL-8 (em inglês, *Interleukin 8*), COX-2 (em inglês, *Cyclooxygenase-2*), EGF (em inglês, *Epidermal Growth Factor*), FGF (em inglês, *Fibroblast Growth Factor*), VEGF (em inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (em inglês, *Platelet-derived Growth Factor*) e TGF- β (em inglês, *Transforming Growth Factor- β*). Além disso, estudos têm mostrado seu papel no processo metastático por facilitar a migração celular através da interação macrófago-célula tumoral e da produção de EGF, bem como pela produção de proteínas de degradação da matriz extracelular que propiciam e auxiliam a invasão tecidual por essas células.⁷⁰

Os macrófagos tipo M2 também colaboram para a supressão da resposta imunológica com produção e liberação de PGE2 (em inglês, *Prostaglandin E2*), IL-10 e TGF- β . Além de não induzirem resposta Th1 citotóxica, os macrófagos tipo M2 induzem a diferenciação de linfócito T regulador, bem como seu recrutamento para o tecido neoplásico através da liberação de CCL22 (em inglês, *C-C motif chemokine 22*).^{70,73}

A polarização dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) em M1 ou tipo M2 depende do tecido e tipo tumoral, do estágio de progressão da doença e da localização no interior do tecido neoplásico, se em regiões normóxicas ou hipóxicas.

^{70,71}

A presença de macrófagos associados ao tumor em CECB tem sido observada predominantemente por imunoistoquímica. Em estudo realizado por Mori et al., 50 amostras de CEC bucal foram coradas por imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti-CD68, anti-CD80 e anti-CD163, marcadores de macrófagos,

macrófagos M1 e macrófagos tipo M2, respectivamente. Esse estudo concluiu que, nas amostras estudadas, o perfil fenotípico predominante dos macrófagos infiltrando o tumor é tipo M2 e que estes são encontrados em maior quantidade nos tumores de elevado grau patológico, sugerindo participação dos mesmos na progressão do CEC bucal.⁷⁴ Em estudo de 108 amostras de CEC de cavidade bucal, macrófagos tipo M2 (CD163+) infiltrando o tumor foram um fator prognóstico independente, com a maior quantidade de TAMs tipo M2 sendo associada a pior sobrevida.⁷⁵

A interferência dos macrófagos associados ao tumor na resposta aos tratamentos de neoplasias malignas tem sido relatada. Agentes citotóxicos aumentam a infiltração de tumores por macrófagos supressores da resposta imune antitumoral, com capacidade de induzir fenótipo quimioprotetor de células T. Quimioterapia e radioterapia induzem dano tecidual que aumenta o recrutamento de células supressoras de origem mieloide, induzindo maior reposta de reparo do tecido e consequentemente promovendo o crescimento e a revascularização do tumor. Além disso, TAMs possuem a capacidade de proteger as células tronco tumorais da citotoxicidade gerada por essas terapias. Por outro lado, a morte imunogênica induzida por agentes quimioterápicos aumenta a imunogenicidade das células malignas, potencializando a capacidade de apresentação antigênica de células mieloides e ativando assim a resposta imune adaptativa antitumoral. Também a radiação de baixa dose pode induzir o fenótipo antitumoral de macrófagos e desencadear o efeito abscopal.⁷²

A resistência de neoplasias ao tratamento com terapias anti-VEGF é frequentemente associada com altos níveis de infiltração de células mieloides porque o tratamento antiangiogênico gera um ambiente de hipóxia, com consequente recrutamento de células mieloides para o local. Essas células então promovem angiogênese por mecanismos alternativos aos que foram inibidos, provocando resistência.^{72,76,77}

Os macrófagos associados ao tumor podem expressar os ligantes PDL1, PDL2, CD80 e CD86, que quando interagem com os receptores de checkpoint imunológico PD1 e CTLA-4 diminuem a atividade de células T. Então, a resistência ao tratamento com inibidores de *checkpoint* imune também pode diminuir se este for

complementado com a modulação de TAMs, removendo assim efeitos inibitórios adicionais que possam restringir a ação de células T apesar do bloqueio dos *checkpoints*.^{72,78,79,80}

Estratégias de modulação de macrófagos podem resultar em benefícios terapêuticos, devido ao próprio papel pró-tumoral dos TAMs e também complementando terapias convencionais, inibidores de angiogênese e imunoterapias.

1.5. MIF como proteína moduladora da resposta imunológica no câncer

São numerosos os mecanismos da MIF que sugerem seu papel na relação da inflamação com a tumorigênese e com a progressão tumoral.¹⁹

A expressão da MIF e seu receptor CD74 sob inflamação crônica seria um estímulo para a transformação de células pré-malignas. Células malignas expressam MIF e CD74 continuamente e a interação entre essas duas moléculas pode ser necessária para o crescimento celular por ativação de ERK 1/2 e produção de outras moléculas inflamatórias.⁸²

Por ser uma citocina e ter função no aumento da angiogênese, proliferação, sobrevivência e migração celular, a MIF já seria um elo entre inflamação e câncer. Entretanto, há outras funções dessa proteína ainda mais diretamente associadas ao sistema imunológico, que corroboram para seu papel no câncer. Segundo Mitchell, a MIF sustenta a viabilidade de macrófagos e conseqüentemente, mantém uma reação inflamatória que pode ser de importância para a progressão tumoral como, por exemplo, a sustentação de macrófagos associados ao tumor, os quais seriam modulados pelo tumor para exercer função pró-tumoral.⁸³

Ao mesmo passo que induz a promoção do tumor, a MIF colabora para a diminuição da reação imune contra o tumor, visto que inibe a lise de células tumorais por células NK e a atividade de linfócitos T citotóxicos.^{84,85}

Em modelo de câncer de cólon (CT26), observou-se que a MIF endógena ao hospedeiro induziu a geração de células T reguladoras e que tumores implantados em ratos nocaute para MIF apresentaram crescimento reduzido em relação aos

implantados em ratos selvagens, sugerindo que a MIF produzida pelas células do estroma tumoral possa ter papel pró-neoplásico importante.⁸⁶

Em concordância, a MIF produzida pelas células tumorais em modelo de melanoma, mostrou não ser suficiente para a progressão tumoral, mas que esta depende também da MIF proveniente das células do hospedeiro, provavelmente sendo de maior importância as que compõem o estroma do tumor como, por exemplo, as do infiltrado inflamatório. Tumores desenvolvidos a partir de células B16-F10 silenciadas para MIF, em ratos selvagens, não apresentaram diferença no crescimento em relação aos ratos selvagens implantados com células MIF+. Em contrapartida, os mesmos tumores, implantados em ratos nocauteados para MIF tiveram seu crescimento reduzido em 47% em comparação aos ratos selvagens. A mais importante causa dessa redução no crescimento tumoral parece ser a angiogênese diminuída observada por imunistoquímica e que possivelmente seja modulada pela MIF endógena ao hospedeiro, principalmente.⁸⁷

Sob outro aspecto, em estudo de modelo de câncer de mama (células 4T1), a proteína MIF mostrou promover o crescimento tumoral e a incidência de metástases apenas em ratos imunocompetentes, mais especificamente por aumentar a prevalência de células supressoras de origem mieloides no tumor, com ação na inibição da resposta imunológica antitumoral.⁸⁸

Em CEC da cavidade bucal, observamos expressão elevada da proteína MIF pelas células tumorais em relação as células epiteliais não tumorais adjacentes. Além disso, encontramos altos níveis sorológicos e salivares da proteína MIF em pacientes com CEC da cavidade bucal. Entretanto, a correlação desses achados com fatores de importância prognóstica não foi conclusiva. No mesmo estudo, observamos paralelamente a alta expressão da proteína MIF também pelas células do infiltrado inflamatório tumoral presente. Em conjunto, esses resultados sugerem uma possível participação da inflamação associada ao tumor e da rede de comunicação tumor-estroma no papel pró-tumoral da proteína MIF.^{54,89}

A proteína MIF também tem sido estudada na modulação do fenótipo de macrófagos associados ao tumor. Em modelo de melanoma em ratos MIF nocaute e selvagens, deficiência da MIF derivada de monócitos/macrófagos atenuou a ativação

alternativa de TAMs, revertendo a imunossupressão e reduzindo a neoangiogênese e o crescimento tumoral.⁹⁰

Maior compreensão da sinalização estabelecida entre os macrófagos, as células neoplásicas e os demais componentes do microambiente tumoral, das vias de modulação fenotípica dos macrófagos infiltrando o tumor e dos fatores associados ao fenótipo pró - tumoral dos macrófagos associados ao tumor, certamente poderá trazer benefícios importantes para o desenvolvimento de alvos e abordagens terapêuticas relacionados ao bloqueio de TAMs.

O presente estudo buscou investigar as alterações no fenótipo de macrófagos induzidas por células de câncer bucal em diferentes modelos e a participação da proteína MIF nestas alterações, a fim de gerar maior conhecimento sobre os macrófagos associados ao câncer de cavidade bucal e de avaliar a proteína MIF como um alvo para a modulação do fenótipo de TAMs.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a modulação do fenótipo de macrófagos por CECB e o papel da proteína MIF nesse processo.

2.2. Específico

Investigar em modelos murino e humano *in vitro* a modulação do fenótipo de macrófagos por células de CECB e o papel da proteína MIF derivada de macrófagos ou derivada das células tumorais nesse processo.

3. MÉTODOS

3.1. Locais de estudo

Os estudos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville – KY/EUA, no Laboratório de Biologia Celular e no Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

3.2. Linhagens celulares

Foram utilizadas no estudo as seguintes linhagens celulares: RAW 264.7 (macrófago murino; ATCC® TIB71™; Manassas, VA - USA), SCCVII (câncer oral murino; uma doação do Dr Bryon D. Johnson, Medical College Wisconsin, Milwaukee, WI, USA), U937 (monócito humano; ATCC® CRL-1593.2™; Manassas, VA-USA), SCC9 (carcinoma epidermoide de língua humano, masculino, 25 anos; ATCC® CRL-1629™; Manassas, VA-USA) e SCC25 (carcinoma epidermoide de língua humano, masculino, 70 anos; ATCC® CRL-1628™; Manassas, VA-USA).

As células SCC9 e SCC25 foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 (Invitrogen®, CA-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen®, CA-USA), 400 ng/ml de hidrocortisona (succinato sódico de hidrocortisona – Eurofarma®, Brasil), L-glutamina 1% e solução antimicótica e antibiótica 1% (Sigma®). As linhagens SCCVII foram mantidas em meio de cultura DMEM e as linhagens RAW 264.7 e U937 foram mantidas em meio de cultura RPMI (Invitrogen®, CA-USA), suplementados com 10% de FBS (soro fetal bovino, Invitrogen®, CA-USA), L-glutamina 1% e solução antimicótica e antibiótica 1% (Sigma®). As células foram cultivadas em frascos plásticos de 25 ou 75cm² (NUNC®, Dinamarca), a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade até atingirem uma confluência de 60-70%. O crescimento celular foi monitorado

diariamente e o meio de cultura trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular. As células RAW 264.7 foram utilizadas até a passagem 12.

3.3. Geração de linhagem RAW 264.7 knockdown para o gene MIF

Para a transdução por partículas lentivirais shRNA (*short hairpin* RNA), 1.5×10^5 células RAW 264.7, ressuspensas em 1 ml de RPMI 10% FBS, foram plaqueadas em um poço de placa de cultura de 12 poços e mantidas em cultura por 24 horas. Então o meio de cultura foi substituído por 1 ml de RPMI 10% FBS contendo 5 ug/ml de Brometo de Hexadimetrina (polybrene®, Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA; #sc-134220) e 37.500 unidades em 7.5 ul de partículas lentivirais shRNA controle (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA; #sc-108080) ou shRNA MIF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA; #sc-37138-V) foram adicionadas à cultura. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por 1 ml de RPMI 10% FBS e as células foram mantidas em cultura por mais 24 horas. Para selecionar os clones estáveis expressando shRNA, as células foram diluídas 1:20 e cultivadas em placa de cultura celular de 10cm² por 48 horas, e então tratadas com 10 ug/ml de dicloridrato de puromicina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA; #sc-108071). As células selecionadas foram mantidas em meio contendo dicloridrato de puromicina enquanto utilizadas para os experimentos.

3.4. Amostras de sangue periférico humano

Amostras de 120 a 240 ml de sangue total periférico foram coletadas de 7 indivíduos saudáveis no período de outubro/2016 a fevereiro/2017. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de densidade usando Percoll® Density Gradient Media (GE Healthcare®, USA; #17-0891-01) conforme protocolo sugerido pelo fabricante e as hemácias foram lisadas utilizando o 1x RBC lysis buffer solution (eBioscience®, CA-USA; #00-433-57).

