

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

GRAZIELA PERRI

**Efeito de IL-33 e do meio condicionado de macrófagos na  
ativação de células de carcinoma espinocelular**

BAURU  
2021



GRAZIELA PERRI

**Efeito de IL-33 e do meio condicionado de macrófagos na  
ativação de células de carcinoma espinocelular**

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Campanelli

**Versão Corrigida**

BAURU  
2021

Perri, Graziela

Efeito de IL-33 e do meio condicionado de macrófagos na ativação de células de carcinoma espinocelular / Graziela Perri. -- Bauru, 2021.

154 p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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:

Data:

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

## ERRATA



---

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO



### Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

---

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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada e defendida por  
**GRAZIELA PERRI**  
e aprovada pela Comissão Julgadora  
em 23 de julho de 2021.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **HAYANA RAMOS LIMA**  
UFSB

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **KAREN ANGÉLICA CAVASSANI DE SOUZA**  
UM

Prof. Dr. **PAULO SERGIO DA SILVA SANTOS**  
FOB-USP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **ANA PAULA CAMPANELLI**  
Presidente da Banca  
FOB - USP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação





---

---

## DEDICATÓRIA

Ao mestre Jesus por todas as minhas conquistas, pois sem as suas bênçãos eu não as teria alcançado, quero agradecer também por todas as pessoas que o senhor me enviou que me ensinaram muito no decorrer da minha vida.

Ao meu pai Osvaldo, por tanto amor e dedicação em todos esses anos.

À minha mãe Elisabete (*In memorian*) que tenho certeza de que está sempre ao meu lado me orientando.

À Rosimeire minha madrasta por tudo que fez e faz por mim, só tenho a agradecer pelo acolhimento e ajuda.

Ao meu irmão Rafael, minha cunhada Ana Carina e minhas sobrinhas amadas Giulia e Liz que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando.

---

---



---

---

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Campanelli, por acreditar em mim e me abrir as portas do mundo da pesquisa. Obrigada pela oportunidade da execução desta tese, pelo crescimento profissional e pessoal, por todos os ensinamentos e, principalmente, pela paciência.

Agradeço muito ao professor Dr. Cory Hogaboam, co-orientador do doutorado sanduiche, que com sua reconhecida capacidade como pesquisador contribuiu muito para elaboração deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen A. Cavassani, minha gratidão por toda ajuda e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. Por todo esforço que empregou durante meu doutorado sanduiche, porém mais importante foi a amizade que nasceu desse projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Coelho por todo o auxílio na realização dos experimentos no Cedars-Sinai Medical Center. Aninha, minha querida amiga, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Muito obrigada pelo carinho e prontidão com que sempre me auxiliou.

Ao Dr. Edwin M. Posadas, médico e pesquisador do Cedars-Sinai Medical Center, por gentilmente permitir o uso de seu laboratório para cultivo das células tumorais.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Renata Salles Nogueira da Costa pela ajuda, suporte, e pelos ensinamentos deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Aparecido Torres, pela convivência, ensinamentos e sugestões e agradável companhia todos esses anos.

À professora Dr<sup>a</sup>. Claudia Ramos Pinheiro pessoa divertida, sincera, de um coração enorme e ótima convivência.

---

---



---

---

Ao professor Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, pela amizade, apoio e disposição em nos ajudar.

À Dr<sup>a</sup>. Hayana Ramos Lima pela disposição e atenção em nos ajudar.

À Dalva Ribeiro de Oliveira, minha querida amiga, pela dedicação nos momentos de dúvidas e pelo carinho em seu modo de nos tratar.

Ao meu amigo André Luís da Silva, como foi e é importante nessa minha jornada. Se não fosse você eu não estaria no mundo da pesquisa. Muito obrigada.

À Livia Maria de Melo, minha amiga, não mede esforços para nos ajudar, sempre sorrindo e com um coração imenso.

Ao Dr. Narciso Almeida Vieira, sempre pronto e disposto a nos ajudar nas coletas de sangue para nossos experimentos.

À minha colega de pós-graduação Raíssa Gabrieli Candido, pela paciência, ajuda e tanta dedicação e companheirismo nos experimentos que realizamos juntas.

Às minhas colegas do Cedars-Sinai Medical Center: Milena Spindola, Miriam Hohmann, Stephanie Garcia, pela amizade, paciência e por toda ajuda.

Aos funcionários dos laboratórios de Histologia e Patologia, por toda colaboração e presteza durante a realização deste doutorado.

À Márcia Graeff, do Centro de Pesquisa Integrada (CIP), pelas dicas e colaboração na captura das imagens de microscopia confocal.

Aos meus amigos Rafael e Nádia por estarem sempre dispostos a me ajudar e pelos momentos divertidíssimos que passamos juntos.

A toda minha família e amigos pela compreensão nesses anos de estudo para que pudesse alcançar meus objetivos.

---

---



---

---

A minha psicóloga Andréia Georges, pessoa fundamental na minha vida pessoal e profissional, sempre me orientando e me ensinando como a vida é maravilhosa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

---

---





---

---

## **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 Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa de sua coordenadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen. Em especial a coordenadora da área de Biologia Oral, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marília A. R. Buzalaf.

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

Ao laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Campanelli.

Ao Hospital Estadual de Bauru “Dr. Arnaldo Prado Curvêllo”, na pessoa de Deborah Maciel Cavalcanti Rosa, diretora-executiva.

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<sup>a</sup>. Maria Renata Sales Nogueira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de minha bolsa de doutorado e doutorado sanduiche.

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.

Muito Obrigada!!!

---

---



---

---

*“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão”*

***Chico Xavier***

---

---



---

---

## RESUMO

Os tumores se desenvolvem em microambientes complexos e dinâmicos. Macrófagos são componentes deste microambiente tumoral e essenciais na defesa do hospedeiro. Em resposta a fatores presentes no microambiente tumoral, estas células podem alterar seu fenótipo e função. Macrófagos com fenótipo M1 ou classicamente ativados, são células pró-inflamatórias e possuem atividade antitumoral. Macrófagos com fenótipo M2 ou alternativamente ativados aumentam a inflamação local e promovem progressão e metástase tumoral. Macrófagos com fenótipo M2 podem promover invasão e metástase das células tumorais. A interleucina 33 (IL-33), tem sido correlacionada com a progressão de vários tipos de malignidades e associada com uma baixa sobrevida. O presente estudo se propôs a avaliar os efeitos de IL-33 e do meio condicionado de macrófagos na ativação de células tumorais da linhagem SCC-25 e Detroit 562. Verificamos que o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 diminuiu a motilidade e a proliferação das células tumorais da linhagem SCC-25, e ativou a expressão dos genes *IL-33*, *ST2*, *SOX2*, *CHGA* e *EPCAM*. Por outro lado, este mesmo estímulo diminuiu a expressão dos genes *MYC*, *MYCN* e *SYP* em células da linhagem SCC-25. Em relação aos efeitos do meio condicionado de macrófagos M2, os dados evidenciaram que este estímulo induziu o aumento da motilidade, proliferação e capacidade invasiva de células da linhagem tumoral SCC-25. Este mesmo estímulo induziu a expressão dos genes *IL-33*, *ST2*, *NANOG*, *SOX2* e *EPCAM* por células da linhagem tumoral SCC-25, ao mesmo tempo que diminuiu a expressão dos genes *MYC*, *AURKA* e *SYP*. Na linhagem tumoral Detroit 562, o meio condicionado da cultura de macrófagos M1 aumentou a motilidade destas células, diminuiu a taxa de proliferação, ativou a expressão dos genes *IL-33* e *ST2* e diminuiu a expressão do gene *MYC*. Enquanto o meio condicionado de macrófagos M2 promoveu a diminuição da motilidade de células da linhagem Detroit 562 e diminuiu a expressão dos genes *IL-33*, *SOX2* e *MYC* por estas células. Por outro lado, este mesmo estímulo levou a aumento da proliferação de células da linhagem Detroit 562. Ao analisarmos os efeitos da citocina IL-33, os resultados demonstraram que esta citocina induziu o aumento da proliferação, migração e invasão das células da linhagem SCC-25. Ademais, a citocina IL-33 levou a diminuição da expressão de *MYC*. A estimulação com IL-33 aumentou significativamente a migração e proliferação

---

---



---

---

da linha celular Detroit 562, e induziu diminuição significativa da expressão dos genes *SOX2*, *MYC*, *SYP* e *EZH2*. Nossos resultados indicam que a citocina IL-33 e o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 e M2 apresenta efeitos na motilidade, proliferação e invasão/migração de células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Macrófagos. Interleucina IL-33.

