

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

RAÍSSA GABRIELI CANDIDO

**Avaliação dos efeitos do meio condicionado de monócitos
sobre a atividade de células tumorais *in vitro***

BAURU
2021

RAÍSSA GABRIELI CANDIDO

**Avaliação dos efeitos do meio condicionado de monócitos
sobre a atividade de células tumorais *in vitro***

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

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

Versão Corrigida

BAURU
2021

Candido, Raíssa Gabrieli

Avaliação dos efeitos do meio condicionado de monócitos sobre a atividade de células tumorais in vitro/ Raíssa Gabrieli Candido. -- Bauru, 2021.

124 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Profª Drª. Ana Paula Campanelli

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

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

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 88330318.9.0000.5417

Data: 19/09/2018

Comitê de Ética do Cedars-Sinai Medical Center

Protocolo nº: 00045523

Data: 01/12/2018

Comitê de Ética do Instituto Lauro de Souza Lima

Protocolo nº: 37644714.7.0000.5475

Data: 10/03/2015



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por
RAÍSSA GABRIELI CANDIDO
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 22 de setembro de 2021.

Prof.^a Dr.^a **HAYANA RAMOS LIMA**
UFSB

Prof.^a Dr.^a **VÂNIA NIETO BRITO DE SOUZA**

Prof.^a Dr.^a **CLÁUDIA RAMOS PINHEIRO**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **ANA PAULA CAMPANELLI**
Presidente da Banca
FOB - USP

Prof.^a Dr.^a **Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Primeiramente, a Deus!

Com muita gratidão, dedico também essa dissertação aos meus pais, Lucilene de Lourdes Massa Candido e João Marcos Candido, pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, João Gabriel Cândido e Marcos Vinícius Cândido, que muitas vezes indiretamente, me ajudaram nessa caminhada com gestos de fraternidade e carinho.

Ao meu namorado Fábio Bosa Carra, agradeço pelo companheirismo, pela compreensão e por sempre me ouvir e me dar força em todos os momentos dessa jornada.

À minha família e todos os amigos, agradeço pela compreensão e apoio nesses anos de mestrado. Em especial, agradeço minha prima Carla de Vito, por me acolher em sua casa quando precisei, pelas conversas e conselhos e pelo apoio que sempre me deu.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Paula Campanelli, agradeço por me acolher em seu laboratório, pelos ensinamentos acadêmicos e profissionais e também pelo apoio e paciência no dia-a-dia. Obrigada pela oportunidade e parceria na realização desse trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Karen A. Cavassani e ao Prof. Dr. Cory Hogaboam, do Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles (CA), que contribuíram para elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Aparecido Torres, pela boa convivência, boas conversas e ensinamentos importantes, durante minha passagem pelo laboratório.

Ao professor Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, que contribuiu para elaboração deste trabalho.

À professora Dr.^a Maria Renata Sales Nogueira da Costa, pela contribuição para elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca, Dr.^a Cláudia Ramos Pinheiro, Dr.^a Hayana Ramos Lima e Dr.^a Vania Brito de Souza, por aceitarem o convite para fazerem parte da comissão julgadora da minha dissertação.

À minha amiga e parceira de laboratório, Graziela Perri, agradeço pelos ensinamentos, pelo companheirismo nos experimentos,

pela paciência em me ajudar em cada etapa, pelas conversas e pelos cafezinhos e pães de mel nos intervalos dos nossos dias de trabalho.

À amiga e secretária da biologia oral, Dalva Ribeiro de Oliveira, agradeço pela atenção, pela dedicação e pela paciência em momentos de dúvidas. Obrigada também pelas conversas esclarecedoras, pelos momentos de “tricotar” sobre nossas séries favoritas, pelos papos sérios e, também, pelos descontraídos que tivemos.

Ao amigo e técnico do laboratório de microbiologia, André Luís da Silva, agradeço pela atenção, pela ajuda de sempre e pelos momentos de conversas e descontração, no qual fez o ambiente de trabalho mais agradável e leve.

À amiga e funcionária, Livia Maria de Melo, agradeço pela dedicação, pela serenidade e por todo auxílio com os materiais para nossos experimentos.

Às minhas colegas de departamento, Rose França e Thalita Dalboni, e as colegas Vanessa Villas Boas e Kamilla Paes, agradeço pelos bons momentos que tivemos ao longo dessa minha passagem pelo laboratório de imunologia.

Ao funcionário do laboratório do HRAC, Narciso Almeida Vieira, por toda ajuda e suporte com esse trabalho. Agradeço por ser sempre solícito quando precisei.

À Márcia Sirlene Zardin Graeff, do Centro de Pesquisa Integrada (CIP-FOB), pelo suporte com a microscopia confocal.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ana Lígia Pagnan, Vanessa Svizzero Fakhoury e Luciana Saíto, pela ajuda e disponibilidade nas aulas e no meu processo de construção acadêmico. Em especial, agradeço ao meu colega Adriano Pessoa, por sempre estar pronto em dar uma “mãozinha” nesse período de trabalho laboratorial e estudos.

A todos que, com gestos e palavras de carinho, me apoiaram e incentivaram, minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

À Comissão de Pós-Graduação da Área de Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de sua coordenadora, Prof^a Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, na pessoa de seu chefe, Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoas de seu docente Prof^a Dr^a. Ana Paula Campanelli.

Ao Cedars-Sinai Medical Center – Los Angeles (CA), na pessoa do professor Dr. Cory Hogaboam.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima, na pessoa da Dr^a. Maria Renata Sales Nogueira.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), agradeço a concessão da minha bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido (Processo 2018/10529-2), que possibilitou a realização de todos os experimentos de minha pesquisa.

“Uma das regras básicas do universo é que nada é perfeito. A perfeição simplesmente não existe. Sem imperfeição, nem você nem eu existiríamos”.

Stephen Hawking

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) é o segundo câncer de pele não melanoma mais comum. Sabe-se que os processos fisiológicos que são necessários para a tumorigênese, como aumento da sobrevivência celular, remodelação tecidual, angiogênese, invasão e supressão da resposta imune adaptativa são reguladas por leucócitos infiltrados no microambiente tumoral. Está estabelecido que os monócitos influenciam vários aspectos do desenvolvimento tumoral. Os monócitos estimulam a proliferação de células neoplásicas, ativam células-tronco tumorais e promovem metástase e também parecem ter a maquinaria celular para matar diretamente as células malignas por indução da morte celular. Sabe-se agora que monócitos fenotipicamente semelhantes parecem desempenhar papéis opostos no desenvolvimento tumoral. Baseado no exposto, o presente estudo procurou avaliar a capacidade de monócitos em promover e influenciar a atividade de células tumorais *in vitro*. Para tal empregamos duas linhagens de células de carcinoma espinocelular (SCC-25 e Detroit 562) em ensaios de motilidade, invasão, proliferação e expressão gênica, avaliando a influência do meio condicionado de monócitos nessas células. Os resultados evidenciaram que o meio condicionado (MC) de monócitos influenciou negativamente a motilidade das duas linhagens de carcinoma espinocelular. Adicionalmente, o meio condicionado de monócitos induziu aumento da taxa de proliferação das células da linhagem tumoral SCC-25, mas diminuiu a taxa de proliferação de células Detroit 562. Os resultados também mostraram uma influência significativa de fatores derivados de monócitos na capacidade de invasão de células da linhagem tumoral SCC-25. Em seguida, analisamos a expressão de genes relacionados com o processo de transição epitelial-mesenquimal. Os resultados mostraram que genes importantes para migração, invasão e metástase, como *MYC*, *SOX2*, *EPCAM*, *AURKA* e *SYP* foram expressos de forma diferente em células tumorais estimuladas com o meio condicionado de monócitos. Os fatores derivados de monócitos induziram aumento na expressão do gene *EPCAM* por células da linhagem tumoral SCC-25, ao mesmo tempo que modularam negativamente a expressão de *MYC*, *SOX2* e *SYP* por essas células. Para a linhagem tumoral Detroit 562, os fatores derivados de monócitos induziram aumento na expressão do gene *SOX2*, ao mesmo tempo que modularam negativamente a expressão de *MYC*, *AURKA*, *EPCAM* e *SYP* por essas células. Dessa forma, os resultados descritos

indicam que fatores derivados de monócitos podem contribuir de diferentes maneiras para processos como motilidade, invasão e proliferação das células das linhagens tumorais provenientes de carcinoma espinocelular testadas em nosso estudo.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Monócitos. Imunologia tumoral.

ABSTRACT

Evaluation of the effects of monocyte conditioned medium on tumor cell activity *in vitro*

Squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common non-melanoma skin cancer. It is known that physiological processes that are necessary for tumorigenesis, such as increased cell survival, tissue remodeling, angiogenesis, invasion and suppression of the adaptive immune response, are regulated by leukocytes infiltrating the tumor microenvironment. It has been established that monocytes influence several aspects of tumor development. Monocytes stimulate neoplastic cell proliferation, activate tumor stem cells and promote metastasis, and also appear to have the cellular machinery to directly kill malignant cells by inducing cell death. It is now known that phenotypically similar monocytes appear to play opposite roles in tumor development. Based on the above, the present study sought to evaluate the ability of monocytes to promote and influence the activity of tumor cells *in vitro*. SCC-25 and Detroit 562 cells were cultured with conditioned medium of monocytes (CM) and analyzed motility and invasion, proliferation and quantitative real time PCR of genes related to the epithelial-mesenchymal transition. CM negatively influenced the motility of squamous cell carcinoma cell lines. Additionally, CM induced an increase in the proliferation rate of SCC-25 cells, but decreased the proliferation of Detroit 562 cells. The results also showed a significant influence of CM on the invasion of SCC-25 cells. Next, we analyzed the expression of genes related to the epithelial-mesenchymal transition process. The results showed that genes important for migration, invasion and metastasis, such as *MYC*, *SOX2*, *EPCAM*, *AURKA* and *SYP* were expressed differently in tumor cells stimulated with the monocyte conditioned medium. Monocyte-derived factors induced an increase in the expression of the *EPCAM* gene by SCC-25 cells, while negatively modulating the expression of *MYC*, *SOX2* and *SYP* by these cells. Also, CM induced an increase in the expression of the *SOX2* gene, while negatively modulating the expression of *MYC*, *AURKA*, *EPCAM* and *SYP* by Detroit cells. Thus, the results described indicate that factors derived from monocytes can contribute in different ways to processes such as motility, invasion and proliferation of cells from tumor cell lines from squamous cell carcinoma tested in our study.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Monocytes. Tumor immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Expressão de CD14 em carcinoma espinocelular	64
Figura 2 -	Presença de CD14 em amostras de carcinoma espinocelular	65
Figura 3 -	Caracterização de monócitos	68
Figura 4 -	Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida e motilidade da linhagem celular SCC-25 após a exposição ao meio condicionado de monócitos	69
Figura 5 -	Ensaio de motilidade da linhagem celular SCC-25 após a exposição ao meio condicionado de monócitos	70
Figura 6 -	Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida e motilidade da linhagem celular Detroit 562 após a exposição ao meio condicionado de monócitos	71
Figura 7 -	Ensaio de motilidade da linhagem celular Detroit 562 após a exposição ao meio condicionado de monócitos	72
Figura 8 -	Ensaio de invasão e migração em <i>transwell</i> para células da linhagem SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de monócitos	73
Figura 9 -	Ensaio de proliferação das linhagens celulares SCC-25 e Detroit 562 estimuladas com o meio condicionado de monócitos	75
Figura 10 -	Expressão de <i>IL-33</i> e <i>ST2</i> pela linhagem celular SCC-25 exposta ao sobrenadante da cultura de monócitos	77
Figura 11 -	Expressão de <i>IL-33</i> e <i>ST2</i> pela linhagem celular Detroit 562 exposta ao sobrenadante da cultura de monócitos	78
Figura 12 -	Expressão de <i>EZH2</i> , <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX2</i> , <i>AURKA</i> , <i>CHGA</i> , <i>EPCAM</i> e <i>SYP</i> em células da linhagem tumoral SCC-25 expostas ao meio condicionado de monócitos	81
Figura 13 -	Expressão de <i>EZH2</i> , <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX2</i> , <i>AURKA</i> , <i>CHGA</i> , <i>EPCAM</i> e <i>SYP</i> em células da linhagem tumoral Detroit 562 expostas ao meio condicionado de monócitos	82

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumina sérica bovina
CA	Califórnia
CAFs	<i>Cancer associated fibroblasts</i> , fibroblastos associados ao câncer
CBC	Carcinoma basocelular
CCL	<i>C-C chemokine ligand</i> , ligante de quimiocina C-C
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i> , receptor de quimiocina C-C
CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> , inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
CEC	Carcinoma espinocelular
CIP	Centro Integrado de Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CD152)</i> , proteína T-linfócito-associada citotóxico 4
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , Linfócitos T Citotóxico
CXCL	<i>C-X-C chemokine ligand</i> , ligante de quimiocina C-X-C
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor</i> , receptor de quimiocina C-X-C
DAB	Diaminobenzidina
DC	<i>Dendritic Cell</i> , célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , ácido etileno-dimano-tetra acético
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>

EUA	Estados Unidos da América
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> , separação celular ativada por fluorescência
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fas	CD95
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , fator de crescimento de fibroblastos
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoersceína
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
g	Gramas
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> , fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H&E	Hematoxilina e eosina
HNSCC	<i>Head and Neck squamous cell carcinoma</i> , carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
HPV	<i>Human papillomavirus</i> , Papilomavírus humano
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i> , interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILCs	<i>Innate lymphoid cells</i> , Células linfóides inatas
ILSL	Instituto Lauro de Souza Lima
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> , Óxido nítrico síntase induzível
Kg	Kilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
M1	Macrófagos M1 polarizados
M2	Macrófagos M2 polarizados
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC	Meio condicionado

M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> , fator estimulador de colônia de macrófagos
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i> , células mielóides supressoras
mg	Miligrama
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade I
miRNAs	MicroRNAs
ml	Mililitros
mm	Milímetro
MMPs	metalloproteínases da matriz
mRNA	RNA mensageiro
N	Tamanho das amostras
N°	Número
NF- κ β	<i>Nuclear factor kappa β</i> , fator nuclear kappa β
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer Cell</i> , célula matadora natural
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampão fosfato salino
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> , fator de crescimento derivado de plaquetas
PD-L1	<i>Programmed cell death protein ligand 1</i> , ligante de morte programado 1
PE	<i>Phycoerythrin</i> , ficoeritrina
PercP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> , proteína clorofil peridina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	<i>Propidium Iodide</i> , iodeto de propídeo
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i> , Fosfoinositídeo 3-quinase
PKB	<i>Protein Kinase B</i> , proteína quinase B
PTPRs	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type S</i> , Receptores da proteína tirosina fosfatase
RAE1	<i>Ribonucleic Acid Export 1</i>

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> , meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SD	<i>Standard Deviation</i> , desvio padrão
SSC	<i>Side Scatter</i> , parâmetro de análise celular por granularidade
sST2	ST2 solúvel
ST2	<i>Interleukin 33 receptor</i> , Receptor de interleucina 33
ST2L	<i>Transmembrane ST2</i> , ST2 transmembrana
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> , Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i> , Estimulador de genes de interferon
T CD4 ⁺	<i>Helper T Lymphocyte</i> , linfócito T auxiliar
T CD8 ⁺	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> , linfócito T citotóxico
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i> , Macrófagos associados ao tumor
TANs	<i>Tumor-associated neutrophils</i> , neutrófilos associados a tumor
TCR	<i>T cell receptor</i> , Receptor de células T
TDA	<i>Tumor derived antigens</i> , Antígenos derivados de tumor
TGF-β	<i>Tumoral Growth Factor</i> , fator de crescimento tumoral beta
Th	<i>Helper T Lymphocyte</i> , linfócito T auxiliar
Th1	<i>Helper T Lymphocyte 1</i> , linfócito T auxiliar 1
Th2	<i>Helper T Lymphocyte 2</i> , linfócito T auxiliar 2
TLR	<i>Toll-like receptors</i> , Receptores do tipo Toll
TME	<i>Tumoral microenvironment</i> , Microambiente tumoral
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> , fator de necrose tumoral alfa
TP53	<i>Tumor protein p53</i> , Proteína de tumor 53
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> , Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
Treg	Células T regulatórias
USA	<i>United States of América</i> , Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
V	Volume

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

VEGF-A *Vascular endothelial growth factor A*, Fator de crescimento
 endotelial vascular A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1	Aspectos gerais das neoplasias	33
2.2	Fatores genéticos associados ao carcinoma espinocelular	36
2.3	Sistema imunológico na prevenção de tumores	39
2.4	Aspectos gerais de monócitos	42
2.5	Monócitos e câncer	45
3	OBJETIVOS	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Aspectos éticos	52
4.2	Casuística e seleção da amostra	52
4.3	Imuno-histoquímica	53
4.4	Obtenção de células mononucleares	54
4.5	Separação de monócitos	54
4.6	Cultura de monócitos	55
4.7	Citometria de fluxo para a análise de expressão de moléculas de superfície	55
4.8	Células tumorais	56
4.9	Ensaio de motilidade celular.....	57
4.10	Ensaio de proliferação.....	57
4.11	Ensaio de invasão em transwell	58
4.12	RT-qPCR	58

4.12.1	Extração do RNA total	58
4.12.2	Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa	59
4.12.3	Reação de PCR	59
4.13	Análise de expressão gênica <i>in silico</i> por bioinformática	60
4.14	Análise estatística	60
5	RESULTADOS	62
5.1	Análise de expressão gênica <i>in silico</i> e por imuno-histoquímica da expressão de CD14	62
5.2	Efeito do meio condicionado de monócitos sobre a motilidade de células das linhagens SCC-25 e Detroit 562	63
5.3	Efeito do meio condicionado de monócitos sobre a invasão de células da linhagem SCC-25	73
5.4	Efeito do meio condicionado de monócitos sobre a proliferação das células das linhagens SCC-25 e Detroit 562	74
5.5	Expressão de <i>IL-33</i> e seu receptor <i>ST2</i> pelas linhagens celulares SCC-25 e Detroit 562 expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos	76
5.6	Expressão dos genes <i>EZH2</i> , <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX2</i> , <i>AURKA</i> , <i>CHGA</i> , <i>EPCAM</i> E <i>SYP</i> pelas linhagens celulares SCC-25 e Detroit 562 expostas ao meio condicionado de monócitos	79
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	98

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular (CEC, do inglês, *Squamous cell carcinoma*) se origina a partir de células epiteliais estratificadas, que se encontram na parte mais externa da camada epiderme e se desenvolvem a partir de disfunções genéticas ou expressão alterada de moléculas importantes para replicação celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). O CEC é classificado de acordo com sua localização, sendo frequentemente encontrados na pele, cabeça e pescoço, esôfago, pulmão e colo do útero (DOTTO; RUSTGI, 2016). Os principais fatores de risco para os carcinomas espinocelulares são exposição à radiação ultravioleta, tabagismo, etilismo e infecções virais como HPV (*Human Papillomavirus*) e EPV (*Epstein-Barr virus*) (DOTTO; RUSTGI, 2016; ISHIZUMI *et al.*, 2010).

No câncer de pele, os tipos mais comuns de câncer não melanoma são o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele não melanoma, incluindo o carcinoma espinocelular, é o tipo de câncer, no Brasil, mais frequente em homens e mulheres. A radiação ultravioleta (UVA e UVB) é a principal causadora de danos ao DNA das células da pele, levando a mutações de genes importantes que mantêm a homeostase desse tecido (EMANUELE; SPENCER; BRAUN, 2014). Tanto o UVA como o UVB podem contribuir para o câncer de pele, em diferentes estágios, gerando instabilidade genômica (BOUKAMP, 2005). Outro tipo de carcinoma espinocelular, o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC do inglês, *head and neck squamous cell carcinoma*), é uma das principais causas de morte por câncer em todo o mundo e inclui tumores biologicamente similares que afetam principalmente lábios, cavidade nasal, seios paranasais, cavidade oral, faringe e laringe (SWIECICKI *et al.*, 2019). As alterações celulares nos casos de HNSCC são resultantes da ação de propriedades químicas do tabaco, álcool e, mais recentemente, pela associação de vírus oncogênicos, tais como HPV (Papilomavírus humano) (SCUTTI *et al.*, 2016). O carcinoma espinocelular de pulmão é o principal tipo histológico de câncer pulmonar e compreende aproximadamente 30% de todos os tumores pulmonares (WILKERSON *et al.*, 2010). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2019), os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão são o tabagismo e a exposição passiva ao tabaco. A molécula de DNA, que armazena a informação genética, é uma estrutura altamente reativa e alterações que

afetam a integridade dessa molécula podem acontecer espontaneamente ou serem induzidas por agentes químicos ou físicos, sendo chamados de fatores endógenos ou exógenos (FRIEDBERG; MCDANIEL; SCHULTZ, 2004). A exemplo disso, o câncer é causado por fatores externos como radiação ultravioleta, tabaco, consumo de álcool entre outros, e por fatores internos como mutações, hormônios e condições imunológicas, sendo as neoplasias resultadas de várias mutações, que ocorrem devido à interação com o ambiente (ANAND *et al.*, 2008). Embora a maioria das mutações somáticas que se acumulam em nossas células sejam inofensivas, alguns tipos de câncer possuem a taxa de mutações aumentada devido à perda de algumas vias de reparo dessas células, sendo esse acúmulo de mutações fundamental para o desenvolvimento do câncer (MARTINCORENA; CAMPEBELL, 2015). Algumas dessas mutações podem ocorrer devido a defeitos na regulação do ciclo celular, nas vias de reparo do DNA ou em vias de apoptose, podendo ter origem a partir de defeitos genéticos hereditários (AMBASTA, 2015).

As células neoplásicas podem apresentar antígenos que não são expressos por células normais, ou ainda antígenos associados a tumores que são encontrados em células normais, mas que nas neoplásicas são expressos em grande quantidade e de maneira descontrolada (COULIE *et al.*, 2014). Segundo Dunn, Old e Schreiber (2004), partindo da teoria da imunoeedição do câncer, existem tumores pouco imunogênicos que fazem o sistema imune não reconhecer seus antígenos, favorecendo o desenvolvimento tumoral. A teoria da imunoeedição prossegue através de três fases: eliminação, equilíbrio e escape. A fase de eliminação, seguindo a Teoria da Vigilância Imunológica de Burnet, consiste no trabalho em conjunto do sistema imune inato e adaptativo para a detecção e destruição das células neoplásicas, antes que se tornem um tumor aparente (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Algumas moléculas como o interferon gama (IFN- γ), a perforina e o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL relacionado ao TNF), atuam como efetores na vigilância imunológica, prevenindo o desenvolvimento tumoral (KHONG; RESTIFO, 2002). Se nessa fase o sistema imune for totalmente eficaz, há um ponto final no crescimento do tumor (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

Entretanto, a massa tumoral possui células heterogêneas, com padrões de mutações genéticas variáveis, alterações epigenéticas e expressão gênica, mesmo fazendo parte de um mesmo tecido (TABY; ISSA, 2010). No entanto, às vezes as

variantes de células neoplásicas raras podem não ser destruídas completamente na fase de eliminação e continuar na fase de equilíbrio, ocorrendo um equilíbrio entre a eliminação de células neoplásicas e o crescimento de variantes tumorais resistentes (Yu; Ho, 2019). Segundo Teng *et al.* (2008), evidências clínicas apoiam a existência de vários mecanismos de dormência tumoral. O mecanismo de dormência celular consiste na parada de replicação e essas células podem desenvolver maneiras de evitar o reconhecimento do sistema imune (AGUIRRE-GHISO, 2007; TENG *et al.*, 2008). A dormência angiogênica, outro mecanismo de dormência tumoral, ocorre quando o tumor não se desenvolve devido a limitações na vascularização da massa tumoral (AGUIRRE-GHISO, 2007; TENG *et al.*, 2008). Há também a dormência imune, onde o sistema imune mantém as células tumorais em baixos números (AGUIRRE-GHISO, 2007; TENG *et al.*, 2008). Considerando o longo período que pode durar essa fase do equilíbrio, algumas células tumorais adquirem, através de alterações genéticas, a capacidade de não serem mais reconhecidas pelo sistema imunológico e expandem o crescimento da massa tumoral, entrando na terceira fase da imunoeedição, a fase de escape (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

Na fase de escape, as células neoplásicas podem evitar o reconhecimento do sistema imune devido à ausência de expressão de antígenos tumorais, como a perda da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês, *major histocompatibility complex*) ou também podem resistir aos mecanismos de apoptose gerados pelo sistema imune (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). A partir disso, as células neoplásicas geram um microambiente imunossupressor, secretando citocinas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês, *vascular endothelial growth factor*), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento tumoral beta (TGF- β do inglês, *tumor growth factor beta*) e também recrutando leucócitos reguladores, como as células T reguladoras (Treg do inglês, *regulatory T cells*), que suprimem a função imune e levam ao escape tumoral (VESELY *et al.*, 2011).

Sabe-se que os processos fisiológicos que são necessários para a tumorigênese, como aumento da sobrevivência celular, remodelação tecidual, angiogênese, invasão e supressão da resposta imune adaptativa são regulados por leucócitos infiltrados no microambiente tumoral (de VISSER *et al.*, 2006). No microambiente inflamatório dos tecidos neoplásicos é possível detectar a presença de

monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células T, que estão entre as células tumorais e no estroma de suporte (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2008). Uma das células de interesse no contexto do microambiente tumoral são os monócitos. Os monócitos representam 10% dos leucócitos no sangue humano (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). No tecido, os monócitos recém egressos do sangue, podem se diferenciar em macrófagos e células dendríticas (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Monócitos apresentam propriedades funcionais que permitem a estas células combater micro-organismos, e participarem da patogênese de diferentes doenças inflamatórias, como o câncer (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

Após muitos estudos, observou-se a existência de subconjuntos de monócitos no sangue humano (HEITBROCK *et al.*, 2010). Assim, a população de monócitos é heterogênea, e as subpopulações destas células são divididas de acordo com o perfil de expressão de receptores de quimiocinas e a presença de moléculas específicas em sua membrana (HEITBROCK *et al.*, 2010). De acordo com seus marcadores de superfície, os monócitos podem ser classificados como: monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos não clássicos (CD14⁻CD16⁺⁺) e ainda intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) (HEITBROCK *et al.*, 2010). Os monócitos clássicos, também chamados de monócitos inflamatórios, que saem da medula óssea e migram para os locais de inflamação, apresentam alto potencial fagocítico e produzem principalmente citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10) (KAWAMURA; OHTEKI, 2018). Os monócitos intermediários possuem características como: receptores Fc como CD32 e CD64, atividade fagocítica e produzem citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF do inglês, *tumor necrosis factor*), IL-1 β e IL-6. (KAWAMURA; OHTEKI, 2018). Já os monócitos não clássicos, chamados de 'monócitos de patrulha', possuem uma fraca expressão de receptores Fc, baixa atividade fagocítica e não produzem citocinas inflamatórias em resposta ao LPS (lipopolissacarídeos), *in vitro* (KAWAMURA; OHTEKI, 2018).