3.5. Geração de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico (sigla em inglês, MDMφ)

Aproximadamente 6×10^6 PBMCs ressuspendidas em 2 ml de RPMI foram plaqueadas por poço em placa de cultura celular de 12 poços. Após 3 horas de cultivo, as células não aderidas foram removidas em seis lavagens com PBS e 2 ml de RPMI 10% FBS contendo 10 ng/ml de M-CSF (PeproTech, NJ, USA; #300-25) foi adicionado por poço. Após 4 dias, 2ml de RPMI 10% FBS contendo 10 ng/ml de M-CSF foi adicionado por poço. No total as células foram cultivadas por 7 dias para diferenciação e então utilizadas para os experimentos.

3.6. Diferenciação da linhagem celular monocítica humana U937 em macrófagos

Células U937 na densidade 5×10^5 /1ml/poço foram plaqueadas no compartimento inferior da câmara de Boyden em placa de 12 poços e tratadas com 10 ng/ml de PMA (*phorbol myristate acetate*) por 24 horas para diferenciação em macrófagos. Em seguida o meio de cultura foi substituído por RPMI 10% FBS e as células foram submetidas a 24 horas de descanso. Ao término do descanso, as células diferenciadas foram utilizadas para os experimentos.

3.7. Animais

Camundongos C57BL/6 *wild-type* (WT) foram obtidos do Jackson Laboratories (CA, USA), camundongos C57BL/6 CD74 *knockout* (CD74KO) foram cedidos para o estudo pelo Dr. Richard Bucala (Yale University, New Haven, CT, USA) e os animais C57BL/6 MIF *knockout* (MIFKO) cedidos pelo Dr. Abhay Satoskar (Ohio State University, Columbus, OH, USA). Os animais foram utilizados para experimentos entre 8 e 24 semanas de idade e manuseados de acordo com as normas da Associação Internacional para Avaliação e Acreditação de Laboratórios de Cuidado com Animais, com a aprovação do Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da University of Louisville (protocolo número 13138).

3.8. Geração de macrófagos derivados da medula óssea (sigla em inglês, BMDM ϕ)

Células da medula óssea foram extraídas de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 imediatamente após o seu sacrifício e as hemácias presentes foram lisadas utilizando o 1x RBC lysis buffer solution (eBioscience®, #00-433-57). Para diferenciação em macrófagos, 4×10^6 células ressuspendidas em 10 ml de RPMI suplementado com 10% de FBS e 25 ng/ml de M-CSF recombinante murino foram plaqueadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Após 4 dias de cultura, o volume de 10 ml de RPMI suplementado com 10% de FBS e 25 ng/ml de M-CSF recombinante murino foi adicionado às células em cultura. No sétimo dia de cultura, as células não aderentes foram descartadas e os macrófagos aderidos à placa foram colhidos para a realização dos experimentos.

3.9. Tratamentos e co-cultivo celular

Células RAW 264.7 na densidade 3×10^5 /1ml/poço foram plaqueadas na câmara inferior da Câmara de Boyden em placa de 12 poços e após 5 horas de cultura foram tratadas com 25 μ M de 4-IPP (*4-Iodo-6-phenylpyrimidine*), inibidor da proteína MIF desenvolvido e produzido pelo Dr. Robert A. Mitchell no laboratório onde as análises foram realizadas (Patente: US6492428B1), ou controle de veículo (DMSO) por 30 minutos. Então, 1×10^5 células SCCVII, pré-tratadas com 4-IPP (50 μ M) ou DMSO por 30 minutos quando necessário, foram adicionadas ao compartimento superior da Câmara de Boyden.

BMDM ϕ foram plaqueadas na câmara inferior da Câmara de Boyden na densidade 1×10^6 /1ml/poço em placa de 12 poços. Após 5 horas de cultura, 1×10^5 células SCCVII, pré-tratadas quando desejado para o experimento com 4-IPP (50 μ M) ou controle de veículo DMSO por 30 minutos, foram adicionadas ao compartimento superior da Câmara de Boyden.

Quando completada a diferenciação, os MDM ϕ foram tratados com 25 μ M de 4-IPP para inibição da proteína MIF e $2,5 \times 10^5$ células SCC25 foram plaqueadas no compartimento superior da Câmara de Boyden para co-cultivo.

Após a diferenciação, células U937 na densidade 5×10^5 /1ml/poço foram tratadas com 25 μ M de 4-IPP (*4-Iodo-6-phenylpyrimidine*) ou controle de veículo (DMSO) por 30 minutos. Em seguida, $2,5 \times 10^5$ células SCC9 ou SCC25 foram adicionadas ao compartimento superior da Câmara de Boyden para co-cultivo.

Nos experimentos em que se desejou avaliar e comparar o efeito da citocina ativadora de fenótipo M2, sozinha ou associada às células de CECB, 10 ng/ml de Interleucina 4 (IL4) foi adicionado aos macrófagos no compartimento inferior da Câmara de Boyden.

Em todos os experimentos as células foram mantidas em co-cultivo ou tratamento por 48 horas e o fenótipo dos macrófagos foi avaliado por PCR quantitativo em tempo real ou Western Blotting.

3.10. Análise por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

RNA total foi extraído pelo RNeasy mini kit® (Qiagen, CA, USA; #74104) conforme instruções do fabricante, incluindo a digestão por RNase-free DNase (Qiagen, CA, USA; #79254) para eliminar a contaminação por DNA genômico. A concentração e a pureza do RNA foram medidas utilizando o NanoDrop® 8000 UV-Vis Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific, USA) na University of Louisville ou o NanoDrop® 1000 UV-Vis Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific, USA) na Faculdade de Odontologia da USP.

A síntese de cDNA foi realizada por RT-PCR (em inglês, Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction) utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, MA, USA; #4368814) e RNase Inhibitor (Applied Biosystems®, MA, USA; #N8080119) conforme protocolo sugerido pelo fabricante. A concentração do cDNA sintetizado variou entre 5 a 50 ng/ μ l de acordo com a concentração do mRNA purificado.

Os níveis de mRNA nas amostras foram avaliados por PCR quantitativo em tempo real em reações com 5ng de cDNA, Taqman® fast advanced mastermix (Applied Biosystems, MA, USA; # 4444557), Taqman® Gene Expression Assay para o gene endógeno 18S (Applied Biosystems, MA, USA; #Hs99999901.s1; VIC) e Taqman® Gene Expression Assay para os genes alvo Arginase 1

(Mm00475988_m1; FAM), CD206 murino (*mannose receptor*; Mm00485148_m1; FAM), COX-2 murino (*cyclooxygenase 2*; Mm00478374_m1; FAM), iNOS murino (*inducible nitric oxide synthase*; Mm00440502_m1; FAM), VEGF-A murino (*vascular endothelial growth factor A*; Mm01281449_m1; FAM), CD206 humano (*mannose receptor*; Hs00267207_m1, FAM), CD163 humano (*Cluster of Differentiation 163*; Hs00174705_m1, FAM), COX-2 humano (*cyclooxygenase 2*; Hs00153133_m1; FAM), EGR2 humano (early growth response 2; Hs00166165_m1, FAM), FOLR2 humano (Folate receptor 2; Hs01044732_g1, FAM) IL1 β humano (*interleukin 1 beta*; Hs01555410_m1, FAM), IL10 humano (*interleukin 10*; Hs00961622_m1, FAM), SERPINB2 humano (*serpin family B member 2*; Hs01010736_m1, FAM), TNF- α humano (*tumor necrosis factor- α* ; Hs00174128_m1, FAM), VEGF-A humano (*vascular endothelial growth factor A*; Hs00900055_m1, FAM), utilizados de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em placas MicroAmp® Fast Optical (Applied Biosystems, MA, USA; #4346907), no instrumento 7500 Fast Real-Time PCR® (Applied Biosystems, MA, USA), na University of Louisville, ou 7500 Real-Time PCR® (Applied Biosystems, MA, USA), na Faculdade de Odontologia da USP. A expressão relativa dos mRNAs foi calculada através do método comparativo Ct (Método $\Delta\Delta Ct$). O $\Delta\Delta Ct$ foi calculado como a diferença entre os valores de Ct normalizados ($\Delta Ct = Ct$ do gene alvo – Ct do gene controle endógeno) da amostra tratada e da amostra controle: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ tratamento – ΔCt controle. $\Delta\Delta Ct$ foi então convertido em quantidade relativa (RQ) pela seguinte fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Replicatas técnicas foram realizadas para todas as reações de qRT-PCR.

3.11. Análise por Western Blotting

A lise celular total foi realizada com solução de lise composta por tampão RIPA® (1:10, Thermo Scientific #89900), 1% de inibidor de protease, 1% do inibidor de *fosfatase ortovanadato* de sódio (Na_3VO_4) e 0,4% de fluoreto de sódio (NaF) 0,5 M. Em seguida as placas foram incubadas por 5 minutos 4°C em agitação e então com o auxílio de um minirrodo o conteúdo de cada placa foi transferido para microtubo de 1,5 mL e mantidos em gelo. Após centrifugação por 5 minutos a 8.000 RPM e 4°C, o sobrenadante foi separado, sendo que de 5 a 10 μL foram utilizados

no ensaio de quantificação de proteínas com o *kit* DC Protein Assay® (BioRad #500-0112), realizado conforme instruções do fabricante. Segundo o resultado do ensaio, quantidades diferentes dos lisados foram utilizadas a fim de se obter a mesma concentração de proteína total entre todas e então o tampão desnaturante Laemmli® (BioRad #161-0737) foi adicionado na proporção 1:1.

As amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, BioRad #456-1094) a 220 V e então transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Immobilon-P Membrane®, Millipore #IPVH00010) a 350 A por 45 minutos. A membrana foi incubada em agitação por 1 hora a temperatura ambiente com 6mL da solução de bloqueio composta por 2% de Tris-HCL 1M pH7,5® (Cellgro, #46-030-CM), 7% de cloreto de sódio (NaCl) 5M, 0,2% de Tween 20 (Sigma® #P7949), 1% de soro de cabra® (Gibco #16210064) e 5% de leite em pó desnatado (Blotting-Grade Blocker®, BioRad #170-6404) em água destilada. Ao término do bloqueio, 6 ul do anticorpo primário anti-Arginase 1 (E-2; Santa Cruz Biotechnology®; #sc-271430) ou 3ul do anti-GAPDH (Clone 14C10, Cell Signaling Technology®, MA, USA; #2118) foram adicionados à solução de bloqueio e realizada nova incubação em agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem para western blotting, 6ml da solução de bloqueio e 0,75 ul do anticorpo secundário foram adicionados à membrana e nova incubação em agitação por 45 minutos a temperatura ambiente foi realizada. Após cinco novas lavagens com tampão de lavagem para western blotting, foi realizada a revelação por quimioluminescência com o Pierce ECL Western Blotting Substrate® (Thermo Fisher Scientific, USA; #32106).

3.12. Análise Estatística

O software GraphPad Prism 7.0c (GraphPad Prism Software, Inc., La Jolla, CA) foi utilizado para as análises estatísticas. Comparações entre grupos foram feitas pelo teste paramétrico T de Student bicaudal. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significantes para todos os testes.

3.13. Aspectos éticos

Os experimentos in vitro foram realizados utilizando linhagens comerciais de células tumorais, de macrófagos e monócitos, células da medula óssea de camundongos e monócitos isolados de sangue periférico de indivíduos sem câncer.

As amostras de sangue periférico foram obtidas de doadores saudáveis na University of Louisville, KY-USA, com aprovação número 16.1045 do *Biomedical Institutional Review Board* (IRB). (Apêndice A)

A utilização de animais no estudo teve aprovação do Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da *University of Louisville* (protocolo número 13138).