---

---





---

---

## ABSTRACT

### Effect of IL-33 and macrophage conditioned media on tumor cells

Tumors develop in complex and dynamic microenvironments. Macrophages are components of this tumor microenvironment and essential in the defense of the host. In response to factors present in the tumor microenvironment, these cells can alter their phenotype and function. Macrophages with M1 phenotype or classically activated, are considered pro-inflammatory and anti-tumor macrophages. M2 or alternatively activated macrophages increase local inflammation and promote tumor progression and metastasis. Macrophages with M2 phenotype can promote invasion and metastasis of tumor cells. Interleukin-33 (IL-33) is known for its dichotomous role in contributing to the development of tumors and is expressed by macrophages. Interleukin 33 (IL-33) has been correlated with the progression of various types of malignancies and associated with a low survival. The present study aimed to evaluate the effects of IL-33 and the conditioned medium of macrophages on the activation of tumor cells of the SCC-25 and Detroit 562 lineage. We verified that M1 macrophages-derived conditioned medium decreased the motility and proliferation of the SCC-25 lineage tumor cells, and induced higher levels of *IL-33*, *ST2*, *SOX2*, *CHGA* and *EPCAM* genes. On the other hand, this medium down-modulated the expression of the *MYC*, *MYCN* and *SYP* genes in SCC-25 cells. In another set of experiments, our data demonstrated that M2 macrophages-derived conditioned medium increased motility, proliferation and invasive capacity of SCC-25 tumor cells and induced higher expression of mRNA levels of *IL-33* genes, *ST2*, *NANOG*, *SOX2* and *EPCAM*. However, M2-derived conditioned medium had a negative modulation on the expression of *MYC*, *AURKA* and *SYP* genes. In the tumor lineage Detroit 562, M1 derived conditioned medium increased the motility of these cells, decreased the proliferation rate, up-regulated mRNA levels of *IL-33* and *ST2*. While the M2-derived conditioned medium increases the proliferation of Detroit 562 cells, we observed a significant decrease on the motility and *IL-33*, *SOX2* and *MYC* mRNA levels. The presence of recombinant human IL-33 demonstrated that this cytokine induced proliferation, migration and invasion of SCC-25 cells. In addition, IL-33 led down-modulated *MYC* expression. Stimulation with IL-33 significantly increased the

---

---



---

---

migration and proliferation of the Detroit 562 cell line and induced a significant down-modulation on the expression of the *SOX2*, *MYC*, *SYP* and *EZH2* genes. Altogether, our results indicate that cytokine IL-33 and the presence of M1 and M2 secreted proteins had a direct effect on the motility, proliferation and invasion of SCC-25 derived cell lines. These results help us to understand better the direct effects of immune components in tumor cells mimicking the tumor microenvironment.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Macrophages. IL-33 Interleukin

---

---



---

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Caracterização de macrófagos quanto à expressão de HLADR e CD206.....	65
Figura 2 -	Expressão de CD68 e CD163 em carcinoma espinocelular.....	74
Figura 3 -	Quantificação da expressão de CD68 e CD163 em amostras de carcinoma espinocelular.....	76
Figura 4 -	Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida de células da linhagem tumoral SCC-25.....	78
Figura 5 -	Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos.....	79
Figura 6 -	Resposta proliferativa da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos.....	80
Figura 7 -	Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562.....	82
Figura 8 -	Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos.....	83
Figura 9 -	Resposta proliferativa da linhagem tumoral Detroit 562 estimulada com o meio condicionado da cultura de macrófagos.....	84
Figura 10 -	Ensaio de invasão e migração em <i>transwell</i> para células da linhagem SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos.....	86
Figura 11 -	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> em células da linhagem tumoral SCC-25 por PCR em tempo real.....	88
Figura 12 -	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> em células da linhagem tumoral SCC-25 por PCR em tempo real.....	89

---

---



---

---

Figura 13 -	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> em células da linhagem tumoral Detroit 562 por PCR em tempo real.....	91
Figura 14 -	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> em células da linhagem tumoral Detroit 562 por PCR em tempo real.....	92
Figura 15 -	Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral SCC-25.....	93
Figura 16 -	Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33....	94
Figura 17 -	Resposta proliferativa da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33....	96
Figura 18 -	Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562.....	97
Figura 19 -	Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33.....	98
Figura 20 -	Resposta proliferativa da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33....	100
Figura 21 -	Ensaio de invasão e migração em <i>transwell</i> para células da linhagem SCC-25 estimuladas com a citocina IL-33.....	101
Figura 22 -	Expressão do gene <i>ST2</i> em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562 por PCR em tempo real.....	103
Figura 23 -	Expressão dos genes <i>IL-33</i> e <i>ST2</i> em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562 por PCR em tempo real.....	104
Figura 24 -	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> em células da linhagem tumoral SCC-25 por PCR em tempo real.....	106
Figura 25 -	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> em células da linhagem tumoral Detroit 562 por PCR em tempo real.....	107

---

---





---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
2B4	CD244
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADP	Adenosina difosfato
ALDH1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1</i>
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato ciclico
APC	<i>Allophycocyanin, aloficocianina</i>
ARF	<i>Auxin response factors</i> , Fatores de Resposta Auxina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bHLHZip	<i>Basic helix-loop-helix leucine zipper</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumina sérica bovina
CA	Califórnia
CAFs	<i>Cancer associated fibroblasts</i> , fibroblastos associados ao câncer
CCI	<i>C-C chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
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 <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , Linfócito T citotóxico
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 (CD152)</i>
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , Linfócitos T Citotóxico
CXCL	<i>C-X-C chemokine ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor</i> ,
DAB	Diaminobenzidina
DC	<i>dendritic cell</i> , células dendríticas
DCC	<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
EBV	<i>Epstein-Barr</i> , Epstein-Bar vírus
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
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 fluoresceína
FIt3L	<i>FMS Like Tyrosine Kinase 3 Ligand</i> , Receptor tirosina quinase 3 do tipo FMS
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>

---

---



---



---

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	<i>Haematoxylin and eosin</i> , Hematoxilina e eosina
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> , Fator 1-alfa induzível por hipóxia
HNSCC	<i>Head and Neck squamous cell carcinoma</i> , Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
HPV	<i>Human papilloma virus</i> , Papilomavírus humano
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IFN- $\gamma$	<i>Interferon-gama</i>
IgE	<i>Immunoglobulin E</i> , Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILCs	<i>Innate lymphoid cells</i> , Células linfóides inatas
ILSL	Instituto Lauro de Souza Lima
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> , Óxido nítrico síntase induzível
Kg	Kilograma
Kras	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i> (CD223)
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MC	Meio condicionado
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> , fator estimulador de colônia de macrófagos
M1	<i>M1-polarized macrophages</i> , macrófagos M1
M2	<i>M2-polarized macrophages</i> , macrófagos M2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i> , células mielóides supressoras
mg	Miligrama
MGMT	<i>O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex I</i> , Complexo principal de histocompatibilidade I
miRNAs	MicroRNAs
ml	Mililitro
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i> , metalloproteínases da matriz
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
N	Tamanho das amostras
N $^{\circ}$	Número
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NETS	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> , Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear fator kappa B</i> , Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NK	Natural Killer, células natural killer
NKp46	<i>Natural cytotoxicity receptor</i> , Receptores naturais de citotoxicidade
NO	<i>Nitric Oxide</i> , óxido nítrico
O $_2$	Oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampão fosfato salino
PD-L1	<i>Programmed cell death protein 1 ligand 1</i>

---



---



---



---

PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> , fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	<i>Phycoerythrin</i> , ficoeritrina
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i> , Prostaglandina E <sub>2</sub>
pH	Hidrogenionico potencial, potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i> , Fosfoinositídeo 3-quinase
PTPRs	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type S</i> , Receptores da proteína tirosina fosfatase
RAE1	<i>Ribonucleic Acid Export 1</i>
RAS	<i>RAt Sarcoma vírus</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SD	<i>Standard Deviation</i> , desvio padrão
sST2	<i>Soluble ST2</i> , 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>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i> , macrófagos associados ao tumor
TANs	<i>Tumor-associated neutrophils</i> , neutrófilos associados ao tumor
TCD4 <sup>+</sup>	<i>Helper T Lymphocyte</i> , Linfócito T auxiliar
TCD8 <sup>+</sup>	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> , Linfócito T citotóxico
TDA	Antígenos derivados do tumor
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> , Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócito T auxiliar (helper)
TIM3	<i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i> , Receptores do tipo Toll
TME	<i>Tumoral microenvironment</i> , Microambiente tumoral
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> , Fator de necrose tumoral
TP53	<i>Tumor protein p53</i> , Proteína de tumor 53
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	Células T regulatórias
$\mu$ m	Micrômetro
USA	<i>United States of América</i> , Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> , Fator de crescimento endotelial vascular A

---



---



---

---

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	23
	1.1 Carcinoma Espinocelular.....	23
	1.2 Fatores de transcrição associados com o desenvolvimento tumoral.....	27
	1.3 Microambiente Tumoral.....	34
	1.4 Macrófago.....	45
	1.5 IL-33.....	48
2	<b>OBJETIVOS .....</b>	55
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	59
3.1	Aspectos éticos.....	59
3.2	Casuística e seleção da amostra.....	59
3.3	Análise histopatológica.....	60
3.4	Imunohistoquímica.....	61
3.5	Análise e quantificação das imunomarcações.....	62
3.6	Isolamento dos leucócitos.....	62
3.7	Obtenção dos monócitos.....	63
3.8	Cultura de monócitos e diferenciação dos macrófagos.....	64
3.9	Citometria de fluxo.....	64
3.10	Cultura de células tumorais.....	66
3.11	Ensaio de migração celular no Incucyte.....	66
3.12	Ensaio de proliferação celular no Incucyte.....	67
3.13	Ensaio de invasão no transwell.....	68
3.14	Extração do RNA total.....	68
3.15	Síntese de cDNA através da transcrição reversa .....	69
3.16	Reação de PCR.....	69
3.17	Análise de expressão gênica <i>in silico</i> por bioinformática.....	70
3.18	Análise estatística.....	70