Os monócitos não clássicos patrulham os vasos sanguíneos e migram para tecidos periféricos não inflamados, como baço, pulmão e fígado, enquanto os monócitos clássicos ou inflamatórios trafegam para os locais de inflamação (SHI; PAMER, 2011). Em condições patológicas, os monócitos inflamatórios adquirem funções como atividades pró-inflamatórias, apresentação de antígenos, remodelação

de tecidos ou habilidades anti-inflamatórias, que geralmente não podem ser cumpridas por outras células (GUILLIAMS; MILDNER; YONA, 2018). No estudo de Serbina *et al.*, (2003), bactérias *Listeria monocytogenes* foram inoculadas via intravenosa em camundongos, infectando predominantemente o baço e o fígado. Os monócitos inflamatórios desses camundongos infectados por *Listeria monocytogenes* migraram para a área onde se estabelece lesões bacterianas, sofreram diferenciação em células dendríticas produtoras de TNF/iNOS (Tip-DCs do inglês, *TNF/iNOS-producing dendritic cells*) e impediram a disseminação bacteriana (SERBINA *et al.*, 2003). Em outro estudo sobre monócitos inflamatórios, camundongos CCR2^{-/-}, após o desafio com *Mycobacterium tuberculosis*, tiveram uma frequência significativamente reduzida de monócitos, o que diminuiu o recrutamento de células T no local da infecção, demonstrando que os monócitos são células importantes no processo inflamatório (PETERS *et al.*, 2004). Estudos semelhantes aos já citados demonstram que durante a infecção por *Toxoplasma gondii* os monócitos inflamatórios são diretamente infectados, secretam IL-12 e NO e matam parasitas, mas esses mesmos monócitos infectados com *T. gondii* também podem estar envolvidos no transporte de parasitas para o cérebro (ROBBEN *et al.*, 2005; COURRET *et al.*, 2006). Em doenças que envolvem inflamações crônicas, como a aterosclerose, os monócitos estão entre as células que formam as placas ateromatosas, que agem acumulando ésteres de colesterol para se tornarem *foam cells* (células espumosas) e usam receptores de quimiocinas como CCR2, CCR5 e CX3CR1 (INGERSOLL *et al.*, 2011).

Há outras doenças que também relacionam o papel dos monócitos na inflamação crônica. Segundo Misharin *et al.* (2014), em modelos murinos de artrite reumatoide, que se caracteriza como uma inflamação autoimune crônica das articulações, os monócitos não clássicos são responsáveis pela iniciação e progressão da inflamação das articulações. Em estudos sobre esclerose múltipla, que é uma doença autoimune caracterizada por alterações inflamatórias e degenerativas no cérebro e medula espinhal, o recrutamento de monócitos inflamatórios é fundamental para o início e progressão da doença (MILDNER *et al.*, 2009). O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é outra doença inflamatória autoimune crônica, na qual uma das características é a disfunção e a homeostase alterada dos monócitos (NARASIMHAN *et al.*, 2019). A nefrite lúpica (LN) é a principal causa de morbidade em pacientes com LES, sendo assim, o estudo de Barrera García *et al.* (2016) mostrou

que pacientes com formas graves de LN, com maior grau de infiltrado de células CD16⁺ (monócitos não clássicos) no glomérulo, apresentavam níveis mais baixos de monócitos não clássicos no sangue periférico, sugerindo que os monócitos não clássicos foram recrutados para os tecidos renais.

No contexto do câncer, os monócitos podem desempenhar papéis opostos devido às diferenças no tipo de câncer ou tecido de origem, no microambiente tumoral, na fase de crescimento do tumor, e no modelo experimental (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). As principais funções pró-tumorais dos monócitos clássicos no câncer são: diferenciação em macrófagos pró-tumorais, recrutamento de Tregs, supressão da função de células T, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). Os monócitos são recrutados durante a progressão e crescimento tumoral, e estudos apontam a quimiocina CCL2 como o principal mediador no recrutamento de monócitos (QIAN *et al.*, 2011; CHUN *et al.*, 2015). Em um estudo de modelo prognóstico para melanoma metastático, o número elevado de monócitos no sangue periférico se mostrou associado a baixa sobrevida dos pacientes (SCHMIDT *et al.*, 2005).

Dados recentes indicam que monócitos circulantes de pacientes com câncer de próstata apresentam expressão gênica aumentada de diversas quimiocinas, citocinas, moléculas de superfície e fatores de transcrição, como exemplo CCL3, CCL5, IL-1 β , IL-6, além de um aumento da ativação de NF- κ B e fagocitose (CAVASSANI *et al.*, 2018). Um outro estudo, de Huang *et al.*, (2020), mostrou que a alta expressão da quimiocina CCL5, que é secretada principalmente por TAMs, derivados de monócitos, promove metástase e aumento de células-tronco no câncer de próstata. Segundo o estudo de Gilani *et al.*, (2018), uma contagem elevada de monócitos no pré-operatório está relacionada a tumores mais agressivos e a uma maior taxa de recorrência em pacientes com câncer no endométrio. Ademais, os monócitos infiltrantes podem se diferenciar em macrófagos associados ao tumor (TAMs do inglês, *tumor associated macrophages*), colaborando para o crescimento do tumor, facilitando a angiogênese, a oferta de nutrientes ao tumor e também exibindo atividade negativa nas células T, através da expressão do ligante de morte programada 1 (PD-L1 do inglês, *programmed death-ligand 1*) (GUILLIAMS; MILDNER; YONA, 2018).

Funcionalmente, os macrófagos teciduais são classificados em dois principais estados de polarização, M1 e M2 (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016). Os macrófagos são as células imunes encontradas com maior frequência no microambiente tumoral e podem desempenhar papéis contrastantes no desenvolvimento do câncer, dependendo de seu fenótipo, sendo os macrófagos do tipo M1 com potencial de contribuir para os estágios iniciais da neoplasia, enquanto os macrófagos do tipo M2 geralmente envolvem-se depois que um tumor progride e cresce (GUO *et al.*, 2016; CONDEELIS; POLLARD, 2006). Os macrófagos M1, ou classicamente ativados, são ativados por IFN- γ , ou receptores toll-like (TLR do inglês, *toll-like receptors*), expressando MHC-II, CD68, CD80, CD86 e secretando citocinas como IL-6, IL-12 e IL-23, apresentando então um perfil Th1 ou pró-inflamatório (CHEN *et al.*, 2019). A polarização M1 geralmente é induzida por ligações de componentes bacterianos aos TLRs, como lipopeptídeos (TLR2), lipopolissacarídeos (TLR4) ou flagelina (TLR5), mas também tem a capacidade de lidar com bactérias intracelulares como *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*, através da secreção de TNF e IL-12, que induzem a produção de IFN- γ em linfócitos, aumentando a capacidade de destruição dessas bactérias intracelulares (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016). Já os macrófagos M2, ou alternativamente ativados, são estimulados pelas citocinas auxiliares da célula T como IL-4 e IL-13, expressam CD163, CD206, arginase 1 (Arg1) e secretam IL-10 e TGF- β , apresentando um perfil imunossupressor e pró-tumoral, com papel mais próximo ao perfil Th2 (CHEN *et al.*, 2019). A polarização M2 pode ser subdividida em M2a que é desencadeada por citocinas como IL-4 e IL-13; M2b, estimulada por LPS ou IL-1 β , caracterizada por baixa produção de IL-12 e alta de IL-10, sendo o inverso funcional de M1; M2c que inclui desativações desencadeadas por glicocorticoides (GC), IL-10 e TGF- β (MARTINEZ *et al.*, 2008). Em geral, macrófagos M2, além de promover a eliminação de detritos, angiogênese, reparo de tecidos e controle da resposta inflamatória mediadas por M1, os M2 são células efetoras competentes contra infecções parasitárias (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Os macrófagos, em geral, são uma população dinâmica, pois ao mesmo tempo em que participam de inflamações, também estão nos eventos de resolução desse processo (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008).

Geralmente, os macrófagos associados ao tumor se assemelham mais ao perfil dos macrófagos M2, devido aos sinais presente no microambiente e trabalham

ativamente para o tumor: eles produzem várias moléculas que sustentam a sobrevivência celular maligna, promovem o desenvolvimento vasos sanguíneos recém-formados, auxiliam as células tumorais em sua progressão, além de afetarem significativamente as respostas imunes adaptativas ao recrutar e estimular células T reguladoras (Treg) e ao recrutar linfócitos de perfil Th2 (SOLINAS *et al.*, 2009). Os TAMs secretam citocinas, quimiocinas e enzimas que suprimem as funções efetoras das células T CD4⁺ e T CD8⁺, recrutando células T reguladoras naturais (nTreg) para o microambiente tumoral, bem como induzem a fração reguladora de CD4⁺ (iTreg, células T reguladoras induzidas) (NOY; POLLARD, 2014). As células Treg são recrutadas ao microambiente tumoral através de quimiocinas como CCL5, CCL22 e CCL20, secretadas pelos TAMs e os mesmos induzem as células Treg através de citocinas como IL-10 e TGF- β , contribuindo para um microambiente tumoral imunossupressor (GUO *et al.*, 2016). As citocinas TGF- β e IL-10 agem modulando as funções das células T, no qual o TGF- β inibe linfócitos T citotóxicos, enquanto a IL-10 inibe funções das células T auxiliares (ADEEGBE; NISHIKAWA, 2013). Estudos demonstram que os TAMs são os principais contribuintes na angiogênese tumoral, através da liberação de fatores como VEGF, PDGF e TGF- β e também de várias enzimas moduladoras, como metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2 ou gelatinase A), metaloproteinase da matriz-7 (MMP-7 ou matrilisina 1), metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9 ou gelatinase B), metaloproteinase da matriz-12 (MMP-12 ou metaloelastase de macrófagos) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (SOLINAS *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2019). A angiogênese contribui para maior nutrição das células cancerígenas e está associada ao crescimento e metástase do tumor, desempenhando um papel importante na progressão do câncer (CHEN *et al.*, 2019). Os macrófagos presentes no tumor podem ainda expressar ligantes que, através de inibidores da função imune das células T, como PD-1 (do inglês, *programmed death 1*) e CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), inibem células efetoras imunológicas ativadas, colaborando para o desenvolvimento tumoral (NOY; POLLARD, 2014). Assim, estudos revelam que os TAMs facilitam a angiogênese e a remodelação da matriz extracelular e ainda promovem a motilidade das células tumorais, sendo essa comunicação que leva à invasão e à saída de células tumorais para os vasos sanguíneos (CONDEELIS; POLLARD, 2006).

Sabemos, então, que a inflamação está diretamente relacionada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, através de processos que envolvem genotoxicidade, reparo desordenado do tecido, respostas proliferativas, invasão e metástase (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Os monócitos, que são células imunes inatas importantes, estão envolvidos na manutenção da homeostase vascular, mas também contibuem de diversas formas nos processos inflamatórios e no câncer (NARASIMHAN *et al.*, 2019). Apesar de descrita na patogênese de diferentes tipos de câncer, a função dos monócitos inflamatórios ainda não é muito bem compreendida. Ao mesmo tempo em que essas células podem participar do controle do desenvolvimento tumoral, também podem contribuir com inflamação sistêmica. Deste modo, a compreensão do papel dessas células se faz importante para determinação de novos alvos terapêuticos para essa condição clínica.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das neoplasias.

Neoplasias malignas ou cânceres são doenças que podem ter origem em órgãos ou tecidos do corpo e são resultado do crescimento anormal e desordenado de algumas células desses locais, podendo invadir tecidos vizinhos, sendo esse processo chamado de metástase (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2020), o câncer é a sexta principal causa de morte no mundo, no qual as mortes por câncer de traqueia, brônquios e pulmão aumentaram de 1,2 milhão para 1,8 milhão, segundo dados de 2019. O câncer surge a partir de complexas mutações genéticas, nos quais muitos desses genes estão associados a controlar atividades essenciais, como diferenciação, proliferação e morte celular (Revisto por MELO; JUNQUEIRA; CHAMMAS, 2003). A transformação de células normais em células tumorais é um processo de vários estágios que geralmente progride de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno, sendo essas alterações o resultado da interação entre fatores genéticos de uma pessoa e agentes externos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2018). Esse processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, devido aos efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos que são os responsáveis pelo início, promoção, progressão e até inibição do tumor (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA 2018).

Os carcinomas espinocelulares (CECs) são os mais frequentes e uma das principais causas de mortalidade por câncer (DOTTO; RUSTGI, 2016). Os diferentes CECs apresentam características histológicas comuns e surgem de tecidos epiteliais que podem ser classificados como epitélio escamoso estratificado (pele, esôfago e cavidade oral) e epitélio não escamoso (vias aéreas) (SÁNCHEZ-DANÉS; BLANPAIN, 2018). Alguns tipos de CEC, como o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC do inglês, *head and neck squamous cell carcinoma*), são causados principalmente pelo consumo de tabaco, álcool e pela infecção do vírus do papiloma humano (HPV), além da predisposição genética (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2010). No carcinoma espinocelular pulmonar (LSCC do inglês, *lung squamous cell carcinoma*), 97% dos casos são atribuídos ao tabagismo (HERBST *et*

al., 2008). O consumo de álcool, juntamente com o tabaco, também é um fator ligado ao HNSCC e principalmente ao carcinoma espinocelular do esôfago (ESCC do inglês, *esophageal squamous cell carcinoma*) (DOTTO; RUSTGI, 2016). O vírus do papiloma humano (HPV), fator de risco ao desenvolvimento de neoplasias, é responsável por 96% dos casos de CEC cervical e por diversos casos de HNSCC, pois age no genoma das células epiteliais através de oncoproteínas que perturbam o ciclo celular e levam a formação do câncer (DOORBAR, 2006). A exposição aos raios ultravioletas (UV) é o principal fator de risco para o câncer de pele em geral (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). A radiação ultravioleta (UVR do inglês, *ultraviolet radiation*) age na pele causando danos ao DNA celular, mutações em genes importantes para a supressão tumoral como o *p53*, imunossupressão, estresse oxidativo e respostas inflamatórias importantes no desenvolvimento de fotoenvelhecimento e do câncer de pele (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010).

O câncer de pele não melanoma é o mais frequente câncer diagnosticado, em ambos os sexos (BRAY *et al.*, 2018). Dentre os tipos de câncer de pele não melanoma, o carcinoma espinocelular é a segunda forma mais comum e tem origem a partir de queratinócitos do estrato espinhoso, localizados na epiderme (FUNDAÇÃO DO CÂNCER DE PELE, 2019; VAN DE GRAAFF, 2003). O carcinoma espinocelular ocorre com maior frequência em áreas do corpo expostas aos raios ultravioleta oriundos do sol, como face, orelhas, pescoço, lábio e dorso das mãos, e menos frequentemente na pele da área genital (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). As lesões visíveis do CEC caracterizam-se, frequentemente, como manchas escamosas vermelhas que podem sangrar, feridas abertas que não cicatrizam, crescimentos semelhantes a verrugas ou crescimentos elevados com uma área mais baixa no centro (FUNDAÇÃO DO CÂNCER DE PELE, 2019). As lesões no DNA mais frequentemente induzidas por UVA ou UVB resultam da ligação covalente de duas bases adjacentes de pirimidina, os chamados dímeros de pirimidina, que incluem principalmente a substituição das bases C → T, incluindo CC → TT, sendo esse evento considerado como assinatura específica de danos ao DNA induzidos por UV (DOUKI; KOSCHEMBAHR; CADET, 2016). Esses danos ao DNA, através de dímeros de pirimidina, foram encontrados principalmente no gene supressor de tumor *p53* de tipos tumorais como o CEC e o carcinoma basocelular (CBC) e também em precursores de tumores como a queratose actínica (BRASH, 2015). Havendo um

número expressivo de danos ao DNA da célula, acontece então a mutação, que no caso de ocorrer no gene p53, retarda o mecanismo de reparo das células, impedindo a apoptose e a morte programada, permitindo então a multiplicação dessas células mutantes e o desenvolvimento do tumor (BRASH, 2015; BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007). Os raios UV na pele também possuem efeitos agudos, como a indução da inflamação (D'ORAZIO *et al.*, 2013). O UVB age induzindo citocinas, mediadores vasoativos e neuroativos na pele, que resultam em uma resposta a esses danos nos queratinócitos, como a ativação da p53, alterando a fisiologia dos queratinócitos, induzindo a apoptose, se for o caso, e após várias horas, após a exposição aos raios UV, há uma grande proliferação de queratinócitos, levando a um aumento da espessura da epiderme para proteção da pele contra a UV (D'ORAZIO *et al.*, 2013). A indução constante de inflamação e a instabilidade genômica provavelmente são as principais causas do desenvolvimento inicial de alterações cromossômicas, no qual o conjunto dessas alterações levam ao carcinoma espinocelular maligno (BOUKAMP, 2005; DOTTO; RUSTGI, 2016).

O carcinoma espinocelular é responsável pela maioria dos cânceres de cabeça e pescoço, surgindo do revestimento escamoso das superfícies com mucosas úmidas, como faringe, laringe e seios paranasais e também da superfície da pele exposta ao sol (GLASTONBURY, 2020). O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é o sexto câncer mais comum em todo o mundo, com 890.000 novos casos e 450.000 mortes em 2018 (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018). Pelo menos 75% das neoplasias de cabeça e pescoço são causados pelo uso de tabaco e álcool (incluindo o chamado "tabaco de mascar" ou "rapé"), especialmente câncer da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe (BLOT *et al.*, 1988; HASHIBE *et al.*, 2009). A infecção por tipos de papilomavírus humano (HPV) que causam câncer, especialmente HPV tipo 16, é também um fator de risco para alguns tipos de câncer de cabeça e pescoço, particularmente cânceres de orofaringe (CHATURVEDI *et al.*, 2011). O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço se origina a partir de células do epitélio da mucosa que revestem a cavidade oral, faringe, laringe e trato nasossinusal, seguindo etapas de progressão como hiperplasia de células epiteliais, displasia (leve, moderada e grave), carcinoma *in situ* e, finalmente, carcinoma invasivo (PORCHERI; MEISEL; MITSIADIS, 2019). A formação do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço geralmente envolve a inativação de genes supressores de tumor, como *CDKN2A*

(inibidor de cinase dependente de ciclina 2A), *TP53* e *PTEN* (gene que codifica fosfatase homóloga à tensina) (JOHNSON *et al.*, 2020).

2.2 Fatores genéticos associados ao carcinoma espinocelular

Alguns dos principais genes e as vias de sinalização relacionadas com a proliferação, crescimento e sobrevivência celular, início, promoção e progressão do carcinoma espinocelular já foram identificados (PHILIP *et al.*, 2016). Dados indicam a presença de alterações em genes associados ao ciclo celular no carcinoma espinocelular como, por exemplo, *TP53*, *CCND1*, *CDKN2A*, *RB1*, *TERT* e as alterações nesses genes promovem desenvolvimento de células com crescimento descontrolado (ARBELÁEZ, 2020). Estudos também indicaram alterações em genes e fatores de transcrição de células-tronco como, por exemplo *NANOG* (*Nanog homeobox transcription factor*), *SOX2* (*sex-determining region Y-box 2*), *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*), *MYCN* e *MYC* (*members of the MYC family of proto-oncogenes*), *CHGA* (*chromogranin A*), *AURKA* (*aurora quinase A*), *EPCAM* (*epithelial cell adhesion molecule*) e *SYP* (*synaptophysin*) desempenham um papel essencial na progressão do câncer (ARBELÁEZ, 2020).

Nos tumores epiteliais malignos, o potencial metastático tem sido relacionado à Transição-Epitélio-Mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*). A transição epitélio-mesenquimal é um processo no qual as células epiteliais perdem a aderência através de junções intercelulares, caderinas, desmossomos e marcadores epiteliais adquirem fenótipo mesenquimal, bem como propriedades invasivas e migratórias (PINTO, 2015). Fatores de transcrição, como os *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* são importantes na manutenção da expressão gênica necessária para a autorrenovação e suprimem a expressão gênica necessária para a diferenciação de células-tronco embrionárias e a alteração da atividade desses fatores induz a diferenciação (SWAIN *et al.*, 2020). *SOX2* desempenha papel fundamental na manutenção do fenótipo de células-tronco embrionárias durante a embriogênese e, no câncer, controla várias características das células neoplásicas, como proliferação, transição epitelial-mesenquimal (EMT), migração, invasão, metástase, iniciação tumoral, formação de células-tronco neoplásicas, bem como resistência à apoptose e terapia (NOVAK *et al.*, 2019). A superexpressão de *SOX2* se correlaciona com a

tumorigenicidade em diversos tipos de câncer, principalmente carcinomas de ovário e carcinomas espinocelular de cabeça e pescoço, e se essa superexpressão de *SOX2* for inibida a proliferação e a expansão de tumores podem ser reduzidas (LEE *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). *NANOG*, outro fator de transcrição relacionado com o desenvolvimento tumoral, tem sua expressão regulada por *OCT4/SOX2* (SWAIN *et al.*, 2020). A proteína *NANOG* é expressa apenas em células-tronco embrionárias, sendo crucial para a manutenção da pluripotência, no entanto, a expressão de *NANOG* pode ser detectável em células cancerosas que exibem propriedades semelhantes às células-tronco, que se acredita serem a fonte de transformação maligna, progressão do câncer e desenvolvimento de metástases (GRUBELNIK *et al.*, 2020). A expressão de *NANOG* foi descrita em vários tipos de tumores. Segundo estudo de Lee *et al.*, (2015), a alta expressão de *NANOG* citoplasmática em carcinoma espinocelular oral (OSCCs) pode conferir características agressivas ao tumorque, por sua vez, indica mau prognóstico.

A família de proto-oncogene *MYC*, que compreende principalmente *c-Myc* (*MYC*), *n-Myc* (*MYCN*) e *l-Myc* (*MYCL*), é importante para o desenvolvimento e proliferação celular normal, mas a expressão anormal da família *MYC* promove a tumorigênese em vários cânceres humanos (LIU *et al.*, 2017). *MYCN* tem sua expressão aumentada principalmente em tumores do sistema nervoso, como neuroblastoma, meduloblastoma, retinoblastoma, astrocitoma e glioblastoma multiforme, mas também em câncer não neuronal, como câncer de próstata do tipo neuroendócrino resistente à castração, tumores hematológicos malignos, câncer de pulmão de células pequenas e tumor pancreático (YOSHIDA, 2018). Estudos propuseram outros alvos da via *MYCN*, como *SOX2*, *p53*, *miR-34a* e *miR-9*, para avaliar o mau prognóstico do câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), sugerindo que a alta expressão de *MYCN* se correlaciona com a expressão de *SOX2*, porém mais investigações são necessárias (RUIZ-PÉREZ; HENLEY; ARSENIAN-HENRIKSSON, 2017). Um outro proto-oncogene da família *MYC*, *c-Myc*, quando ativado inadequadamente, contribui para o desenvolvimento das neoplasias humanas, ocorrendo através de mecanismos como: translocações cromossômicas, amplificação gênica, estímulo da transcrição gênica, inserção de retrovírus adjacente ao gene *c-Myc* etc (FARIA; RABENHORST, 2006). Em estágios avançados de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, o estudo de Waitzberg e

colaboradores (2004) mostrou que a expressão concomitante de ambos os oncogenes *c-Myc* e *p53* foi associada a pior sobrevida livre de doença, o que sugere um papel importante desses genes na progressão tumoral.

Dentre os muitos genes com expressão aumentada em células tumorais, o potenciador do homólogo Zeste 2 (*EZH2*) é um importante exemplo, pois atua em vários processos biológicos, e com isso está relacionado a muitas doenças, incluindo o câncer (LU *et al.*, 2010). *EZH2* é uma subunidade catalítica enzimática do complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2), que pode alterar a expressão gênica por trimetilação de *Lys-27* na histona 3 (H3K27me3), sendo esse processo associado à repressão da expressão de genes e é considerado um evento epigenético crítico durante o desenvolvimento do tecido e a determinação do destino das células-tronco (DUAN; DU; GUO, 2020). No estudo de Xia e colaboradores (2020) foi demonstrado que o *EZH2* atuou como um promotor tumoral no câncer de pulmão, no qual a diminuição de expressão de *EZH2* reduziu a secreção da proteína CCL5, inibindo o recrutamento de macrófagos e, finalmente, levando à diminuição da capacidade de invasão e metástase das células de câncer de pulmão.

Um outro gene de importância, *CHGA*, é um gene que codifica proteínas neuroendócrinas da família cromogranina/secretogranina, encontrado em vesículas secretoras de neurônios e células endócrinas (MURPHY *et al.*, 2021). Evidências sugerem que a cromogranina A (CHGA), presente em quantidades variáveis no sangue de pacientes com câncer, pode desempenhar um papel na regulação da angiogênese tumoral, estrutura vascular e permeabilidade, e que pode também afetar a resposta a certas terapias (LOH *et al.*, 2012). O gene *CHGA* foi considerado um biomarcador para neoplasias neuroendócrinas e um biomarcador potencial para o diagnóstico precoce de câncer gástrico e câncer de próstata (ZHANG *et al.*, 2019). Aurora quinase A (AURKA), também conhecida como serina/treonina proteína quinase 6, possui funções importantes na mitose e em processos biológicos não mitóticos e sua expressão aumentada tem sido implicada instabilidade genética e tumorigênese, que são observadas em cânceres, incluindo leucemia, ovário, pulmão, pâncreas, fígado e câncer colorretal (WU *et al.*, 2018). Em uma análise retrospectiva de CEC de laringe, a análise de 37 amostras pareadas por RT-PCR revelou aumento da expressão de *AURKA* em tecido tumoral, correlacionando também com metástase de linfonodo e estágio clínico (Zhang *et al.*, 2012). Em outro estudo, pacientes com

carcinoma de cabeça e pescoço e mRNA de *AURKA* elevado tiveram uma sobrevida global e livre de doença mais curta, desempenhando papel crítico na progressão tumoral (REITER *et al.*, 2006).

A molécula de adesão de células epiteliais (EPCAM), uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, tem sido estudada em uma ampla variedade de carcinomas humanos e tecidos epiteliais normais e é considerado o antígeno associado a tumor mais estudado (BAEUERLE; GIRES, 2007). A expressão do gene de *EPCAM* é significativamente elevada em vários adenocarcinomas humanos, bem como em carcinomas espinocelulares, sendo de grande interesse para ser aplicado como um marcador de prognóstico, diagnóstico e intervenção terapêutica para cânceres epiteliais (MOHTAR *et al.*, 2020).