Os resultados obtidos desse trabalho foram enviados à publicação em revista científica, garantindo a confidencialidade dos dados e o respeito aos indivíduos envolvidos.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer n.: 1.856.527). (Apêndice B)

4. RESULTADOS

4.1. Alteração fenotípica de macrófagos induzida por células de CEC bucal em modelo murino

4.1.1. Células de CECB promovem alteração fenotípica de macrófagos RAW 264.7 de maneira dependente da densidade celular e da expressão macrofágica da proteína MIF

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 co-cultivados com células tumorais SCCVII mostraram expressão elevada de Arginase 1, VEGF-A, COX-2 e iNOS e esse efeito mostrou ser dependente da densidade de células tumorais ($P \leq 0.05$). A inibição da proteína MIF nos macrófagos por tratamento com 4-IPP foi capaz de reduzir a expressão basal e também, significativamente ($P \leq 0.01$), a indução pelas células tumorais da expressão desses marcadores. (Gráficos 1, 3, 5, 7)

O co-cultivo com células tumorais induziu a expressão de CD206 pelos macrófagos significativamente quando a proteína MIF foi inibida por 4-IPP. (Gráfico 9)

Os resultados observados nos macrófagos RAW 264.7 tratados com 4-IPP foram reproduzidos nos macrófagos RAW 264.7 transduzidos com shRNA anti-MIF. A redução da expressão, induzida pelas células tumorais, de Arginase 1, VEGF-A, COX-2 e iNOS em macrófagos tratados com 4-IPP foi observada também nos macrófagos transduzidos com shRNA anti-MIF. (Gráficos 2, 4, 6, 8)

O aumento da expressão de CD206 induzido pela inibição da proteína MIF derivada dos macrófagos por 4-IPP foi observado também nos macrófagos transduzidos com shRNA anti-MIF. (Gráfico 10)

Gráfico 1. Expressão de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII em diferentes densidades (0.3: 0.3×10^5 células/inserto; 1.0: 1.0×10^5 células/inserto). RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 2. Expressão de ARG1 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. ns, não significante: $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 3. Expressão de VEGF-A em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII em diferentes densidades (0.3: 0.3×10^5 células/inserto; 1.0: 1.0×10^5 células/inserto). RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 4. Expressão de VEGF-A em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 5. Expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII em diferentes densidades (0.3: 0.3×10^5 células/inserto; 1.0: 1.0×10^5 células/inserto). RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 6. Expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. ns, não significante: $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 7. Expressão de iNOS em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII em diferentes densidades (0.3: 0.3×10^5 células/inserto; 1.0: 1.0×10^5 células/inserto). RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 8. Expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. * $P \leq 0.05$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 9. Expressão de CD206 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e pela inibição da expressão da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII em diferentes densidades (0.3: 0.3×10^5 células/inserto; 1.0: 1.0×10^5 células/inserto). RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 10. Expressão de CD206 em macrófagos RAW 264.7 é induzida por CECB e pela inibição da expressão da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.1.2. Alteração fenotípica de macrófagos RAW 264.7 dependente da expressão macrofágica mas não da expressão tumoral da proteína MIF

A inibição da proteína MIF derivada das células tumorais por 4-IPP não afetou a expressão de Arginase 1, VEGF-A, COX-2 e iNOS pelos macrófagos RAW 264.7. (Gráficos 11 a 14)

Entretanto, a inibição da MIF derivada das células tumorais reduziu a expressão de CD206 induzida pelas células tumorais nos macrófagos tratados com 4-IPP. (Gráfico 15)

Gráfico 11. Expressão de ARG1 induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 12. Expressão de VEGF-A induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; $P > 0.05$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 13. Expressão de COX-2 induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 14. Expressão de iNOS induzida por CECB em macrófagos RAW 264.7 não depende da expressão tumoral da MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 15. Expressão de CD206 induzida por CECB e pela inibição da MIF em macrófagos RAW 264.7 depende parcialmente da expressão tumoral da MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.1.3. IL4 e células SCCVII colaboram para a alteração fenotípica de macrófagos RAW 264.7

IL4, reconhecidamente um fator indutor do fenótipo alternativo de macrófagos, induziu a expressão de Arginase 1 e CD206 pela linhagem de macrófagos RAW 264.7. A indução da expressão de Arginase 1 por IL4 foi significativamente menor ($P < 0.0001$) nos macrófagos tratados com 4-IPP ou transduzidos com shRNA anti-MIF comparados aos macrófagos controle. (Gráficos 16 e 17)

A adição de IL4 aos macrófagos concomitante com o seu co-cultivo com células tumorais SCCVII, mostrou uma indução de Arginase 1 significativamente maior que o tratamento isolado com IL4 ($P<0.001$), e esse efeito também foi reduzido com a inibição da proteína MIF nos macrófagos por 4-IPP ($P<0.05$) ou por shRNA anti-MIF. (Gráficos 16 e 17; Figura 1)

O marcador CD206 também foi induzido por IL4 nos macrófagos RAW 264.7, entretanto, ao contrário da Arginase 1, sua expressão aumentou com a inibição da MIF por 4-IPP ou por shRNA anti-MIF. O tratamento com IL4 concomitante com o co-cultivo com células tumorais também induziu maior expressão de CD206 comparada à expressão induzida por IL4 ($P<0.05$), mas esse efeito não foi tão expressivo quanto o observado para Arginase 1. (Gráficos 18 e 19)

Gráfico 16. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 17. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. ns, não significante: $P > 0.05$; $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$; $****P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Figura 1. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e CECB em macrófagos RAW 264.7 é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF. Análise por western blotting da expressão de Arginase 1 em lisado celular total de macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII.

Gráfico 18. Expressão de CD206 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é aumentada com a inibição da expressão macrofágica da proteína MIF (4-IPP). Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos da linhagem RAW 264.7 tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência estimulada com controle de veículo DMSO. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 19. Expressão de CD206 induzida por IL4 e/ou CECB em macrófagos RAW 264.7 é aumentada com a inibição da expressão macrofágica da proteína MIF (shRNA anti-MIF). Expressão de mRNA por PCR em tempo real. Expressão de CD206 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 infectados com shRNA controle ou shRNA anti-MIF; tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência infectada com shRNA controle. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.1.4. Alteração fenotípica de BMDM ϕ dependente de ambas expressão macrofágica e expressão tumoral da proteína MIF

A expressão de Arginase 1 ($P < 0.01$), VEGF-A ($P < 0.0001$) e CD206 ($P < 0.0001$) foi significativamente induzida pelo co-cultivo com células tumorais em macrófagos derivados da medula-óssea de camundongos C57BL/6 WT e essa indução foi menor em BMDM ϕ de camundongos MIFKO. (Gráficos 20 a 22)

A inibição da proteína MIF derivada das células SCCVII por 4-IPP, diferente do observado em macrófagos RAW 264.7, reduziu significativamente a expressão de Arginase 1 ($P < 0.01$) e VEGF-A ($P < 0.01$) induzida pelas células tumorais. (Gráficos 20 e 21). Esse efeito não foi observado na expressão de CD206. (Gráfico 22)

Gráfico 20. Expressão de ARG1 em BMDM ϕ é induzida por CECB e dependente da expressão macrófágica e tumoral da proteína MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM ϕ) *wild-type* (WT) ou MIF *knockout* (MIFKO); co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência *wild-type*. ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 21. Expressão de VEGF-A em BMDM ϕ é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica e tumoral da proteína MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM ϕ) *wild-type* (WT) ou MIF *knockout* (MIFKO); co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência *wild-type*. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráfico 22. Expressão de CD206 em BMDM ϕ é induzida por CECB e dependente da expressão macrofágica mas não tumoral da proteína MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM ϕ) *wild-type* (WT) ou MIF *knockout* (MIFKO); co-cultivados com células SCCVII tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência *wild-type*. ns, não significante: $P > 0.05$; ** $P \leq 0.01$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.1.5. IL4 e células SCCVII colaboram para a alteração fenotípica de BMDM ϕ

A indução de Arginase 1 por IL4 mostrou ser dependente da expressão de MIF ($P < 0.01$) e o co-cultivo com células tumorais colaborou com IL4 para induzir níveis de expressão ainda mais altos de Arginase 1 em BMDM ϕ WT ($P < 0.001$), com um efeito menor em BMDM ϕ MIFKO ($P < 0.01$). (Gráfico 23 e Figura 2)

A expressão de CD206 por BMDM ϕ foi induzida por IL4 e maior expressão foi observada em BMDM ϕ co-cultivados com células SCCVII. O tratamento com IL4 concomitante com o co-cultivo com células tumorais induziu maior expressão de CD206 em BMDM ϕ do que IL4 ou o co-cultivo sozinhos. Os efeitos de IL4 observados na expressão de CD206, entretanto, não mostraram participação da proteína MIF. (Gráfico 24)

Gráfico 23. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDM ϕ é dependente da expressão macrofágica e tumoral da proteína MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM ϕ) *wild-type* (WT) ou MIF *knockout* (MIFKO); tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência *wild-type*. **P $\leq$ 0.01; ***P $\leq$ 0.001; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Figura 2. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDMφ é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF. Análise por western blotting da expressão de Arginase 1 em lisado celular total de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMφ) *wild-type* (WT) ou MIF *knockout* (MIFKO); tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII.

Gráfico 24. Expressão de CD206 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDM ϕ não é dependente da expressão macrofágica da proteína MIF. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM ϕ) *wild-type* (WT) ou MIF *knockout* (MIFKO); tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência *wild-type*. ns: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.1.6. Alteração fenotípica de BMDM ϕ dependente de expressão da proteína MIF não requer expressão do receptor CD74

A expressão de Arginase 1 induzida por células tumorais SCCVII ou IL4 mostrou ser independente da expressão de CD74, principal receptor de membrana da proteína MIF, em BMDM ϕ . (Gráfico 25)

Gráfico 25. Expressão de ARG1 induzida por IL4 e/ou CECB em BMDMφ não é dependente da expressão macrófágica de CD74. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMφ) *wild-type* (WT) ou CD74 *knockout* (CD74KO); tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCCVII. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência *wild-type*. ns: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.2. Alteração fenotípica de macrófagos induzida por células de CEC bucal em modelos humanos

4.2.1. Linhagem celular humana de CECB altera o fenótipo de macrófagos derivados de monócitos (MDMφ) do sangue periférico humano.

Macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de três indivíduos sem câncer foram co-cultivados com células da linhagem de CECB humana, SCC25.

Os resultados mostram que as células tumorais SCC25 induziram aumento na expressão de mRNA dos marcadores de macrófagos tipo M2, CD206, SERPINB2 e VEGF-A nos MDM ϕ dos três indivíduos. (Gráficos 26 A-C a 28 A-C)

A indução da expressão desses marcadores pelas células tumorais em MDM ϕ não foi alterada de maneira significativa e consistente nas amostras dos três indivíduos com a inibição da proteína MIF macrofágica ou tumoral por 4-IPP. (Gráficos 26 A-C a 28 A-C)

O co-cultivo com células tumorais e/ou a inibição da proteína MIF macrofágica ou tumoral não alterou de forma significativa e consistente a expressão de mRNA dos demais marcadores de macrófagos tipo M2, CD163, IL10, FOLR2 e COX2. (Gráficos 29 A-C a 32 A-C)

O efeito do tratamento dos MDM ϕ com IL4 foi analisado na amostra de apenas um indivíduo. Nos MDM ϕ deste indivíduo, IL4 induziu a expressão de mRNA de CD206 e VEGF-A e inibiu SERPINB2, IL10 e FOLR. (Gráficos 26 A - 32 A)

Gráficos 26 A-C. Expressão de CD206 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 27 A-C. Expressão de SERPINB2 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 28 A-C. Expressão de VEGF-A em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significativo: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 29 A-C. Expressão de CD163 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 30 A-C. Expressão de IL10 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer.

Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 31 A-C. Expressão de FOLR2 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 32 A-C. Expressão de COX-2 em MDM ϕ de diferentes indivíduos sem câncer. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em macrófagos derivados de monócitos (MDM ϕ) do sangue periférico de indivíduos sem câncer. MDM ϕ pré-tratados com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (A) Doador 5. MDM ϕ tratados com IL4 ou/e co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (B) Doador 6. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. (C) Doador 7. MDM ϕ co-cultivados com células SCC25 pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo (DMSO). ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

4.2.2. Método de diferenciação de células da linhagem de monócitos humanos U937 altera a expressão basal de marcadores clássicos e alternativos

Monócitos da linhagem celular U937 foram diferenciados com três diferentes concentrações de PMA e comparados aos monócitos não diferenciados tratados com o controle de veículo DMSO. A diferenciação com PMA mostrou indução dos marcadores de macrófagos tipo M2, IL10, EGR2, CD163, SERPINB2, COX-2 e dos marcadores de macrófagos tipo M1, TNF α e IL1 β . A expressão dos marcadores de macrófago tipo M2, CD206 e VEGF foi parcialmente inibida com a diferenciação dependendo da concentração de PMA utilizada. (Gráficos 33 A-I)

Menor interferência na expressão basal dos marcadores de macrófagos tipo M1 e tipo M2 foi observada para a diferenciação com PMA nas concentrações 5 e 10 ng/ml. (Gráficos 33 A-I)

Gráficos 33 A-I. Expressão de marcadores de macrófagos tipo M1 e tipo M2 é alterada durante a diferenciação dos monócitos U937 em macrófagos. Expressão de mRNA de IL10 (A), CD206 (B), EGR2 (C), CD163 (D), SERPINB2 (E), COX-2 (F), VEGF-A (G), TNF α (H) e IL1 β (I) por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 tratadas com controle de veículo (DMSO); PMA 5ng/ml; PMA 10 ng/ml; PMA 100 ng/ml. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO.