---

---





---

---

4	<b>RESULTADOS</b> .....	73
4.1	Expressão de CD68 e CD163 em amostras de carcinoma espinocelular.....	73
4.2	Células da linhagem tumoral SCC-25 quando estimuladas com o meio condicionado de macrófagos M1 apresentaram menor motilidade e atividade proliferativa.....	77
4.3	Células da linhagem tumoral Detroit 562 quando estimuladas com o meio condicionado de macrófagos M1 apresentaram maior motilidade.....	81
4.4	Invasão/migração, <i>in vitro</i> , das células da linhagem tumoral SCC-25 é induzida pelo meio condicionado da cultura de macrófagos.....	85
4.5	Avaliação 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> em células da linhagem tumoral SCC- 25.....	87
4.6	Avaliação 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> em células da linhagem tumoral Detroit 562.....	90
4.7	IL-33 altera a motilidade e a atividade proliferativa de células da linhagem tumoral SCC-25.....	90
4.8	Células da linhagem tumoral Detroit 562 quando estimuladas com IL- 33 apresentaram maior motilidade e atividade proliferativa.....	95
4.9	Invasão/migração, <i>in vitro</i> , das células da linhagem tumoral SCC-25 é induzida por IL-33.....	99
4.10	IL-33 induziu aumentou na expressão do receptor ST2 na linhagem de células tumorais SCC-25.....	102
4.11	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> em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562.....	105
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	111

---

---



---

---

6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	121
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	125

---

---



# 1 INTRODUÇÃO

---



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Carcinoma espinocelular

As neoplasias representam um dos mais relevantes problemas de saúde pública no mundo e, nas próximas décadas, estima-se a incidência de mais de 21.4 milhões de novos casos e 13.2 milhões de mortes (FERLAY; SOERJOMATARAM; DIKSHIT; ESER *et al.*, 2015). O carcinoma espinocelular (CEC) é o segundo tipo de neoplasia mais comum no mundo (KARAM; RABEN, 2019) e o mais frequente no Brasil, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, o número de novos casos de câncer de pele não melanoma estimado será de 83.770 em homens e de 93.160 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 80,12 novos casos a cada 100 mil homens e 86,65 novos casos a cada 100 mil mulheres. cerca de 176.000 novos casos e 2.616 casos de morte (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

No mundo, mais de meio milhão de indivíduos são diagnosticados com CEC e cerca de 300.000 pacientes chegam a óbito (BRAY, 2018; FITZMAURICE; ALLEN; BARBER; BARREGARD *et al.*, 2017; GHANTOUS; ABU ELNAAJ, 2017). Em geral, os homens apresentam riscos duas a quatro vezes maior do que as mulheres de desenvolver esse tipo de tumor. A idade média de diagnóstico para câncer não associado à vírus é de 66 anos, enquanto a idade média de diagnóstico de câncer orofaríngeo associado ao papiloma vírus humano (HPV) e câncer de nasofaringe associado ao vírus Epstein-Barr (EBV) é de aproximadamente 53 anos e 50 anos, respectivamente (FUNG; LAM; CHAN, 2016; WINDON; D'SOUZA; RETTIG; WESTRA *et al.*, 2018).

Dentre os fatores de risco clássicos que aumentam as chances do surgimento desse tipo de câncer, cerca de 75% estão relacionados à exposição ao tabaco e produtos semelhantes além do consumo excessivo de álcool (MAIER; DIETZ; GEWELKE; HELLER *et al.*, 1992). O consumo de álcool e tabaco são fatores de alto risco associados à prevalência geográfica, onde os usuários dessas substâncias possuem um risco 35 vezes maior de desenvolver o câncer (BLOT; MCLAUGHLIN; WINN; AUSTIN *et al.*, 1988). Os efeitos causados pelo uso do cigarro eletrônico ainda

---

---

são desconhecidos. A exposição à poluentes atmosféricos cancerígenos, produtos químicos orgânicos e inorgânicos também estão relacionados com o surgimento dessa neoplasia (MISHRA; MEHEROTRA, 2014; WONG; NG; LUI, 2014). Em países da Ásia-Pacífico, algumas populações apresentam carcinoma espinocelular de cavidade oral por possuírem o hábito de mastigar noz de areca, uma espécie de noz, cujos efeitos são comparáveis com a nicotina (SAMET; CHIU; COGLIANO; JINOT *et al.*, 2020). Outros fatores de risco incluem o envelhecimento, higiene bucal precária e dieta deficiente em vegetais (FREEDMAN; PARK; SUBAR; HOLLENBECK *et al.*, 2008). Verificou-se também que infecções causadas por agentes virais como o HPV e EBV aumentam as chances do desenvolvimento dessa neoplasia (CHATURVEDI; ENGELS; PFEIFFER; HERNANDEZ *et al.*, 2011), principalmente na região da orofaringe (CASTELLSAGUÉ; ALEMANY; QUER; HALEC *et al.*, 2016). Além disso, fatores genéticos contribuem para o risco do surgimento do CEC. Indivíduos com anemia de Falconi, uma doença genética hereditária rara caracterizada por reparo de DNA prejudicado, tem risco de 500-700 vezes maior de desenvolverem essa neoplasia, principalmente na cavidade oral (VELLEUER; DIETRICH, 2014).

Há hipóteses que sustentam a ideia de que os tumores malignos têm início e são mantidos por uma população de células tumorais com propriedades biológicas semelhantes às células-tronco adultas normais (TAN; PARK; AILLES; WEISSMAN, 2006). Sabe-se que o câncer surge devido ao acúmulo de mutações genéticas dentro de uma única célula ou grupo de células com vantagem proliferativa que permite que elas escapem dos controles de crescimento homeostático. Como resultado tem se o surgimento de uma massa de células heterogêneas (NOWELL, 1978). A iniciação e progressão do tumor acontece por um processo contínuo e aleatório de variabilidade genética adquirida e seleção natural darwiniana, resultando em subclones cada vez mais agressivos (BURRELL; SWANTON, 2016). Este modelo sugere que todas as células dentro da massa tumoral possuem as mesmas probabilidades de serem a célula que origina o tumor. Estudos têm demonstrado essa heterogeneidade genética dentro de tumores individuais, sítios primários e metastáticos e entre neoplasias primárias e recorrentes (SCHRAMM; KÖSTER; ASSENOV; ALTHOFF *et al.*, 2015; SHAH; ROTH; GOYA; OLOUMI *et al.*, 2012). Fatores como as instabilidades genômicas juntamente com a presença de alterações epigenéticas nas células tumorais, também contribuem para a diversidade clonal (MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012). Além disso, com base neste modelo, a resistência tumoral aos

---



medicamentos ocorre devido à seleção de clones pré-existentes capazes de resistir ao tratamento, eventualmente crescendo e formando a maior parte do tumor. Um outro modelo hierárquico ou de células-tronco cancerosas de tumorigênese, descreve que um subconjunto biologicamente heterogêneo de células dentro de um tumor é responsável pela iniciação e propagação desse tumor devido aos seus traços semelhantes a células-tronco de renovação e capacidade de propagação clonal de longo prazo (REYA; MORRISON; CLARKE; WEISSMAN, 2001).

A instabilidade genética é outro fator ligado ao carcinoma espinocelular. Algumas anormalidades cromossômicas são atribuídas aos estágios de progressão (PAI; WESTRA, 2009). Durante a progressão da mucosa epitelial não alterada para hiperplasia, verificou-se a perda da região cromossômica 9p21, que inclui os genes supressores do tumor como *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) e *ARF* (*Auxin response factors*). Na etapa seguinte de progressão, para displasia, ocorre a perda de 3p21 e 17p13, o locus de *TP53* (*Tumor protein p53*). De displasia para carcinoma *in situ* observa-se a deleção de 11q13, 13q21 e 14q32, enquanto na progressão para o carcinoma invasivo há deleção da região cromossômica 6p, 8, 4q27 e 10q23. Além de alterações genéticas, as epigenéticas têm papel importante na oncogênese de CEC, causando hipometilação global de DNA, hipermetilação e expressão diminuída dos genes supressores de tumores incluindo *CDKN2A*, *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) e *MGMT* (*O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*) (FOY; PICKERING; PAPADIMITRAKOPOULOU; JELINEK *et al.*, 2015; HA; CALIFANO, 2006). Proteínas de sinalização e/ou ativação tem a expressão aumentada em tumores de cabeça e pescoço. Cerca de 80 a 90% dos tumores tem uma alta expressão de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*) e está associado à sobrevida geral ruim (ZHU; ZHANG; ZHANG; HE *et al.*, 2013). A expressão aumentada de *EGFR* no carcinoma espinocelular oral foi correlacionada com aumento do tamanho do tumor, estágio patológico avançado, aumento da incidência e gravidade da recorrência, diminuição da sobrevida livre de doença e, portanto, funciona como um marcador prognóstico promissor. Além disso, o *EGFR* tem sido um alvo importante no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. A expressão aumentada da interleucina 6 (IL-6) e de seu receptor também está associada a um mal prognóstico no carcinoma espinocelular (KARAKASHEVA; LIN; TANG; QIAO *et al.*, 2018; TSAI; CHEN; LU; CHEN, 2019). PI3K-AKT-mTOR é a via de sinalização oncogênica mais alterada no

---

carcinoma espinocelular (NETWORK, 2015; WANG; VALERA; ZHAO; CHEN *et al.*, 2017). Embora raramente sofra mutação, a sinalização via STAT3 (*Signal Transducer and Activators of Transcription 3*) é regulada positivamente em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (LUI; PEYSER; NG; HRITZ *et al.*, 2014; PEYSER; DU; LI; LUI *et al.*, 2015) devido mutações nos genes que codificam os receptores da proteína tirosina fosfatase (PTPRs, do inglês, *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor*) resultando em mal prognóstico (JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018). A sinalização via STAT3 guia a expressão gênica de promotores de proliferação, sobrevivência celular e citocinas imunossupressoras (JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018). A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina contribui para o surgimento do carcinoma espinocelular (ALAMOUD; KUKURUZINSKA, 2018). O crescimento e sobrevivência das células tumorais é regulada pela via de sinalização RAS-MAPK (NETWORK, 2015).