Por último, outro gene que avaliamos em nosso estudo foi o *SYP* que codifica a proteína Sinaptofisina, uma proteína de membrana e marcador neuroendócrino envolvido na formação de vesículas sinápticas, e está envolvida na diferenciação neuronal e neuroendócrina principalmente em humanos. Estudos anteriores relataram que *SYP* é principalmente expresso em tumores adrenocorticais e sua expressão em adenomas adrenocorticais pode estar associada a funções como transporte ou secreção de glicocorticóides. Portanto, é possível que o *SYP* possa desempenhar um papel importante nos tecidos do adenoma adrenocortical (ZHONG *et al.*, 2019).

2.3 Sistema imunológico na prevenção de tumores

O sistema imunológico é muito importante na prevenção de tumores e tem como papéis principais: Age na eliminação de patógenos e na pronta resolução da inflamação, impedindo o surgimento de um ambiente inflamatório propício à tumorigênese e, também, possui a capacidade de identificar e eliminar especificamente células tumorais, através do reconhecimento de antígenos ou moléculas expressados por essas células, induzidos pelo estresse celular (SWANN; SMYTH, 2007). Esse processo, no qual o sistema imune identifica e induz a morte celular de células transformadas antes de formarem neoplasias malignas, é conhecido como imunovigilância (VESELY *et al.*, 2011). Em 1909, Paul Ehrlich formulou a

hipótese de que o hospedeiro possui defesas que podem impedir as células neoplásicas de se transformarem em tumores, mas essa teoria não pôde ser comprovada á época, pois não tinham recursos metodológicosadequados (RIBATTI, 2017). Mais tarde, Lewis Thomas e Sir Frank Mac Farlane Burnet sugeriram que o sistema imunológico reconhece os tumores através da expressão de neo-antígenos específicos nas células tumorais e os elimina para manter a homeostase tecidual (RIBATTI, 2017). Após experimentação através da indução de tumor em camundongos, a hipótese da imunovigilância, de Burnet e Thomas, ganhou reconhecimento (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Novos dados, no entanto, mostraram que a imunovigilância representa apenas uma parte da complexa relação entre o sistema imunológico e o câncer, onde o sistema imunológico também podeinduzir o surgimento de tumores primários com imunogenicidade reduzida, que são capazes de escapar ao reconhecimento e à destruição das células imunes, levando ao desenvolvimento da hipótese da imunoedição do câncer (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

A imunoedição é uma extensão da hipótese de imunovigilância, propondo que a pressão seletiva imposta pelo sistema imunológico molde o fenótipo tumoral e favoreça o desenvolvimento de neoplasias que não induzam uma resposta imune efetiva. Este processo ocorre em três fases distintas: eliminação; equilíbrio e escape, mas em alguns casos, as células tumorais podem entrar diretamente nas fases de equilíbrio ou de escape sem passar pela fase anterior (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

A fase de eliminação corresponde à imunovigilância e envolve a capacidade do sistema imunológico de reconhecer os antígenos tumorais e desencadear os mecanismos de resposta imune às células neoplásicas (DUNN *et al.*, 2002). Durante a resposta imune inata há a indução de sinais inflamatórios que levam ao recrutamento de células do sistema imune para o microambiente tumoral. Independente dos mecanismos de reconhecimento, as vias efetoras são mediadas por IFN- γ . IFN- γ exerce citotoxicidade limitada às células tumorais, com efeitos antiproliferativos, antiangiogênicos e indução de apoptose, levando à formação de detritos de células tumorais que serão ingeridos pelas células dendríticas imaturas (KIM; EMI; TANABE, 2007; DUNN *et al.*, 2002). As células NK produzem IL-12 e IFN- γ , que eliminam as células tumorais por mecanismos citotóxicos mediados por TRAIL,

perforina e intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio. Paralelamente, esse processo de eliminação das células neoplásicas, as células dendríticas migram para o linfonodo satélite e estimulam a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ tumor-específicas. Por fim, as células da imunidade adaptativa, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ efetores, migram para o microambiente tumoral onde reconhecem os antígenos tumorais e são ativados para eliminar as células neoplásicas (KIM; EMI; TANABE, 2007; DUNN *et al.*, 2002).

Na segunda fase, a fase de equilíbrio, as células neoplásicas e as células do sistema imunológico entram em equilíbrio dinâmico, na qual o sistema imune adaptativo controla a proliferação das células tumorais, mas também esculpe a imunogenicidade dessas células (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Nesta fase valem as regras da seleção natural darwiniana, na qual as novas variantes de células tumorais são selecionadas pela resistência ao ataque do sistema imune (TORREZINI; ATHANAZIO, 2008). Neste processo de equilíbrio, os linfócitos e o IFN- γ exercem pressão sobre as células tumorais, contendo a maioria delas, mas não as extinguindo completamente e, então, as células tumorais geneticamente instáveis sofrem rápida mutação, o que proporciona resistência aos mecanismos de resposta imunológica (KIM; EMI; TANABE, 2007). A fase de equilíbrio é pouco compreendida e, provavelmente, a mais longa dos três processos e pode ocorrer durante um período de muitos anos (DUNN *et al.*, 2002).

As células neoplásicas que sobrevivem à fase de equilíbrio entram na fase de escape. Nesta terceira fase, as células neoplásicas acumularam características que impedem o ataque do sistema imunológico, o que favorece o crescimento do tumoral (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). O escape de células tumorais pode ocorrer através de muitos mecanismos como: redução do reconhecimento pela ausência de antígenos tumorais, modificações estruturais e de expressão das moléculas de MHC, desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor através da liberação de citocinas inibitórias (TGF- β ou IL-10) e pela indução de moléculas imunorreguladoras, ou adquirindo insensibilidade ao IFN- γ (MITTAL *et al.*, 2014). A perda de antígenos, o primeiro mecanismo de escape tumoral citado, surge devido à seleção imune de células neoplásicas que não possuem ou modificam os antígenos tumorais, bem como a deficiência na apresentação de antígenos, como por exemplo, a perda da expressão de moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) (BEATTY; GLADNEY, 2015). A partir desses mecanismos de escape, as células neoplásicas estabelecem um ambiente imunossupressor dentro do microambiente tumoral através da secreção de citocinas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF- β , IL-10, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e/ou recrutando células reguladoras que funcionam como efetores da imunossupressão, como células T reguladoras (Treg) e células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs) (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

2.4 Aspectos gerais dos monócitos

No microambiente tumoral, as interações celulares afetam o desenvolvimento e a progressão do câncer e nesse microambiente contém várias células não cancerosas, como fibroblastos e células endoteliais, e também células do sistema imunológico inato e adaptativo, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células T (HIRATA; SAHAI, 2017; ARNETH, 2020). Uma célula importante dentre as inseridas no microambiente tumoral e que é de interesse no presente estudo é o monócito. Em condições homeostáticas, os monócitos se originam de células progenitoras mielóides comuns, que se desenvolveram a partir de células tronco pluripotentes da medula óssea, no entanto, em condições inflamatórias ou patológicas, pode ocorrer monopoiese extramedular no baço (MITCHELL; ROEDIGER; WENINGER, 2014). As células progenitoras mielóides comuns se diferenciam sequencialmente em progenitoras de macrófagos e granulócitos, depois em progenitoras de células dendríticas e macrófagos comuns e, finalmente, em progenitoras de monócitos comprometidos (MITCHELL; ROEDIGER; WENINGER, 2014). Os monócitos são células sanguíneas circulantes, responsáveis pelas funções de homeostase, defesa imunológica e reparo tecidual, que constituem aproximadamente 10% dos leucócitos periféricos em humanos e originam macrófagos teciduais e células dendríticas (GUILLIAMS; MILDNER; YONA, 2018). O fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF do inglês, *macrophage colony stimulating factor*), ou fator estimulador de colônias 1 (CSF-1 do inglês, *colony stimulating factor 1*), são os fatores mais conhecidos que influenciam o desenvolvimento de monócitos durante a homeostase (MITCHELL; ROEDIGER; WENINGER, 2014). Já o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

(GM-CSF do inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) contribui principalmente para a monopoiese durante os estados inflamatórios (MITCHELL; ROEDIGER; WENINGER, 2014).

Os monócitos do sangue periférico são identificados e caracterizados em três subconjuntos funcionalmente diferentes, de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16 (SPRANGERS; DE VRIES; EVERTS, 2016): monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos não clássicos (CD14⁻ CD16⁺⁺) e monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) (GUILLIAMS; MILDNER; YONA, 2018). Os monócitos clássicos ou inflamatórios, além de possuírem os marcadores CD14⁺⁺ CD16⁻, podem ser distinguidos por marcadores adicionais, como CD36, CCR2 e CD64, e possuem funções de participar das respostas antimicrobianas do hospedeiro (KAPELLOS *et al.*, 2019). Uma vez que os monócitos clássicos são liberados na circulação, permanecem por aproximadamente um dia para posteriormente sofrer diferenciação em macrófagos nos tecidos ou, alternativamente, se converterem em monócitos não clássicos (GUILLIAMS; MILDNER; YONA, 2018). Essa “polarização” dos monócitos clássicos depende de citocinas com perfis Th1 ou inflamatórias ou até Th2 (MITCHELL; ROEDIGER; WENINGER, 2014). Os monócitos intermediários possuem como característica, além dos marcadores de superfície CD14⁺⁺ CD16⁺, uma alta expressão das moléculas CCR5 e HLA-DR e estão envolvidos em processos como apresentação de antígenos e na migração transendotelial (KAPELLOS *et al.*, 2019). Os monócitos não clássicos possuem marcadores de superfície CD14⁻ CD16⁺⁺, expressam elevados níveis de CX3CR1 e tem como principal função um comportamento de patrulha e pesquisa do endotélio como parte da vigilância local inata (KAPELLOS *et al.*, 2019; SPRANGERS; DE VRIES; EVERTS, 2016). Há também monócitos que são classificados pela expressão do receptor de angiopoietina (Tie2) (do inglês, *TIE2-expressing monocytes*), que é uma população de monócitos presente tanto no sangue periférico como no microambiente tumoral e estão localizados em espaços perivasculares (JEONG; SUH; JUNG, 2019). Acreditava-se que apenas as células endoteliais expressavam Tie-2, no entanto, De Palma *et al.*, (2005) identificaram um subconjunto de monócitos que expressavam Tie-2 e estimularam a angiogênese em tumores experimentais. No estudo de Venneri *et al.*, (2007), os monócitosTie2⁺ representavam uma população de monócitos distinta dos precursores dos TAMs.

Os monócitos clássicos são recrutados para locais de inflamação através do receptor CCR2 e seus ligantes CCL2 (ou MCP-1) e CCL7 (ou MCP-3) para, então, chegar ao alvo onde exercem uma resposta imune imediata através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina IL-1 β , TNF- α e ainda IL-18, desempenhando assim um papel importante na progressão da resposta imune (SPRANGERS; DE VRIES; EVERTS, 2016; SPAHN; KREISEL, 2014). O baço é um reservatório de monócitos, no qual a população de monócitos clássicos é recrutada, podendo posteriormente se diferenciar em macrófagos, células dendríticas ou TipDCs (SWIRSKI *et al.*, 2009). Os monócitos que expressam CD16, dependentes de sinais mediados pelo receptor de quimiocina CX3CR1, neutralizam o dano tecidual causado pela resposta imune agressiva dos monócitos clássicos através de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e também se acumulam no tecido lesionado, contribuindo para a angiogênese e fibrose (SPRANGERS; DE VRIES; EVERTS, 2016; SPAHN; KREISEL, 2014).

Os monócitos, quando relacionados com doenças inflamatórias, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), caracterizada por um grupo de doenças pulmonares que causam a obstrução da passagem de ar pelos pulmões, havendo um aumento do número de macrófagos pulmonares que agem em defesa do hospedeiro, remodelação das vias aéreas e destruição do parênquima, sugerido em estudos que o aumento do número de macrófagos pulmonares na DPOC é devido ao recrutamento aumentado de monócitos sanguíneos (RAVI *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2016). Em outra doença, como o Alzheimer, células da microglia e macrófagos derivados de monócitos estão relacionados à iniciação e progressão da doença (MARTIN *et al.*, 2017). Monócitos e macrófagos também são células protagonistas na aterosclerose, pois, os macrófagos inflamatórios são as células imunes mais abundantes dentro das placas, originadas a partir de monócitos circulantes que se ligam a células endoteliais ativadas e migram para a camada íntima, orquestrando a progressão do processo aterosclerótico pela absorção de partículas de lipoproteína de baixa densidade oxidadas (oxLDL) e subsequente formação de células espumosas (MOORE; TABAS, 2011; GROH *et al.*, 2018).

2.5 Monócitos e câncer

No contexto do câncer, os monócitos podem exibir diversas funções em diferentes estágios de crescimento e progressão tumoral (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). Mesmo contendo características semelhantes, podendo desempenhar papéis opostos devido a diferenças no tecido de origem do câncer, diferenças no microambiente tumoral, estágio de crescimento do tumor e modelo experimental (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). Assim como na inflamação, o recrutamento de monócitos para os tumores é regulado principalmente por citocinas, como CCL2 (MCP-1), quimiocinas e fatores de crescimento, nesse caso derivados de células tumorais e estromais no microambiente tumoral (CHANMEE *et al.*, 2014). Os monócitos circulantes expostos a IFN- γ ou IFN- α produzem a proteína TRAIL, que é capaz de induzir a morte celular em células cancerosas sensíveis (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). No entanto, muitas células cancerosas são resistentes a apoptose mediada por TRAIL e, em vez disso, pode estimular a secreção de citocinas pró-tumorais, como CCL2 e IL-8 (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). Monócitos clássicos desempenham principalmente funções pró-tumorais, expressando altos níveis de CCR2 em sua superfície, que medeiam a sua migração da medula óssea para o microambiente tumoral que, por sua vez, os monócitos clássicos recrutados liberam VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), um importante estimulador da angiogênese, que facilita o extravasamento de células tumorais e a metástase (JEONG; SUH; JUNG, 2019). A partir dessa ideia, Sanford *et al.*, (2013), demonstraram que a mobilização de monócitos inflamatórios foi fundamental para a progressão do câncer pancreático em humanos e, além disso, o eixo CCL2/CCR2 favoreceu essa mobilização e o recrutamento de monócitos inflamatórios da medula óssea para o tumor primário e fígado pré-metastático, facilitando o crescimento tumoral e metástase. Em algumas ocasiões os monócitos clássicos podem desempenhar funções antitumorais, como demonstrado no estudo de Long *et al.*, (2016), no qual foi utilizado IFN- γ e CCL2 liberados sistemicamente em resposta a um agonista de CD40 para redirecionar monócitos clássicos infiltrantes de tumor, facilitando a degradação da fibrose em adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC do inglês, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) e levando a uma maior eficácia da quimioterapia. Para os monócitos não clássicos, as suas funções variam dependendo do contexto em que estão inseridos (JEONG; SUH; JUNG, 2019). O estudo de Jung

et al., (2017) demonstrou que os monócitos não clássicos, em pacientes com câncer colorretal, possuem um papel imunossupressor, mediando a resistência ao tratamento de bloqueio da sinalização de VEGF. Sidibe *et al.*, (2018) mostrou também em seu estudo que, para melhorar a terapia antitumoral, o direcionamento com terapia antiangiogênica combinada com imunoterapia com IFN- γ para o recrutamento de monócitos proangiogênicos seria uma estratégia valiosa. Em outros estudos, os monócitos não clássicos exibiram propriedades antitumorais em diferentes tipos de tumor e tratamentos (JEONG; SUH; JUNG, 2019). Segundo Hanna *et al.*, (2015), em varios tipos tumorais primários como, melanoma e o carcinoma mamário, os monócitos não clássicos auxiliam na vigilância do câncer, ativando células NK e evitando a metástase no pulmão. O estudo de Kubo *et al.*, (2017), também mostrou que em melanomas (B16F10 e B16F0), metastático e não metastático, os monócitos não clássicos também ativam as células NK pela liberação de IL-15, uma importante citocina para a homeostase, evitando metástases pulmonares em camundongos com tumor primário.

Estudo analisam monócitos como biomarcadores diagnósticos e prognósticos em diferentes tipos de câncer. Feng *et al.*, (2011), forneceram evidências de que pacientes com câncer de mama têm uma frequência aumentada de monócitos CD14⁺ CD16⁺, que estão relacionados ao tamanho e estágio do tumor, podendo ser considerados como indicador para o diagnóstico precoce de câncer de mama. No estudo de Urakawa *et al.*, (2019), pacientes com câncer gástrico tiveram uma alta contagem de monócitos pré-operatórios, sugerindo ser um importante marcador para o prognóstico. Também, segundo análises de Shigeta *et al.*, (2016), a contagem elevada de monócitos foi associada a características agressivas e baixa sobrevida em pacientes com tumor de próstata resistente a castração, tratados com quimioterapia docetaxel. Em outro trabalho, Hu e seus colaboradores (2016), encontraram uma associação entre a contagem de monócitos do sangue periférico pré-operatório e a presença de metástase hepática em pacientes com câncer colorretal (CCR), podendo ser uma abordagem barata e viável para o prognóstico pós-operatório desses pacientes. Para Chen *et al.*, (2018), o carcinoma hepatocelular (CHC) é promovido pelo monócitos peritumorais, induzindo o aumento da autofagia em células cancerosas que povoam a borda invasora do CHC com TNF e IL1- β .

No microambiente tumoral, os monócitos recém migrados podem se diferenciar em macrófagos. A mobilização de macrófagos para os tecidos tumorais é regulada por vários sinais do meio, como citocinas, quimiocinas, componentes da matriz extracelular (ECM) e hipóxia (CHANMEE *et al.*, 2014). Os macrófagos podem ter vários subtipos e assumir vários fenótipos, dependendo do microambiente, sendo proposto dois estados distintos de ativação polarizada: o macrófago classicamente ativado (M1) e os subconjuntos de macrófagos ativados alternativamente (M2) (HAO *et al.*, 2012). Os estímulos M1, como o IFN- γ , LPS, TNF e até GM-CSF, induzem respostas inflamatórias prototípicas e marcadores específicos (MARTINEZ; GORDON, 2014). Macrófagos M1 desempenham papéis críticos na defesa inata do hospedeiro, matando células tumorais e patógenos através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- β , IL-12, TNF, IL-6 e IL-1 β , quimiocinas como CCL2, CXCL10 e CXCL11, e expressão de moléculas de apresentação de antígeno, como membros MHC (MARTINEZ; GORDON, 2014). Os macrófagos M2 sofrem polarização induzida por citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, que são importantes para a resposta imune Th2, e produzem citocinas antiinflamatórias como IL-10, IL-13 e TGF- β , que promovem o desenvolvimento tumoral (CHEN *et al.*, 2019). Mantovani *et al.*, (2004) dividiram os macrófagos M2 em subcategorias: quando ativados alternativamente *in vitro* por IL-4 ou IL-13 foram designados como macrófagos M2a; quando ativados por complexos imunes (Ic), em combinação com agonistas do receptor Toll-like (TLR) ou do receptor IL-1 (IL-1R), como M2b; quando ativados por IL-10 ou glicocorticóides (GC), como M2c. Em relação aos marcadores de superfície dos macrófagos, nos M1 são comuns MHC-II, CD68, CD80, CD86 e M2 com marcadores como CD163, CD200R, MGL-1, MGL-2 (CHEN *et al.*, 2019). Conhecida por regular a polarização de macrófagos, a IL-33, interleucina da família IL-1, é uma importante citocina pró-inflamatória e exerce sua atividade por meio da ligação ao seu receptor primário específico ST2 (AFFERNI *et al.*, 2018; MAI *et al.*, 2021). Essas observações e estudos indicam que a sinalização de IL-33/ST2 em macrófagos promove polarização M2, imunossupressão e progressão tumoral (AFFERNI *et al.*, 2018).

O microambiente tumoral é composto por diferentes tipos celulares e os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são os leucócitos mais predominantes, podendo constituir até 50% de uma massa tumoral (HAO *et al.*, 2012; KIM; BAE, 2016). No estudo de Ong *et al.*, (2012), foi relatado que, em tumores colorretais, os

TAMs são pró-inflamatórios (M1) e desempenham um papel antitumoral, promovendo células tumorais que expressam galactina-3, induzindo infiltração de TAMs e expressando uma série de citocinas pró-inflamatórias que ativam células T tipo 1, como IFN- γ , IL-1 e IL-6, o que leva a uma ampla resposta imune e destruição das células tumorais. No entanto, na maioria dos tumores, os TAMs são considerados anti-inflamatórios (M2) e isso sugere que um microambiente rico em macrófagos irá promover um tumor agressivo com alto potencial metastático (HAO *et al.*, 2012). Os TAMs possuem vários efeitos pró-tumorais que fornecem suporte para o desenvolvimento do câncer (CHEN *et al.*, 2019; YANG; ZHANG, 2017). Essas funções pró-tumorais dos TAMs incluem: iniciação e promoção do câncer, no qual os TAMs podem produzir citocinas, como IL-6/IL-17/IL-23, para induzir a iniciação e progressão do câncer através da via de sinalização NF- κ B ou STAT3 em células tumorais; a supressão imunológica de linfócitos T citotóxicos (CTL do inglês, *cytotoxic T lymphocytes*) pelos TAMs, ocorrendo através da inibição das respostas de CTL por meio da via de sinalização PD1/PD-L1 e da prostaglandina E2 (PGE2), IL-10 e CCL17/18/22 derivadas de TAM, que promovem a indução e recrutamento de Tregs, que também suprimem os CTLs; A metástase de células neoplásicas, que pode ser promovida por meio de remodelação da matriz extracelular derivada de tumor, onde TNF- α , VEGF e TGF- β derivados de TAMs podem ser transportados através da corrente sanguínea para órgãos de destino, que recrutam então células tumorais para esses órgãos e promove a formação de focos metastáticos; A angiogênese, que é impulsionada principalmente pela hipóxia, no qual o fator HIF-1 α , expresso por TAMs, regula a transcrição de genes como o VEGF, associado à angiogênese em locais hipóxicos (YANG; ZHANG, 2017). As principais estratégias terapêuticas anti-tumorais direcionadas aos TAMs incluem redução da sobrevivência desses TAMs, redução do recrutamento de macrófagos e troca de TAMs tipo M2 para fenótipo tipo M1 (ZHENG *et al.*, 2017). Como o macrófago M1 clássico possui atividade antitumoral, a reprogramação dos TAMs com perfil M2 em direção a um fenótipo antitumoral M1 parece ser uma boa alternativa para a terapia do câncer (CHANMEE *et al.*, 2014). Portanto, mais investigações são necessárias para identificar abordagens mais eficazes para elevar a proporção de TAMs tipo M1 para prevenir a progressão e recorrência do tumor (ZHENG *et al.*, 2017).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo procurou avaliar a capacidade de monócitos em promover e influenciar a atividade de células tumorais de carcinoma espinocelular *in vitro*, de modo a:

- Avaliar a expressão da molécula CD14 em amostras de carcinoma espinocelular, *in silico* e *in situ*;
- Avaliar se os fatores derivados de monócitos poderiam interferir na motilidade, capacidade de invasão, capacidade de proliferação e expressão de genes relacionados com a transformação epitélio-mesenquimal em células das linhagens tumorais SCC-25 e Detroit 562.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Esta investigação obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, sob o protocolo de pesquisa número 88330318.9.0000.5417 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima, protocolo de pesquisa número 37644714.7.0000.5475. Foi resguardado sigilo quanto à identidade dos pacientes envolvidos. Parte dos experimentos foi realizada no *Cedars-Sinai Medical Center* e obteve aprovação pelo Comitê de Ética do *Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA*. Todos os voluntários que concordaram em participar deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após a leitura da carta de informação ao paciente.

4.2. Casuística e seleção da amostra

Para esse estudo, selecionamos espécimes cirúrgicos de carcinoma espinocelular (n= 11) que são provenientes dos arquivos do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), de pacientes com idade que variam entre 58 e 91 anos, seguindo os seguintes critérios diagnósticos: lâminas histológicas e os respectivos laudos anatomopatológicos. As amostras selecionadas foram subdivididas em: 3 amostras de carcinoma espinocelular bem diferenciado (grau I), 5 amostras de CEC moderadamente diferenciado (grau II) e 3 amostras de CEC pouco diferenciado (grau III), de acordo com a diferenciação escamosa. Os critérios de exclusão foram prontuários com dados incompletos e espécimes cirúrgicas de CEC com material insuficiente para a realização posterior da imuno-histoquímica. Incluímos também na pesquisa, amostras de sangue periférico de indivíduos sadios como grupo controle (n=04). Estes indivíduos foram selecionados entre funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru e do *Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA*. Os indivíduos do grupo controle foram informados e esclarecidos sobre sua participação na pesquisa e tiveram a livre opção de participarem ou não participarem do estudo.

4.3 Imuno-histoquímica

A presença de CD14 em amostras de pacientes com carcinoma espinocelular foi detectada por imuno-histoquímica, utilizando-se anticorpo específico anti-CD14 (monócitos) humano, através do método da imunoperoxidase por meio da avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, *Vector, Burlingame*). O início da reação de imuno-histoquímica se deu com a desparafinização das lâminas em estufa, *overnight* e imersão em xilol. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato por 10 minutos. A lavagem dos cortes em solução de PBS 0,01 M (pH 7,2) foi realizada por 3 vezes consecutivas. Posteriormente, seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas com água oxigenada (H₂O₂) a 3% em metanol por 30 minutos. Após as lavagens com PBS, realizou-se o bloqueio dos sítios das ligações com proteínas inespecíficas. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpos primários anti CD14 humano (M5E2) (R&D Systems – Minneapolis, MN, USA) na diluição de 1/100 em PBS, em câmara úmida, em temperatura de 4°C, *overnight*. No dia seguinte, os cortes foram lavados três vezes com PBS e adicionados os anticorpos conjugados a biotina. Após lavagens sucessivas, adicionou-se o complexo biotina-avidina-peroxidase e as lâminas foram incubadas por 60 minutos. Finalmente, a reação foi revelada com DAB (*Vector*), a coloração e a contra coloração realizada em hematoxilina de Mayer por 50 segundos, lavadas em água corrente durante cinco minutos ou até a água não ficar mais corada. Desidratação dos espécimes em concentrações graduais de álcool (70% e absoluto) em duas trocas rápidas cada, imersão em xilol duas vezes, por três minutos cada. A montagem das lâminas se deu com a resina Permunt (*Fisher Scientific*) e lamínulas. As lâminas foram observadas em microscópio Invertido Leica DM IRBE com objetiva de 10X e 40X, por dois observadores independentes. A quantificação das células imunomarcadas foi realizada de forma subjetiva. Para se quantificar a frequência da imunomarcção, foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e em cada campo as células marcadas positivamente foram contadas na objetiva de 40X. A captura foi feita através do Microssistema de câmara digital LEICA DFC310 FX a cores, para rápida aquisição de imagem de alta qualidade no Centro Integrado de

Pesquisa (CIP) FOB/USP, o que permitiu resolução e identificação correta para a documentação.