4.2.3. Alterações no fenótipo de células U937 diferenciadas são induzidas por IL4 e por linhagens celulares de CECB e parcialmente dependentes da expressão da proteína MIF

Monócitos da linhagem celular U937 foram diferenciados com PMA e posteriormente tratados com IL4 e/ou co-cultivados com células da linhagem de CECB, SCC25.

Como descrito acima, os níveis basais de expressão dos marcadores de macrófagos tipo M1 e tipo M2 sofrem alteração com o procedimento de diferenciação dos monócitos U937 em macrófagos, o que, aparentemente, influencia nos efeitos observados e mostrados nos resultados abaixo. Portanto, embora alguns gráficos representativos destes dados mostrem significância estatística, são considerados e descritos nestes resultados, apenas os efeitos que se repetiram e mostraram significância em todos as réplicas dos experimentos realizados.

O tratamento com IL4 induziu um aumento na expressão de mRNA dos marcadores de macrófagos tipo M2, IL10 ($P \leq 0.01$), CD206 ($P \leq 0.001$ e $P \leq 0.0001$) e EGR2 ($P \leq 0.01$ e $P \leq 0.001$). (Gráficos 34 A-B a 36 A-B)

A inibição por 4-IPP da proteína MIF macrofágica levou a uma redução parcial da expressão de mRNA de IL10 ($P \leq 0.01$ e $P \leq 0.05$) e CD206 ($P \leq 0.01$ e $P \leq 0.0001$), mas não de EGR2, induzidas por IL4. (Gráficos 34 A-B a 36 A-B)

A expressão de mRNA dos marcadores de macrófagos tipo M2, CD163 ($P \leq 0.0001$ e $P \leq 0.01$), SERPINB2 ($P \leq 0.0001$ e $P \leq 0.01$), COX2 ($P \leq 0.05$) e tipo M1, TNF α ($P \leq 0.01$ e $P \leq 0.0001$) e IL1 β ($P \leq 0.001$ e $P \leq 0.05$) foi inibida pelo tratamento com IL4, mas esse efeito não mostrou ser dependente da expressão da proteína MIF nos macrófagos. (Gráficos 37 A-B a 39 A-B, 41 A-B, 42 A-B)

O co-cultivo com células tumorais SCC9 induziu a expressão macrofágica dos marcadores de macrófagos tipo M2, SERPINB2 ($P \leq 0.01$), COX-2 ($P \leq 0.001$) e VEGF-A ($P \leq 0.01$) mas apenas a expressão induzida de COX-2 foi parcialmente revertida pela inibição da proteína MIF nos macrófagos ($P \leq 0.01$). (Gráficos 38 A a 40 A)

A expressão de COX-2 foi induzida também por células de CECB SCC25 ($P \leq 0.01$), mas esse efeito não mostrou ser dependente da expressão da proteína MIF. (Gráfico 39 B)

A expressão de mRNA do marcador de macrófagos tipo M1, $\text{TNF}\alpha$, foi inibida pelo co-cultivo com as células tumorais SCC25 ($P \leq 0.001$), enquanto que a expressão de $\text{IL1}\beta$ foi induzida pelas células tumorais SCC9 ($P \leq 0.001$). (Gráficos 41 B e 42 A)

O co-cultivo com SCC9 ou SCC25 potencializou a expressão de EGR2 induzida por IL4 quando associados, embora o co-cultivo sozinho não tenha demonstrado efeito sobre a expressão deste marcador. (Gráficos 36 A-B)

Gráficos 34 A-B. Expressão de IL10 é induzida por IL4 e parcialmente dependente da expressão macrofágica da proteína MIF em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 35 A-B. Expressão de CD206 é induzida por IL4 e parcialmente dependente da expressão macrofágica da proteína MIF em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 36 A-B. Expressão de EGR2 é induzida por IL4 em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 37 A-B. Expressão de CD163 é inibida por IL4 em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 38 A-B. Expressão de SERPINB2 é inibida por IL4 e induzida por SCC9 em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 39 A-B. Expressão de COX2 é inibida por IL4 e induzida por SCC9 e SCC25 em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 40 A-B. Expressão de VEGF-A é induzida por CECB em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 41 A-B. Expressão de TNF α é inibida por IL4 e por SCC25 em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significante: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

Gráficos 42 A-B. Expressão de IL1 β é inibida por IL4 e induzida por SCC9 em células U937 diferenciadas com PMA. Expressão de mRNA por PCR em tempo real em células da linhagem monocítica humana U937 diferenciadas com PMA; pré-tratadas com controle de veículo (DMSO) ou 4-IPP; tratadas com IL4 ou/e co-cultivadas com células da linhagem de CECB (A) SCC9 ou (B) SCC25. RQ: Quantidade relativa mostrada em relação à amostra referência tratada com controle de veículo DMSO. ns, não significativa: $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.000.1$; (asterisco preto: relativo à amostra referência; asterisco vermelho: relativo à comparação mostrada pela chave)

5. DISCUSSÃO

Os macrófagos associados ao tumor são as células não malignas mais abundantes infiltrando os nichos tumorais e o estroma circundante, compreendendo de 5 a 40% dos tumores sólidos malignos.⁹¹⁻⁹³

A população de TAMs é formada por macrófagos residentes do tecido de origem da neoplasia, diferenciados a partir de progenitores embrionários e que possuem capacidade de auto renovação, por macrófagos diferenciados de monócitos do sangue periférico que são recrutados para o microambiente tumoral ou ainda por macrófagos derivados de células supressoras de origem mieloides (MDSCs).^{94,95}

Essas células apresentam alta plasticidade funcional em resposta aos estímulos do microambiente local e então podem ser “educadas” pelo tumor e pela sinalização presente no microambiente, assumindo diferentes fenótipos.⁹⁶

A caracterização dos macrófagos associados ao tumor, bem como suas funções no microambiente tumoral, se combatendo ou dando suporte à progressão do câncer, são aspectos ainda pouco compreendidos e bastante controversos. A exemplo disto, estudos têm observado populações mistas de TAMs com fenótipo M1 e fenótipo M2 infiltrando o mesmo microambiente tumoral e promovendo a capacidade invasiva da célula neoplásica.^{97,98} Outros relatos, a despeito do esperado, têm mostrado a ação de macrófagos identificados como tipo M1, na promoção do desenvolvimento tumoral. Em carcinoma hepatocelular, TAMs tipo M1 (CD68⁺HLA-DR⁺) induziram a supressão da imunidade anti-tumoral e promoveram metástase.⁹⁹

Em câncer de cabeça e pescoço, as investigações têm mantido o foco principalmente na identificação ex-vivo dos macrófagos associados ao tumor e em sua associação com características clínicas e desfechos da doença. Entretanto, os resultados apresentados muitas vezes se apresentam discordantes. Com o objetivo de encontrar pontos em comum, uma recente revisão sistemática reuniu 17 estudos, incluindo 1528 pacientes, que apresentavam dados de identificação de TAMs expressando o marcador geral de macrófagos CD68 e/ou o marcador de macrófagos tipo M2 mais comumente utilizado nestes estudos, o CD163, e de sua ligação com

prognóstico e características clínicas. A meta-análise realizada mostrou que a expressão de CD68, ou seja, a infiltração do tumor por macrófagos independente de seu fenótipo, não apresenta relação com o prognóstico da doença. Entretanto, a alta expressão de CD163 no estroma foi associada com pior sobrevida global e pior sobrevida livre de progressão.¹⁰⁰

Outra revisão analisou 14 estudos, incluindo apenas as neoplasias de sítios do andar inferior da cavidade bucal, e mostrou que a alta concentração de macrófagos expressando CD68 e CD163 está associada com pior sobrevida dos pacientes.¹⁰¹

Além de identificar e quantificar macrófagos infiltrando CECB, estudo realizado por Costa et al., buscou também caracterizar o fenótipo dessa população de TAMs por meio da análise de expressão de citocinas M1, pró-inflamatórias (IL-12, IL-23, IFN- γ), e M2, anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). Os dados obtidos por eles mostraram predominância de macrófagos com fenótipo M2 no estroma de amostras de CECB, sendo que em maior número quando comparados aos macrófagos de tecidos não neoplásicos. A porcentagem de TAMs foi maior em CECB metastático do que em não metastático e apresentou relação inversamente proporcional ao tempo de sobrevida.¹⁰²

Essas observações feitas em estudos ex vivo demonstram a importância dos macrófagos associados ao tumor como marcadores de prognóstico de neoplasias, incluindo CECB, e destacam a necessidade de melhor compreender os fenótipos e a dinâmica de macrófagos associados aos tipos específicos de câncer, bem como a rede de sinalização que suporta esses fenótipos. Esse conhecimento é necessário pelo potencial desenvolvimento de terapias que tenham como alvo a modulação de macrófagos associados ao tumor e ainda se mostra escasso.

Então, a fim de melhor compreender as alterações na expressão de marcadores fenotípicos de macrófagos induzidas por células de carcinoma epidermoide da cavidade bucal, nós, no presente trabalho, co-cultivamos in vitro macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 ou macrófagos derivados de células da medula óssea de camundongos, com células de CECB murino da linhagem SCCVII, cujos principais resultados estão resumidos no Quadro I.

A lógica por trás do foco inicial nas avaliações de mRNA de Arginase-1, VEGF-A e CD206 resultou principalmente do fato de que esses marcadores são muito bem

caracterizados como determinantes funcionais da ativação alternativa de macrófagos e porque estudos anteriores revelaram que MIF é especialmente importante na condução da expressão máxima desses produtos gênicos em TAMs de melanoma murino.⁹⁰

A enzima Arginase 1 metaboliza L-arginina em L-ornitina e ureia. No sistema imune, a Arginase 1 produzida por células mieloides provoca a depleção de L-arginina, reduzindo a síntese de óxido nítrico e suprimindo assim a resposta mediada por linfócitos T. A Arginase 1 é induzida em células mieloides por citocinas Th2 e também tem ação na indução de fibrose e na regeneração tecidual.¹⁰³ Embora sua expressão seja observada em células humanas e murinas, a proteína Arginase 1 é um marcador da ativação alternativa de macrófagos induzida por IL-4, apenas em camundongos.^{104,105} No microambiente tumoral, além de contribuir para a imunossupressão, a Arginase 1 expressa por TAMs em seu metabolismo produz poliaminas, substratos para a proliferação da célula tumoral.^{106,107}

CD206, ou receptor de manose, é um receptor de lectina tipo C expresso na membrana de macrófagos. O CD206 é um receptor endocítico e fagocítico, que se liga a porções de carboidrato em diversos patógenos e também a glicoproteínas endógenas, apresentando então funções de receptor de reconhecimento padrão, na limpeza de moléculas e na modulação da resposta imune contra patógenos.^{108,109} Em modelo de câncer de ovário, foi demonstrado que o CD206 é o receptor de lectina mais proeminentemente expresso em TAMs e que sua interação com mucinas tumorais, como o CA125, induz o fenótipo imunossupressor de macrófagos com o aumento da expressão de IL-10 e a redução da expressão de IL-12.¹¹⁰ A expressão de CD206 é considerada um marcador da ativação alternativa induzida por IL-4 em macrófagos murinos e humanos.^{111,112}

O papel de VEGF-A na indução e suporte da neoangiogênese associada ao câncer é bem conhecido.¹¹³ Um mecanismo menos conhecido e bastante interessante é a sinalização autócrina de VEGF em macrófagos M2 promovendo a expressão de PDL1 e consequente imunomodulação de linfócitos T.¹¹⁴

Nossos estudos indicam que a linhagem celular de CECB murina SCCVII é suficiente para promover modesta ativação alternativa de macrófagos, como

demonstrado pela indução no aumento da expressão de Arginase 1, CD206 e VEGF-A.

Como já é conhecido, IL-4 induz a expressão de Arginase 1 CD206 em macrófagos murinos.⁹⁹ Nós aqui mostramos que a indução de Arginase 1 e CD206 por SCCVII pode ser significativamente aumentada na presença da citocina Th2, IL-4, mas que esse efeito não parece ser apenas somatório e sim sinérgico.

Nossos dados também demonstram que a proteína MIF derivada de macrófagos é necessária para a máxima polarização de macrófagos expressando Arginase 1 e CD206 induzida tanto por SCCVII quanto por IL-4, embora sua requisição seja maior para a ativação alternativa mediada por SCCVII do que para IL-4 sozinha ou em combinação com SCCVII. A ausência da expressão macrofágica de MIF também foi associada à redução da expressão de VEGF-A pelos macrófagos.