As neoplasias de cabeça e pescoço compreendem tumores sólidos, heterogêneos (PLUQUET; GALMICHE, 2019) e agressivos que se manifestam no trato aéreo digestivo superior, cavidade oral, faringe, laringe e seios paranasais (WYSS; HASHIBE; CHUANG; LEE *et al.*, 2013). São conhecidos vários tipos de CEC, dentre eles 90% dos casos são responsáveis pelo carcinoma epidermóide oral (BROĆIĆ; KOZOMARA; CEROVIĆ; JOVIĆ *et al.*, 2009). O carcinoma espinocelular origina-se de queratinócitos do revestimento epitelial escamoso estratificado da cavidade oral. Clinicamente, o carcinoma espinocelular se apresentam como ulcerações que não cicatrizam devido à destruição do tecido, endurecimento devido à formação excessiva de queratina dentro do estroma tumoral, fixação do tecido subjacente devido à invasão da submucosa e margens tumorais elevadas e/ou evertidas (LINDBERG; RHEINWALD, 1990). As células epiteliais orais são vulneráveis às alterações cancerígenas, pois atuam como a primeira barreira defensiva contra poluentes e carcinógenos. O desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral surge da expansão clonal e do crescimento aberrante de uma única célula-tronco ou de algumas células que são o ponto de partida do tumor que adquirem capacidade de auto renovação. Estas células escapam ao controle de crescimento normal e ganham vantagem de crescimento permitindo a expansão clonal que substitui o tecido epitelial normal. A medida que a lesão aumenta, o dano genético adicional origina subclones, resultando em um câncer invasivo (FELLER; ALTINI; LEMMER, 2013).

---

A transição epitelial para mesenquimal é um processo biológico definido pela perda das características epiteliais e aquisição de um fenótipo mesenquimal (THIERY, 2002). Uma vez adquirida essas características, a célula apresenta aumento no potencial migratório e invasivo, assim como aumento da resistência à apoptose, capacidade de romper a membrana basal, e de alterar expressões de certos microRNAs (miRNAs) (KALLURI; NEILSON, 2003; ROCHE, 2018). Ademais o processo reverso, transição mesenquimal-epitelial (MET do inglês *mesenchymal to epithelial transition*), foi indicado como essencial em estágios finais da progressão do câncer e abrange o desenvolvimento de metástases (CHAFFER; THOMPSON; WILLIAMS, 2007). A plasticidade das células cancerígenas refere-se a mudança funcional e fenotípica entre o estado mesenquimal e epitelial em tumores e tem sido sugerida por gerar heterogeneidade e controlar a progressão do tumor (LAMBERT; WEINBERG, 2021; TEEUWSEN; FODDE, 2019). Redes de sinalização orquestradas por fatores de transcrição específicos determinam o destino das células-tronco e a identidade da célula neoplásica (MASSAGUÉ; GOMIS, 2006). Nos últimos anos, alguns genes reguladores, dentre eles *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM*, *SYP*, têm atraído atenções por se comportarem como fatores que envolvem tumorigênese e malignidade, e que podem ser usados como potenciais biomarcadores moleculares (ZHAO; LI; ZHANG, 2017).

## **1.2. Fatores de transição associados com o desenvolvimento tumoral**

### **A família: *MYC*, *MYCN* e *L-Myc***

A família *MYC* de proto-oncogenes inclui três parálogos: *MYC*, *MYCN* e *L-Myc* (MATHSYARAJA; EISENMAN, 2016). O proto-oncogene *MYC* foi isolado e caracterizado em 1982 e a expressão desregulada desse gene está associada com o desenvolvimento de diferentes tipos de tumores (DEPINHO; SCHREIBER-AGUS; ALT, 1991; MARCU; BOSSONE; PATEL, 1992). *MYC* é um gene importante para a homeostasia e exerce papel importante no crescimento celular, ciclo celular, diferenciação e indução de apoptose (EVAN; CHRISTOPHOROU; LAWLOR; RINGSHAUSEN *et al.*, 2005). Sabe-se que a indução da expressão de *MYC* estimula células quiescentes, não transformadas, a passarem pela fase G1 e entrarem em S (FACCHINI; PENN, 1998). A expressão aumentada deste gene resulta no desenvolvimento de linfomas, osteosarcomas e carcinomas hepatocelulares (WU;

---

VAN RIGGELEN; YETIL; FAN *et al.*, 2007) com uma frequência de amplificação da expressão de *MYC* de aproximadamente 14% (SCHAUB; DHANKANI; BERGER; TRIVEDI *et al.*, 2018). Dados de estudos *in vivo*, indicam que a expressão aumentada de *MYC* em células hematopoiéticas leva ao desenvolvimento de tumores de células T (SMITH; BATH; HARRIS; CORY, 2005), além de aumentar a quantidade de monócitos na medula óssea e de linfócitos B no baço (SMITH; BATH; HARRIS; CORY, 2005). A desregulação de *MYC* é observada em torno de 30% dos casos de câncer (VITA; HENRIKSSON, 2006), principalmente em tumores de mama, cólon, pâncreas, carcinomas cervicais, de pulmão, osteosarcomas, glioblastomas e carcinoma espinocelular (MASTRONIKOLIS; RAGOS; KYRODIMOS; CHRYSOVERGIS *et al.*, 2019). A desregulação ocorre devido às alterações epigenéticas, amplificações, translocações cromossômicas e mutações (ARVANITIS; FELSHER, 2006). *MYC* contribui para a tumorigênese através da promoção da proliferação descontrolada e, também, por exercer efeitos na adesão celular, metabolismo, angiogênese e instabilidade genômica (EISENMAN, 2001). Dados da literatura indicam que neoplasias com expressão desregulada de *MYC* apresentam pior prognóstico (ARVANITIS; FELSHER, 2006). A inibição de *MYC* em várias linhagens tumorais resulta em parada de ciclo celular em diferentes fases (WANG; MANNAVA; GRACHTCHOUK; ZHUANG *et al.*, 2008). A importância de *MYC* na proliferação celular mostra o seu potencial para suportar a demanda aumentada de células cancerosas para um maior crescimento celular (CARTER; SUTTON; PAJIC; MURRAY *et al.*, 2016). Os tumores que apresentam desregulação de *MYC*, apresentam aumento do transporte de glutamina e do metabolismo do glutamato (CARTER; SUTTON; PAJIC; MURRAY *et al.*, 2016). Isso sugere que o metabolismo da glutamina é essencial neste contexto e é um regulador das principais atividades biosintéticas que são reguladas por *MYC* em um mecanismo de ciclo de *feedback* negativo (KORSHUNOV; REMKE; KOOL; HIELSCHER *et al.*, 2012; REN; YUE; XIAO; XIU *et al.*, 2015). Em carcinoma espinocelular a expressão de *MYC* estava aumentada entre 56,3 e 91% dos casos (KRECICKI; FRACZEK; JELEN; ZATONSKI *et al.*, 2004). Embora esteja bem estabelecido que *MYC* é altamente expresso no câncer, ainda faltam estudos sobre a modulação deste fator de transcrição nas diferentes linhagens de células de carcinoma espinocelular. A expressão anormal de *MYCN* está correlacionada com cânceres de alto risco e mau prognóstico (SCHWAB; ALITALO; KLEMPNAUER; VARMUS *et al.*, 1983). Além disso, o aumento da expressão de

---

*MYCN* é um dos eventos genéticos mais comumente encontrados em câncer de próstata neuroendócrino clínico (AKAMATSU; INOUE; OGAWA; GLEAVE, 2018).