4.4 Obtenção de células Mononucleares

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa e 40 ml coletados em tubo contendo anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi diluído em igual volume de meio RPMI e esta mistura foi aplicada sobre gradiente Ficoll-Paque (1,077g/ml) e centrifugada a 400 xg por 30 minutos, em temperatura ambiente, como descrito previamente (PERRI, 2021). A interface obtida, composta por células mononucleares do sangue periférico (PBMC), foi coletada e lavada duas vezes em meio RPMI. Após este procedimento, o precipitado foi ressuspense em 1 ml de meio contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e os leucócitos contados com o auxílio da câmara de Neubauer. A viabilidade foi determinada pela exclusão de coloração com azul de Trypan a 0,1%. Parte das células foi analisada por citometria de fluxo e a outra parte submetida à separação para o isolamento de monócitos.

4.5 Separação de monócitos

Os monócitos foram isolados por meio de seleção positiva com auxílio de *beads* magnéticas (Milteney Biotec, Auburn, CA, USA), como descrito previamente (PERRI, 2021). Primeiramente procedeu-se a separação de células CD3⁺ a partir das células mononucleares isoladas do sangue periférico de indivíduos sadios. Nesta etapa, as células 1×10^8 foram ressuspensas em 160 μ l de tampão e adicionado 40 μ l das “*beads*” anti-CD3, e esta mistura foi mantida no gelo por 15 minutos. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas 300 xg por 10 minutos e o pellet ressuspense em 500 μ l de tampão. Para a separação, a suspensão celular foi adicionada à coluna de separação (Milteney Biotec, Auburn, CA, USA), devidamente conectada ao suporte magnético (MACS Separator, Milteney Biotec, Auburn, CA, USA), aguardou-se a eluição por gravidade. Após a primeira eluição foi adicionado a coluna 5 ml de tampão, permitindo-se novamente a eluição por gravidade. As células que passaram através da coluna, parcela negativa da eluição, foram consideradas como uma população enriquecida em monócitos totais, designada como CD14⁺. Em

seguida, realizou-se a separação das células CD14⁺, para tal, as células foram ressuspensas em 160 µl adicionado 40 µl de “beads” anti-CD14, e esta mistura foi mantida no gelo por 15 minutos. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos e o pellet ressuspenso em 500 µl de tampão. Para a separação, a suspensão celular foi adicionada à coluna de separação MACS Column (Milteney Biotec, Auburn, CA, USA), devidamente conectada ao suporte magnético (MACS Separator, (Milteney Biotec, Auburn, CA, USA), aguardando-se a eluição por gravidade. Para a obtenção das células CD14⁺, a coluna de separação foi retirada do magnético e a suspensão de células eluída com 5 ml de tampão. A ambas as suspensões celulares foi adicionado volume de meio RPMI e os tubos centrifugados a 300 xg por 10 min à 4°C. As células foram ressuspensas com meio RPMI completo, contadas em Câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada com azul de Trypan 0,1%. A pureza dos monócitos foi averiguada por citometria de fluxo empregando o marcador CD14.

4.6 Cultura de monócitos

Os monócitos ($1,5 \times 10^6$) recém isolados foram distribuídos em placas de 24 poços, contendo meio de cultura RPMI suplementado com com 10% de soro bovino fetal e antibiótico e incubadas a 37°C com 5% de CO₂, como descrito previamente (PERRI, 2021). Após as 24 horas, o sobrenadante da cultura dos monócitos foi coletado e centrifugado a 300 xg por 10 minutos a 4°C, coletado e armazenado -80°C.

4.7 Citometria de fluxo para a análise de expressão de moléculas de superfície

A análise fenotípica de monócitos foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo padrão. As células (1×10^6 células) foram lavadas e incubadas em soro de coelho diluído em 2:10 em PBS para bloqueio de ligações inespecíficas por 60 minutos a 4°C. Em seguida, realizou-se a incubação com os anticorpos contra os determinantes específicos marcados com fluorocromos por 30 minutos a 4°C. Os anticorpos utilizados foram: anti-human CD68 (*PerCP*), CD64 (*FITC*), CD11c (*FITC*), CCR2 (*PE*), CD206 (*PE*), HLA-DR (*PerCP*), CD16 (*PE*), CD62L (*PE*) e CD56 (*PE*). Após este procedimento, as células foram lavadas duas vezes em PBS através de

centrifugação a 1200rpm, por 10 minutos a 4°C, ressuspensas em PBS-formol 1% e armazenadas em geladeira por um dia para posterior aquisição em FACS Calibur (Becton and Dickson, San Jose, CA USA). As análises foram realizadas com o programa *FlowJo* (TreeStar, versão 5.7.2). A partir dos eventos adquiridos foram determinadas populações individualizadas na “*Gate*” de monócitos, estabelecida com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

4.8 Células tumorais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas duas linhagens comerciais de células tumorais:

I. SCC-25 (ATCC®CRL-1628™) (Manassas, VA, USA) oriunda de carcinoma espinocelular oral (língua) de paciente do sexo masculino de 70 anos. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² inicialmente, em meio DMEM: F12 (ATCC® 30-2006™), contendo 1.2 g/l de bicarbonato de sódio, 2.5 mM L-glutamina, 15 mM HEPES, 0.5 mM piruvato de sódio e suplementado com 400 ng/ml hidrocortisona (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) e 10% soro fetal bovino, 10,000 U/ml penicilina, 10,000 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina (Lonza).

II. Detroit 562 (ATCC®CCL-138™) (Manassas, VA, USA) oriunda de carcinoma da faringe, de um sítio metastático pulmonar de um paciente do sexo feminino adulto. As células foram cultivadas em meio EMEM (ATCC® 30-2003™) contendo 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1500 mg/l de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% soro fetal bovino, 10,000 U/ml penicilina, 10,000 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina (Lonza).

As linhagens celulares foram negativas para micoplasma (MycoAlert™ - Myco alert kit, Lonza, USA) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera úmida. O meio de cultura de ambas as linhagens celulares foi trocado a cada dois dias até que as células atingissem uma confluência de aproximadamente 90% da área e então eram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Corning® NY, USA) e cultivadas em proporção dependente do planejamento de cada ensaio a ser realizado.

4.9 Ensaio de motilidade celular

Para o ensaio de motilidade, placas de 96 poços foram previamente tratadas com 100 µl de BME (*Cultrex Basement membrane extract*) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), matriz gelatinosa, e deixada em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, as diferentes linhagens de células tumorais, na densidade de 4×10^4 células da linhagem SCC-25 e 5×10^4 células da linhagem Detroit 562, foram distribuídas em placas de 96 poços, contendo meio de cultura suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), como descrito previamente por Perri (2021). Todas as linhagens foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após confluência, uma ferida artificial (*scratch*) foi realizada utilizando o Incucyte® WoundMaker® (capaz de realizar feridas iguais nos 96 poços, simultaneamente). Os poços foram lavados com PBS para remover as células não aderidas. Neste momento, foi adicionado o sobrenadante da cultura de monócitos e o respectivo controle negativo, em triplicata. A quantificação da migração celular foi analisada por sistema automatizado para microscopia em tempo real (Incucyte Zoom HD/2 channel, Essen Bioscience), durante 48 horas. Imagens foram capturadas e enviadas para um disco rígido externo conectado a rede, sendo possível acompanhar, em tempo real o andamento dos ensaios que aconteciam dentro da incubadora, no qual foram capturadas imagens em um intervalo de tempo de 2 horas. Essas imagens foram enviadas para um software próprio (IncuCyte® ZOOM Software-Essen BioScience), posteriormente foram analisadas.

4.10 Ensaio de proliferação

As diferentes linhagens de células tumorais, na densidade de 1×10^4 /poço células, foram distribuídas em placas de 96 poços, contendo meio de cultura suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂, como descrito previamente (Perri, 2021). Após, 16 horas, o meio foi retirado e substituído por um meio com 0,1% de BSA durante 4 horas (*fasting*). Após as 4 horas, o meio foi descartado e adicionado o sobrenadante da cultura de monócitos e o respectivo controle negativo, em triplicata. As placas foram, então, colocadas no IncuCyte e a proliferação celular acompanhada por 72 horas. O ensaio de proliferação foi realizado utilizando o IncuCyte ZOOM System (Essen BioScience, MI, USA).

4.11 Ensaio de invasão no *Transwell*

Para complementar os estudos de migração, avaliamos a capacidade dos sobrenadantes dos monócitos em inibir ou estimular a invasão celular. Para isso utilizamos um sistema de placas de transwell ou câmara de Boyden. A câmara superior foi recoberta com 40 µl de BME (*Basement membrane extract*) (Cultrex, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) na diluição de 1:20. As células na densidade de 1×10^5 /poço células foram distribuídas na câmara superior e, na porção inferior, foi adicionado 400 µl do sobrenadante das culturas, como descrito previamente por Perri (2021). As células foram incubadas por 48 horas. As células que atravessaram a barreira do BME foram fotografadas em microscópio EVOS M5000 (Invitrogen MA, USA) (5 campos por *transwell*).

4.12 RT-qPCR

4.12.1 Extração do RNA total

Utilizando 1 ml de Trizol Reagent (Life Technologies, USA), o RNA total das células foi isolado e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, como descrito previamente (Perri, 2021). Após a incubação, a suspensão foi transferida para tubos eppendorfs e adicionamos 200 µl de clorofórmio por tubo. As amostras foram então homogeneizadas por 15 segundos vigorosamente e incubadas a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Após a incubação, nos certificamos de que havia 2 fases no tubo (fase clara, aquosa e o Trizol). Centrifugamos a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após o término da centrifugação, a fase clara foi transferida para um novo tubo, onde adicionamos 500 µl de álcool isopropílico a cada 1 ml de Trizol e deixamos incubando por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 2x com 1 ml de álcool 75%, 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado novamente e os tubos permaneceram em temperatura ambiente aproximadamente 20 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram dissolvidos em 10 µl de água *RNAase-free*. A concentração de RNA foi determinada usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.12.2 Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa

Uma vez obtido o RNA total das células, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), como descrito previamente (Perri, 2021). Para cada reação foram utilizados 3 µg de RNA total, diluídas em 12.1 µl de DEPC H₂O, 5 µl de tampão de enzima (5x; Invitrogen MA, USA), 0,5 µl de Oligo dT 12-18 a (0.5mg/ml; Invitrogen MA, USA), 0,1 µl de cada dNTP (100mM; Invitrogen MA, USA), 0,5 µl MMLV RT Invitrogen MA, USA), 1 µl DTT (0.1M; Invitrogen MA, USA), completando 25 µl de solução de reação. As reações foram incubadas no termociclador (Labnet- Multigene™ Optimax, Burlington, MA, USA) e submetidas ao seguinte programa: 60 minutos a 38°C, 10 minutos a 90°C. Após o término da transcrição reversa, os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso para a reação da PCR em tempo real.

4.12.3 Reação de PCR

A reação de PCR para amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando o TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) e o termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), como descrito previamente (Perri, 2021). Primers e sondas para IL-33 (Hs00369211) e ST2 (Hs00545033) foram obtidos do fornecedor (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems) e as sequências são propriedades privadas. Os primers para os genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* foram projetados e sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT). A análise foi baseada no resultado do ciclo limiar (*Ct-cycle threshold*), cujo valor corresponde ao ciclo no qual a amplificação das amostras atingiu o grau de fluorescência com amplificação exponencial, que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo. Os dados de cada amostra foram normalizados pela expressão do gene de referência (*housekeeper gene*) *18S* ou *GAPDH* e as análises para cada primer através da quantificação relativa ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

4.13 Análise de expressão gênica *in silico* por bioinformática.

Dados da expressão gênica foram analisados utilizando a ferramenta “*Gene Expression Profile Interactive Analysis (GEPIA)*” (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). Este banco de dados é um servidor web interativo desenvolvido para analisar os dados de expressão de sequenciamento de RNA de 9.736 tumores e 8.587 amostras normais dos projetos *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* e *Genotype-Tissue Expression (GTEx)*, usando um canal de processamento padrão (TANG *et al.*, 2017). Esta análise objetivava avaliar a expressão gênica dos fatores de transcrição em amostras de pacientes com carcinoma espinocelular e normais, bem como a sobrevida geral de pacientes, de acordo com a baixa ou alta expressão de genes selecionados. Todos os dados foram processados em novembro e dezembro de 2020, utilizando amostras pareadas e não pareadas para comparar o nível de expressão de CD14 entre as amostras de tecidos normais e tumorais.

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelos testes *T student* ou *Mann-Whitney*, não pareados com distribuição normal e não-normal, respectivamente. Os dados foram expressos como a média \pm SEM dos resultados obtidos para cada grupo. O software utilizado foi o *Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA USA)*. A ferramenta GEPIA usa o teste *Log-rank* para a análise de sobrevida, e as informações do intervalo de confiança de 95% estão incluídas no gráfico de sobrevivência. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise de expressão gênica *in silico* e por imuno-histoquímica de expressão de CD14.

Inicialmente avaliamos se a expressão de CD14, marcador específico para monócitos, constitui um fator prognóstico para o carcinoma espinocelular. Para tal, utilizamos a plataforma GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Anylisis*), uma ferramenta que acessa dados públicos de expressão gênica por *microarray* e informações clínicas. Na figura 1 são apresentados os dados da análise *in silico* da expressão de CD14 em amostras de pacientes com carcinoma espinocelular cervical e adenocarcinoma endocervical (CESC, n=306), carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSC, n=519), carcinoma espinocelular de pulmão (LUSC, n= 486) e sua correlação com sobrevivência global. De acordo com a análise do banco de dados público, mostrado na figura 1A, o carcinoma espinocelular cervical (CESC) apresenta expressão de CD14 estatisticamente diferente do tecido sadio (N) ($p < 0,05$). Em amostras de pacientes com carcinoma pulmonar (LUSC), a expressão de CD14 foi maior em tecidos normais e, em amostras de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSC), a expressão de CD14 foi maior em tecidos tumorais (figura 1A). Analisando o gráfico referente a expressão de CD14 em pacientes portadores de carcinoma espinocelular pulmonar (LUSC) (figura 1B), os dados evidenciaram baixo nível de expressão de CD14 e correlação com maior sobrevida dos pacientes, e estes dados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0.00054$).

Uma vez que confirmamos a associação da expressão de CD14 com maior sobrevida dos pacientes, procedemos a análise por imuno-histoquímica da presença de células CD14⁺ em amostras de carcinoma espinocelular (figura 2). Os resultados demonstraram imunorreatividade para CD14 em amostras de carcinoma espinocelular de grau II, seguido por amostras de grau I e por último em amostras de grau III, como ilustrado na figura 2A. Como pode ser visto na figura 2, detectamos monócitos CD14⁺ em torno de vasos sanguíneos e dentro do tecido tumoral.

5.2 Efeito do meio condicionado de monócitos sobre a motilidade de células das linhagens SCC-25 e Detroit 562.

Estudos recentes indicam que os monócitos são reguladores importantes do desenvolvimento e progressão tumoral, com os diferentes subtipos de monócitos apresentando papéis opostos no crescimento tumoral e prevenção da disseminação metastática (QIAN et al., 2011; HANNA et al., 2015; ENGBLOM; PFIRSCHKE; PITTET, 2016). Com base nessas informações, buscamos avaliar o efeito do meio condicionado de monócitos sobre a atividade de células tumorais *in vitro*. Para estes ensaios foram utilizadas duas linhagens comerciais de células tumorais (SCC-25 e Detroit 562) e preparado meio condicionado (MC) proveniente de cultura de monócitos de indivíduos saudáveis.

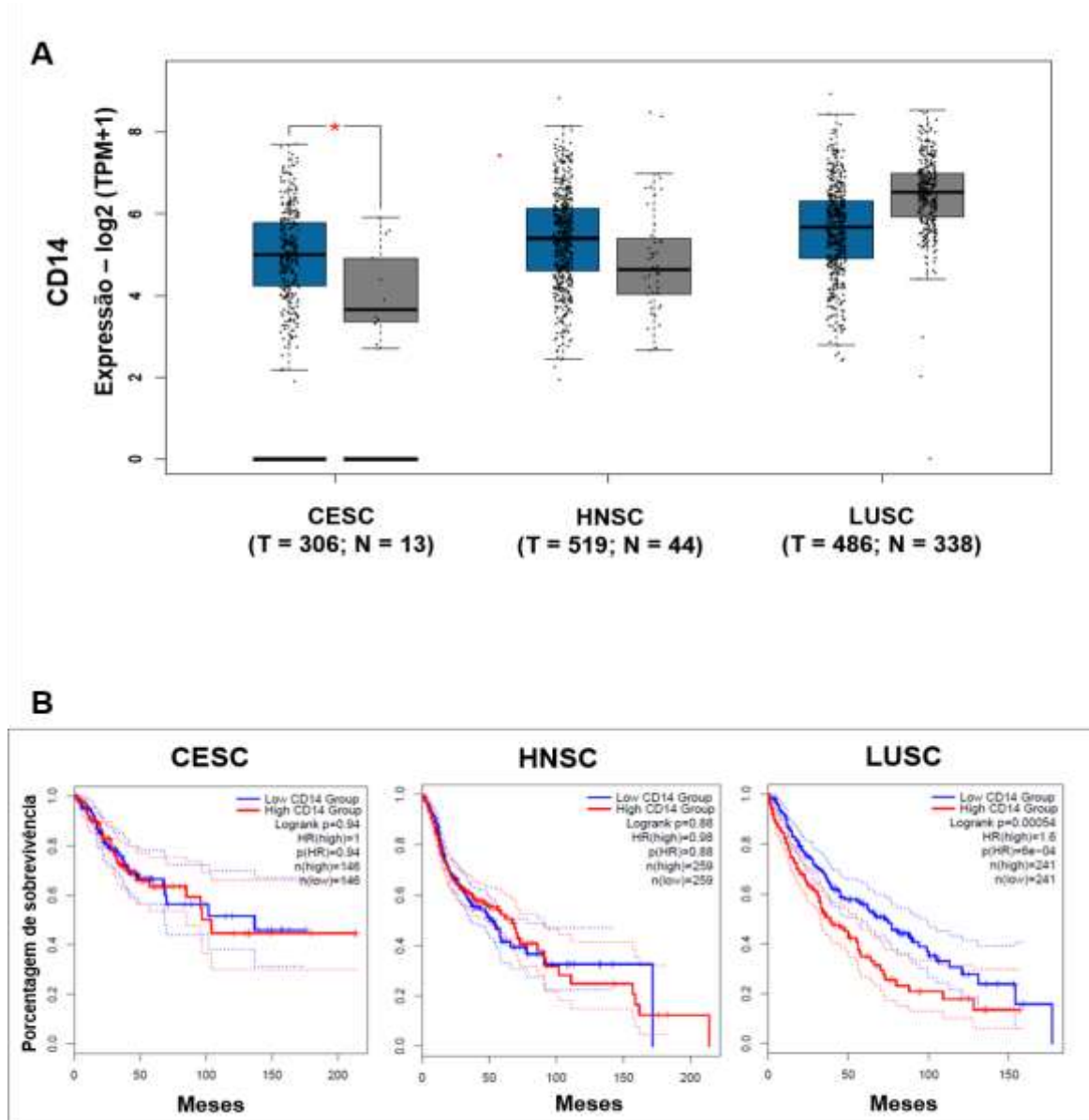


Figura 1 – Expressão de CD14 em carcinoma espinocelular. A análise de expressão gênica foi realizada usando a ferramenta GEPIA e o banco de dados público TGCA. **(A)** Análise de bioinformática comparativa da expressão de CD14 entre amostras de tecido sadio (N) e de carcinoma espinocelular (T) em dados públicos do GEPIA. **(B)** Curvas de sobrevida em pacientes com carcinoma espinocelular, divididos em alta (linha vermelha) e baixa (linha azul) expressão de CD14. * $p < 0,05$. *Log-rank test*. CESC - carcinoma espinocelular cervical e adenocarcinoma endocervical; HNSC - carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço; LUSC - carcinoma espinocelular de pulmão.

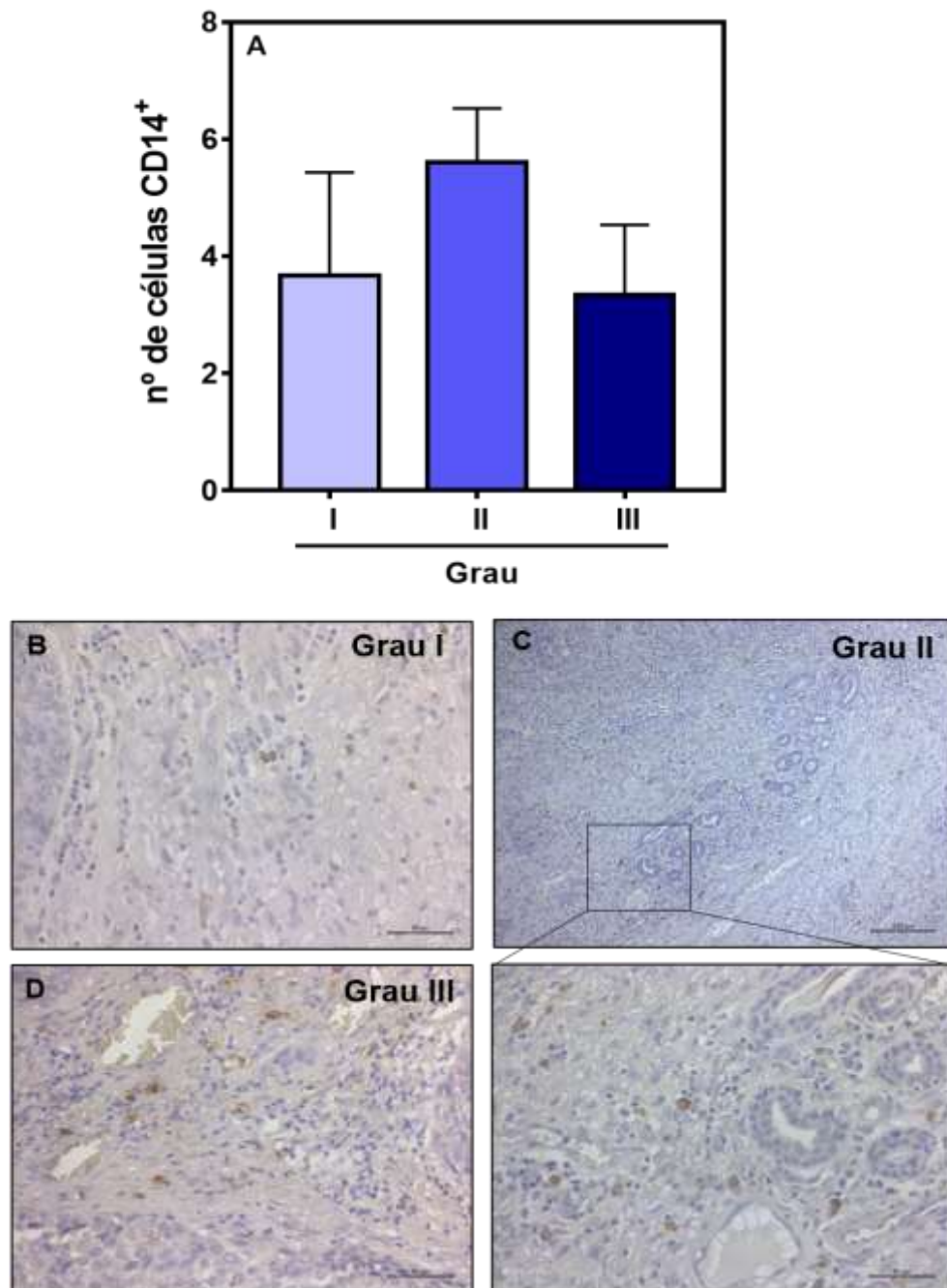


Figura 2 – Presença de CD14 em amostras de carcinoma espinocelular. A presença de células expressando a molécula CD14 foi determinada por imuno-histoquímica. **(A)** As barras indicam a média \pm SEM do número de células marcadas positivamente para CD14 no infiltrado inflamatório, de acordo com o grau de displasia. Fotomicrografias de amostras representativas de carcinoma espinocelular classificadas em Grau I **(B)**, Grau II **(C)**, Grau III **(D)**. Aumento de 400x.

Iniciamos estes experimentos analisando a população de monócitos isolada do sangue periférico de indivíduos saudáveis (figura 3). A análise dos dados demonstrou alta expressão de CD68, CD64, CD11c, CCR2, e HLA-DR em monócitos recém isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis. A expressão de CD16, CD62L, CD206 e CD56 foi detectada em uma percentagem menor de monócitos CD14+. Nossos resultados confirmaram a pureza da população de monócitos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis e indicaram o predomínio de monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻).

Em seguida, analisamos o efeito do meio condicionado de monócitos na motilidade das células tumorais. Na figura 4 são apresentadas as fotomicrografias, obtidas em tempo real, da cultura de células da linhagem SCC-25 cultivadas na presença e ausência do meio condicionado de monócitos. As imagens evidenciam que as células da linhagem SCC-25, expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, apresentaram níveis de motilidade menores que os observados para as células cultivadas na presença apenas do meio de cultura ($p < 0,01$) (figura 5A). Os resultados acompanhados no gráfico, em tempo real, confirmaram que as células da linhagem SCC-25, expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, apresentaram menor motilidade no período entre 13 a 22h de cultivo, sendo observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$, $p < 0,0001$) (figura 5B). Após este período, observou-se 90% de confluência para as células expostas ao meio condicionado de monócitos, enquanto as células controle estavam próximo de 100% de confluência (figura 5C). No período de 37h, as células da linhagem SCC-25, expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, apresentaram níveis de motilidade com porcentagem de confluência semelhantes aos observados para as células cultivadas na presença apenas de meio de cultura (figura 5A).

Quando analisamos as células da linhagem Detroit 562, as imagens evidenciam que estas células expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, também apresentaram níveis de motilidade foram menores que os observados para as células cultivadas na presença apenas do meio de cultura ($p < 0,01$) (figuras 6 e 7A). Os resultados acompanhados no gráfico, em tempo real, confirmaram que as células da linhagem Detroit 562, expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, apresentaram menor motilidade no período entre 13 a 22h de cultivo, sendo observada diferença estatisticamente significativa, quando comparado as

células cultivadas na ausência deste estímulo ($p < 0,001$) (figura 7B). Após 24h de exposição ao meio condicionado de monócitos, a motilidade relativa não foi estatisticamente significativa quando comparado as células cultivadas na ausência deste estímulo (figura 7C).