Resultados prévios publicados pelo laboratório da *University of Louisville* onde este estudo foi desenvolvido, revelaram que camundongos deficientes na produção de MIF implantados com células de melanoma com alta expressão e secreção de MIF exibiram redução significativa no crescimento e progressão de melanoma subcutâneo e metastático. Essas reduções coincidiram com uma diferença observada entre os perfis de polarização de TAMs isolados de camundongos MIF^{-/-} (M1 – baixa expressão de Arg1, alta expressão de TNF- α) e aqueles isolados de camundongos MIF^{+/+} (M2 – alta expressão de Arg1, baixa expressão de TNF- α). Importaneamente, TAMs e MDSCs de camundongos MIF^{+/+} tratados com 4-IPP ou de camundongos MIF^{-/-} exibiram reduzida atividade supressora de células T, indicando que a proteína MIF derivada de monócitos e macrófagos é necessária para a função imunossupressora de TAMs tipo M2 e de MDSCs.^{90,115} Esses achados são similares aos de um estudo prévio reportando que MIF derivado de melanoma B16F10 foi dispensável para o máximo crescimento tumoral, enquanto que MIF derivado do estroma foi necessário.⁸⁷

Entretanto, já foi reportado também que a proteína MIF derivada de células tumorais com ação parácrina promoveu a ativação de macrófagos pró—angiogênicos bem como a diferenciação de MDSCs, sugerindo que MIF extracelular é capaz e suficiente para promover a imunossupressão de células da imunidade inata.^{88,116}

Um dos objetivos do presente estudo foi investigar se a proteína MIF derivada de macrófagos ou de células tumorais é dominante em mediar a polarização de TAMs para um fenótipo tipo M2. Para tanto, nós inibimos a proteína MIF nas células tumorais com 4-IPP e co-cultivamos as mesmas com macrófagos RAW 264.7 ou BMDM ϕ expressando ou não a proteína MIF. Embora nossos resultados demonstrem requisição dominante de MIF derivada de macrófagos para a ativação alternativa de macrófagos induzida por IL-4 e SCCVII tanto em células RAW 264.6 quanto em BMDM ϕ primários, a contribuição relativa de MIF derivada de células SCCVII é dependente de se elas são co-cultivadas com macrófagos primários (BMDM ϕ – sensíveis) ou com linhagem celular de macrófagos (RAW 264.7 – resistente). Uma explicação razoável para esta diferença de comportamento entre os tipos de macrófagos é que macrófagos imortalizados apresentam expressão e secreção consideravelmente mais altas de MIF comparados aos macrófagos primários e então já possuem MIF proveniente de fontes autócrinas suficiente para sua ativação.

Uma exceção interessante foi observada para a expressão de CD206 em macrófagos RAW 264.7 que, diferentemente, apareceu aumentada com a inibição de MIF por 4IPP ou shRNA anti-MIF nos macrófagos, mas parcialmente reduzida quando a proteína MIF foi inibida nas células tumorais. Ao mesmo tempo, a ausência de MIF em BMDM ϕ não surtiu efeito na expressão de CD206. Paralelamente, o co-cultivo com células tumorais SCCVII não foi capaz de induzir a expressão de CD206 em macrófagos RAW 264.7, mas sim em BMDM ϕ . Associadas, essas observações permitem levantar a hipótese de que a expressão macrofágica de CD206 é dependente da proteína MIF derivada de células tumorais, mas que essa indução ocorre apenas quando a expressão de MIF é inibida nos macrófagos que a expressam em grandes quantidades (RAW 264.7) ou quando essa expressão é baixa o suficiente (BMDM ϕ) para permitir a ação parácrina de MIF derivada do tumor.

Esses achados enfatizam que a ação da proteína MIF ocorre por vias diversas, autócrina ou parácrina, para a ativação específica dos diferentes marcadores tipo

M1 ou M2, demonstrando a complexidade das redes de sinalização entre o tumor e o estroma que culminam na modulação fenotípica de TAMs.

Nós também investigamos a expressão relativa dos mediadores pró-inflamatórios COX-2 e iNOS nos modelos murinos, que podem ser considerados tanto marcadores de fenótipo tipo M1 quanto de fenótipo tipo M2.¹¹⁷

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima com participação no metabolismo de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Em macrófagos, COX-2 participa da biossíntese dos mediadores inflamatórios prostaglandina E2, prostaciclina I2 e tromboxano A2, bem como de fatores de crescimento vascular como o VEGF. Estudos prévios mostram que a COX-2 suporta o fenótipo do tipo M2 em macrófagos associados ao tumor e que, secretada por eles, induz o aumento da proliferação e sobrevivência de células neoplásicas, bem como de metástases.^{118,119}

A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS/NOS2) é bem conhecida por seu papel na indução de citotoxicidade. No microambiente tumoral, especificamente em macrófagos associados ao tumor, a alta concentração de NO (óxido nítrico) gerada por iNOS nos eventos iniciais da carcinogênese induz a apoptose e destrói as células transformadas emergentes. Entretanto, quando o tumor escapa da vigilância imunológica e cresce, os macrófagos são reprogramados pelo microambiente tumoral para dar suporte ao desenvolvimento da neoplasia e produzem baixas quantidades de óxido nítrico que favorecem a angiogênese e o potencial metastático por meio da indução de VEGF e metaloproteinases da matriz. O aumento da expressão de iNOS pelos macrófagos do estroma da neoplasia é associada com atividade antitumoral. Então, a função de iNOS depende de sua concentração, fonte celular e dos estímulos envolvidos.¹²⁰ Em cortes histológicos de glioma humano, Perrota e colaboradores encontraram TAMs do tipo M2 expressando tanto CD206 quanto iNOS e suas investigações *in vitro* mostraram que o óxido nítrico gerado por iNOS em macrófagos é capaz de proteger as células tumorais da apoptose induzida pelo agente quimioterápico cisplatina.¹²¹

No presente estudo, nós identificamos que o co-cultivo com células tumorais SCCVII promove uma indução modesta de iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7.

Interessantemente, embora MIF tenha mostrado induzir a expressão desses mediadores em uma gama de doenças pró-inflamatórias e estados de ativação, em macrófagos associados ao melanoma a proteína MIF inibiu a expressão dos mesmos.^{90,122,123}

Entretanto, nossos estudos *in vitro* claramente indicam que a proteína MIF derivada de macrófagos é necessária para expressão de ambos iNOS e COX-2 em células RAW 264.7 co-cultivadas com SCCVII. Em contraste, nem o tratamento com IL-4 ou o co-cultivo com SCCVII exibiram qualquer indução desses produtos gênicos em BMDM ϕ , sugerindo que este fenótipo misto M1/M2 induzido por SCCVII é restrito ao co-cultivo dos macrófagos RAW 264.7.

Em conjunto, nossos resultados em modelos murinos apresentam novas evidências de que a linhagem celular de CECB SCCVII induz funcionalmente a polarização do fenótipo de macrófagos e que a proteína MIF derivada de macrófagos é necessária para a máxima ativação alternativa. Também apresentamos evidências de que MIF é importante para a ativação alternativa de macrófagos induzida por IL-4 e que IL-4 aumenta significativamente a polarização de macrófagos do tipo M2 induzida por SCCVII, acima da polarização induzida por IL-4 apenas.

Estudos prévios *in vivo*, avaliando o efeito da perda de MIF no estroma sobre o crescimento e progressão do melanoma, revelaram que a pequena molécula antagonista de MIF, 4-IPP, recapitula completamente a deficiência de MIF em TAMs infiltrando melanoma em camundongos MIF^{-/-}.^{90,124} Os resultados de experimentos *in vitro* aqui apresentados validam essas descobertas e fornecem evidência adicional de que 4-IPP é um inibidor seletivo e não tóxico de MIF que reproduz fenótipos deficientes em MIF.

Gutiérrez-González e colaboradores demonstraram em modelos *in vitro* e *in vivo* de melanoma múltiplo que a reprogramação de TAMs com GMCSF (em inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) associado ao bloqueio autócrino e parácrino da proteína MIF com o inibidor 4-IPP, promove aumento da expressão de marcadores de macrófagos tipo M1, redução da expressão de marcadores de macrófagos tipo M2 e consequente atividade tumoricida.¹²⁵

Algumas opções de imunoterapia para a reprogramação de TAMs já existem. Estratégias de inibição do *checkpoint* de ativação de macrófagos SIRP α (em inglês, *Signal regulatory protein α*), impedem sua interação com o receptor CD47 na membrana de células tumorais, desligando assim o sinal “não me coma” e aumentando a fagocitose. Inibidores da via CSF-1R/CSF-1 (em inglês, *Colony stimulating factor 1 receptor*), também são uma alternativa terapêutica que provoca redução da sobrevivência, proliferação, diferenciação e recrutamento de TAMs.¹²⁶

Então, a reprogramação de macrófagos utilizando um inibidor da citocina pró-M2, MIF, conforme resultados reportados aqui e também por outros estudos, parece ser uma alternativa para as imunoterapias já existentes.^{90,124-126}

O co-cultivo de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano ou de macrófagos derivados de monócitos da linhagem celular humana U937 com células de CECB das linhagens humanas SCC9 ou SCC25 também foi realizado para investigar se os resultados encontrados nos modelos murinos, mais estabelecidos, são reprodutíveis em modelos humanos. (Quadro I) Entretanto, é sabido que os modelos humanos utilizados para o estudo de macrófagos possuem algumas limitações. Diversos protocolos são reportados na literatura para a diferenciação de macrófagos a partir de monócitos do sangue periférico, incluindo separação magnética prévia de monócitos por beads CD14⁺, cultivo com soro bovino, soro humano ou ausência de soro, diferenciação com M-CSF ou GM-CSF e também variações nos tempos de incubação e concentrações dos reagentes. Mesmo assim, essas células primárias são difíceis de serem mantidas vivas *in vitro*.¹²⁷⁻¹³⁰ Após testar alguns protocolos diferentes, o que utilizou amostras de sangue de alguns doadores, optamos por realizar o método de diferenciação descrito com soro fetal bovino e M-CSF, que mostrou ser melhor para a viabilidade dessas células. A variação observada entre os resultados obtidos nos experimentos utilizando amostras de diferentes doadores era esperada, uma vez que diferenças específicas associadas ao gênero, idade e fatores genéticos individuais são observadas no fenótipo de células imunológicas humanas.^{111,131,132}

Os macrófagos derivados das linhagens monocíticas THP1 e U937 por diferenciação com PMA são os modelos *in vitro* mais frequentemente usados em estudos de macrófagos. Entretanto, os protocolos também são bastante variáveis na

literatura, principalmente quanto a concentração de PMA utilizada e ao tempo de exposição. Nós então resolvemos investigar a expressão basal dos marcadores selecionados em células U937 tratadas com três diferentes concentrações de PMA (5, 10 e 100 ng/ml) para assim definir a melhor opção de protocolo e observamos que, ao fim do tratamento, não houve diferença na morfologia e quantidade de células aderidas, mas quanto maior a concentração de PMA utilizada, mais alta foi a expressão da maioria dos mRNAs analisados. Em acordo com nossas observações, Minafra e colaboradores, em 2011, já haviam reportado que a diferenciação de células U937 com PMA induz a expressão de CD206.¹³³

Considerando que isto poderia mascarar os efeitos que pretendíamos investigar, optamos por utilizar o modelo de diferenciação de células U937 com 10 ng/ml de PMA, com menor efeito sobre os marcadores e, apesar das limitações metodológicas encontradas, nós observamos alguns efeitos consistentes e interessantes nestes modelos.

O co-cultivo com células de CECB induziu aumento na expressão dos marcadores tipo M2 CD206, SERPINB2 e VEGF-A nos macrófagos derivados de monócitos de três indivíduos diferentes, mesmo com as variações possíveis inter-indivíduos já discutidas anteriormente. A expressão desses marcadores, entretanto não foi alterada com a inibição macrófagica de MIF, o que não exclui o seu papel, considerando a necessidade de ser mais explorado em amostras mais numerosas e/ou em outros protocolos.

SERPINB2, também conhecido como PAI-2 (em inglês, *plasminogen activator inhibitor type 2*) é descrito como um inibidor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA). Sua função nas células mieloides ainda não é totalmente conhecida, mas seu envolvimento na inibição da resposta imune adaptativa Th1 e na manutenção da sobrevivência de macrófagos já foram demonstradas.¹³⁴⁻¹³⁶ Em nossa investigação, SERPINB2 foi induzida por células tumorais nos dois modelos humanos estudados, demonstrando ser um importante marcador da ativação alternativa de macrófagos associados ao CECB.