### **CHGA**

O gene da cromogranina-A humana (*CHGA*) é um membro das graninas, uma família de proteínas ácidas encontradas em abundância em células neuroendócrinas e em alguns tumores (GUO; WANG; XIANG; WANG *et al.*, 2019). *CHGA* regula as funções celulares e é o precursor de vários peptídeos bioativos, que estão implicados a funções biológicas diferentes e distintas (CHANAT; HUTTNER, 1991) que regulam os sistemas endócrino, cardiovascular e imunológico (D'AMICO; GHINASSI; IZZICUPO; MANZOLI *et al.*, 2014; LOH; CHENG; MAHATA; CORTI *et al.*, 2012). Alguns tumores podem sofrer diferenciação neuroendócrina e apresentar expressão focal de *CHGA* (CORTI, 2010). Nos estudos iniciais sobre a associação deste gene com o desenvolvimento do carcinoma espinocelular, os autores observaram diferenciação neuroendócrina (REKHTMAN, 2010). No entanto, estudos analisaram a expressão de *CHGA* em HNSCC e encontraram a expressão em 41% dos espécimes de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (SCHARTINGER; FALKEIS; LAIMER; SPRINZL *et al.*, 2012), correlacionando a diferenciação neuroendócrina com desfechos insatisfatórios (NISMAN; HECHING; BIRAN; BARAK *et al.*, 2006). A expressão de *CHGA* foi relacionado a estágios mais avançados da doença em amostras de pacientes portadores de carcinoma pulmonar de células não pequenas (SUNDARESAN; REEVE; STENNING; STEWART *et al.*, 1991). De modo contrário, a expressão deste gene foi a associada a maior sobrevida na presença de diferenciação neuroendócrina (SCHLEUSENER; TAZELAAR; JUNG; CHA *et al.*, 1996). Vários estudos sugeriram que a alta expressão de *CHGA* está relacionada a pior sobrevida em câncer de próstata metastático resistente à castração (CONTEDEUCA; BURGIO; MENNA; CARRETTA *et al.*, 2014; DE NUNZIO; ALBISINNI; PRESICCE; LOMBARDO *et al.*, 2014). Foi comprovado que a expressão do *CHGA* está associada ao prognóstico no câncer colorretal (DOST GUNAY; KIRMIZI; ENSARI; İCLI *et al.*, 2019; KLEIST; POETSCH, 2015). Ademais, estudos evidenciaram que em tumores primários metastáticos há menor expressão deste gene do que tumores primários sem metástase (WEISBROD; ZHANG; JAIN; BARAK *et al.*, 2013).

---

## **SOX2**

SOX2 é um fator de transcrição, membro da família dos genes SOX (*SRY-related high mobility group box*) expresso em uma grande variedade de células-tronco (SARKAR; HOCHEDLINGER, 2013). SOX2 está envolvido na manutenção e/ou proliferação de células tronco embrionárias e neurais, sendo estas altamente dependente dos níveis da expressão de SOX2 (LIU; LIN; ZHAO; YANG *et al.*, 2013). Além disso, ele atua em diversos processos importantes para o desenvolvimento do câncer, regulando diversas vias como a proliferação celular e evasão de sinais apoptóticos, migração, invasão e metástase, manutenção da tumorigenicidade e da pluripotência (LIU; LIN; ZHAO; YANG *et al.*, 2013; WEINA; UTIKAL, 2014). Altos níveis de sua expressão correlacionam com maior grau tumoral de câncer de mama, cervical e carcinoma pancreático (CHEN; SHI; ZHANG; LI *et al.*, 2008; JI; ZHENG, 2010). Estudos mostraram que em câncer de mama, SOX2, junto com  $\beta$ -catenina, é capaz de promover a proliferação celular e tumorigênese por intermédio da regulação de ciclina D1, facilitando a transição de G1/S do ciclo celular (CHEN; SHI; ZHANG; LI *et al.*, 2008). Nos casos de câncer colorretal e câncer de próstata, estudos mostraram que tumores que expressam SOX2 se correlacionam com o aumento de metástases distantes e linfáticas (JIA; LI; XU; ZHANG *et al.*, 2011; NEUMANN; BAHR; HORST; KRIEGL *et al.*, 2011). No carcinoma de células escamosas, as amplificações do gene SOX2 ativam a migração celular (HUSSENET; DALI; EXINGER; MONGA *et al.*, 2010). De forma semelhante, em carcinomas de células escamosas de esôfago, os tumores nos quais mais de 50% das células expressam SOX2 foram correlacionados com aumento da invasão linfática e vascular (SAIGUSA; MOHRI; OHI; TOIYAMA *et al.*, 2011). Contrariamente, estudos mostraram que o câncer gástrico parece ser a exceção na função de SOX2, atuando como supressor tumoral, quando foram observados menores níveis de expressão em amostras de câncer comparado à mucosa normal (LI; EISHI; BAI; SAKAI *et al.*, 2004; LONG; HORNICK, 2009). Ainda, nesses tumores, o aumento da expressão de SOX2 esteve associado à inibição no crescimento celular, além de redução dos níveis de migração e invasão dessas células, através do aumento de p21 (CHEN; HUANG; ZHU; CHEN *et al.*, 2016).

---

## ***EZH2***

Acredita-se que o gene *EZH2* funcione predominantemente como um repressor transcricional que silencia uma série de genes-alvo, incluindo mais de 200 supressores de tumor (SIMON; LANGE, 2008). Estudos mostraram que *EZH2* atua na angiogênese tumoral, apoptose, transição epitélio mesenquimal, migração e invasão celular de uma variedade de cânceres (LUO; JIANG; MA; CHANG *et al.*, 2016; SUN; ZHENG; GU; GUO, 2015; ZHOU; REN; KONG; CAI *et al.*, 2015). O aumento da expressão de *EZH2* foi descrita em uma ampla gama de tipos de câncer, como por exemplo, câncer de próstata, mama, bexiga, estômago, pulmão e ovário (CHASE; CROSS, 2011; JIANG; WANG; ZHOU; GAO *et al.*, 2016). No câncer de mama, a expressão elevada de *EZH2* foi correlacionada a tumores pouco diferenciados e ao comportamento agressivo do tumor (GUO; LI; ROHR; WANG *et al.*, 2016; RAAPHORST; MEIJER; FIERET; BLOKZIJL *et al.*, 2003). Outros estudos apontaram que a alta expressão de *EZH2* está associada com a agressividade, metástase e prognóstico desfavorável do câncer de próstata (BACHMANN; HALVORSEN; COLLETT; STEFANSSON *et al.*, 2006), características observadas também no câncer de bexiga, câncer endometrial e melanoma (BACHMANN; HALVORSEN; COLLETT; STEFANSSON *et al.*, 2006; BRACKEN; PASINI; CAPRA; PROSPERINI *et al.*, 2003). *EZH2* apresenta um papel importante na transição epitélio mesenquimal, invasão tumoral e metástase em HNSCC mediado pelo eixo STAT3/VEGFR2 (ZHAO; HU; XU; WU *et al.*, 2019). Dados também demonstraram que a expressão elevada de *EZH2* estava associada a um mau prognóstico em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CAO; FENG; CUI; ZHANG *et al.*, 2012). Contrariamente, em alguns tipos de câncer a alta expressão de *EZH2* se mostrou como fator de melhor prognóstico (CAO; RIBEIRO; LIU; SAINTIGNY *et al.*, 2012). Mutações que inativam *EZH2* são encontradas em pacientes com malignidades mielóides incluindo síndrome mielodisplásica e neoplasias mieloproliferativas, e tais mutações em *EZH2* estão associadas a baixa sobrevida do paciente (ERNST; CHASE; SCORE; HIDALGO-CURTIS *et al.*, 2010; NIKOLOSKI; LANGEMEIJER; KUIPER; KNOPS *et al.*, 2010).

---

## **NANOG**

*NANOG* é um fator de transcrição de células-tronco, que regula o desenvolvimento humano e determina o destino, proliferação e morte celular (MATO PRADO; FRAMPTON; STEBBING; KRELL, 2015). Após o nascimento, este gene é expresso em níveis muito baixos ou é silenciado, permanecendo nesse estado por toda a vida. A alta expressão de *NANOG* induz proliferação, migração e invasão das células tumorais e além disto, auxilia na manutenção da capacidade de autorrenovação de células tronco tumorais (JI; JIANG, 2013; SIU; WONG; KONG; CHAN *et al.*, 2013). Em tumores de células germinativas, *NANOG* é expresso em tumores com características indiferenciadas, como carcinoma *in situ*, carcinoma embrionário e seminomas; enquanto que tumores mais diferenciados, teratomas e tumores do saco vitelino esse gene está pouco expresso ou ausente (ZAMBLE; MIKATA; ENG; SANDMAN *et al.*, 2002). A expressão elevada de *NANOG* foi relatada em vários tipos de câncer como por exemplo em carcinoma espinocelular oral, câncer pulmonar, mama, glioma, sendo sua alta expressão correlacionada com mau prognóstico (CHANG; PARK; CHOI; IN *et al.*, 2017; GRUBELNIK; BOŠTJANČIČ; PAVLIČ; KOS *et al.*, 2020; NAGATA; SHIMADA; SEKINE; MORIYAMA *et al.*, 2017; YANG; NIU; CHENG, 2013; ZHAO; LIU; CHEN; FANG *et al.*, 2018). Além disso, é importante ressaltar que os níveis de expressão de *NANOG* são frequentemente correlacionados positivamente com a resistência ao tratamento e baixa sobrevida de pacientes com câncer. Vários estudos demonstraram que a regulação positiva da expressão de *NANOG* aumenta a tumorigenicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*, enquanto a repressão ou ablação de *NANOG* inibe a iniciação do tumor (GONG; LI; JETER; FAN *et al.*, 2015). Dados sobre a expressão de *NANOG* em HNSCC sugerem que a expressão de *NANOG* é regulada positivamente no HNSCC, sendo associada ao desenvolvimento, transformação e metástase de tumor e com metástases em linfonodos (CURTARELLI; GONÇALVES; DOS SANTOS; SAVI *et al.*, 2018). Em contraste, a regulação negativa de *NANOG* induz a diferenciação de células tronco embrionárias de camundongo e humano (DARR; MAYSHAR; BENVENISTY, 2006).