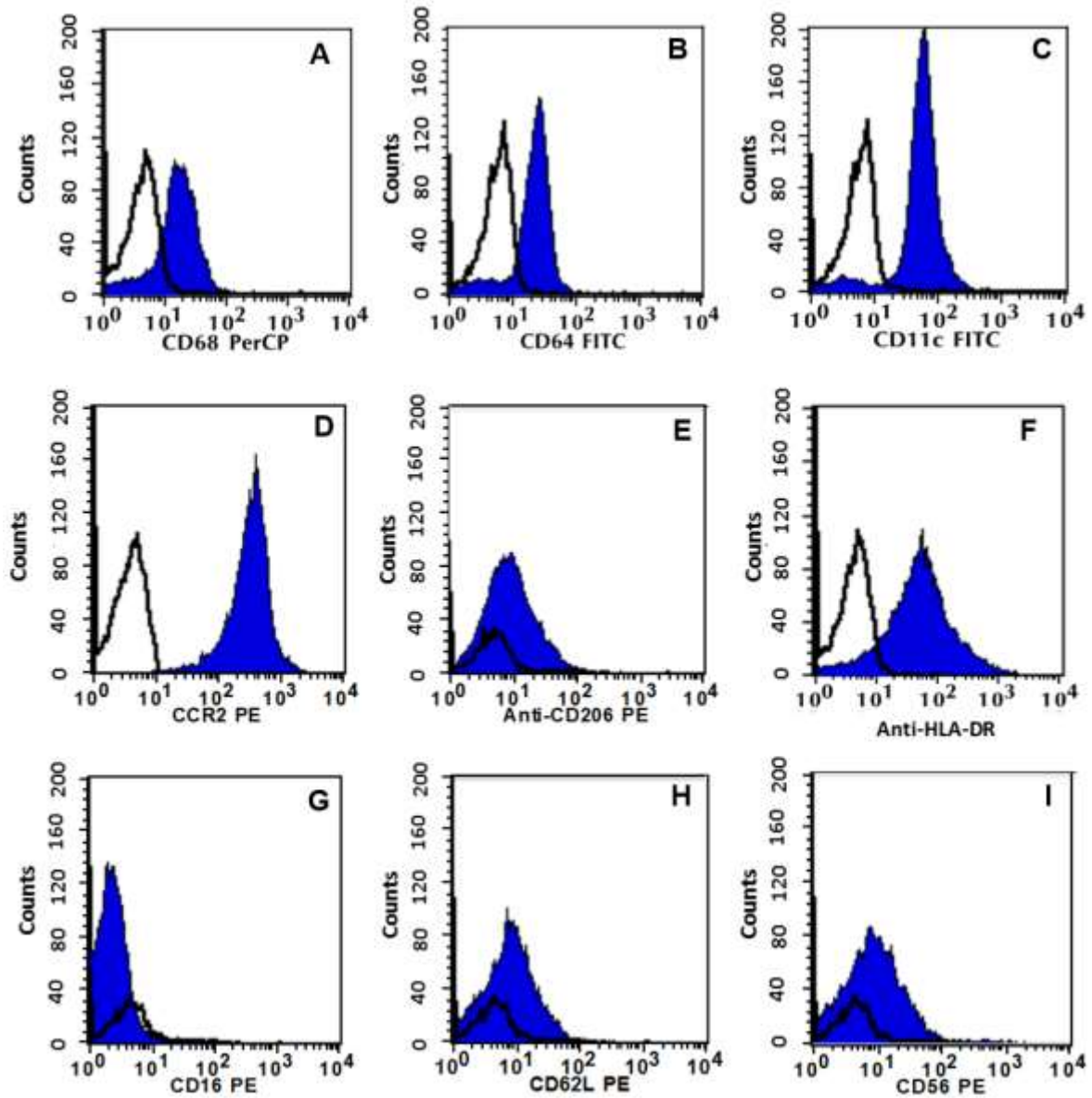


Figura 3 - Caracterização de Monócitos. Células mononucleares recém isoladas do sangue periférico foram separadas por *beads* e a população de células CD14⁺ analisadas por citometria de fluxo. Análise do percentual de células CD14-positivas que expressaram os marcadores CD68 (A), CD64 (B), CD11c (C), CCR2 (D), CD206 (E), HLA-DR (F), CD16 (G), CD62L (H) e CD56 (I). Resultados de um indivíduo sadio (representativo de 4 experimentos independentes, para quatro indivíduos sadios, com variação inferior a 10%).

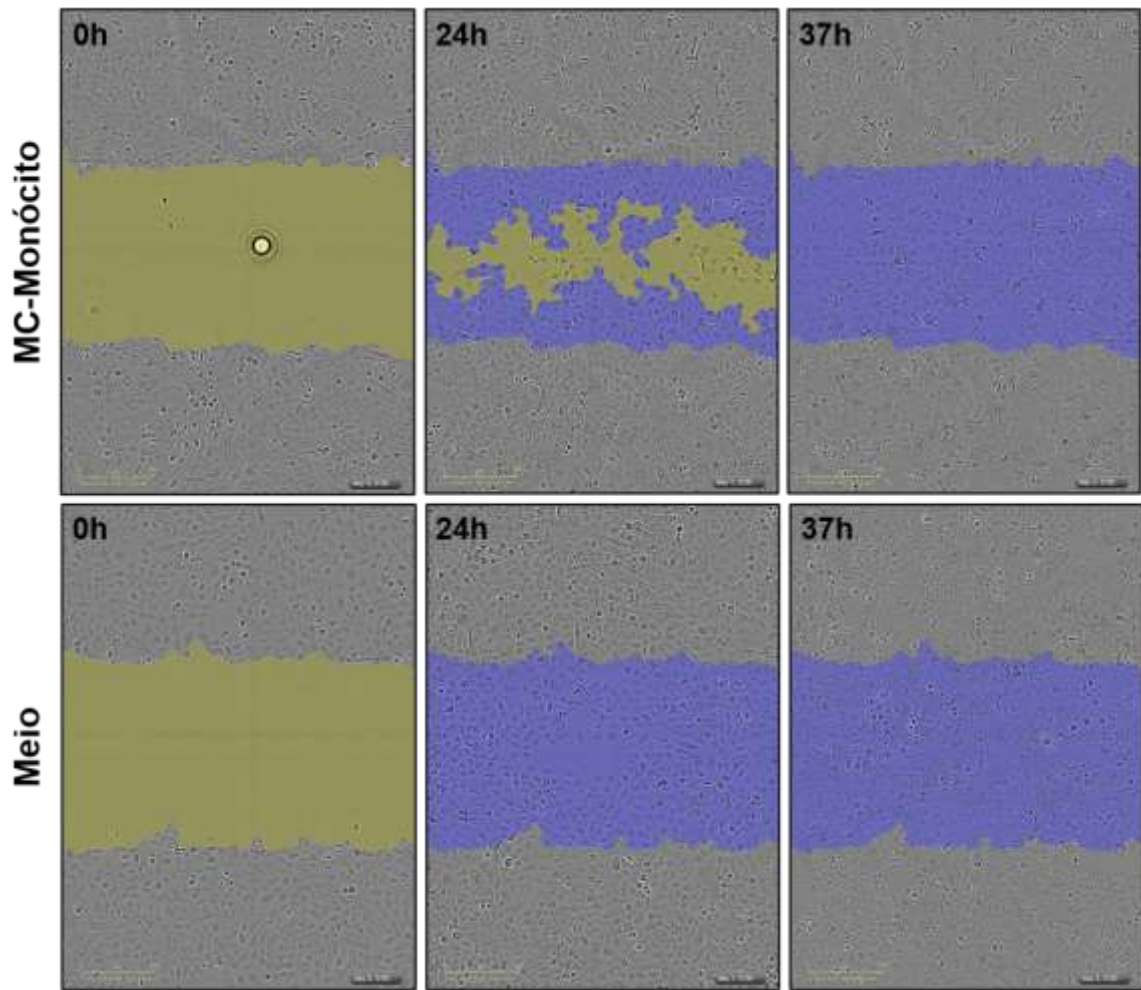


Figura 4 - Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida e motilidade da linhagem celular SCC-25 após a exposição ao meio condicionado de monócitos. Células da linhagem SCC-25 foram expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos e acompanhadas por um período de 37 horas. Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de fechamento da ferida foram adquiridas a cada 2 horas. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h, 24h e 37h para as células cultivadas na presença do meio condicionado da cultura de monócitos e, as do quadro inferior, para as células cultivadas na presença de meio. Em amarelo é representada a ferida e em azul as camadas de confluência a partir das bordas. MC=meio condicionado.

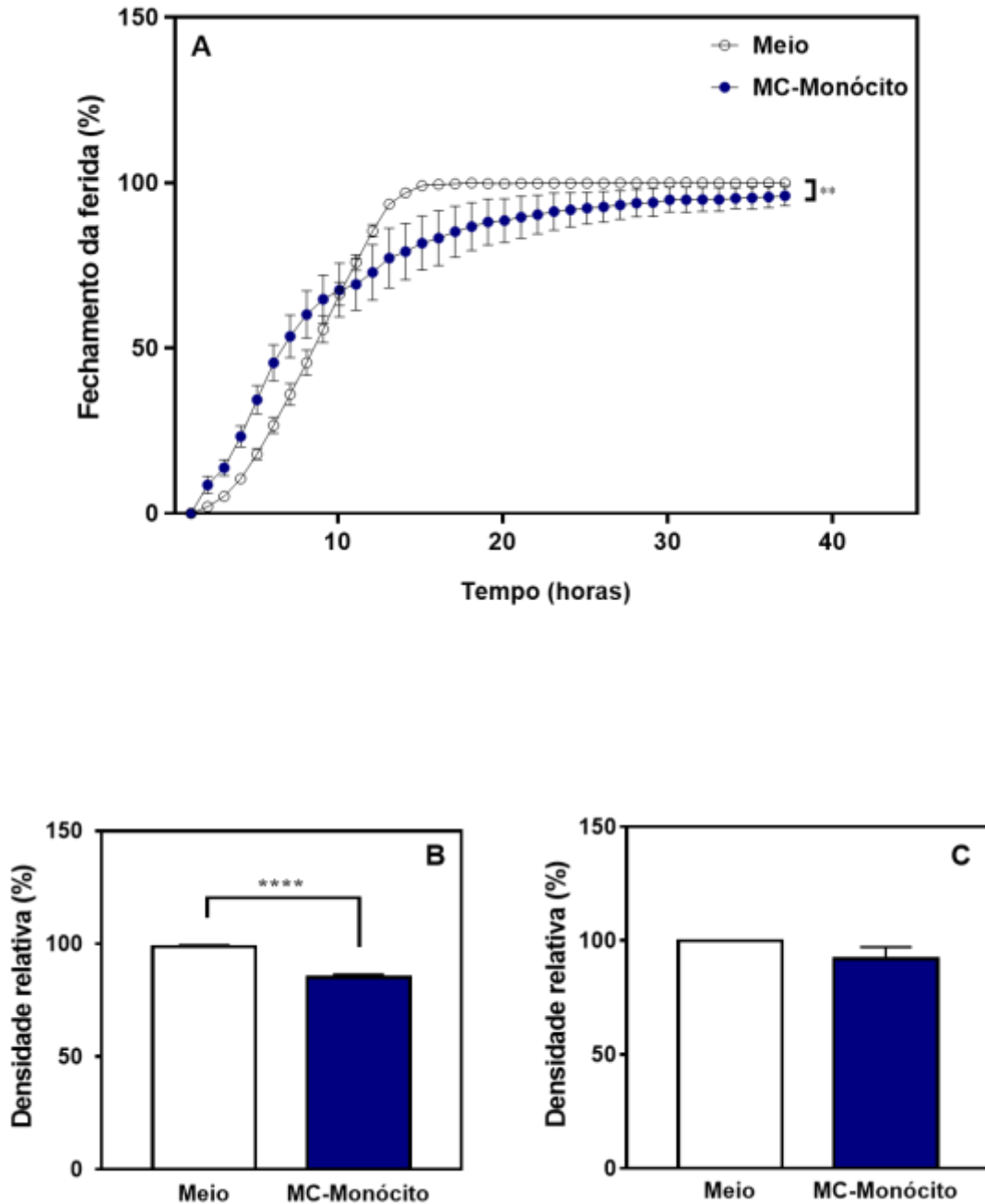


Figura 5 - Ensaio de motilidade da linhagem celular SCC-25 após a exposição ao meio condicionado de monócitos. (A) O gráfico ilustra a progressão e confluência da ferida durante o período de 37 horas. **(B)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após o período de 13h à 22h. **(C)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 24h. Os dados são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. *Test t student e Mann-Whitney test*. MC= meio condicionado.

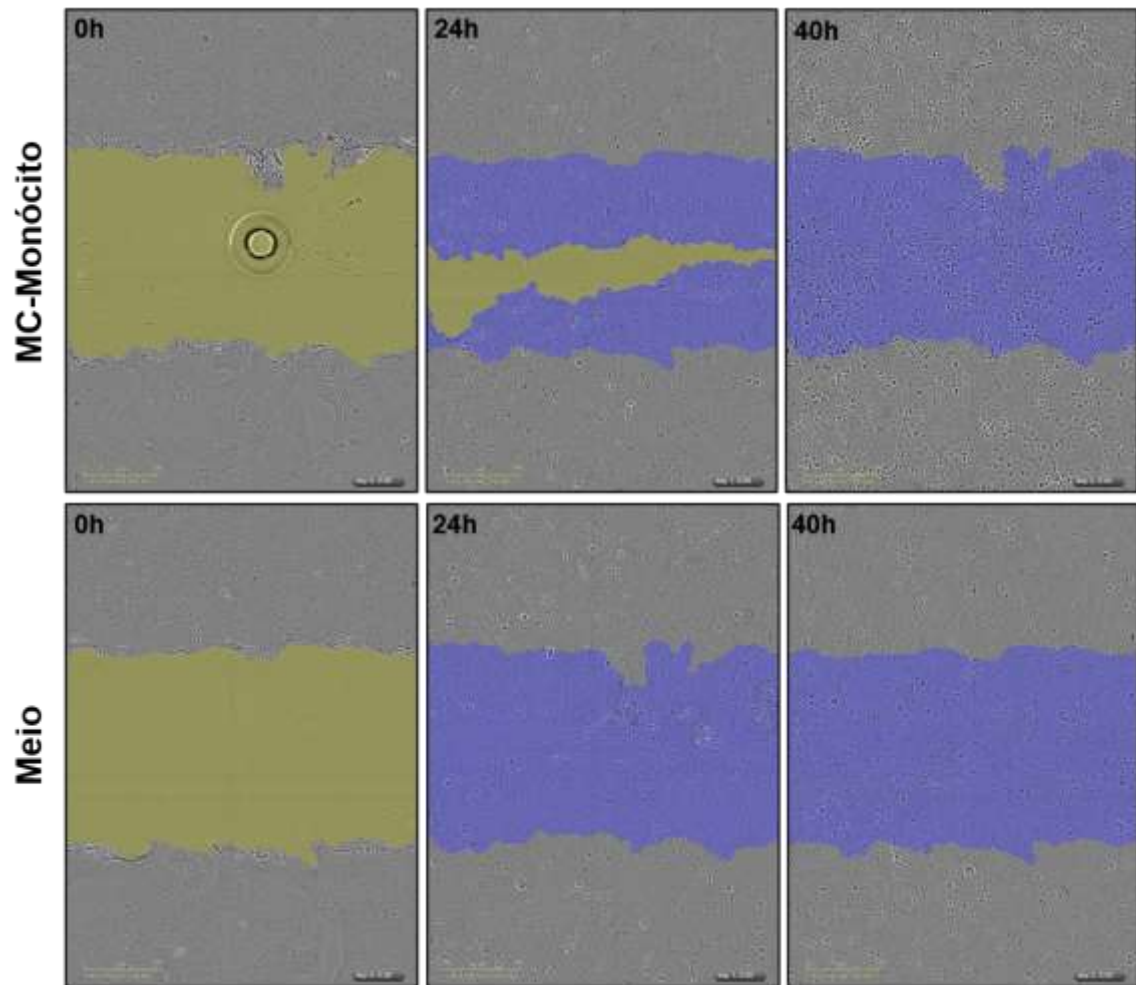


Figura 6 - Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida e motilidade da linhagem celular Detroit 562 após a exposição ao meio condicionado de monócitos. Células da linhagem Detroit 562 foram expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos e acompanhadas por um período de 40 horas. Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de fechamento da ferida foram adquiridas a cada 2 horas. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h, 24h e 40h para as células cultivadas na presença do meio condicionado da cultura de monócitos e, as do quadro inferior, para as células cultivadas na presença de meio. Em amarelo é representada a ferida e em azul as camadas de confluência a partir das bordas. MC=meio condicionado.

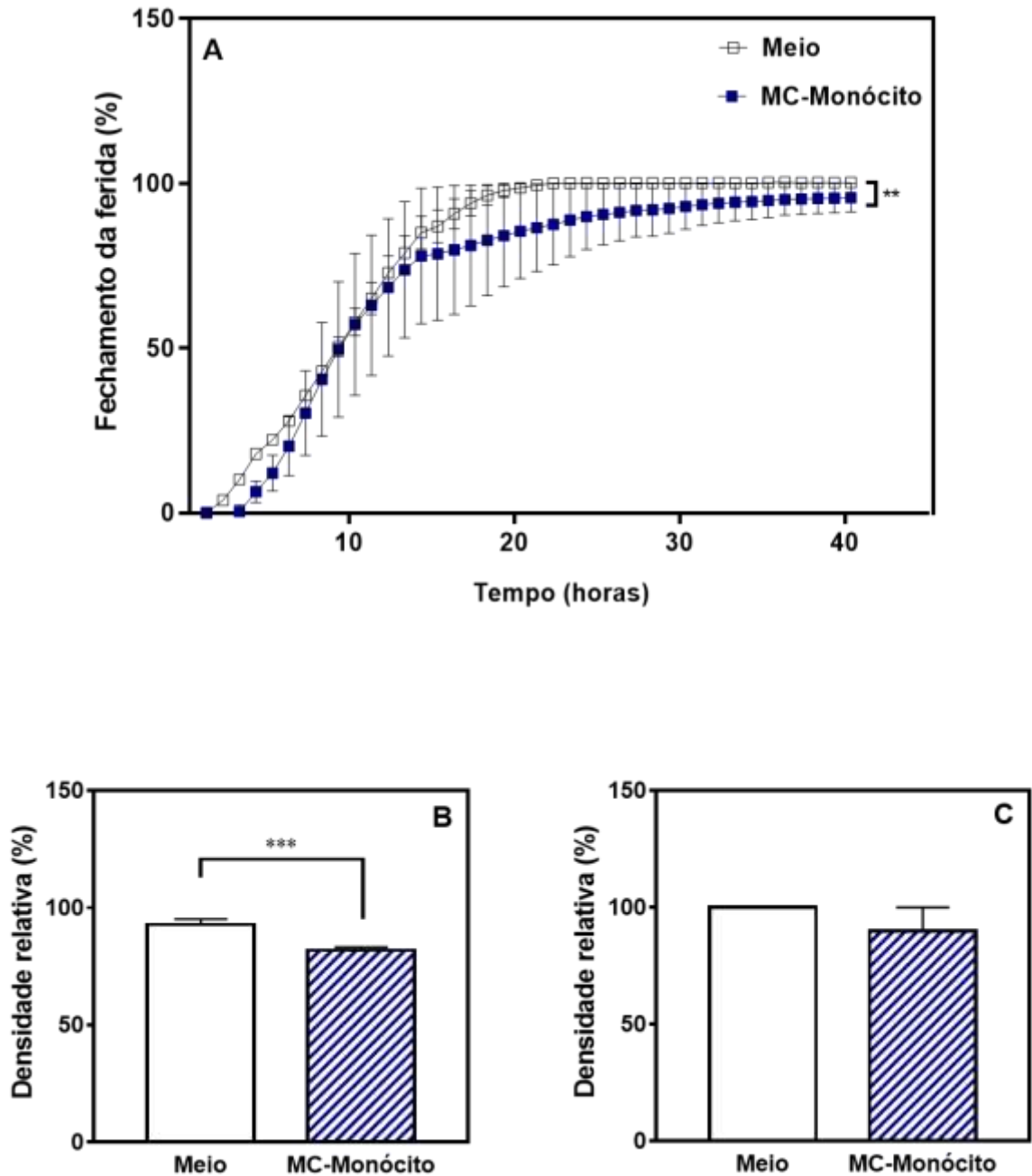


Figura 7 - Ensaio de motilidade da linhagem celular Detroit 562 após a exposição ao meio condicionado de monócitos. (A) O gráfico ilustra a progressão e confluência da ferida durante o período de 40 horas. **(B)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após o período de 13h à 22h. **(C)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 24h. Os dados são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. *Test t student e Mann-Whitney test.* MC= meio condicionado.

5.3 Efeito do meio condicionado de monócitos sobre a capacidade de invasão de células da linhagem SCC-25.

Para determinar o efeito do meio condicionado da cultura dos monócitos na invasão de células tumorais, foi realizado o ensaio de invasão em placas *transwell* recobertas com matriz gel. Células da linhagem tumoral SCC-25 que foram expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos apresentaram alta capacidade de invasão (figura 8), sendo esse um resultado significativamente estatístico, quando comparado as células cultivadas na ausência deste estímulo ($p < 0,0001$). Este ensaio também foi realizado com a linhagem celular Detroit 562, mas as células não migraram ou invadiram através do Matriz gel.

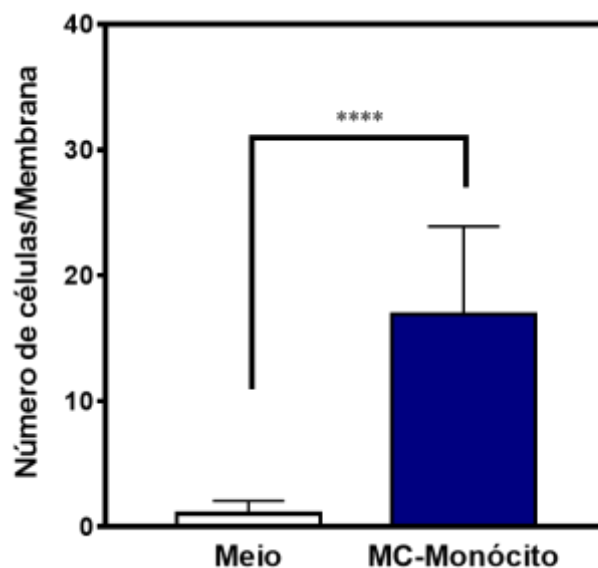


Figura 8 - Ensaio de invasão e migração em *transwell* para células da linhagem SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de monócitos. (A) As barras representam o número de células que atravessaram a membrana. Os resultados são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. **** $p < 0,0001$, *Test t student*. MC= meio condicionado.

5.4 Efeito do meio condicionado de monócitos sobre a proliferação das células das linhagens SCC-25 e Detroit 562.

Para verificar a influência do meio condicionado da cultura de monócitos sobre as células da linhagem SCC-25, foi realizado o ensaio de proliferação no *Incucyte*. Após as primeiras 24 horas de exposição das células ao meio condicionado de monócitos, há evidências de que a taxa de proliferação celular apresentava aumento progressivo e já eram muito expressivas, levando a resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$), quando comparado aos valores observados para o controle (figura 9A).

O mesmo ensaio de proliferação foi realizado para as células da linhagem Detroit 562, expostas em meio condicionado da cultura de monócitos e as taxas detectadas foram contrárias às observadas para as culturas de células da linhagem SCC-25. Após aproximadamente 24 horas de exposição das células ao meio condicionado de monócitos, a taxa de proliferação celular teve aumento progressivo (figura 9B). Entretanto, a taxa de proliferação das células da linhagem Detroit 562, expostas ao meio condicionado de monócitos, foi menor e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado as células cultivadas na ausência do estímulo de monócitos.

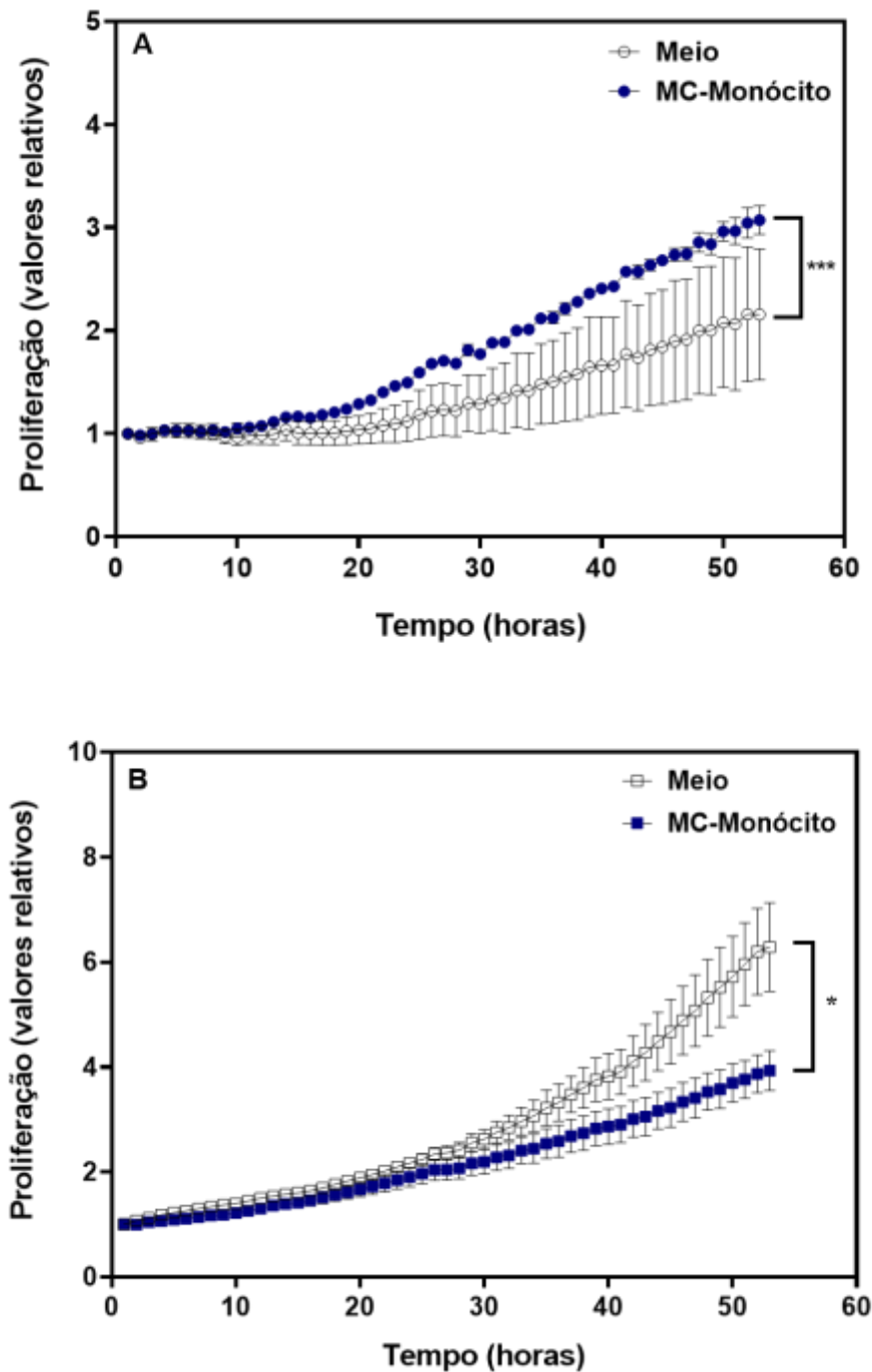


Figura 9 - Ensaio de proliferação das linhagens celulares SCC-25 e Detroit 562 estimuladas com o meio condicionado de monócitos. (A) O gráfico ilustra a progressão da resposta proliferativa das células da linhagem tumoral SCC-25 durante o período de 53 horas. **(B)** O gráfico ilustra a progressão da resposta proliferativa das células da linhagem tumoral Detroit 562 durante o período de 53 horas. Os resultados são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. *Mann-Whitney test*

5.5 Expressão de *IL-33* e seu receptor *ST2* pelas linhagens celulares *SCC-25* e *Detroit 562* expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos.