Os efeitos observados no fenótipo de macrófagos derivados de células U937 foram dependentes da linhagem de CECB utilizada no co-cultivo. Células SCC9 induziram a expressão dos marcadores tipo M2 SERPINB2, COX-2, VEGF-A e

também do marcador tipo M1 IL1- β , enquanto as células SCC25 induziram apenas COX-2 e inibiram a expressão do marcador tipo M1 TNF- α . Nestes modelos, a inibição macrofágica da proteína MIF levou a inibição apenas de COX-2 induzida pelas células SCC9. Estes resultados nos remetem ao pensamento de que a ausência de efeito da inibição da proteína MIF em macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico pode ser específica para o modelo com células SCC25.

Ainda neste modelo, IL4 induziu a expressão macrofágica dos marcadores tipo M2 IL10, CD206, EGR2, como já esperado, e inibiu a expressão dos também marcadores tipo M2 CD163, SERPINB2 e COX-2 e dos marcadores tipo M1 IL1 β e TNF- α .¹³⁷ A inibição da proteína MIF nos macrófagos foi capaz de reduzir a expressão de IL10 e CD206 induzida por IL4.

EGR2 pertence a uma família de reguladores transcricionais envolvidos no crescimento e diferenciação celular. A expressão de EGR2 em macrófagos é conhecidamente induzida por IL4 e é associada com a habilidade de macrófagos não ativados e de macrófagos M2 em responder a estímulos inflamatórios, ou seja, está associada com a plasticidade dessas células. Além disso, já foi reportado que EGR2, por meio da indução das moléculas SOCS1 e SOCS3, inibidoras da via STAT, suprime a ativação de linfócitos T, apresentando, então, papel imunossupressor.^{138,139}

Em MDM ϕ , tanto IL-4 quanto SCC25 induziram a expressão de CD206 e VEGF-A, mas a expressão de SERPINB2 foi induzida por SCC25 enquanto apareceu inibida por IL-4. Já em macrófagos derivados de células U937, células SCC9/SCC25 e IL4 divergiram em todos os marcadores induzidos e ainda, IL-4 inibiu a expressão de SERPINB2, COX-2 e IL1 β , marcadores estes induzidos pelas células de CECB. Então, interessante, o fenótipo induzido por fator/fatores derivados de células de CECB e o fenótipo induzido por IL-4 parecem ser diferentes ou mesmo complementares.

TNF- α é uma citocina característica de células imunológicas com perfil Th1 e sua participação e mecanismos na resposta aguda e citotóxica são bem conhecidos. Além disso, foi observado anteriormente que TNF- α inibe a expressão de genes tipo M2 in vivo e in vitro.¹⁴⁰ Nossos resultados, em concordância, mostram que tanto o

co-cultivo com as duas linhagens celulares de CECB utilizadas, quanto o tratamento com IL-4 inibiram a expressão de TNF- α em macrófagos derivados de células U937, sugerindo que o fenótipo do tipo M2 surge associado à diminuição na expressão de TNF- α .

Embora CD163¹⁴¹ seja o marcador mais utilizado em imunoistoquímica para caracterizar TAMs com fenótipo M2 em CECB humano, em nossos modelos humanos *in vitro* ele não mostrou ser induzido por células tumorais. Já o marcador de macrófagos tipo M2 CD206 mostrou, tanto nos modelos murinos como nos modelos humanos estudados, ser o marcador mais frequentemente induzido por células de CECB e, como já bem descrito na literatura, pela citocina Th2 IL4¹¹¹. Interessantemente, variando conforme os modelos, mas presente em todos eles, o bloqueio da proteína MIF levou a redução da expressão de CD206 induzida por CECB ou IL-4.

Um dos poucos estudos semelhantes ao nosso foi reportado em um modelo com macrófagos derivados da linhagem de monócitos THP1 e macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico, co-cultivados com células de CECB SCC25 e Cal27. Neste estudo foi demonstrado *in vitro* que exossomos provenientes de células de CECB ativam macrófagos para um perfil tipo M1, com indução da expressão de mRNA e da secreção das proteínas TNF- α , IL1 β e IL-6 (em inglês, *Interleukin 6*) e sem alteração nos níveis de IL-10, CCL18 (em inglês, e CD206. Eles também mostraram que esse fenótipo é induzido nos macrófagos pela proteína THBS1 (em inglês, *Thrombospondin 1*) transportada da célula tumoral pelos exossomos e que ativa as vias P38, Akt e SAPJ/JNK (em inglês, *Stress-activated protein kinases /Jun N-terminal kinases*). Em contrapartida, os macrófagos tipo M1 resultantes promovem a migração das células tumorais.¹³⁰

Nós, diferentemente, observamos que células de CECB promovem ativação dos macrófagos para um fenótipo M2. Entretanto, nossos resultados também mostraram indução na expressão de IL1 β , mas por outra linhagem de CECB, SCC9, e em macrófagos derivados de outra linhagem monocítica, U937. A expressão de IL1 β é induzida por sinais inflamatórios em diversas células imunológicas, mas precisa ser processada pela caspase-1 após ativação mediada por inflamassoma. Mais comumente atribuída ao fenótipo tipo M1, a sinalização via IL1 β ativa células

apresentadoras de antígenos, dirige a polarização de LTCD4 para fenótipos Th1 e Th17 e inicia a resposta adaptativa antitumoral. Entretanto, IL1 β produzida por TAMs pode também promover a expressão de fatores angiogênicos e anti-apoptóticos em células tumorais, e é associado também a promoção da propagação de MDSCs.¹⁴²

Outro estudo recente também reportou o papel dos exossomos na polarização de macrófagos derivados de monócitos THP1 em modelos de CECB, entretanto por uma via diferente. Segundo Cai e colaboradores, exossomos derivados das células de CECB SCC9 e Cal27 transportam miR-29a-3p para os macrófagos, induzindo a ativação alternativa de macrófagos, demonstrada pelo aumento na expressão de CD163, CD206, Arginase1 e IL-10, que em contrapartida promovem a proliferação e invasividade das células tumorais. Este microRNA tem como alvo a molécula SOCS1 (em inglês, *Suppressor of cytokine signaling 1*), que por sua vez é inibidora da via STAT6, esta última sendo a principal via associada a polarização tipo M2 de macrófagos ativada por IL-4 e IL-13, com a transcrição de Arginase 1 e CD206. Portanto, ao induzir a degradação de SOCS1, o miR-29a-3p está inibindo a regulação da via STAT6 e promovendo a ativação alternativa de macrófagos.¹⁴³

Embora o objetivo do presente estudo não tenha sido investigar minuciosamente as vias de sinalização envolvidas nos nossos modelos de ativação alternativa de macrófagos por CECB, nossas observações em conjunto com as reportadas pela literatura, permitem levantar algumas hipóteses.

Uma delas, considerando o que foi demonstrado por Cai et al., é que as células de CECB SCCVII, se assim como SCC9, produzem miRNA miR-29a-3p e entregam via exossomos aos macrófagos, inibem a regulação da via STAT6 e assim o tratamento com IL4 associado ao co-cultivo leva a uma produção de Arginase 1 e CD206 significativamente maior do que IL-4 ou o co-cultivo isolados, como observado nos modelos murinos.¹⁴³

Outra possível explicação para a ação sinérgica entre IL-4 e o fator ou fatores derivados de SCCVII na indução dos marcadores de macrófagos tipo M2, estaria na via metabólica. Células tumorais sofrem reprogramação metabólica para preferencialmente produzir energia através da glicólise aeróbica (efeito Warburg), uma adaptação para suportar o alto requerimento biossintético para a proliferação descontrolada, com produção de lactato mesmo em condições de normóxia.¹⁴⁴

Colegio et al., demonstraram em uma série de experimentos, que o lactato proveniente da glicólise aeróbica das células tumorais é capaz de estabilizar a enzima HIF-1 α em macrófagos, e que esta é necessária para a indução, via lactato ou via IL-4, da expressão de VEGF-A e Arginase 1.^{145,146} Esses dados discordam do papel preferencial, descrito na literatura, de HIF-1 α na ativação de macrófagos M1 por LPS e de HIF-2 α na ativação de macrófagos M2 por IL4.^{147,148} Entretanto, associado a outro relato de que a IL-4 induz o aumento da expressão de HIF-1 α , permite sugerir que, no nosso modelo, o tratamento com IL4 que induz a expressão de HIF-1 α , potencializa a estabilização, provocada por lactato derivado das células de CECB, de HIF-1 α nos macrófagos, com consequente aumento na expressão de Arginase 1 além do induzido por IL4 ou SCCVII sozinhos. Outro indício do envolvimento da via lactato- HIF-1 α na ativação alternativa de macrófagos nos nossos modelos é que os demais marcadores VEGF, iNOS e COX-2, também induzidos por CECB, são sabidamente alvos transcricionais diretos de HIF-1 α .^{147,149} Se essa relação é verdadeira e se existe também para o sinergismo observado na indução de CD206, precisa ser ainda investigado. O mecanismo do envolvimento de MIF nesta via, já que a indução de Arg1 e CD206 por IL4 e SCCVII foi pelo menos parcialmente dependente da expressão de MIF, poderia ser explicado tanto pela hipótese de estabilização de HIF-1 α por Jab1, ligante intracelular de MIF, quanto pela hipótese de sequestro de P53 por MIF no citoplasma, com consequente liberação de HIF-1 α .^{49,150}

Combinados, nossos resultados mostram que fatores derivados de CECB são capazes de induzir fenótipos pró-tumorais em TAMs e fornecem evidências adicionais de que a proteína MIF expressa por macrófagos é funcionalmente necessária para a ativação alternativa de macrófagos induzida por tumores e por citocina Th2, podendo representar um alvo imunoterapêutico para uso clínico futuro.

Quadro I. Quadro resumo dos efeitos observados na expressão de marcadores tipo M1 e tipo M2 pelos macrófagos, nos experimentos *in vitro* murinos e humanos.

	MODELOS MURINOS		MODELOS HUMANOS	
	RAW 264.7	BMDM ϕ	MDM ϕ	U937 - PMA
CO-CULTIVO SCCVII (murina) SCC25 / SCC9 (humana)	Indução: ARG1 VEGF-A COX-2 iNOS	Indução: ARG1 VEGF-A CD206	Indução: CD206 SERPINB2 VEGF-A	Indução: COX-2 SERPINB2 VEGF-A IL1 β Inibição: TNF α
Inibição de MIF (Mϕ) 4IPP / ShRNA / KO	Inibição: ARG1 VEGF-A COX-2 iNOS Indução: CD206	Inibição: ARG1 VEGF-A CD206	sem efeito significativo	Inibição: COX-2
Inibição de MIF (SCC) 4IPP	sem efeito significativo	Inibição: ARG1 VEGF-A	N.A.	N.A.
TRATAMENTO COM IL4	Indução: ARG1 CD206	Indução: ARG1 CD206	Indução: CD206 VEGF-A Inibição: SERPINB2 IL10 FOLR2	Indução: CD206 IL-10 EGR2 Inibição: CD163 SERPINB2 COX-2 TNF α IL1 β
Inibição de MIF (Mϕ) 4IPP / ShRNA / KO	Inibição: ARG1 Indução: CD206	Inibição: ARG1 CD206	sem efeito significativo	Inibição: IL10 CD206
SINERGISMO (IL4+SCC)	Indução: ARG1	Indução: ARG1 CD206	sem efeito significativo	sem efeito significativo
Inibição de MIF (Mϕ)	Inibição: ARG1	Inibição: ARG1	sem efeito significativo	sem efeito significativo

Títulos das colunas descrevem o tipo de macrófago utilizado em cada modelo. Títulos das linhas descrevem o estímulo oferecido (co-cultivo com SCC e/ou tratamento com IL4) e a inibição da proteína MIF nos tipos celulares específicos para avaliação do seu efeito sobre o estímulo recebido.