---



**AURKA**

*AURKA* (Aurora quinase A) é uma serina-treonina quinase que atua na formação do fuso mitótico e na segregação cromossômica (NIKONOVA; ASTSATUROV; SEREBRIISKII; DUNBRACK *et al.*, 2013). *AURKA* apresenta propriedades oncogênicas quando expressa de forma aberrante e desempenha papel essencial na modulação do crescimento tumoral (ZHENG; YUE; LI; HE *et al.*, 2016). A expressão de *AURKA* foi correlacionada ao mau prognóstico em câncer colorretal (GOOS; COUPE; DIOSDADO; DELIS-VAN DIEMEN *et al.*, 2013). Em carcinoma espinocelular oral, a alta expressão de *AURKA* foi correlacionada com prognósticos ruins. O silenciamento gênico de *AURKA* reduziu significativamente a proliferação, migração e invasão de células OSCC. Além disso, a apoptose e a produção de ROS foram altamente induzidas pelo silêncio de *AURKA* (DAWEI; HONGGANG; QIAN, 2018).

**EPCAM**

O gene *EPCAM* possui sua expressão aumentada em várias neoplasias de origem epitelial incluindo carcinomas colorretais, de mama, cabeça e pescoço e hepáticos (GASTL; SPIZZO; OBRIST; DÜNSER *et al.*, 2000; SPIZZO; FONG; WURM; ENSINGER *et al.*, 2011). Estudos correlacionaram o aumento da expressão de *EPCAM* com um fenótipo mais agressivo de câncer de língua (YANAMOTO; KAWASAKI; YOSHITOMI; IWAMOTO *et al.*, 2007). Contudo, nenhuma correlação óbvia de aumento de expressão de *EPCAM* com sobrevivência foi observada em câncer de cólon, próstata ou pulmão (WENT; VASEI; BUBENDORF; TERRACCIANO *et al.*, 2006). A molécula de adesão de células epiteliais (*EPCAM*, do inglês *Epithelial cell adhesion molecule*) é um biomarcador promissor para o carcinoma de células escamosas (WENT; LUGLI; MEIER; BUNDI *et al.*, 2004). É uma glicoproteína da superfície celular envolvida na adesão intercelular, que consiste em dois domínios extracelulares semelhantes ao fator de crescimento epitelial, uma região pobre em cisteína, um domínio transmembrana, e uma cauda citoplasmática curta (WINTER; NAGTEGAAL; VAN KRIEKEN; LITVINOV, 2003).

---

## **SYP**

Synaptophysin é uma proteína de membrana integral e um marcador neuroendócrino (NE) (WIEDENMANN; FRANKE; KUHN; MOLL *et al.*, 1986) envolvido na formação de vesículas sinápticas (WIEDENMANN; FRANKE, 1985) e a família do gene *SYP* está envolvida na diferenciação neuronal e neuroendócrina (LEUBE, 1994). Os efeitos do *SYP* e os mecanismos das alterações genômicas ou genéticas do *SYP* no adenoma produtor de cortisol ainda precisam ser validados. O baixo nível de mRNA de sinaptofisina em diferentes linhagens de células foi inesperado, pois foram negativos para vários marcadores NE. No entanto, esse baixo nível de expressão pode indicar uma certa propensão para a especialização NE dentro da capacidade de diferenciação pluripotencial dessas células. Essa diversidade está bem dentro do espectro de diferenciação de muitas células-tronco e tumores, principalmente aqueles de origem epitelial (LEUBE, 1994). Estudos relataram que a *SYP* é ubiquamente expressa em tumores adrenocorticais e sua expressão em adenomas adrenocorticais pode estar associada a funções como transporte ou secreção de glicocorticóides (SHIGEMATSU; NISHIDA; SAKAI; IGAWA *et al.*, 2009).

### **1.3. Microambiente tumoral**

O microambiente tumoral desempenha um papel relevante no desenvolvimento e progressão do câncer, e tem ganhado crescente interesse no campo de pesquisa do câncer nas últimas décadas. Os tumores se desenvolvem em microambientes complexos e dinâmicos que influenciam seu crescimento, invasão e metástase. Estas interações entre as células malignas e não transformadas criam o microambiente tumoral (TME) que pode fornecer as condições necessárias para o desenvolvimento tumoral, devido à liberação de vários fatores que facilitam a indução da inflamação e da angiogênese (CAO; ZHONG; SUN, 2009). A progressão tumoral é influenciada por dois fatores principais, a saber, alterações genéticas/epigenéticas nas células tumorais e o comportamento dos componentes do microambiente tumoral por meio de *crosstalk* mútuo e dinâmico (JAHANBAN-ESFAHLAN; SEIDI; MONHEMI; ADLI *et al.*, 2017). O microambiente tumoral pode variar em tamanho e composição, de tumor para tumor, e sua presença é considerada uma evidência de que o hospedeiro não ignora o tumor em desenvolvimento, mas tenta interferir na progressão do tumor, em um processo conhecido como vigilância imunológica. Neste microambiente são

---

ativados vários mecanismos que contribuem para a evasão da vigilância imunológica, o que facilita o surgimento de um ambiente ideal para o desenvolvimento tumoral (CANNING; GUO; YU; MYINT *et al.*, 2019; CURRY; SPRANDIO; COGNETTI; LUGINBUHL *et al.*, 2014). A percepção de que o tumor compreende um microambiente complexo, no qual interagem células geneticamente alteradas e não alteradas, substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea, tem se mostrado muito importante para a compreensão de como ocorre o desenvolvimento tumoral (CRISTINA; HERRERA-GÓMEZ; SZTURZ; ESPELI *et al.*, 2019; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010) .

O microambiente tumoral é composto por células e estruturas não celulares. Como parte do componente celular temos as células endoteliais, adipócitos, células neuroendócrinas, células sanguíneas e linfáticas, fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células imunes como linfócitos T e B, células natural Killer (NK), células dendríticas (DC), células mielóides supressoras (MDSC), T reguladoras (Treg) caracterizada por TCD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>, além de macrófagos (CRISTINA; HERRERA-GÓMEZ; SZTURZ; ESPELI *et al.*, 2019). O componente acelular é composto por proteínas da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, elastina, laminina e tenascina. Além disso, ainda se detecta nesse microambiente tumoral fatores químicos e físicos como pH, tensão de oxigênio, pressão intersticial e o fluxo do fluido. Esses fatores estão intimamente ligados e relacionados a cada etapa da progressão, metástase e metabolismo dos tumores. O carcinoma espinocelular leva ao desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor que influencia a resposta imune (HANNA; LIU; JONES; BACAY *et al.*, 2017; KECK; ZUO; KHATTRI; STRICKER *et al.*, 2015). A imunoevasão da resposta imune é alcançada através da diminuição da expressão do sistema antígeno leucocitário humano HLA, que causa prejuízo no reconhecimento de células tumorais pelas células T (MEISSNER; REICHERT; KUNKEL; GOODING *et al.*, 2005). Além disso, é notável a intrínseca relação entre células imunes e o endotélio, que interagem através de moléculas de adesão presentes nas células endoteliais para poder alcançar o tecido tumoral e exercer suas funções antitumorais (ALBINI; BRUNO; NOONAN; MORTARA, 2018). O sistema imune inato é responsável por eliminar as células alteradas, por reconhecimento direto ou por auto ativação que culmina no desencadeamento da resposta imune adaptativa (PRADEU; JAEGER; VIVIER, 2013; VIVIER; ARTIS; COLONNA; DIEFENBACH *et al.*, 2018). Inicialmente, as células imunes inatas

---

detectam tumores por meio do reconhecimento de antígenos derivados de tumor (TDAs, do inglês, *tumor derived antigens*) que incluem DNA derivado de tumor e conduzem a produção de IFN tipo I (Interferon tipo I) através da via do gene do estimulador de interferon (STING)(MARCUS; MAO; LENSINK-VASAN; WANG *et al.*, 2018), RNA derivado de tumor, detectado pelo receptor *toll-like 7* (TLR7) e TLR8 e *microRNAs* (miRNAs) que são secretados em vesículas extracelulares e podem modular o TME (RIOS-DORIA; DURHAM; WETZEL; ROTHSTEIN *et al.*, 2015). O *crosstalk* entre diferentes células imunes inatas e células tumorais resulta em diferentes resultados que fornecem novos alvos e oportunidades para possivelmente modular o TME.