Utilizando o ensaio de RT-qPCR, avaliamos a expressão de *IL-33* e *ST2* em células das linhagens *SCC-25* e *Detroit 562* expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos. As células da linhagem *SCC-25* expostas ao meio condicionado de monócitos apresentaram expressão de *ST2* diminuída em relação ao controle, ou seja, o meio condicionado de monócitos inibiu a expressão do gene *ST2* por essas células, e esta diferença foi estatisticamente significativa (figura 10). Quando analisamos a expressão de *IL-33*, os dados evidenciaram que o meio condicionado de monócitos induziu diminuição na expressão de *IL-33* em células da linhagem tumoral *SCC-25* (figura 10) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em células da linhagem *Detroit 562*, constatou-se que o meio condicionado de monócitos não induziu aumento da expressão de *ST2*, e este valor foi similar ao controle. Em relação à expressão de *IL-33*, o meio condicionado de monócitos levou à diminuição na expressão deste gene em relação ao controle, contudo, não foi detectado diferença estatística significativa (figura 11).

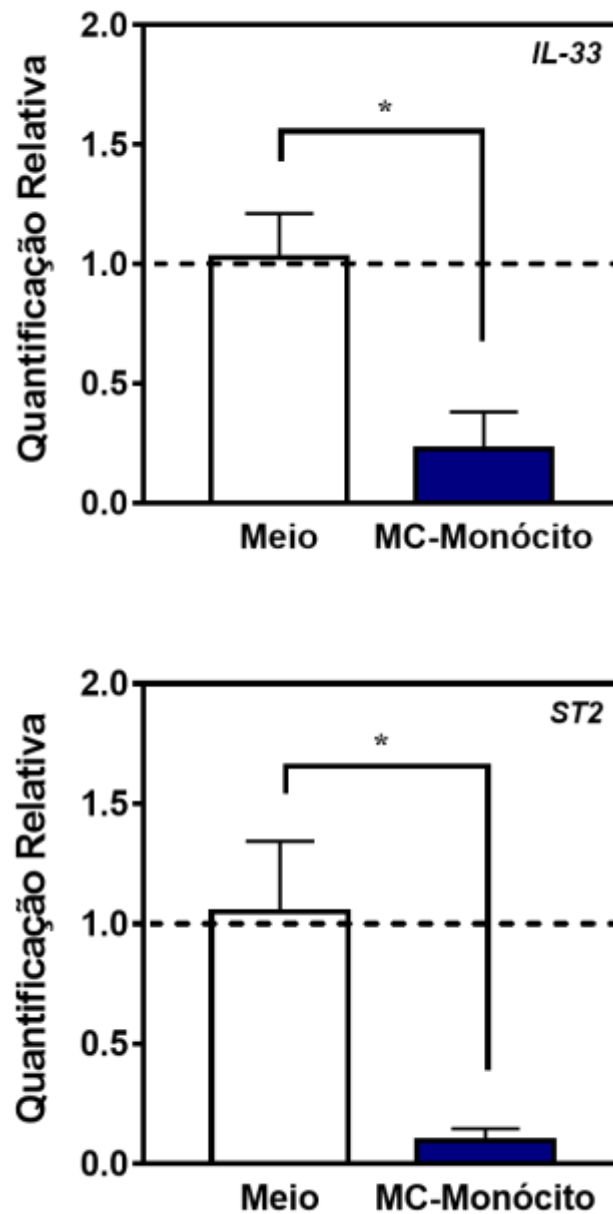


Figura 10 - Expressão de *IL-33* e *ST2* pela linhagem celular SCC-25 exposta ao sobrenadante da cultura de monócitos. As células da linhagem tumoral SCC-25 foram estimuladas com o meio condicionado da cultura de monócitos e o cDNA foi empregado em ensaios de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para cada gene analisado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada tratamento, indicando o valor de mediana. * $p < 0,05$. *Test t student*. MC= meio condicionado da cultura de monócitos.

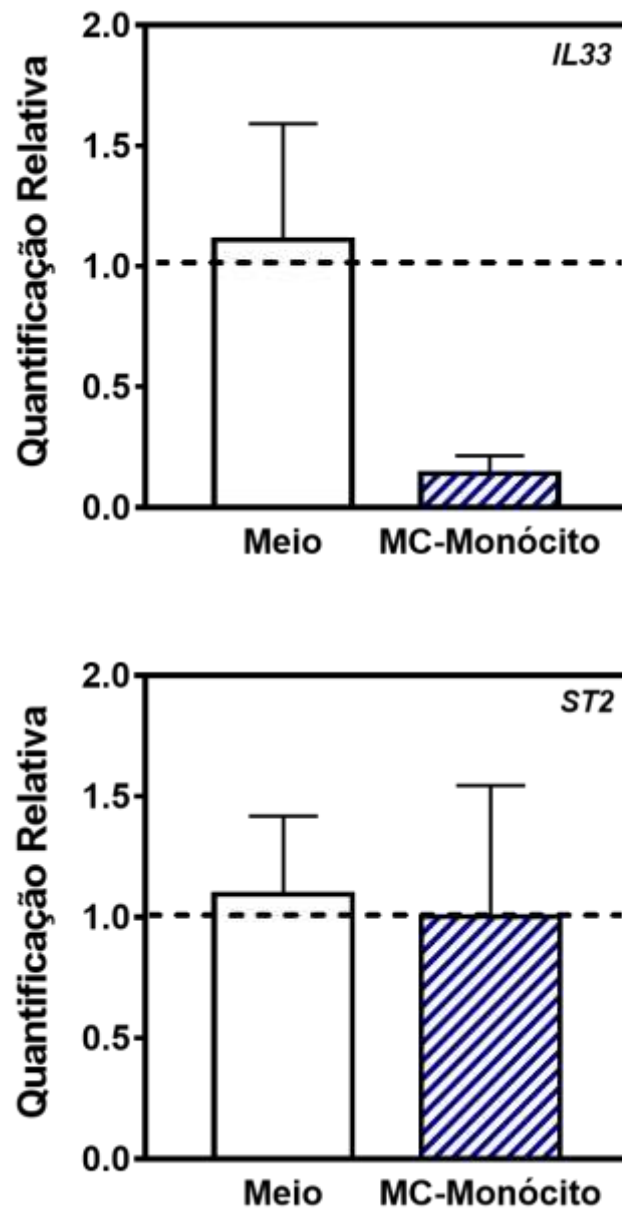


Figura 11 - Expressão de *IL-33* e *ST2* pela linhagem celular Detroit 562 exposta ao sobrenadante da cultura de monócitos. As células da linhagem tumoral Detroit 562 foram estimuladas com o meio condicionado da cultura de monócitos e o cDNA foi empregado em ensaios de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para cada gene analisado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada tratamento, indicando o valor de mediana. *Test t student*. MC= meio condicionado da cultura de monócitos.

5.6 Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* pelas linhagens celulares SCC-25 e Detroit 562 expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos.

Utilizando o ensaio de RT-qPCR, avaliamos a expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* nas linhagens SCC-25 e Detroit 562, quando expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos. Ao expor a linhagem SCC-25 ao meio condicionado de monócitos, os resultados evidenciaram que os genes *MYC* e *SOX2* foram minimamente ou não foram expressos por células da linhagem tumoral SCC-25 expostas ao meio condicionado de monócitos, que então, quando comparados ao meio, resultaram em diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (figuras 12B e 12E). Em relação a análise da expressão de *EPCAM*, constatou-se que o meio condicionado de monócitos induziu aumento da expressão deste gene quando comparado ao meio, contudo, estes valores não foram estatisticamente significantes (figura 12H). De modo contrário, o meio condicionado de monócitos induziu diminuição na expressão de *SYP* por células da linhagem SCC-25, entretanto, esses valores não foram estatisticamente significativos (figura 12I). Ademais, o meio condicionado de monócitos não alterou significativamente a expressão de *EZH2*, *MYCN*, *NANOG*, *AURKA*, e *CHGA* por células da linhagem tumoral SCC-25, quando comparado aos valores do meio.

A análise da expressão gênica por células da linhagem tumoral Detroit 562 evidenciou que a exposição ao meio condicionado de monócitos induziu a expressão de *SOX2* com diferença estatisticamente significativa em relação ao meio ($p < 0,01$) (figura 13E). De modo contrário, a estimulação com o meio condicionado de monócitos inibiu significativamente a expressão dos genes *AURKA* e *EPCAM* em células da linhagem Detroit 562, quando comparado ao meio ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) (figuras 13F e 13H). Os genes *MYC* e *SYP* não foram expressos ou foram expressos minimamente por células da linhagem Detroit 562 expostas ao meio condicionado de monócitos, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (figuras 13B e 13I). Constatou-se, ainda, que o meio condicionado de monócitos induziu a expressão de *CHGA* por células da linhagem tumoral Detroit 562, mas estes valores não apresentaram diferença estatística significativa (figura 13G). Em relação a expressão de *EZH2*, *MYCN* e *NANOG*, os dados evidenciaram que o meio condicionado de monócitos não alterou

significativamente a expressão destes genes por células da linhagem tumoral Detroit 562, quando comparado ao meio (figura 13A e 13D).

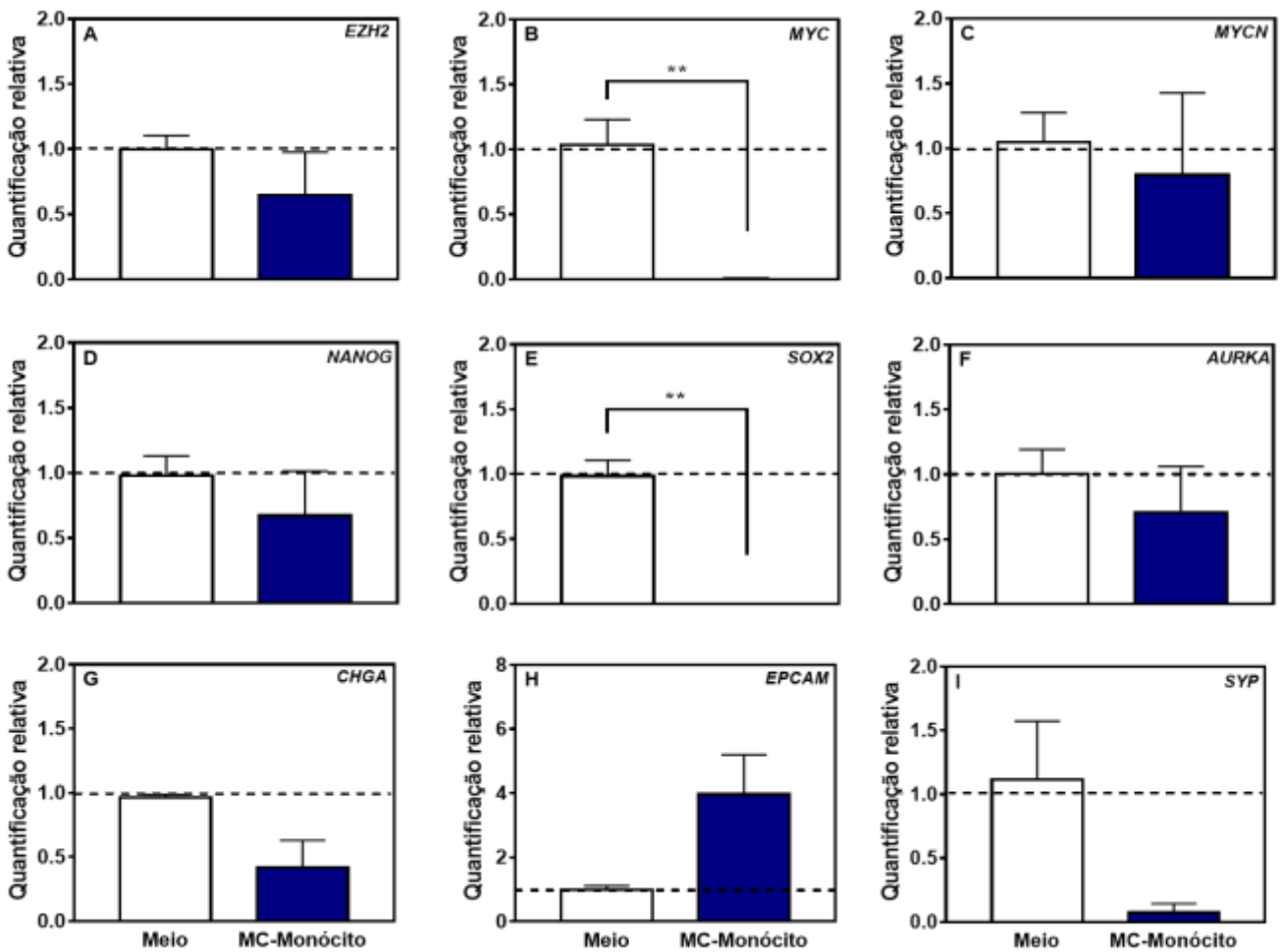


Figura 12 – Expressão de *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 expostas ao meio condicionado de monócitos. As células da linhagem tumoral SCC-25 foram estimuladas com o meio condicionado de monócitos e o cDNA foi empregado em ensaios de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para cada gene analisado. Os resultados são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *T student*.

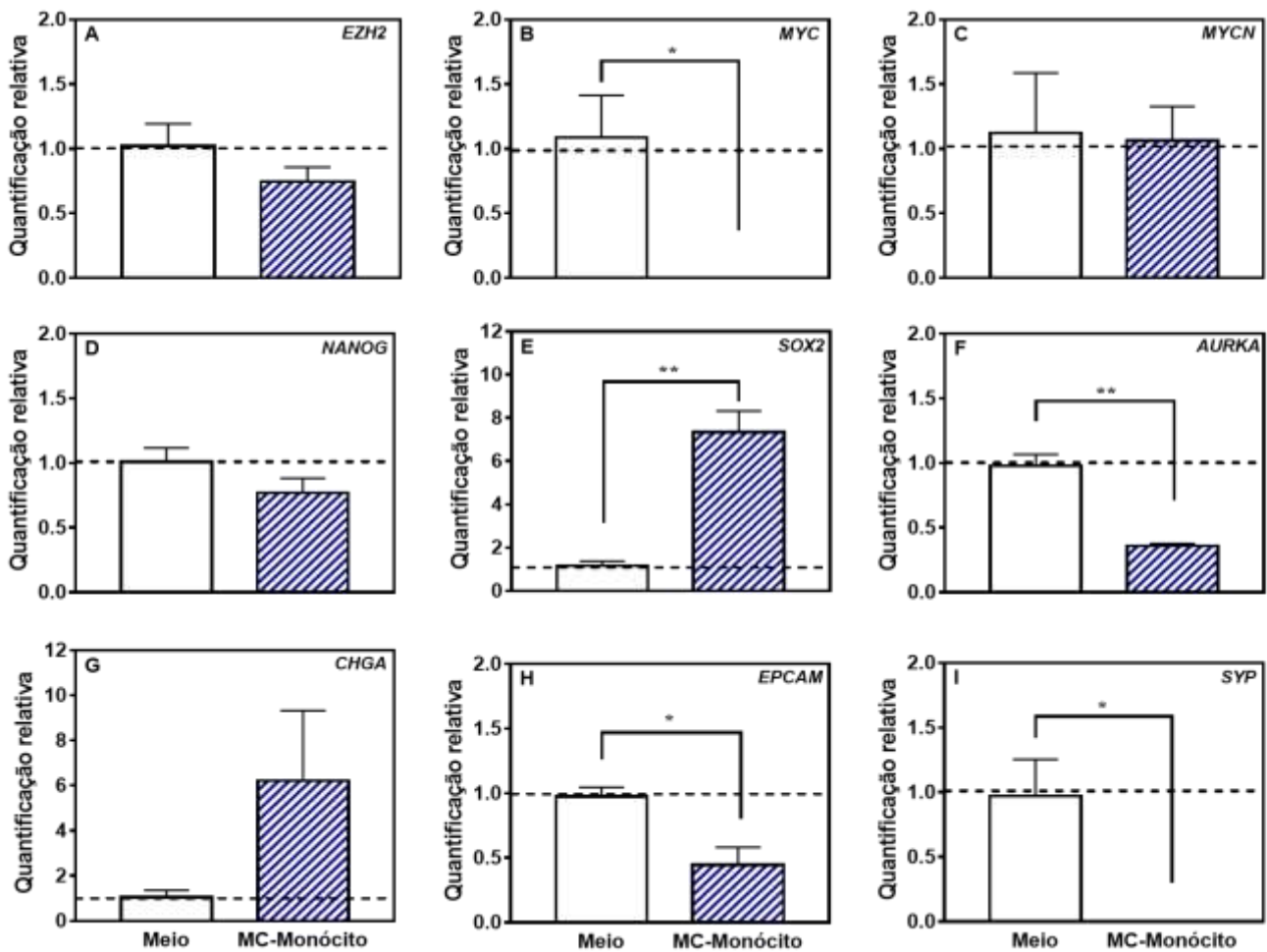


Figura 13 – Expressão de *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral Detroit 562 expostas ao meio condicionado de monócitos. As células da linhagem tumoral Detroit 562 foram estimuladas com o meio condicionado de monócitos e o cDNA foi empregado em ensaios de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para cada gene analisado. Os resultados são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Test *T* student.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O microambiente tumoral representa um sistema complexo que envolve diversos tipos celulares, como células T, células B, células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas e fibroblastos associados ao câncer, além de moléculas de sinalização, vasos sanguíneos e matriz extracelular, que influenciam na progressão e resposta do tumor (WONDERGEM *et al.*, 2020). Os monócitos desempenham papéis importantes no suporte da homeostase do tecido e surgiram como reguladores importantes do desenvolvimento e progressão do câncer, bem como fonte primária de macrófagos associados a tumores e células dendríticas que modulam o microambiente tumoral (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019).

Os monócitos são identificados de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16 (SPRANGERS; DE VRIES; EVERTS, 2016). Desta forma, inicialmente avaliamos se a expressão de CD14 constitui um fator prognóstico para o carcinoma espinocelular, utilizando a plataforma GEPIA. Estes dados indicaram que baixo nível de expressão de CD14 em amostras de pacientes portadores de carcinoma espinocelular pulmonar (*LU*SC), tem correlação com maior sobrevida dos pacientes. O estudo de Gustafson e colaboradores (2015), está de acordo com o sugerido anteriormente, quando infere que monócitos CD14⁺ foram encontrados mais predominantemente em tumores de células renais, e sua abundância está fortemente associada com a diminuição da sobrevida do paciente. Estudos indicam ainda que monócitos estão envolvidos na resposta imune ao tumor, com uma parte considerável deles acumulando no tecido tumoral (FENG *et al.*, 2011). Esta evidência também foi observada em nosso estudo quando avaliamos amostras de carcinoma espinocelular e detectamos a presença de células CD14⁺. A molécula CD14 é expressa abundantemente na superfície de monócitos e macrófagos humanos e empregada como marcador de monócitos humanos (YANG *et al.*, 2014). Em nosso estudo, observou-se imunorreatividade para CD14 no infiltrado inflamatório de amostras de carcinoma espinocelular. Dados da literatura indicam que a frequência de monócitos CD14⁺⁺ CD16⁺ poderia ser um biomarcador de diagnóstico em pacientes portadores de carcinoma espinocelular oral (OSCC), e estaria correlacionado com o pior padrão de invasão (YUXIAN *et al.*, 2018).

Sabe-se que os monócitos também possuem subpopulações, sendo que as células CD14⁺⁺ CD16⁻ são classificadas como monócitos clássicos; as células CD14⁻ CD16⁺⁺ são classificadas como monócitos não clássicas, e as células CD14⁺⁺ CD16⁺ são identificadas como monócitos intermediários. Os monócitos com o perfil clássico representam mais de 80% dos monócitos circulantes (BOYETTE *et al.*, 2017). Para monócitos inflamatórios, a molécula CD14 é o principal marcador sendo empregado amplamente para a identificação destas células nos diferentes tecidos. Para a caracterização dos monócitos, analisamos a população de monócitos isolada do sangue periférico de indivíduos saudáveis, demonstrando alta expressão de CD68, CD64, CD11c, CCR2, e HLA-DR. A expressão de CD16, CD62L, CD206 e CD56 foi detectada em uma percentagem menor de monócitos CD14⁺.

Os monócitos podem apresentar diversas funções em diferentes estágios de crescimento e progressão tumoral, mesmo fenotipicamente semelhantes podem desempenhar papéis opostos devido a diferenças no tecido de origem do câncer, diferenças no microambiente tumoral, estágio de crescimento do tumor e modelo experimental (OLINGY; DINH; HEDRICK, 2019). As interações entre monócitos/macrófagos e células de carcinoma espinocelular, bem como os consequentes efeitos na progressão do CEC são amplamente desconhecidos. Para analisar a influência dos monócitos no carcinoma espinocelular, ensaios de motilidade, invasão e proliferação foram realizados utilizando duas linhagens comerciais de células tumorais (SCC-25 e Detroit 562) em presença do meio condicionado da cultura de monócitos. Os resultados do ensaio de motilidade mostraram que as duas linhagens comerciais de células tumorais, quando expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, apresentaram menores níveis na motilidade comparado com as células tumorais cultivadas apenas na presença do meio de cultura, sendo observada diferença estatisticamente significativa (figuras 5 e 7). Dessa forma, podemos sugerir que o meio condicionado de monócitos induziu a diminuição da motilidade de células tumorais de carcinoma espinocelular. Dados de estudos com outros tipos de tumores também indicaram que os monócitos podem influenciar a motilidade das células tumorais. Similar ao observado em nosso estudo, Benzing e colaboradores (2019) demonstraram que células semelhantes a monócitos - que são uma parte essencial do microambiente tumoral - têm a capacidade de diminuir de forma muito significativa o comportamento migratório e invasivo de células

de adenocarcinoma, o que inibiria seu potencial metastático e indicando que a atividade supressora de células semelhantes pode ser mediada pela secreção de TIMP2, mas não de TIMP1. Diferentemente do observado em nosso estudo, em ensaios com células tumorais de câncer de colo e pulmão (MC38 e carcinoma de pulmão de Lewis) demonstraram que o meio condicionado de monócitos e macrófagos, isolados do microambiente metastático, promove a migração e invasão destas linhagens tumorais (LIM *et al.*, 2016).

As células neoplásicas podem influenciar o remodelamento da matriz extracelular (MEC), resultando em perfis heterogêneos de composição da matriz e influenciando a migração de células para o microambiente tumoral (MALANDRINO *et al.*, 2018). A migração, invasão e adesão celular são etapas fundamentais no processo de desenvolvimento e progressão do câncer, constituindo como principal causa de morbidade e mortalidade (PIJUAN *et al.*, 2019). A migração celular é um evento essencial na progressão do câncer, durante o qual as células tumorais se disseminam do tumor primário e alcançam a matriz TME e o sistema vascular. Desta forma, a próxima etapa do presente estudo foi avaliar o efeito do meio condicionado de monócitos na invasão de células da linhagem tumoral SCC-25. No ensaio de invasão celular através de placas *transwell*, células da linhagem tumoral SCC-25, expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos, apresentaram alta capacidade de invasão/migração. De modo similar, um estudo recente demonstrou que o meio condicionado de monócitos contribui para a invasividade e migração de células neoplásicas de câncer de próstata avançado (CaP) em ensaios funcionais *in vitro* (CAVASSANI *et al.*, 2018). Aumento da invasão das células neoplásicas co-cultivadas com monócitos foi demonstrado em modelo de câncer gástrico. Neste estudo, as células neoplásicas (MKN1, *a human gastric carcinoma cell line*) co-cultivadas com monócitos demonstraram aumento da invasividade que foi acompanhado por aumento na produção de MMP-9 (KAMOSHIDA *et al.*, 2013). Embora em nosso estudo não tenhamos analisado a produção de metaloproteinases, dados da literatura indicam que no carcinoma espinocelular a produção da metaloproteinase 9 também está relacionada com a maior invasividade deste tipo de linhagem tumoral (PRAMANIK *et al.*, 2018). As células da linhagem tumoral Detroit 562 não migraram através do matriz gel, não puderam ser analisadas. Isso pode ter ocorrido pois, segundo Pijuan *et al.*, (2019), alguns tipos de células podem migrar horizontalmente muito rápido, mas não

podem invadir uma membrana porosa, sendo importante verificar previamente se as células escolhidas para o ensaio são capazes de invadir a membrana e o revestimento de matriz gel. Estas alterações fenotípicas das células tumorais induzidas por monócitos parecem depender do tipo de células tumorais. Uma possível explicação é que as células tumorais responderam diferentemente pela co-cultura com monócitos.