6. CONCLUSÕES

Nossas observações permitem concluir que, em modelos murinos, **(I)** células de CECB induzem fenótipo imunossupressor e pró-angiogênico de macrófagos e **(II)** essa modulação fenotípica é dependente principalmente da expressão macrofágica e secundariamente da expressão tumoral da proteína MIF; **(III)** fator/fatores derivados do tumor e a citocina Th2 IL4 contribuem entre si para induzir alterações fenotípicas ainda maiores. Em modelos humanos, **(IV)** o fenótipo imunossupressor e pró-angiogênico de macrófagos foi também induzido por células de CECB, mas **(V)** apenas o fenótipo de macrófagos tipo M2 induzido por IL-4 mostrou ser dependente da expressão macrofágica de MIF.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6):394-424.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2016.
3. Curado MP, Johnson NW, Kerr AR, Mendonça e Silva DR, Lanfranchi H, Pereira DL. Oral and oropharynx cancer in South America: Incidence, mortality trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Translational Research in Oral Oncology.* 2016; 1: 1-7.
4. Boing AF, Antunes JL, Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr, et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health.* 2011; 1979: 1-6.
5. de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck.* 2010; 32: 357-67.
6. Huber MA, Tantiwongkosi B. Oral and oropharyngeal cancer. *Med Clin North Am.* 2014; 98(6):1299-321.
7. Marques LA, Eluf-Neto J, Figueiredo RA, Góis-Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, et al. Oral health, hygiene practices and oral cancer. *Rev Saúde Pública.* 2008; 42: 471-9.
8. Purdue MP, Hashibe M, Berthiller J, La Vecchia C, Dal Maso L, Herrero R, et al. Type of alcoholic beverage and risk of head and neck cancer--a pooled analysis within the INHANCE Consortium. *Am J Epidemiol.* 2009; 169: 132-42.
9. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2014; 26(2):123-41.

10. Baykul T, Yilmaz HH, Aydin U, Aydin MA, Aksoy M, Yildirim D. Early Diagnosis of Oral Cancer. *J Int Med Res*. 2010; 38:737-49.
11. Le Campion ACOV, Ribeiro CMB, Luiz RR, da Silva Júnior FF, Barros HCS, Santos KCB, et al. Low Survival Rates of Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Dent*. 2017; 2017: 5815-493.
12. National Institutes of Health - NIH [Internet]. Fact sheet - Oral Cancer; [atualizado out.2010; citado 17.fev.2013]. Research Portfolio Online Reporting Tools; [aproximadamente 3 telas]. Disponível em: <http://report.nih.gov/nihfactsheets/ViewFactSheet.aspx?csid=106>.
13. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition)*. New York: Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
14. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol*. 2010; 2: 9.
15. Sharma P, Shah SV, Taneja C, Patel AM, Patel MD. A prospective study of prognostic factors for recurrence in early oral tongue cancer. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7: 2559-62.
16. Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley; 2002.
17. Tai SK, Li WY, Yang MH, Chu PY, Wang YF. Perineural invasion in T1 oral squamous cell carcinoma indicates the need for aggressive elective neck dissection. *Am J Surg Pathol*. 2013; 37: 1164-72.
18. Vered M, Davan D, Dobriyan A, Yahalon R, Shalmon B, Barshack I, et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. *Clin Oncol*. 2010; 136: 1039-1048.
19. Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel R, Bacher M. Role of MIF in Inflammation and Tumorigenesis. *Oncology*. 2008; 75:127-33.
20. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. *Science*. 1966; 153: 80-2.

21. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Pathology*. 1966; 56: 72-7.
22. Calandra T, Bernhagen JL, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1994; 179: 1895-902.
23. Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wong J. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg*. 2005; 242: 55-63.
24. Sun HW, Swope M, Cinquina C, Bedarkar S, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng*. 1996; 9: 631-5.
25. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*. 2000; 408: 211-6.
26. Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2009; 9: 230.
27. Wu HM, Zhu SL, He LJ, Liu YH, Xie D. Clinical significance of macrophage migration inhibitory factor in invasion of ovarian cancer. *Chinese Journal of Cancer*. 2009; 28: 1054-60.
28. Yasasever V, Camlica H, Duranyildiz D, Oguz H, Tas F, Dalay N. Macrophage migration inhibitory factor in cancer. *Cancer Invest*. 2007; 25: 715-9.
29. Cooke G, Armstrong ME, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *Biofactors*. 2009; 35: 165-8.
30. Sanchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juárez I, Whitacre C, et al. Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in

- treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FASEB J.* 2010; 24: 2583-90.
31. Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, Rot A, Müller-Newen G, Bachelier F, Gawaz M, et al. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J.* 2015; 29(11):4497-511.
 32. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007; 13:587-96.
 33. McClelland M, Zhao L, Carskadon S, Arenberg D. Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol.* 2009; 174: 638-46.
 34. Rendon BE, Willer SS, Zundel W, Mitchell RA. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation. *Exp Mol Pathol.* 2009; 86: 180-5.
 35. Camlica H, Duranyildiz D, Oguz H, Oral EN, Yasasever V. The diagnostic value of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer. *Pathol Oncol Res.* 2008; 14: 79-83.
 36. Fang W, Li X, Jiang Q, Liu Z, Yang H, Wang S, et al. Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China. *J Transl Med.* 2008; 6: 32.
 37. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer.* 2000; 89: 334-41.
 38. Mohri Y, Mohri T, Wei W, Qi YJ, Martin A, Miki C, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor and human neutrophil peptides 1-3 as potential biomarkers for gastric cancer. *Br J Cancer.* 2009; 101: 295-302.
 39. Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T, Sugimachi K. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res.* 2002;8: 3755-60.

40. Xia HH, Zhang ST, Lam SK, Lin MC, Kung HF, Wong BC. Expression of macrophage migration inhibitory factor in esophageal squamous cell carcinoma and effects of bile acids and NSAIDs. *Carcinogenesis*. 2005;26: 11-5.
41. Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Angiogenesis and Deteriorates Prognosis after Radical Resection for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer*. 2005; 103: 588-98.
42. Krockenberger M, Engel JB, Kolb J, Dombrowsky Y, Häusler SF, Kohrenhagen N, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136: 651-7.
43. Chen YC, Zhang XW, Niu XH, Xin DQ, Zhao WP, Na YQ, Mao ZB. Macrophage migration inhibitory factor is a direct target of HBP1-mediated transcriptional repression that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 3067-78.
44. Denz A, Pilarsky C, Muth D, Rückert F, Saeger HD, Grützmann R. Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Surg Res*. 2010;160: 29-34.
45. Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim HS, Min BS, Kim NK, Kim H. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2008; 129: 772-9.
46. Li GQ, Xie J, Lei XY, Zhang L. Macrophage migration inhibitory factor regulates proliferation of gastric cancer cells via the PI3K/Akt pathway. *World J Gastroenterol*. 2009;15: 5541-8.
47. Schrader J, Deuster O, Rinn B, Schulz M, Kautz A, Dodel R, et al. Restoration of contact inhibition in human glioblastoma cell lines after MIF knockdown. *BMC Cancer*. 2009; 9: 464.
48. Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, Kondo M, Sato Y, Sasaki F, Todo S. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Tumor Invasion and Metastasis via the Rho-Dependent Pathway. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1050-8.

49. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*. 1999; 190: 1375-82.
50. Funamizu N, Hu C, Lacy C, Schetter A, Zhang G, He P, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Induces Epithelial to Mesenchymal Transition, Enhances Tumor Aggressiveness and Predicts Clinical Outcome in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2012; 132: 785-94.
51. Babu SN, Chetal G, Kumar S. Macrophage Migration Inhibitory Factor: a Potential Marker for Cancer Diagnosis and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13:1737-44.
52. Brock SE, Rendon BE, Yaddanapudi K. Negative Regulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Activity by MIF Family Members in NSCLC. *J Biol Chem*. 2012; 287: 37917-25.
53. Liu RM, Sun DN, Jiao YL, Wang P, Zhang J, Wang M, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma via activation of Akt and inactivation of GSK3 β . *Cancer letters*. 2018; 412: 289-296.
54. Souza MB. Estudo do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade bucal [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.
55. Koontongkaew S. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66-83.
56. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144: 646-74.
57. Alexandrescu DT, Riordan NH, Ichim TE, Kauffman CL, Kabigting F, Dutton CT, DasanuCA. On the missing link between inflammation and cancer. *Dermatol Online J*. 2011; 17(1):10.
58. Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, Bando H, Meng J, Arima Y, et al. Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology. *Cancer Res*. 2014; 74:8-14.

59. Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22:33-40.
60. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, et al. Cancer and Inflammation: Promise for Biological Therapy. *J Immunother.* 2010; 33(4): 335-51.
61. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res.* 2006;4(4): 221-33.
62. Rasch S, Algül H. A clinical perspective on the role of chronic inflammation in gastrointestinal cancer. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014; 7:261-72.
63. Dayan D, Salo T, Salo S, Nyberg P, Nurmenniemi S, Costea DE, Vered M. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. *Cancer Medicine.* 2012; 1(2): 128–40.
64. Kayhan KB. Role of Inflammation in Oral Squamous Cell Carcinoma, In: Li X (Ed.). Rijeka: InTech; 2012. p. 195-212. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/squamous-cell-carcinoma/role-of-inflammation-in-oral-squamous-cellcarcinoma>.
65. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39(1):98-106.
66. Gong J, Chehraz-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer.* 2018; 6(1):8.
67. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 2018; 8:86.
68. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 2018; 50(12):165.
69. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer.* 2018; 118(1):9-16.

70. Richards DM, Hettinger J, Feuerer M. Monocytes and Macrophages in Cancer: Development and Functions. *Cancer Microenviron.* 2013; 6(2):179-91.
71. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *nature immunology.* 2010; 11(10): 889-96.
72. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(7):399-416.
73. Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nör JE, Tarquinio SBC. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: Tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sciences.* 2013; 92:101-7.
74. Mori K, Hiroi M, Shimada J, Ohmori Y. Infiltration of M2 Tumor-Associated Macrophages in Oral Squamous Cell Carcinoma Correlates with Tumor Malignancy. *Cancers.* 2011; 3: 3726-39.
75. Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, Ryoke K, Ito H. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41: 444-51.
76. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell.* 2013; 23:277-86.
77. Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* 2015; 212: 435-45.
78. Cassetta L, Kitamura T. Targeting Tumor-Associated Macrophages as a Potential Strategy to Enhance the Response to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Cell Dev Biol.* 2018; 6:38.
79. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity.* 2014; 41(1):49-61.
80. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell.* 2015; 27(4):462-72.

81. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor- infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 2014; 74:5057-69.
82. Beswick EJ, Reyes VE. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 2855-61.
83. Mitchell R.A. Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumourigenesis. *Cell Signal.* 2004; 16: 13-9.
84. Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol.* 2001; 166:747-53.
85. Repp AC, Mayhew ES, Apte S, Niederkorn JY. Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by NK cells. *J Immunol.* 2000; 165: 710-5.
86. Choi S, Kim HR, Leng L, Kang I, Jorgensen WL, Cho CS, et al. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Regulatory T Cell Response of Tumor-Bearing Mice. *J Immunol.* 2012; 189: 3905-13.
87. Girard E, Strathdee C, Trueblood E, Quéva C. Macrophage migration inhibitory factor produced by the tumour stroma but not by tumour cells regulates angiogenesis in the B16-F10 melanoma model. *Br J Cancer.* 2012; 107: 1498-505.
88. Simpson KD, Templeton DJ, Cross JV. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Tumor Growth and Metastasis by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *J Immunol.* 2012; 189: 5533-40.
89. Souza MB, Curioni OA, Kanda JL, Carvalho MB. Serum and salivary macrophage migration inhibitory factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014; 8(5):2267-75.

90. Yaddanapudi K, Putty K, Rendon BE, Lamont GJ, Faughn JD, Satoskar A, et al. Control of Tumor-Associated Macrophage Alternative Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J Immunol*. 2013; 190: 2984-93.
91. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*. 2011; 9:216.
92. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim KW, Knolhoff BL, Zuo C, et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*. 2017; 47(3):597.
93. Ireland LV, Mielgo A. Macrophages and Fibroblasts, Key Players in Cancer Chemoresistance. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Oct 9;6:131.
94. Schultze JL, Schmidt SV. Molecular features of macrophage activation. *Semin Immunol*. 2015; 27:416-23.
95. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. 2013; 342(6161):1242974.
96. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*. 2007; 37(1):14-6.
97. Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I, et al. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2014; 135:843-61.
98. Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH. Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol*. 2014; 92:543-52.
99. Wang H, Wang X, Li X, Fan Y, Li G, Guo C, et al. CD68(+) HLA-DR(+) M1-like macrophages promote motility of HCC cells via NF-kappaB/FAK pathway. *Cancer Lett*. 2014; 345:91-9.
100. Troiano G, Caponio VCA, Adipietro I, Tepedino M, Santoro R, Laino L, et al. Prognostic significance of CD68+ and CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2019; 93:66-75.