Um subtipo de células imunes que fazem parte desse microambiente são as células supressoras mielóides, que compreendem uma população heterogênea de células imunes inibitórias imaturas (YOUN; NAGARAJ; COLLAZO; GABRILOVICH, 2008). Estas células desempenham papel crucial na regulação da resposta imune em patologias como o câncer, inibindo células do sistema imune. As células mielóides supressoras imaturas CD34<sup>+</sup> foram detectadas no sangue periférico de pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço (GARRITY; PANDIT; WRIGHT; BENEFIELD *et al.*, 1997; YOUNG; WRIGHT; LOZANO; PRECHEL *et al.*, 1997) e estão relacionadas com estágios avançados do carcinoma espinocelular e outros tipos de neoplasias (FILIPAZZI; HUBER; RIVOLTINI, 2012; VASQUEZ-DUNDEDEL; PAN; ZENG; GORBOUNOV *et al.*, 2013). As células mielóides supressora expressam uma diversidade de moléculas de superfície o que torna sua identificação um desafio para pesquisadores (CD11b, CD33, CD14, CD15 e CD16). Além da função imunossupressora, dados da literatura indicam que as células mielóides supressoras podem promover a angiogênese, através da produção de fatores de crescimento pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA do inglês *Vascular endotelial growth factor A*), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2 do inglês *Fibroblast growth factor 2*), ligante CXC-quimiocina 8 (CXCL8), WNT7B (do inglês *Wnt family member 7B*) e molécula BV8, também conhecida como procinetina-2. Também secretam várias citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *Tumor Necrosis Factor*), além de muitas proteases, incluindo metaloproteinases (MMP do inglês *matrix metalloproteinases*) e catepsinas, que também têm funções pró-angiogênicas (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017). A atividade imunossupressora é mediada

---

através da produção de arginase -1 e óxido nítrico sintase (NOS), levando à supressão de células T, através da expansão de células Treg no microambiente tumoral que suprimem respostas de células TCD8<sup>+</sup> através da liberação de citocinas com IL-10 e fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$  do inglês *Tumor Growth Factor Beta*), (MAGGIONI; PIGNATARO; GARAVELLO, 2017; YU; YANG; ZHANG; GUO *et al.*, 2018). Existe uma correlação entre um microambiente tumoral hipóxico e o aumento da expressão PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*) em células mielóides supressoras, através da expressão do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1alfa, do inglês *Hipóxia-inducible fator-1-alfa*) (NOMAN; DESANTIS; JANJI; HASMIM *et al.*, 2014). CD38 é um membro da família da ribosil ciclase e é expresso na superfície de diversas células do sistema imunológico, incluindo células B, células T, células NK e células mielóides (CHEN; DIAO; YANG; YI *et al.*, 2018). A expressão desta molécula é uma característica comum a vários tipos de células imunossupressoras. A expressão da molécula CD38 em células mielóide supressoras faz com que ocorra um aumento de células mielóides monocíticas, promovendo o crescimento tumoral (CHEN; DIAO; YANG; YI *et al.*, 2018; KARAKASHEVA; DOMINGUEZ; HASHIMOTO; LIN *et al.*, 2018). No modelo experimental, o tratamento de camundongos com anti-CD38 leva a uma redução no desenvolvimento de tumores (MORANDI; HORENSTEIN; COSTA; GIULIANI *et al.*, 2018).

Neutrófilos são reconhecidos como peças fundamentais durante a inflamação. São as primeiras células imunes a serem recrutadas para o tecido danificado, onde modulam a inflamação por mecanismos como fagocitose, secreção de proteínas antimicrobianas, liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) e exocitose de grânulos contendo protease, além de atuarem na eliminação dos patógenos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os neutrófilos associados ao tumor (TANs do inglês *Tumor-Associated Neutrophils*), foram associados a um prognóstico adverso em diferentes neoplasias (DONSKOV, 2013; KEIZMAN; ISH-SHALOM; HUANG; EISENBERGER *et al.*, 2012). Existem dois fenótipos de neutrófilos associados aos tumores, e estes são chamados neutrófilos "N1" e "N2", semelhante ao fenótipo M1 e M2 de macrófagos, para descrever populações pró e antitumorais, respectivamente (FRIDLENDER; SUN; KIM; KAPOOR *et al.*, 2009). O recrutamento de TANs para o microambiente tumoral é mediado principalmente por ligantes do receptor CXCR2, como CXCL1, CXCL2 e CXCL5 (KATOH; WANG; DAIKOKU; SUN *et al.*, 2013), que são secretados por células

---

neoplásicas e do estroma. Em modelos experimentais, os neutrófilos que expressam o receptor do fator de crescimento de hepatócitos (*c-MET*, do inglês *MNNG HOS transforming gene*) desempenham papéis antitumorais e anti-metastáticos importantes. A expressão de *c-MET* é induzida pelo TNF e é provável que as células NK e T efectoras sejam a fonte de TNF no microambiente tumoral (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018). Acredita-se que os TANS contribuem para a inflamação durante a progressão tumoral através, por exemplo, da elastáse neutrofílica que atua como uma enzima elastolítica potente, promovendo a invasão de células tumorais, angiogênese e proliferação de células cancerosas (GONG; CUMPIAN; CAETANO; OCHOA *et al.*, 2013; HOUGHTON; RZYMKIEWICZ; JI; GREGORY *et al.*, 2010). No câncer gástrico, os TANS induzem a imunossupressão direta em células T pela expressão de PD-L1 induzida por fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage Colony Stimulating Factor*) derivados de tumor (WANG; ZHAO; PENG; CHEN *et al.*, 2017). Estudos mostraram que a maioria dos TANS em lesões pré-cancerosas e carcinoma espinocelular cutâneo exibem funções pró-tumorais contrárias aos neutrófilos isolados da pele. Definiram características-chave de TANS pró-tumorais em carcinoma espinocelular cutâneo que destacam a relevância funcional de direcionar neutrófilos neste câncer (KHOU; POPA; LUCI; BIHL *et al.*, 2020). Além disso, outros autores relataram que no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, os neutrófilos apresentam apoptose reduzida, devido à secreção do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF, do inglês *migration inhibitory factor*) pelas células tumorais (TRELLAKIS; FARJAH; BRUDEREK; DUMITRU *et al.*, 2011). Adicionalmente, a presença de NETs no TME tem sido associada à progressão do câncer (TOHME; YAZDANI; AL-KHAFAJI; CHIDI *et al.*, 2016). As NETs são redes extracelulares liberadas por neutrófilos, compostas de cromatina, proteases (como elastase, catepsina G e MMP9) e proteínas intracelulares que imobilizam patógenos para facilitar sua eliminação (PAPAYANNOPOULOS, 2018).

As células *natural killer* (NK) exibem atividade citolítica potente em resposta a células infectadas ou transformadas, (CERWENKA; LANIER, 2016). As células NK são recrutadas em grandes tumores sólidos pela IL-15 produzida por células tumorais e causam a morte dos tumores estabelecidos (LIU; ENGELS; ARINA; SCHREIBER *et al.*, 2012). Células NK expressam uma ampla gama de receptores inibitórios e estimuladores em sua superfície celular, usados para vigilância imunológica. Após sua ativação, as células NK causam a morte das células tumorais através da liberação de

---

perforina e granzima ((VOSKOBOINIK; SMYTH; TRAPANI, 2006). Células NK expressam receptores naturais de citotoxicidade como o NKp46 e o receptor inibitório Ly49 em camundongos (KARLHOFFER; RIBAUDO; YOKOYAMA, 1992). Esses receptores evitam o crescimento metastático em modelos de melanoma, pulmão, fibrossarcoma, além de serem marcadores para prognósticos favoráveis em HNSCC (ANDREWS; SULLIVAN; BASCHUK; CHAN *et al.*, 2012; GLASNER; GHADIALLY; GUR; STANIETSKY *et al.*, 2012). Esses receptores inibitórios têm como alvo células tumorais sem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), marcando-as para morte celular (MARCUS; GOWEN; THOMPSON; IANNELLO *et al.*, 2014). As células NK têm um efeito antitumoral bem definido, uma vez que presença de infiltração de células NK em diferentes tipos de tumores e correlaciona-se com um bom prognóstico (IANNELLO; THOMPSON; ARDOLINO; MARCUS *et al.*, 2016). No carcinoma espinocelular de esôfago demonstrou-se a infiltração intratumoral de células NK, e que está estaria associada a um desfecho favorável e poderia ser empregada como uma variável com valor prognóstico (HSIA; CHEN; CHEN; HSU *et al.*, 2005). As células NK possuem funções de grande importância no controle da progressão do câncer, mas ainda é necessário esforços na definição de novos sinalizadores da imunidade inata e adaptativa que resulta na morte das células tumorais pelas células NK.

Um outro membro do compartimento mielóide são os mastócitos que se originam de células progenitoras pluripotentes da medula óssea, alcançando sua maturação nos tecidos periféricos (GALLI; BORREGAARD; WYNN, 2011). A ativação destas células ocorre pela ligação cruzada do receptor IgE expresso em sua superfície, liberando grânulos inflamatórios no espaço extracelular, dentre eles a histamina, leucotrieno e GM-CSF (PRUSSIN; METCALFE, 2003). Mastócitos podem se associar ao tumor por degranular seu conteúdo em áreas inflamadas de tumores (DVORAK, 2005). Mastócitos associados ao tumor podem desempenhar papéis pró e antitumorigênicos no desenvolvimento do câncer. Para a promoção tumoral, induzem angiogênese, através da produção de fatores endoteliais vasculares (VEGF do inglês *vascular endothelial growth factor*) e fatores de crescimento dos fibroblastos (NORRBY; JAKOBSSON; SÖRBO, 1989). Além disso, mastócitos degradam a membrana extracelular, resultando na invasão e migração de células tumorais (BARAM; VADAY; SALAMON; DRUCKER *et al.*, 2001). Os efeitos antitumorigênicos dos mastócitos, mostraram em alguns tipos de tumores a rejeição mediando a apoptose de células

---

tumorais através da secreção de IL-4 e TNF (LÄTTI; LESKINEN; SHIOTA; WANG *et al.*, 2003).