A taxa de proliferação das células tumorais reflete um distúrbio no equilíbrio entre a proliferação celular, o tempo do ciclo celular, a diferenciação e a senescência (BEGG, 1994; DRESSLER, 1993; HALL, 2000; HOSHINO *et al.*, 1989). A taxa de crescimento tumoral é considerada um indicador prognóstico útil da agressividade do tumor e da resposta do tumor à terapia (KROHN; MANKOFF; EARLY, 2001; MEHDI *et al.*, 1998). A proliferação celular com controle alterado é uma das primeiras características de uma população de células neoplásicas (STRUIKMANS *et al.*, 2001; WEST; KENG; SUTHERLAND, 1988). No ensaio de proliferação celular, a linhagem SCC-25 exposta ao meio condicionado de monócitos, apresentou proliferação progressiva quando comparado aos valores observados para o controle, levando a resultados com diferença estatística significativa. De modo similar ao resultado apresentado, um estudo mostrou que fatores de monócitos, como IL-1, IL-6 e TNF- α , podem estimular proliferação de células neoplásicas provenientes de câncer de ovário (WU *et al.*, 1992). Outro estudo sugere a via de sinalização mediada por STAT3 estaria relacionada com os mecanismos pelos quais os monócitos promovem a proliferação de células neoplásicas de carcinoma hepatocelular (WU *et al.*, 2011). Apesar de não termos estabelecidos os mecanismos moleculares relacionados com o maior aumento da proliferação das células SCC-25 após a estimulação com o meio condicionado de monócitos, acreditamos que a citocina IL-6 possa estar presente no meio condicionado de monócitos e relacionada com este aumento na proliferação das células tumorais SCC-25 (STEINBICHLER *et al.*, 2018). Novos estudos são necessários para comprovar esta hipótese e estão em desenvolvimento. Para a linhagem Detroit 562, dentro de um período aproximado de 24 horas de exposição das células ao meio condicionado de monócitos, a taxa de proliferação celular teve aumento progressivo e similar ao grupo controle. Entretanto, ao final da análise, a taxa de proliferação celular da linhagem Detroit 562 exposta ao meio condicionado de monócitos foi menor e com resultado significativo quando comparado às células cultivadas na ausência do estímulo, levando à hipótese de que o meio condicionado

de monócitos e suas citocinas participantes, diminuíram a proliferação de células tumorais Detroit 562.

Dentre estes fatores presentes no meio condicionado de monócitos que poderiam influenciar a ativação das células tumorais, a citocina IL-33 seria um importante mediador associado com o aumento da proliferação e invasão das células tumorais. IL-33 é um membro da família de citocinas IL-1, que desempenha um papel crucial na iniciação e amplificação das respostas imunes para combater lesões e infecção (CAYROL; GIRARD, 2018; LIEW *et al.*, 2016; SCOTT *et al.*, 2018). IL-33 é expressa no núcleo das células epiteliais dos tecidos de barreira e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, no qual sua liberação a partir de células danificadas, ativa muitos tipos diferentes de células imunes por meio de seu receptor, semelhante ao receptor de IL-1 (IL1RL1, também conhecido como ST2) (LU *et al.*, 2020). No entanto, os papéis diretos da atividade da IL-33 na regulação da diferenciação celular e as funções das células mononucleares permaneceram mal compreendidos (LU *et al.*, 2020). Em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e oral, a citocina IL-33 intratumoral foi expressa por fibroblastos associados ao tumor, e teria um efeito pró-tumorigênico direto nas células neoplásicas e efeitos indiretos nos outros componentes do microambiente tumoral (FORNIÉ; POUPOT, 2018). A IL33 é altamente expressa em amostras de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de esôfago. Em linhas celulares correspondentes, a superexpressão de *IL33* promoveu a migração e invasividade, enquanto a baixa expressão de *IL33* inibiu o potencial metastático dessas células (YUE *et al.*, 2020). O silenciamento de *ST2* em células CT26, uma linhagem de células de câncer de cólon, resultou no aumento do crescimento do tumor *in vivo*, mostrando que a sinalização de IL33 tem um papel inibidor nas células tumorais (O'DONNELL *et al.*, 2015). Considerando essas observações sobre o possível papel da citocina IL33 na fisiologia das células tumorais, analisamos através do ensaio de RT-qPCR, a expressão de *IL-33* e *ST2* em células das linhagens SCC-25 e Detroit 562, expostas ao meio condicionado da cultura de monócitos. As células da linhagem SCC-25 expostas ao meio condicionado de monócitos apresentaram expressão de *ST2* e *IL33* diminuídas em relação ao controle, ou seja, o meio condicionado de monócitos inibiu à expressão dos genes *ST2* e *IL33* em células tumorais, com diferença estatisticamente significativa. Em células da linhagem Detroit 562, constatou-se que o meio

condicionado de monócitos induziu aumento da expressão de *ST2*, com valor próximo do controle. Mas, em relação à expressão de *IL33*, o meio condicionado de monócitos levou a diminuição na expressão deste gene em células tumorais em relação ao controle. O estudo de Ishikawa e colaboradores (2014), sugeriu que o eixo IL-33/ST2 contribui para a agressividade do tumor e afeta o microambiente tumoral. Estudos anteriores demonstraram que a IL-33 promove a metástase do câncer por meio do recrutamento de macrófagos associados ao tumor (TAMs) (YANG *et al.*, 2016). Outro estudo recente demonstrou que a via IL-33/ST2 contribui para o desenvolvimento de CEC, aumentando o recrutamento de células T CD4⁺, células dendríticas e macrófagos e prejudicando a atividade citotóxica de NK (AMÔR *et al.*, 2018). IL-33 pode induzir o recrutamento de macrófagos e alterar seu fenótipo para se assemelhar a macrófagos ativados alternativamente, adicionalmente, estudo de Peng *et al.* (2020) mostra que IL-33 tem um papel heterogêneo no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, o que provavelmente é determinado pelas fontes celulares de IL-33, onde a IL-33 derivada do estroma atua como um fator pró-tumor, enquanto a IL-33 derivada do epitélio atua como um fator antitumoral. Gao e colaboradores (2015) demonstraram que a superexpressão de IL-33 em células tumorais inibe fortemente o crescimento tumoral. A diminuição da expressão de IL-33 pelas células tumorais após a estimulação com o meio condicionado de monócitos pode ter contribuído para o aumento da proliferação das células da linhagem tumoral SCC-25. Contudo, estudos adicionais são necessários para comprovar esta hipótese.

O processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*) e seu processo reverso, transição mesenquimal-epitelial (MET) são processos fundamentais no desenvolvimento embrionário e na reparação de tecidos, mas conferem propriedades malignas às células de carcinoma, incluindo comportamento invasivo, atividade de células-tronco cancerígenas e maior resistência a quimioterapia e imunoterapia (LU; KANG, 2019). O processo de transição epitelial-mesenquimal pode ser induzido por vários fatores de crescimento (EGF, HGF, FGF, TGF- β , NOTCH, IL-6, IL-8, entre outros), que podem ser produzidos por diferentes células presentes no microambiente tumoral, levando a expressão dos fatores de transcrição associados à transição epitelial-mesenquimal (VERNOT, 2020). O estroma tumoral envolve vários tipos de células além das células neoplásicas, como fibroblastos, células do sistema imunológico e células endoteliais, que interagem com

as células cancerosas e influenciam a invasão e a metástase (MALANDRINO *et al.*, 2018). Células como os macrófagos, que secretam TNF- α e TGF- β , estimulam MMP1 e MMP2 em células neoplásicas, levando ao aumento da velocidade migratória e persistência em matrizes extracelulares (LI *et al.*, 2017). Para carcinoma espinocelular, o estudo de Gao e colaboradores (2016) revelou que as células do estroma tumoral no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) leva ao recrutamento e polarização de monócitos em macrófagos M2, o que por sua vez promoveu a migração e invasão das células cancerosas. Então, para melhor entender esse *crosstalk* entre as células tumorais e os monócitos no microambiente tumoral, analisamos nesse estudo a expressão de genes relacionados com o processo de transição epitelial-mesenquimal, através do ensaio de RT-qPCR.

O proto-oncogene *MYC* é um regulador importante para a proliferação e transformação celular e sua atividade está ligada a inúmeros cânceres (FAN *et al.*, 2015). Por exemplo, no câncer de próstata, a superexpressão de *MYC* está associada à recorrência do câncer e mau prognóstico (HAWKSWORTH *et al.*, 2010). O mRNA e as proteínas de *MYC* são supostamente regulados positivamente em tecidos de câncer de próstata humano em relação ao tecido de próstata normal (GUREL *et al.*, 2011). Já, no carcinoma espinocelular de língua, a regulação negativa de *MYC* está associada ao avanço da doença e pior prognóstico (VORA *et al.*, 2007). Em nosso estudo, descobrimos que o meio condicionado de monócitos pode inibir a expressão *MYC* em células das linhagens tumorais de carcinoma espinocelular SCC-25 e Detroit 562. Na análise da expressão do gene *MYC* pelas células SCC-25 e Detroit 562, a literatura diz que a comparação de várias linhagens celulares mostrou ser importante no contexto celular para os efeitos transcricionais e biológicos do *MYC*, onde, dependendo das células, o *MYC* exerce efeitos opostos na migração, em correlação com a regulação inversa de certos genes, e controla a proliferação celular por diferentes vias (CAPPELLEN *et al.*, 2006). O envolvimento direto de *MYC* na formação de metástases está bem estabelecido *in vitro* e *in vivo* e o seu papel não é questionável, mas o *MYC* sozinho parece ser insuficiente, havendo, então, cooperação com outros genes e fatores de transcrição para promover as fases inicial (invasão e migração) e tardia da progressão metastática (MESKYTE; KESKAS; CIRIBILLI, 2020). Na apoptose, o gene *MYC* está envolvido de várias maneiras, no

qual, dependendo de outros genes apoptóticos, a redução da expressão de *MYC* pode levar a apoptose celular (THOMPSON, 1998).

O fator de transcrição *SOX2*, que não é expresso no epitélio da pele normal e é dispensável para a homeostase epidérmica, marca as células iniciadoras de tumor (*TICs*) nos carcinomas espinocelular (CEC) (SIEGLE *et al.*, 2014). A superexpressão de *SOX2* foi encontrada em pelo menos 25 neoplasias diferentes em humanos e a expressão forçada de *SOX2* promove a progressão neoplásica ao acelerar a proliferação, migração, invasão e metástase de células cancerígenas (NOVAK *et al.*, 2019). Além disso, a expressão elevada de *SOX2* está positivamente correlacionada com resistência a medicamentos e baixa sobrevida de pacientes com câncer (NOVAK *et al.*, 2019; GRIMM *et al.*, 2019). Em relação à expressão do gene *SOX2* pela linhagem tumoral SCC-25, nossos resultados foram contrários à maioria dos estudos contidos na literatura, como no estudo de Vicente e colaboradores (2019), onde foi observado que a expressão de *SOX2* foi mais frequente nos estágios iniciais de carcinoma espinocelular oral e os pacientes com expressão positiva de *SOX2* exibiram uma sobrevida melhor do que aqueles com expressão negativa. Quanto a expressão de *SOX2* pela linhagem Detroit 562, nossos resultados evidenciaram que a exposição ao meio condicionado de monócitos induziu aumento da expressão de *SOX2*. Sabemos que *SOX2* controla várias características das células tumorais, como proliferação, transição epitelial-mesenquimal (EMT), migração, invasão, metástase, esfera e formação de colônia, iniciação tumoral, formação de células-tronco cancerosas, bem como resistência à apoptose e terapia, então seu efeito exercido nas células tumorais pode variar dependendo do tipo de câncer (LIU *et al.*, 2018). Em concordância com nossos resultados de expressão de *SOX2* pelas células da linhagem Detroit 562, Bass e colaboradores (2009) detectaram que houve amplificação no locus de *SOX2* e, conseqüentemente, aumento de expressão, o que também aumentou a proliferação e crescimento de células tumorais.

A molécula de adesão de células epiteliais (EpCAM) é uma glicoproteína transmembranica que foi descoberta em células de câncer colorretal há 40 anos (HERLYN *et al.*, 1979). Em carcinomas humanos, a expressão do gene *EPCAM* é comumente elevada em vários tipos de tumor primário. Estes dados indicam que a alta expressão de *EPCAM* facilita o crescimento e a progressão do câncer maligno e está associada a um mau prognóstico e irresponsividade terapêutica em pacientes com câncer (MOHTAR *et al.*, 2020; LEI *et al.*, 2012; GAISER *et al.*, 2012; KELLER;

WERNER; PANTEL, 2019). Em nosso estudo, em relação à análise da expressão de *EPCAM* em células da linhagem SCC-25, constatou-se que o meio condicionado de monócitos induziu aumento da expressão deste gene quando comparado ao meio, contudo, estes valores não foram estatisticamente significantes. *EPCAM* é expresso pelo epitélio de indivíduos saudáveis, exceto pelo epitélio escamoso, e alguns tipos específicos de células epiteliais, como hepatócitos e queratinócitos, mas na maioria dos carcinomas humanos, *EPCAM* é superexpresso em vários graus (VAN DER GUN *et al.*, 2010). Em estudos com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), a expressão de *EPCAM* levou a diferenciação tecidual de hiperplasia para tumor *in situ*, sugerindo um papel importante na formação tumoral (ANDRATSCHKE *et al.*, 2006). Em outro estudo que examinou especificamente o CEC da língua, a expressão de *EPCAM* foi associada a tumor de tamanho maior, metástase e dediferenciação tumoral (YANAMOTO *et al.*, 2007). De modo contrário aos resultados observados com a linhagem tumoral SCC-25, a estimulação com o meio condicionado de monócitos inibiu significativamente a expressão do gene *EPCAM* em células da linhagem tumoral Detroit 562. Em concordância com nosso resultado, Hwang e colaboradores (2009) sugerem que a expressão diminuída de *EPCAM* é um evento precoce para carcinoma espinocelular oral. Alguns tipos tumorais frequentemente não apresentam expressão de *EPCAM*, como carcinoma uroteliais e carcinoma espinocelular (SPIZZO *et al.*, 2011).

A sinaptofisina, uma proteína que participa da transmissão sináptica e codificada pelo gene *SYP*, está amplamente distribuída em células neuroendócrinas e neoplasias, e é um bom marcador neuroendócrino de amplo espectro (ERICKSON; LLOYD, 2004). Estudos mostram que *SYP* e a sinaptofisina não são exclusivos da diferenciação neuronal, mas também são formados em certas células epiteliais, e vesículas contendo sinaptofisina continuam a serem formadas durante a transformação celular e crescimento maligno (SCHARTINGER *et al.*, 2012). Em nosso estudo, a análise de expressão do gene *SYP*, tanto para linhagem tumoral SCC-25 quanto para Detroit 562, o meio condicionado de monócitos induziu diminuição na expressão de *SYP*, quando comparados ao meio. Segundo Erickson e Lloyd (2004), *SYP* não é específico para células neuroendócrinas e tumores, pois células corticais adrenais normais, adenomas corticais adrenais e carcinomas podem mostrar imunopositividade para esse marcador. Se tratando de carcinoma espinocelular, trabalhos mostraram que essa diferenciação neuroendócrina também foi encontrada

em alguns tumores de origem não neuroendócrina, incluindo carcinoma espinocelular de pulmão e esôfago, levantado à hipótese de que células tumorais com caracterização neuroendócrina podem produzir peptídeos para estimular o crescimento do tumor via mecanismos autócrinos ou parácrinos (NISMAN *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2007).

A proteína aurora quinase A, codificada pelo gene *AURKA*, faz parte da família de quinases (A, B e C) consistindo em proteínas quinases serina/treonina, envolvidas em vários eventos mitóticos: regulação da via de verificação de montagem do fuso, função de centrossomas e citoesqueleto, e citocinese (KOLLAREDDY *et al.*, 2008). *AURKA* são super-expressos em uma variedade de linhagens de células tumorais, sugerindo que as proteínas quinases podem desempenhar importante papel na tumorigênese (FU *et al.*, 2007). Nosso estudo mostrou que, em células tumorais das linhagens SCC-25 e Detroit 562, a estimulação com o meio condicionado de monócitos inibiu expressão dos genes *AURKA*. Em contrapartida, estudos mostram que, para carcinoma espinocelular oral, a superexpressão de *AURKA* está relacionada com alta proliferação celular, migração, invasão e mau prognóstico de pacientes com CEC (YANG *et al.*, 2019; DAWEI; HONGGANG; QIAN, 2018).

Células tumorais com comportamento de células tronco usam de diversos mecanismos para o desenvolvimento de tumores e disseminação metastática (GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2013). O fator de transcrição SOX2 funciona como uma molécula central em carcinomas espinocelulares, pois atua como um ponto de integração de mecanismos de sinalização oncogênica e de desenvolvimento, tornando as células tronco tumorais autossuficientes para estímulos mitogênicos essenciais (SIEGLE *et al.*, 2014). Desta forma, os resultados sugerem que o meio condicionado de monócitos modula a expressão de genes, como *SOX2*, *EPCAM*, *MYC*, *AURKA* e *SYP*, que controlam funções tumorais de carcinomas espinocelulares, levando a maior invasividade e proliferação tumoral.

Os resultados deste estudo sugerem que o microambiente tumoral pode ser modulado por monócitos e células derivadas de monócitos. Assim, fatores derivados de monócitos podem contribuir para a invasão e proliferação de células neoplásicas de carcinoma espinocelular, dependendo também de características das células tumorais. A literatura mostra que citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas foram mais detectadas no CEC, incluindo IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF, VEGF e FGF (CHEN *et al.*, 1999). Ainda são necessários mais estudos para

determinar quais os fatores derivados de monócitos estariam envolvidos com os mecanismos descritos em nosso estudo e que poderiam influenciar o microambiente tumoral do carcinoma espinocelular.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

- ✓ Os fatores derivados de monócitos inibiram a motilidade de células no carcinoma espinocelular.
- ✓ Os fatores derivados de monócitos influenciaram positivamente na capacidade de invasão de células da linhagem tumoral SCC-25.
- ✓ Os fatores derivados de monócitos influenciaram positivamente a proliferação de células de carcinoma espinocelular, da linhagem SCC-25, mas, inibiram a proliferação de células da linhagem Detroit 562.
- ✓ Os fatores derivados de monócitos induziram aumento na expressão do gene *EPCAM* por células da linhagem tumoral SCC-25. Ao mesmo tempo que inibiram a expressão de *MYC*, *SOX2* e *SYP* por essas células.
- ✓ Os fatores derivados de monócitos induziram aumento na expressão do gene *SOX2* por células da linhagem tumoral Detroit 562. Ao mesmo tempo que inibiram a expressão de *MYC*, *AURKA*, *EPCAM* e *SYP* por essas células.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADEEGBE, D. O.; NISHIKAWA, H. Natural and Induced T Regulatory Cells in Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00190/abstract>. Acesso em: 13 abr. 2020.

AFFERNI, C. *et al.* The Pleiotropic Immunomodulatory Functions of IL-33 and Its Implications in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, 13 nov. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6242976/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 11, p. 834–846, nov. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519109/>. Acesso em: 02 mar. 2020.

AMBASTA, R. K. MOLECULAR SIGNALLING SAGA IN TUMOUR BIOLOGY. **Journal of Tumor**, v. 3, n. 2, p. 309–313, 22 jul. 2015. Disponível em: <http://www.ghrnet.org/index.php/JT/article/view/1114>. Acesso em: 13 fev. 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics for Basal and Squamous Cell Skin Cancers**. Atlanta. 2020. Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/about/key-statistics.html#written_by. Acesso em: 31 jan. 2020.

AMÔR, N. G. *et al.* ST2/IL-33 signaling promotes malignant development of experimental squamous cell carcinoma by decreasing NK cells cytotoxicity and modulating the intratumoral cell infiltrate. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 56, p. 30894–30904, 20 jul. 2018.

ANAND, P. *et al.* Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, 1 set. 2008. DOI 10.1007/s11095-008-9661-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-008-9661-9>. Acesso em: 12 fev. 2020.

ANDRATSCHKE, M. *et al.* Limited Suitability of EpCAM for Molecular Staging of Tumor Borders in Head and Neck Cancer. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 26, n. 1A, seç. Experimental Studies, p. 153–158, 1 jan. 2006.

ARBELÁEZ, M. I. A. UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Odontologia de Araraquara. [S. l.], , p. 99, 2020.

ARNETH, B. Tumor Microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 1, 30 dez. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7023392/>. Acesso em: 20 jun. 2020.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 669–692, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>. Acesso em: 05 mar. 2020.

BAEUERLE, P. A.; GIRES, O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 417–423, 12 fev. 2007.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, n. 3, p. 211–217, 1 mar. 2005. Disponível em: [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(05\)00066-8](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(05)00066-8). Acesso em: 02 mar. 2020.

BARRERA GARCÍA, A. *et al.* Infiltrating CD16+ Are Associated with a Reduction in Peripheral CD14+CD16++ Monocytes and Severe Forms of Lupus Nephritis. **Autoimmune Diseases**, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187455/>. Acesso em: 08 jun. 2020.

BASS, A. J. *et al.* SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. **Nature Genetics**, Bandiera_abtest: aCg_type: Nature Research Journalsnumber: 11Primary_atype: Researchpublisher: Nature Publishing Group, v. 41, n. 11, p. 1238–1242, nov. 2009.

BEATTY, G. L.; GLADNEY, W. L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. **Clinical cancer research: an official journal of the American**

Association for Cancer Research, v. 21, n. 4, p. 687–692, 15 fev. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334715/>. Acesso em: 17 jun. 2020.

BEGG, A. C. Prediction of Repopulation Rates and Radiosensitivity in Human Tumours. **International Journal of Radiation Biology**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 103–108, 1 jan. 1994.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 241–248, 1 nov. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2080850/>. Acesso em: 06 fev. 2020.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 15 set. 2008. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/181/6/3733>. Acesso em: 05 mar. 2020.

BENZING, C. *et al.* TIMP-2 secreted by monocyte-like cells is a potent suppressor of invadopodia formation in pancreatic cancer cells. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1214, 13 dez. 2019.

BLOT, W. J. *et al.* Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 48, n. 11, seq. Clinical and Epidemiological Investigations, p. 3282–3287, 1 jun. 1988.

BOUKAMP, P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? **Carcinogenesis**, v. 26, n. 10, p. 1657–1667, 1 out. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article/26/10/1657/2390682>. Acesso em: 10 fev. 2020.

BOYETTE, L. B. *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 4, 26 abr. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406034/>. Acesso em: 15 maio 2021.

BRASH, D. E. UV Signature Mutations. **Photochemistry and photobiology**, v. 91, n.

1, p. 15–26, jan. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4294947/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21492>. Acesso em: 22 jun. 2020.

Câncer da pele - Sociedade Brasileira de Dermatologia. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>. Acesso em: 29 set. 2020.

Cancer. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 29 set. 2020.

CAVASSANI, K. A. *et al.* Circulating monocytes from prostate cancer patients promote invasion and motility of epithelial cells. **Cancer Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 4639–4649, 9 ago. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.1695>. Acesso em: 28 abr. 2020.

CAYROL, C.; GIRARD, J.-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 281, n. 1, p. 154–168, jan. 2018.

CHANMEE, T. et al. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1670–1690, 13 ago. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190561/>. Acesso em: 24 jun. 2020.

CHATURVEDI, A. K. *et al.* Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 29, n. 32, p. 4294–4301, 10 nov. 2011.

CHEN, D.-P. *et al.* Peritumoral monocytes induce cancer cell autophagy to facilitate the progression of human hepatocellular carcinoma. **Autophagy**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1335–1346, 28 jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6103724/>. Acesso em: 30 out. 2020.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, dez. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3114424/>. Acesso em: 24 jun. 2020.

CHEN, Y. et al. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, 20 out. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6800990/>. Acesso em: 30 mar. 2020.

CHEN, Z. *et al.* Expression of Proinflammatory and Proangiogenic Cytokines in Patients with Head and Neck Cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 5, n. 6, seq. Molecular Oncology, Markers, Clinical Correlates, p. 1369–1379, 1 jun. 1999.

CHUN, E. et al. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. **Cell reports**, v. 12, n. 2, p. 244–257, 14 jul. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620029/>. Acesso em: 09 jun. 2020.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 27 jan. 2006. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(06\)00055-9](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(06)00055-9). Acesso em: 16 mar. 2020.

COSTA, C. et al. Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 47, n. 4, p. 1093–1102, 1 abr. 2016. Disponível em: <https://erj.ersjournals.com/content/47/4/1093>. Acesso em: 26 jun. 2020.

COULIE, P. G. et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 135–146, fev. 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc3670>. Acesso em: 06 fev. 2020.

COURRET, N. et al. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309–316, 1 jan. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1895351/>. Acesso em: 09 jun. 2020.

D'ORAZIO, J. et al. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 7 jun. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709783/>. Acesso em: 26 jun. 2020.

DAS, A. *et al.* Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 185, n. 10, p. 2596–2606, out. 2015.

DAWEI, H.; HONGGANG, D.; QIAN, W. AURKA contributes to the progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) through modulating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and apoptosis via the regulation of ROS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 507, n. 1–4, p. 83–90, 9 dez. 2018.

DE VICENTE, J. C. *et al.* SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 1744, 21 out. 2019.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525–541, 1 maio 2006. Disponível em: </clinsci/article/110/5/525/68249/Molecular-biology-of-human-papillomavirus>. Acesso em: 25 jun. 2020.

DOTTO, G.P.; RUSTGI A.K. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. **Cancer Cell**, v.29, p. 622-637, May. 2016. Supl. 5. DOI 10.1016/j.ccell.2016.04.004. Disponível em: [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(16\)30162-3](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(16)30162-3). Acesso em: 06 fev. 2020.

DOUKI, T.; VON KOSCHEMBAHR, A.; CADET, J. Insight in DNA Repair of UV-induced Pyrimidine Dimers by Chromatographic Methods. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 1, p. 207–215, jan. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/php.12685>. Acesso em: 07 fev. 2020.

DRESSLER, L. G. DNA flow cytometry measurements as surrogate endpoints in chemoprevention trials: clinical, biological, and quality control considerations. **Journal of Cellular Biochemistry. Supplement**, [S. l.], v. 17G, p. 212–218, 1993.

DUAN, R.; DU, W.; GUO, W. EZH2: a novel target for cancer treatment. **Journal of Hematology & Oncology**, [S. l.], v. 13, 28 jul. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7385862/>. Acesso em: 15 maio 2021.

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

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 329–360, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>. Acesso em: 02 mar. 2020.

ELLIOTT, L. A. et al. Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, 6 fev. 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00086/full>. Acesso em: 23 jun. 2021.

EMANUELE, E.; SPENCER, J. M.; BRAUN, M. From DNA repair to proteome protection: new molecular insights for preventing non-melanoma skin cancers and skin aging. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 13, n. 3, p. 274–281, mar. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24595571>. Acesso em: 17 fev. 2020.

ENGBLOM, C.; PFIRSCHKE, C.; PITTET, M. J. The role of myeloid cells in cancer therapies. **Nature Reviews. Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 447–462, jul. 2016.