101. Alves AM, Diel LF, Lamers ML. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2018; 47(5):460-467.
102. Costa NL, Valadares MC, Souza PP, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA, Batista AC. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013; 49(3):216-23.
103. Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 1999; 163(7):3771-7.
104. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(1):23-35.
105. Raes G, Van den Bergh R, Baetselier PD, Ghassabeh GH. Arginase-1 and Ym1 Are Markers for Murine, but Not Human, Alternatively Activated Myeloid Cells. *J Immunol*. 2005; 174(11): 6561-2.
106. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Macrophage Arginase Promotes Tumor Cell Growth and Suppresses Nitric Oxide-mediated Tumor Cytotoxicity. *Cancer Res*. 2001; 61(3):1100-6.
107. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141(1):39-51.
108. Ezekowitz RA, Gordon S. Surface properties of activated macrophages: sensitized lymphocytes, specific antigen and lymphokines reduce expression of antigen F4/80 and FC and mannose/fucosyl receptors, but induce Ia. *Adv Exp Med Biol*. 1982; 155:401-7
109. Tietze C, Schlesinger P, Stahl P. Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. *J Cell Biol*. 1982; 92(2):417-24.
110. Allavena P1, Chieppa M, Bianchi G, Solinas G, Fabbri M, Laskarin G, Mantovani A. Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clin Dev Immunol*. 2010; 2010:547179.

111. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014; 41(1):14-20.
112. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992; 176(1):287-92.
113. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*. 2000; 192:150-8.
114. Lai YS, Wahyuningtyas R, Aui SP, Chang KT. Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(2):1257-67
115. Yaddanapudi K, Rendon BE, Lamont G, Kim EJ, Al Rayyan N, Richie J, et al. MIF Is Necessary for Late-Stage Melanoma Patient MDSC Immune Suppression and Differentiation. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4(2):101-12.
116. White ES, Strom SR, Wys NL, Arenberg DA. Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. *J Immunol*. 2001; 166:7549-55.
117. Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, van der Zee AG, de Vries EG, Daemen T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res*. 2001; 61:7305–9.
118. Li H, Yang B, Huang J, Lin Y, Xiang T, Wan J, et al. Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes breast cancer cell survival by triggering a positive-feedback loop between macrophages and cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 6(30):29637-50.
119. Na YR, Yoon YN, Son DI, Seok SH. Cyclooxygenase-2 inhibition blocks M2 macrophage differentiation and suppresses metastasis in murine breast cancer model. *PLoS One*. 2013; 8(5):e63451.
120. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*. 2015; 6:334-43.

121. Perrotta C, Cervia D, Di Renzo I, Moscheni C, Bassi MT, Campana L, et al. Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated with Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition. *Front Immunol*. 2018; 9:1186.
122. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:345-50.
123. Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum*. 2001; 44:1273-80.
124. Winner M, Meier J, Zierow S, Rendon BE, Crichlow GV, Riggs R, et al. A novel, macrophage migration inhibitory factor suicide substrate inhibits motility and growth of lung cancer cells. *Cancer Res*. 2008; 68:7253–7.
125. Gutiérrez-González A, Martínez-Moreno M, Samaniego R, Arellano-Sánchez N, Salinas-Muñoz L, Relloso M, et al. Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood*. 2016; 128(18):2241-2252.
126. Evrard D, Szturz P, Tijeras-Raballand A, Astorgues-Xerri L, Abitbol C, Paradis V, et al. Macrophages in the microenvironment of head and neck cancer: potential targets for cancer therapy. *Oral Oncol*. 2019; 88:29-38.
127. Saghaeian-Jazi M, Mohammadi S, Sedighi S. Culture and Differentiation of Monocyte Derived Macrophages Using Human Serum: An Optimized Method. *Zahedan J Res Med Sci*. 2016; 18(6):e7362.
128. Kelly A, Grabiec AM, Travis MA. Culture of Human Monocyte-Derived Macrophages. *Methods Mol Biol*. 2018; 1784:1-11.
129. Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmström V, Harris RA. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol*. 2014; 79(5):305-14.

130. Xiao M, Zhang J, Chen W, Chen W. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018; 37(1):143.
131. Imahara S, Jelacic S, Junker C, O'Keefe, G. The influence of gender on human innate immunity. *Surgery*. 2005; 138(2):275-282.
132. Levy, O. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other toll-like receptor agonists. *J Endotoxin Res*. 2005; 11(2):113-6.
133. Minafra L, Di Cara G, Albanese NN, Cancemi P. Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leuk Res*. 2011; 35(2):226-36.
134. Schroder WA, Major L, Suhrbier A. The role of SerpinB2 in immunity. *Crit Rev Immunol*. 2011; 31(1):15-30.
135. Shea-Donohue T, Zhao A, Antalis TM. SerpinB2 mediated regulation of macrophage function during enteric infection. *Gut Microbes*. 2014; 5(2): 254-8.
136. Zhao A, Yang Z, Sun R, Grinchuk V, Netzel-Arnett S, Anglin IE, et al. SerpinB2 is critical to Th2 immunity against enteric nematode infection. *J Immunol*. 2013; 190(11):5779-87.
137. Wang HW, Joyce JA. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle*. 2010; 9(24):4824-35.
138. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*. 2015; 10(12):e0145342.
139. Veremeyko T, Yung AWY, Anthony DC, Strekalova T, Ponomarev ED. Corrigendum: Early Growth Response Gene-2 Is Essential for M1 and M2 Macrophage Activation and Plasticity by Modulation of the Transcription Factor CEBP β . *Front Immunol*. 2018; 9:2923.
140. Kratochvill F, Neale G, Haverkamp JM, Van de Velde LA, Smith AM, Kawauchi D, et al. TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep*. 2015; 12(11):1902-14.

141. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol.* 2000; 67(1):97-103.
142. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci.* 2018; 19(8).
143. Cai J, Qiao B, Gao N, Lin N, He W. Oral squamous cell carcinoma-derived exosomes promote M2 subtype macrophage polarization mediated by exosome-enclosed miR-29a-3p. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019; 316(5):C731-C740.
144. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016; 41(3):211-218.
145. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 2014; 513(7519):559-63.
146. Colegio OR. Lactic acid polarizes macrophages to a tumor-promoting state. *Oncoimmunology.* 2016; 5(3): e1014774.
147. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity.* 2014; 41(4):518-28.
148. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 2010; 24(5):491-501.
149. Scharte M, Jurk K, Kehrel B, Zarbock A, Van Aken H, Singbartl K. IL-4 enhances hypoxia induced HIF-1 α protein levels in human transformed intestinal cells. *FEBS Lett.* 2006; 580(27):6399-404.
150. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS One.* 2008; 3(5):e2215.

Apêndice A - Aprovação do Institutional Review Board – University of Louisville

Human Subjects Protection Program Office
MedCenter One – Suite 200
501 E. Broadway
Louisville, KY 40202-1798
Office: 502.852.5188 Fax: 502.852.2164

DATE: October 12, 2016
TO: Robert A Mitchell
FROM: The University of Louisville Institutional Review Board
IRB NUMBER: 16.1045
STUDY TITLE: Utilization of normal human donor monocytes to investigate MIF-dependent macrophage alternative activation.
REFERENCE #: 630946
DATE OF REVIEW: 10/12/2016
IRB STAFF CONTACT: Christy LaDuke (502-852-2541)

The IRB Chair/Vice-Chair has reviewed your submission and the project described does not meet the "Common Rule" definition of human subjects' research. Therefore, this research project does not require IRB review prior to conducting the research.

If you have any questions, please contact the IRB analyst listed above or the Human Subjects Protection Program office at hsppofc@louisville.edu.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Julie L. Goldman".

Julie L. Goldman, MD, Vice Chair

Biomedical Institutional Review Board

Apêndice B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – FMUSP

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do papel do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) na modulação do infiltrado inflamatório tumoral e na progressão do carcinoma epidermoide da cavidade bucal..

Pesquisador: Marcos Brasilino de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61196816.1.3001.0065

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.856.527

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado que visa comparar a atividade e características fenotípicas e de produção de produtos com ação biológica de macrófagos isolados de pacientes com carcinoma bucal e controles sadios. Não há intervenção nos pacientes exceto a biópsia e a coleta de sangue periférico para isolamento dos macrófagos.

Objetivo da Pesquisa:

Estudo do papel do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) na modulação do infiltrado inflamatório tumoral e na progressão do carcinoma epidermoide da cavidade bucal..

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios indiretos, caso seja detectada alguma característica específica benéfica, esta poderá servir a estudos intervencionistas futuros

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O isolamento de tecido biológico pressupõe a construção de biorepositório na instituição proponente, que deve encaminhar seu regulamento no futuro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há inclusão de seguro nas informações fornecidas, mas acredito que pode ser uma

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	
Bairro: PACAEMBU	CEP: 01.246-903
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.856.527

recomendação apenas, para que os autores e proponentes, todos do Sistema SUS, incluam uma frase garantindo a cobertura por seguro de qualquer intercorrência decorrentes dos procedimentos de coleta.

Recomendações:

Inclusão de frase garantindo a cobertura e tratamento de qualquer intercorrência decorrente dos procedimentos de coleta de material pelo hospital coordenador

Inclusão de emenda com o regulamento de biorepositório do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Há algumas pequenas modificações que podem ser incluídas numa emenda e que não impedem a aprovação atual do projeto

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_789739.pdf	09/09/2016 14:36:01		Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1410696.pdf	09/09/2016 14:30:02	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_07set16.pdf	09/09/2016 14:28:43	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Outros	Doc003.pdf	08/09/2016 12:17:22	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Outros	Doc002.pdf	08/09/2016 12:16:48	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Outros	TCLE_INFLAMACAO_CEPHH_controle_s.docx	08/09/2016 12:12:47	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_INFLAMACAO_CEPHH.docx	08/09/2016 12:12:18	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PhD_PlataformaBrasil.docx	08/09/2016 12:11:39	Marcos Brasilino de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.856.527

SAO PAULO, 06 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Apêndice C – Comprovante de publicação de artigo científico

QJM: An International Journal of Medicine, 2018, 769–778

doi: 10.1093/qjmed/hcy163

Advance Access Publication Date: 16 July 2018

Original paper

ORIGINAL PAPER

Oral squamous carcinoma cells promote macrophage polarization in an MIF-dependent manner

M. Barbosa de Souza Rizzo^{1,2,3}, M. Brasilino de Carvalho^{1,2}, E.J. Kim³, B.E. Rendon³, J.T. Noe^{3,4}, A. Darlene Wise^{3,5} and R.A. Mitchell^{3,4,5,6}

From the ¹Department of Radiology and Oncology, Medical School, University of Sao Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Laboratory of Molecular Biology, Heliopolis Hospital, São Paulo, São Paulo, Brazil, ³J.G. Brown Cancer Center, ⁴Department of Biochemistry and Molecular Genetics, ⁵Department of Microbiology and Immunology and ⁶Department of Medicine, University of Louisville, Louisville, KY, USA

Address correspondence to Prof. R.A. Mitchell, University of Louisville, Clinical and Translational Research Building, Room 404, 505 South Hancock Street, Louisville, KY 40202, USA. email: robert.mitchell@louisville.edu

Summary

Background: Tumor-associated macrophages (TAMs) are important determinants of intratumoral immune evasion, neoangiogenesis, extracellular matrix remodeling and dysregulated tumor cell proliferation. Our prior studies revealed that macrophage-derived, but not tumor cell-derived, macrophage migration inhibitory factor (MIF), is an important determinant of TAM alternative activation and M2 polarization.

Aim: Because MIF is historically thought to initiate signaling via a receptor-dependent, outside-in mode of action, we wished to investigate the specific contributions of tumor-derived vs. macrophage-derived MIF to M2 marker expression during macrophage polarization.

Design: Murine oral squamous cell-carcinoma cells (SCCVII) were co-cultured with either the RAW 264.7 mouse macrophage cell line or mouse primary bone marrow-derived macrophages in the context of MIF genetic loss/inhibition individually or in combination each cell type.

Methods: Twelve well Transwell plates were used to co-culture SCCVII cells and RAW 264.7, MIF^{+/+} or MIF^{-/-} macrophages treated with/without the small molecule MIF inhibitor, 4-iodo-6-phenylpyrimidine and incubated in the presence or absence of interleukin (IL-4) for 48 h. Macrophages were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction and/or immunoblotting for relative macrophage polarization marker expression.

Results: IL-4 treatment synergizes with SCCVII co-culture in inducing the expression of macrophage M2 markers and loss or inhibition of macrophage-derived MIF significantly reduces both IL-4 alone and IL-4/SCCVII co-culture-induced macrophage M2 marker expression.

Conclusion: These studies identify an important and dominant requirement for macrophage MIF in maximal Th2-cytokine and oral squamous carcinoma cell-induced macrophage polarization and M2 marker expression.

Received: 8 June 2018; Revised (in revised form): 6 July 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the Association of Physicians. All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com