ERICKSON, L. A.; LLOYD, R. V. Practical Markers Used in the Diagnosis of Endocrine Tumors. **Advances in Anatomic Pathology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 175–189, jul. 2004.

FAN, L. et al. Regulation of c-Myc expression by the histone demethylase JMJD1A is essential for prostate cancer cell growth and survival. **Oncogene**, Bandiera_abtest: aCg_type: Nature Research Journalsnumber: 19Primary_atype: Researchpublisher: Nature Publishing GroupSubject_term: Biochemistry;Cell growth;Hormone receptors;Prostate cancerSubject_term_id: biochemistry;cell-growth;hormone-receptors;prostate-cancer, v. 35, n. 19, p. 2441–2452, maio 2016.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 165–171, 30 jun. 2006.

FENG, A.-L. *et al.* CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. **Clinical and Experimental Immunology**, [S. l.], v. 164, n. 1, p. 57–65, abr. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074217/>. Acesso em: 30 out. 2020.

FERLAY, J. *et al.* Estimando a incidência global de câncer e mortalidade em 2018: fontes e métodos do GLOBOCAN. *Int. J. Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).

FRANKEN, L.; SCHIWON, M.; KURTS, C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system: macrophages in infections. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 475–487, abr. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12580>. Acesso em: 16 mar. 2020.

FRIEDBERG, E. C.; MCDANIEL, L. D.; SCHULTZ, R. A. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, n. 1, p. 5–10, fev. 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X03001631>. Acesso em: 18 fev. 2020.

FU, J. *et al.* Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 5, n. 1, seq. Subject Review, p. 1–10, 1 jan. 2007.

GAISER, M. R. *et al.* Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 15, p. E889–E897, 10 abr. 2012.

GAO, X. *et al.* Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8+ T and NK Cells. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 194, n. 1, seq. TUMOR IMMUNOLOGY, p. 438–445, 1 jan. 2015.

GAUTIER, E. L.; JAKUBZICK, C.; RANDOLPH, G. J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to

atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 10, p. 1412–1418, out. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2782657/>. Acesso em: 09 jun. 2020.

GLASTONBURY, C. M. Head and Neck Squamous Cell Cancer: Approach to Staging and Surveillance. *In*: HODLER, J.; KUBIK-HUCH, R. A.; VON SCHULTHESS, G. K. (org.). **Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020–2023: Diagnostic Imaging**. IDKD Springer Series. Cham (CH): Springer, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554349/>. Acesso em: 15 maio 2021.

GONZÁLEZ-MOLES, M. A. *et al.* The cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma. **Oral Oncology**, [S. l.], v. 49, n. 8, p. 738–746, ago. 2013.

GRETEN, F. R. *et al.* IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 285–296, ago. 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404006713>. Acesso em: 27 abr. 2020.

GRIMM, D. *et al.* The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 67, p. 122–153, 1 dez. 2020.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 19 mar. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866629/>. Acesso em: 08 jun. 2020.

GROH, L. *et al.* Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 2, p. 203–214, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5809534/>. Acesso em: 27 jun. 2020.

GULLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 595–613, 16 out. 2018. Disponível em: [https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(18\)30446-1](https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(18)30446-1). Acesso em: 17 mar. 2020.

GUO, Q. *et al.* New Mechanisms of Tumor-Associated Macrophages on Promoting Tumor Progression: Recent Research Advances and Potential Targets for Tumor

Immunotherapy. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/9720912/>. Acesso em: 14 abr. 2020.

GUREL, B. *et al.* Nuclear MYC Protein Overexpression is an Early Alteration in Human Prostate Carcinogenesis. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 1156–1167, set. 2008.

GUSTAFSON, M. P. *et al.* Intratumoral CD14+ Cells and Circulating CD14+HLA-DRlo/neg Monocytes Correlate with Decreased Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 21, n. 18, seq. Biology of Human Tumors, p. 4224–4233, 15 set. 2015.

HALL, E. Radiobiology for the Radiologist. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:427–428. 4. Hoshino T, Prados M, Wilson CB, Cho KG, Lee KS, Davis RL. Prognostic implications of the bromodeoxyuridine labeling index of human gliomas. *J Neurosurg*. 1989;71:335–341

HANNA, R. N. *et al.* Patrolling Monocytes Control Tumor Metastasis to the Lung. **Science (New York, N.Y.)**, v. 350, n. 6263, p. 985–990, 20 nov. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4869713/>. Acesso em: 29 jun. 2020.

HAO, N.-B. *et al.* Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3385963/>. Acesso em: 29 jun. 2020.

HASHIBE, M. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 541–550, fev. 2009.

HAWKSWORTH, D. *et al.* Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 311–315, dez. 2010.

HERBST, R. S.; HEYMACH, J. V.; LIPPMAN, S. M. **Lung Cancer**. review-article. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra0802714>>. Acesso em: 29 set. 2020.

HERLYN, M. *et al.* Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 1438–1442, mar. 1979.

HIRATA, E.; SAHAI, E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5495051/>. Acesso em: 29 jun. 2020.

HU, S. *et al.* The Preoperative Peripheral Blood Monocyte Count Is Associated with Liver Metastasis and Overall Survival in Colorectal Cancer Patients. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 6, 29 jun. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4927165/>. Acesso em: 19 nov. 2020.

HUANG, R. *et al.* CCL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating β -catenin/STAT3 signaling. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 4, p. 234, abr. 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41419-020-2435-y>. Acesso em: 23 abr. 2020.

HWANG, E. Y.-C. *et al.* Decreased expression of Ep-CAM protein is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 87–93, jan. 2009.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> Acesso em: 05 fev. 2020.

ISHIKAWA, K. *et al.* Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. **Auris, Nasus, Larynx**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 552–557, dez. 2014.

ISHIZUMI, T. et al. Natural history of bronchial preinvasive lesions. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 1, p. 5–14, mar. 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-010-9214-7>. Acesso em: 20 abr. 2020.

JEONG, J.; SUH, Y.; JUNG, K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 16 ago. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6706790/>. Acesso em: 29 jun. 2020.

JUNG, K. et al. Ly6Clo monocytes drive immunosuppression and confer resistance to anti-VEGFR2 cancer therapy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 8, p. 3039–3051, [s.d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5531423/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

KAMOSHIDA, G. *et al.* Potentiation of tumor cell invasion by co-culture with monocytes accompanying enhanced production of matrix metalloproteinase and fibronectin. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 289–297, mar. 2013.

KAPELLOS, T. S. et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 30 ago. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6728754/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

KAWAMURA, S.; OHTEKI, T. Monopoiesis in humans and mice. **International Immunology**, v. 30, n. 11, p. 503–509, 29 out. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/intimm/article/30/11/503/5104823>. Acesso em: 17 mar. 2020.

KELLER, L.; WERNER, S.; PANTEL, K. Biology and clinical relevance of EpCAM. **Cell Stress**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 165–180, [s. d.].

KHONG, H. T.; RESTIFO, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 999–1005, nov. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1508168/>. Acesso em: 03 mar. 2020.

KIM, J.; BAE, J.-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4757693/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1–14, maio 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265921/>. Acesso em: 03 ago. 2020.

KOLLAREDDY, M. *et al.* AURORA KINASES: STRUCTURE, FUNCTIONS AND THEIR ASSOCIATION WITH CANCER. **Biomedical Papers**, [S. l.], v. 152, n. 1, p. 27–33, 1 jun. 2008.

KROHN, K. A.; MANKOFF, D. A.; EARLY, J. F. Imaging cellular proliferation as a measure of response to therapy. **Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 41, n. S7, p. 96S-103S, jul. 2001.

KUBO, H. *et al.* Primary Tumors Limit Metastasis Formation through Induction of IL15-Mediated Cross-Talk between Patrolling Monocytes and NK Cells. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 9, p. 812–820, 1 set. 2017. Disponível em: <https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/5/9/812>. Acesso em: 03 ago. 2020.

LEE, H.-J. *et al.* Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, [S. l.], v. 15, 1 dez. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4667499/>. Acesso em: 15 maio 2021.

LEE, S. H. *et al.* SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 111, n. 11, p. 2122–2130, nov. 2014.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9–22, jan. 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc2982>. Acesso em: 17 jun. 2020.

LEI, Z. *et al.* EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. **Developmental biology**, [S. l.], v. 371, n. 2, p. 136–145, 1 nov. 2012.

LI, R. *et al.* Macrophage-secreted TNF α and TGF β 1 Influence Migration Speed and Persistence of Cancer Cells in 3D Tissue Culture via Independent Pathways. **Cancer research**, [S. l.], v. 77, n. 2, p. 279–290, 15 jan. 2017.

LI, X. *et al.* Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 157–167, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/66/1/157>. Acesso em: 10 jun. 2020.

LI, Y. *et al.* Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 36, n. 12, p. 9823–9828, 1 dez. 2015.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J.-P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 676–689, nov. 2016.

LIM, S. Y. *et al.* Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells. **Oncogene**, [S. l.], v. 35, n. 44, p. 5735–5745, 3 nov. 2016.

LIU, L. *et al.* MYCN contributes to the malignant characteristics of erythroleukemia through EZH2-mediated epigenetic repression of p21. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. e3126, out. 2017.

LIU, X. *et al.* Sox2 promotes tumor aggressiveness and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 1418–1426, set. 2018.

LOH, Y. P. *et al.* Chromogranin A and Derived Peptides in Health and Disease. **Journal of molecular neuroscience : MN**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 347–356, out. 2012.

LONG, K. B. et al. IFN- γ and CCL2 cooperate to redirect tumor-infiltrating monocytes to degrade fibrosis and enhance chemotherapy efficacy in pancreatic carcinoma. **Cancer discovery**, v. 6, n. 4, p. 400–413, abr. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4843521/>. Acesso em: 04 ago. 2020.

LU, C. et al. Regulation of Tumor Angiogenesis by EZH2. **Cancer cell**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 185–197, 9 ago. 2010.

LU, W.; KANG, Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. **Developmental cell**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 361–374, 6 maio 2019.

LU, Y. et al. Interleukin-33 Signaling Controls the Development of Iron-Recycling Macrophages. **Immunity**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 782-793.e5, 19 maio 2020.

MAI, S. et al. Oesophageal squamous cell carcinoma–associated IL-33 rewires macrophage polarization towards M2 via activating ornithine decarboxylase. **Cell Proliferation**, [S. l.], v. 54, n. 2, 10 dez. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7848962/>. Acesso em: 19 abr. 2021.

MALANDRINO, A. et al. Complex mechanics of the heterogeneous extracellular matrix in cancer. **Extreme Mechanics Letters**, [S. l.], v. 21, p. 25–34, maio 2018.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, jul. 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature07205>. Acesso em: 03 mar. 2020.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 1 dez. 2004. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906\(04\)00295-9](https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906(04)00295-9). Acesso em: 05 ago. 2020.

MARTIN, E. et al. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer’s disease models: effects of aging and amyloid pathology. **Aging Cell**, v. 16, n. 1, p. 27–38, fev. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5242297/>. Acesso em: 05 ago. 2020.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 25 set. 2015. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/349/6255/1483>. Acesso em: 08 fev. 2020.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 13, p. 453, 2008. Disponível em: <http://www.bioscience.org/2008/v13/af/2692/list.htm>. Acesso em: 18 mar. 2020.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, 3 mar. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3944738/>. Acesso em: 05 ago. 2020.

MEHDI, S. A. *et al.* Prognostic significance of Ki-67 immunostaining and symptoms in resected stage I and II non-small cell lung cancer. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 99–108, maio 1998.

MELO, F. H. M. DE; JUNQUEIRA, M. DE S.; CHAMMAS, R. Mecanismos de invasão e metástases. **Bases da Oncologia**, 2003. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001331593>. Acesso em: 06 ago. 2020.

MILDNER, A. et al. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. **Brain**, v. 132, n. 9, p. 2487–2500, 1 set. 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article/132/9/2487/356201>. Acesso em: 15 jun. 2020.

MISHARIN, A. V. et al. Non-classical Ly6C⁺ monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. **Cell reports**, v. 9, n. 2, p. 591–604, 23 out. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223808/>. Acesso em: 15 jun. 2020.

MITCHELL, A. J.; ROEDIGER, B.; WENINGER, W. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. **Cellular Immunology**, v. 291, n. 1–2, p. 22–31, out. 2014.

MITTAL, D. et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. **Current opinion in immunology**, v.

27, p. 16–25, abr. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388310/>. Acesso em: 07 ago. 2020.

MOHTAR, M. A. *et al.* Revisiting the Roles of Pro-Metastatic EpCAM in Cancer. **Biomolecules**, [S. l.], 002 2020. Disponível em: <https://www.meta.org/papers/revisiting-the-roles-of-pro-metastatic-epcam-in/32046162>. Acesso em: 12 jul. 2021.

MOORE, B. B. *et al.* Inflammatory Leukocyte Phenotypes Correlate with Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Frontiers in Medicine**, v. 1, 22 dez. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286285/>. Acesso em: 07 ago. 2020.

MOORE, K. J.; TABAS, I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341–355, 29 abr. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111065/>. Acesso em: 07 ago. 2020.

MORONI, F. *et al.* The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 4 abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6476044/>. Acesso em: 10 jun. 2020.

MURPHY, M. *et al.* **Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection**. [S. l.]: National Center for Biotechnology Information (US), 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3841/>. Acesso em: 15 maio 2021.

NARASIMHAN, P. B. *et al.* Nonclassical Monocytes in Health and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 439–456, 26 abr. 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-042617-053119>. Acesso em: 16 jun. 2020.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–986, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>. Acesso em: 17 jun. 2020.

NISMAN, B. *et al.* The prognostic significance of circulating neuroendocrine markers chromogranin a, pro-gastrin-releasing peptide and neuron-specific enolase in patients with advanced non-small-cell lung cancer. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 8–16, 2006.

NOVAK, D. *et al.* SOX2 in development and cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 67, p. 74–82, 1 dez. 2020.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, jul. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314002301>. Acesso em: 16 abr. 2020.

O que é câncer? Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

O'DONNELL, C. *et al.* An antitumorigenic role for the IL-33 receptor, ST2L, in colon cancer. **British Journal of Cancer**, Bandiera_abtest: aCc_license_type: cc_yCg_type: Nature Research Journalsnumber: 1Primary_atype: Researchpublisher: Nature Publishing GroupSubject_term: Cell signalling;Colon cancer;Interleukins;OncogenesisSubject_term_id: cell-signalling;colon-cancer;interleukins;oncogenesis, v. 114, n. 1, p. 37–43, jan. 2016.

OLINGY, C. E.; DINH, H. Q.; HEDRICK, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 309–322, ago. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6658332/>. Acesso em: 16 jun. 2020.

ONG, S.-M. *et al.* Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 1, p. 89–100, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.201141825>. Acesso em: 10 ago. 2020.

PALMA, M. D. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 211–226, 1 set. 2005. Disponível

em: [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(05\)00260-6](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(05)00260-6). Acesso em: 30 out. 2020.

PENG, L. *et al.* The Role of Interleukin-33 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Determined by Its Cellular Sources in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, p. 588454, 9 fev. 2021.

PERRI, G. **Efeito de IL-33 e do meio condicionado de macrófagos na ativação de células tumorais**, Bauru, 2021.

PETERS, W. *et al.* CCR2-Dependent Trafficking of F4/80dim Macrophages and CD11cdim/intermediate Dendritic Cells Is Crucial for T Cell Recruitment to Lungs Infected with Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7647–7653, 15 jun. 2004. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/172/12/7647>. Acesso em: 10 jun. 2020.

PIJUAN, J. *et al.* In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 7, 14 jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6587234/>. Acesso em: 15 maio 2021.

PINTO, M. T. **Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na biologia das células endoteliais**. 2015. Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-25092015-151215/>. Acesso em: 15 maio 2021.

PORCHERI, C.; MEISEL, C. T.; MITSIADIS, T. Multifactorial Contribution of Notch Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 6, 26 mar. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471940/>. Acesso em: 15 maio 2021.

PRAMANIK, K. K. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and its involvement in oral squamous cell carcinoma progression and invasion. **Cellular Oncology (Dordrecht)**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 47–60, fev. 2018.

QIAN, B.-Z. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 222–225, 8 jun. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3208506/>. Acesso em: 17 jun. 2020.

QUE, S. K. T.; ZWALD, F. O.; SCHMULTS, C. D. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 78, n. 2, p. 237–247, 1 fev. 2018. Disponível em: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(17\)32325-3/abstract](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(17)32325-3/abstract). Acesso em: 19 fev. 2020.

Queratose Actínica - Sociedade Brasileira de Dermatologia. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/queratose-actinica/19/>. Acesso em: 29 set. 2020.

RAVI, A. K. et al. COPD monocytes demonstrate impaired migratory ability. **Respiratory Research**, v. 18, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425971/>. Acesso em: 11 ago. 2020.

REITER, R. *et al.* Aurora Kinase A Messenger RNA Overexpression Is Correlated with Tumor Progression and Shortened Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 17, seq. Imaging, Diagnosis, Prognosis, p. 5136–5141, 1 set. 2006.

RIBATTI, D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 7175–7180, 18 out. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5351698/>. Acesso em: 25 jul. 2020.

ROBBEN, P. M. et al. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1761–1769, 6 jun. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213275/>. Acesso em: 11 jun. 2020.

RUIZ-PÉREZ, M. V.; HENLEY, A. B.; ARSENIAN-HENRIKSSON, M. The MYCN Protein in Health and Disease. **Genes**, [S. l.], v. 8, n. 4, 30 mar. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406860/>. Acesso em: 15 maio 2021.

SÁNCHEZ-DANÉS, A.; BLANPAIN, C. Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. **Nature reviews. Cancer**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 549–561, 1 set. 2018.

SANFORD, D. E. et al. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 13, p. 3404–3415, 1 jul. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700620/>. Acesso em: 11 ago. 2020.

SCHMIDT, H. et al. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 3, p. 273–278, 8 ago. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2361564/>. Acesso em: 11 jun. 2020.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 25 mar. 2011. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1203486>. Acesso em: 03 mar. 2020.

SCOTT, I. C.; REES, D. G.; COHEN, E. S. New perspectives on IL-33 and IL-1 family cytokines as innate environmental sensors. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 1345–1353, 19 out. 2018.

SCUTTI, J. A. B.; PINEDA, M. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. [S. l.], p. 8, [s. d.].

SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 1 jul. 2003. Disponível em: [https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(03\)00171-7](https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(03)00171-7). Acesso em: 15 jun. 2020.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762–774, 10 out. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3947780/>. Acesso em: 17 jun. 2020.

SHIGETA, K. *et al.* High Absolute Monocyte Count Predicts Poor Clinical Outcome in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Docetaxel Chemotherapy. **Annals of Surgical Oncology**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 4115–4122, 2016.

SIDIBE, A. *et al.* Angiogenic factor-driven inflammation promotes extravasation of human proangiogenic monocytes to tumours. **Nature Communications**, v. 9, 24 jan. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5783934/>. Acesso em: 11 ago. 2020.

SIEGLE, J. M. *et al.* SOX2 is a cancer-specific regulator of tumor initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. **Nature communications**, [S. l.], v. 5, p. 4511, 31 jul. 2014a.

SILVA, R. D. DA; DIAS, M. A. I. Incidência do carcinoma basocelular e espinocelular em usuários atendidos em um hospital de câncer. **Revista Família, Ciclos de Vida e Saúde no Contexto Social**, v. 5, n. 2, p. 228–234, 11 abr. 2017. Disponível em: <http://seer.uftm.edu.br/revistaeletronica/index.php/refacs/article/view/1681>. Acesso em: 17 jun. 2020.

SOLINAS, G. *et al.* Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–1073, nov. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0609385>. Acesso em: 01 abr. 2020.

SONG, Y. *et al.* Frequency of circulating CD14⁺⁺ CD16⁺ intermediate monocytes as potential biomarker for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 923–929, nov. 2018.

SPAHN, J. H.; KREISEL, D. Monocytes in sterile inflammation: recruitment and functional consequences. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 62, n. 3, p. 187–194, jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4294530/>. Acesso em: 12 ago. 2020.

SPRANGERS, S.; DE VRIES, T. J.; EVERTS, V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. **Journal of Immunology**

Research, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4958468/>. Acesso em: 12 ago. 2020.

STEINBICHLER, T. B. *et al.* Epithelial-mesenchymal crosstalk induces radioresistance in HNSCC cells. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 3641–3652, 14 dez. 2017.

STRUIKMANS, H. *et al.* Proliferative capacity in head and neck cancer. **Head & Neck**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 484–491, 2001.

SWAIN, N. *et al.* SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 368–373, 2020.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137–1146, 1 maio 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857231/>. Acesso em: 17 jun. 2020.

SWIECICKI, P. L. *et al.* Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Detection and Surveillance: Advances of Liquid Biomarkers. **The Laryngoscope**, [S. l.], v. 129, n. 8, p. 1836–1843, ago. 2019.

SWIRSKI, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 612–616, 31 jul. 2009. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/325/5940/612>. Acesso em: 12 ago. 2020.

TABY, R.; ISSA, J.-P. J. Cancer Epigenetics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 6, p. 376–392, 1 nov. 2010. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.20085>. Acesso em: 04 mar. 2020.

TAM, W. L.; WEINBERG, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature medicine**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 1438–1449, nov. 2013.

TANG, Z. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling

and interactive analyses. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. Web Server issue, p. W98–W102, 3 jul. 2017.

TENG, M. W. L. et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 4, p. 988–993, 1 out. 2008. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.1107774>. Acesso em: 04 mar. 2020.

THOMPSON, E. B. THE MANY ROLES OF c-Myc IN APOPTOSIS. **Annual Review of Physiology**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 575–600, 1 out. 1998.

THULER, L. C. S. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA) Coordenação de Ensino Rua Marquês de Pombal, 125 Centro – Rio de Janeiro – RJ Cep 20230-240 Tel.: (21) 3207-5500 www.inca.gov.br. p. 111, [s.d.].

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D. A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. [S. l.], , p. 16, [s. d.].

URAKAWA, S. et al. Peri-operative monocyte count is a marker of poor prognosis in gastric cancer: increased monocytes are a characteristic of myeloid-derived suppressor cells. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, [S. l.], v. 68, n. 8, p. 1341–1350, ago. 2019.

VAN DER GUN, B. T. F. et al. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1913–1921, 1 nov. 2010.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 643–675, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>. Acesso em: 19 mar. 2020.

VENNERI, M. A. et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. **Blood**, [S. l.], v. 109, n. 12, p. 5276–5285, 15 jun. 2007. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/109/12/5276/23076/Identification-of-proangiogenic-TIE2-expressing>. Acesso em: 30 out. 2020.

VERNOT, J. P. Senescence-Associated Pro-inflammatory Cytokines and Tumor Cell Plasticity. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 7, p. 63, 13 maio 2020.

VESELY, M. D. et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 235–271, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>. Acesso em: 05 mar. 2020.

VORA, H. H. et al. Expression of C-Myc mRNA in squamous cell carcinoma of the tongue. **Journal of Surgical Oncology**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 70–78, 1 jan. 2007.

WAITZBERG, A. F. L. et al. Clinical significance of c-myc and p53 expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Detection and Prevention**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 178–186, 1 jul. 2004.

WEST, C. M.; KENG, P. C.; SUTHERLAND, R. M. Growth phase related variation in the radiation sensitivity of human colon adenocarcinoma cells. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1213–1219, jun. 1988.

WILKERSON, M. D. et al. Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important and correspond to different normal cell types. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, [S. l.], v. 16, n. 19, p. 4864–4875, 1 out. 2010.

WONDERGEM, N. E. et al. The Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: on Subsets and Subsites. **Current Oncology Reports**, [S. l.], v. 22, n. 8, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7324425/>. Acesso em: 15 maio 2021.

WU, C. et al. Targeting AURKA-CDC25C axis to induce synthetic lethality in ARID1A-deficient colorectal cancer cells. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, 10 ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6086874/>. Acesso em: 15 maio 2021.

WU, S. et al. Stimulation of ovarian tumor cell proliferation with monocyte products

including interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α . **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, [S. l.], v. 166, n. 3, p. 997–1007, 1 mar. 1992.

WU, W.-Y. *et al.* STAT3 activation in monocytes accelerates liver cancer progression. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 11, p. 506, 5 dez. 2011.

XIA, L. *et al.* EZH2 enhances expression of CCL5 to promote recruitment of macrophages and invasion in lung cancer. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 1011–1019, 2020.

YANAMOTO, S. *et al.* Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. **Oral Oncology**, [S. l.], v. 43, n. 9, p. 869–877, out. 2007.

YANG, J. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, [S. l.], v. 2, p. 1, 7 jan. 2014.

YANG, L.; ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, 28 fev. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5329931/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

YANG, Y. *et al.* The PDGF-BB-SOX7 axis-modulated IL-33 in pericytes and stromal cells promotes metastasis through tumour-associated macrophages. **Nature Communications**, Bandiera_abtest: aCc_license_type: cc_byCg_type: Nature Research Journalsnumber: 1Primary_atype: Researchpublisher: Nature Publishing GroupSubject_term: Cancer therapy;Metastasis;Monocytes and macrophages;Tumour immunologySubject_term_id: cancer-therapy;metastases;monocytes-and-macrophages;tumour-immunology, v. 7, n. 1, p. 11385, 6 maio 2016.

YANG, Z. *et al.* Identification of AUNIP as a candidate diagnostic and prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. **EBioMedicine**, [S. l.], v. 47, p. 44–57, 10 ago. 2019.

YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis.

Molecular Oncology, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 28–39, jan. 2017.

YOSHIDA, G. J. Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, [S. l.], v. 37, 27 jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6062976/>. Acesso em: 15 maio 2021.

YU, Y. -R.; HO, P. -C. Sculpting tumor microenvironment with immune system: from immunometabolism to immunoeediting. **Clinical and Experimental Immunology**, [S. l.], v. 197, n. 2, p. 153–160, ago. 2019.

YUAN, A. *et al.* Chromogranin A-positive tumor cells in human esophageal squamous cell carcinomas. **Pathology & Oncology Research**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 321–325, dez. 2007.

ZHANG, H. *et al.* Overexpression of Aurora-A promotes laryngeal cancer progression by enhancing invasive ability and chromosomal instability. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, [S. l.], v. 269, n. 2, p. 607–614, 2012.

ZHANG, X. *et al.* Chromogranin-A Expression as a Novel Biomarker for Early Diagnosis of Colon Cancer Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 12, 14 jun. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628020/>. Acesso em: 15 maio 2021.

ZHENG, X. *et al.* Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 48436–48452, 12 abr. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5564660/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

ZHONG, J.-Y. *et al.* Aberrant DNA methylation of synaptophysin is involved in adrenal cortisol-producing adenoma. **Aging (Albany NY)**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. 5232–5245, 28 jul. 2019.