Ainda sobre os granulócitos, o papel dessas células no câncer não é bem compreendido. Basófilos e eosinófilos se diferenciam e amadurecem na medula óssea e participam de doenças alérgicas, autoimunes, infecção de parasitas e, também na diferenciação de células Th2 (KARASUYAMA; MUKAI; OBATA; TSUJIMURA *et al.*, 2011; VOEHRINGER, 2009). Através da secreção de CCL3 e CCL4 basófilos recrutam linfócitos TCD8<sup>+</sup> para o microambiente tumoral e ativam essas células através do MHC I e molécula coestimuladora CD86 (SEKTIOGLU; CARRETERO; BULBUC; BALD *et al.*, 2017) KARASUYAMA; MUKAI; OBATA; TSUJIMURA *et al.*, 2011). As células T reguladoras modulam a ativação de basófilos por meio de IL-3 e STAT5, mas o estado de ativação dos basófilos no microambiente tumoral ainda é desconhecido (SHARMA; DAS; STEPHEN-VICTOR; GALEOTTI *et al.*, 2018). Além disso, os basófilos através da liberação de VEGF-A podem influenciar o crescimento tumoral (VARRICCHI; LOFFREDO; GALDIERO; MARONE *et al.*, 2018). No câncer de ovário por exemplo, em pacientes que apresentam ascite, foi observado um número aumentado de basófilos (KHAN; EMMONS; WONG; ALQASSIM *et al.*, 2020). Apesar da escassez de dados da participação dos basófilos no câncer, verificou-se que em pacientes com câncer de pulmão, a quantidade de basófilos no microambiente tumoral foi menor quando comparada com outras células imunes (STANKOVIC; BJØRHOVDE; SKARSHAUG; AAMODT *et al.*, 2018). A presença de basófilos nos linfonodos de drenagem de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático foi associado com um prognóstico ruim, assim como o baixo número dessas células no sangue de pacientes com câncer colorretal (AFFERNI; BUCCIONE; ANDREONE; GALDIERO *et al.*, 2018). Além disso, a basopenia parece estar associada a um pior prognóstico de câncer colorretal (WEI; ZHANG; WANG; ZHOU *et al.*, 2018). Em contraste, em carcinoma de células escamosas oral a presença de basófilos no sangue periférico não têm papel preditivo (GRIMM; RIETH; HOEFERT; KRIMMEL *et al.*, 2016). No caso de eosinófilos, estas células podem promover a progressão tumoral, suprimindo células imunes. Por exemplo, a regulação positiva da expressão PD-L1 de uma forma dependente de IFN- $\gamma$  leva a supressão de respostas Th1 (ARNOLD; ARTOLA-BORÁN; TALLÓN DE LARA; KYBURZ *et al.*, 2018). Além disso, eosinófilos podem impedir a produção de anticorpos por células B, pela liberação de proteínas catiônicas, inibir a proliferação de células T e induzir a degranulação de

---



mastócitos (YOUNG; PETERSON; VENGE; COHN, 1986). Dependendo do tipo de câncer, a eosinofilia pode estar relacionada com um prognóstico ruim ou não (SIMON; UTIKAL; UMANSKY, 2019). Estudos relataram que a presença de uma intensa eosinofilia em amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, e que a presença destas células indica prognóstico favorável (GOLDSMITH; BELCHIS; CRESSON; MERRITT *et al.*, 1992).

As células dendríticas são peças-chaves, responsáveis pelo início e manutenção das respostas imunes adaptativas (WCULEK; CUETO; MUJAL; MELERO *et al.*, 2020). Estas células apresentadoras de antígenos ao reconhecerem os antígenos pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano e a patógenos, incluindo receptores Toll-like, migram para órgãos linfoides para apresentar antígenos para células T antígeno-específicas (ROBERTS; BROZ; BINNEWIES; HEADLEY *et al.*, 2016). Quando ativadas, essas APCs regulam positivamente a expressão de moléculas co-estimuladoras e produzem citocinas que conduzem o *priming* das células T (STEINMAN, 2012). Para a eficácia da resposta antitumoral, é essencial que a apresentação do antígeno seja bem-sucedida (WCULEK; CUETO; MUJAL; MELERO *et al.*, 2020). Células tumorais induzem alterações nas funções de apresentação de antígenos pelas células dendríticas e, com isso, escapam do reconhecimento pelo sistema imunológico, bem como interferem no processamento do antígeno e na maquinaria de apresentação (BANDOLA-SIMON; ROCHE, 2019).

As células da resposta imune adaptativa se referem aos linfócitos T e B que contribuem cooperativamente para a eliminação do tumor (ANGELL; GALON, 2013). Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> exercem papéis significantes no carcinoma espinocelular, dependendo da sua localização, e podem interferir no microambiente tumoral (ADAMS; GRAY; DEMARIA; GOLDSTEIN *et al.*, 2014). Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> *naïve* quando ativados por células dendríticas maduras carregadas com antígenos tumorais, diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs). Os CTLs têm como alvo as células tumorais por meio da interação do receptor de células T com MHC de classe I e matam as células tumorais por meio da indução de apoptose, podendo ser iniciada pelo receptor de morte, o ligante Fas (FasL do inglês *Fas ligand*) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ou pela secreção de perforina e granzima (MARTÍNEZ-LOSTAO; ANEL; PARDO, 2015). Moléculas de sinalização, como quimiocinas, influenciam a infiltração

---

dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> para o microambiente tumoral como, por exemplo, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CXCL16 (MAIMELA; LIU; ZHANG, 2019). Estudos sugerem que a presença de linfócitos TCD8<sup>+</sup> na região peri-tumoral está relacionada com melhores parâmetros clínicos dos pacientes com HNSCC (CHO; YOON; LEE; HONG *et al.*, 2011). Além disso, outros estudos relatam que a presença de linfócitos TCD8<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório de HNSCC estaria associado a um melhor prognóstico e sobrevida de pacientes (BALERMPAS; MICHEL; WAGENBLAST; SEITZ *et al.*, 2014; DISTEL; FICKENSCHER; DIETEL; HUNG *et al.*, 2009). A presença de linfócitos TCD8<sup>+</sup> disfuncionais também são bastante comuns no microambiente tumoral. Linfócitos T CD8<sup>+</sup> exaustos apresentam diminuição da produção de citocinas e funções citotóxicas, assim como uma regulação positiva de vários *immune checkpoints* como, por exemplo, PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4 e 2B4 (LI; VAN DER LEUN; YOFE; LUBLING *et al.*, 2020; PERRI; IONNA; LONGO; DELLA VITTORIA SCARPATI *et al.*, 2020).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> podem ser agrupados em diferentes subconjuntos funcionais com base na função e nos padrões de secreção de citocinas (KEENE; FORMAN, 1982). Originalmente, as células TCD4 foram simplesmente classificadas como células Th1 (do inglês *T helper 1*) que produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF após a estimulação com o antígeno. Estas células também são responsáveis pela regulação retardada tipo reações de hipersensibilidade e imunidade mediada por células a patógenos intracelulares e células tumorais. A via de desenvolvimento do linfócito Th1 é conduzida pela ativação de IL-12 e STAT4 (do inglês *Signal transducer and activator of transcription 4*) e do fator de transcrição T-bet durante a ativação imune de células T *naive* (GLIMCHER; MURPHY, 2000). Alternativamente, as células Th2 são caracterizados pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e são responsáveis pela coordenação da imunidade humoral (BAO; REINHARDT, 2015). IL-4 é a citocina responsável pela diferenciação de células Th2 através do fator de transcrição STAT6 e o fator de transcrição GATA-3 (MOWEN; GLIMCHER, 2004). As vias de desenvolvimento de Th1 e Th2 são controladas por um delicado equilíbrio de *loops* de *feedback* positivo, pois o IFN- $\gamma$  aumenta o desenvolvimento de Th1 e a IL-4 suporta a diferenciação de células Th2. As células T CD4<sup>+</sup> podem modular o microambiente tumoral, seja diretamente por mecanismos citolíticos ou indiretamente pela produção de citocinas e quimiocinas (KENNEDY; CELIS, 2008; MELSSSEN; SLINGLUFF, 2017). Um microambiente antitumoral caracterizado pela abundância de células Th1 e

---

citocinas, frequentemente, indica um grau de contenção do tumor pelo sistema imunológico e pode até mesmo levar à erradicação tumoral (TAUBE; GALON; SHOLL; RODIG *et al.*, 2018). As células Th são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imune (SURMAN; DUDLEY; OVERWIJK; RESTIFO, 2000) e participam da ativação de células efectoras específicas do antígeno e recrutamento de células do sistema imune inato (OSSENDORP; TOES; OFFRINGA; VAN DER BURG *et al.*, 2000). Contudo, as neoplasias desenvolveram mecanismos que tornam o microambiente tumoral imunossupressivos, e com isso, driblam a imunovigilância (KANDALAFT; POWELL; SINGH; COUKOS, 2011).

O eixo Th1/Th2 é conhecido por ser crítico na manutenção das funções imunológicas de várias malignidades (OGAWARA; HANDA; YAMAZAKI; TODA *et al.*, 2005; SHARMA; KHAN; JOSHI; KUMAR *et al.*, 2010). Diferentes achados da literatura mostram que a polarização para o perfil Th1 está associada com resolução do câncer, através da expressão de citocinas envolvidas na resposta pró-inflamatória e também por mecanismos que incluem efeitos citotóxicos diretos contra células tumorais via produção de TNF- $\alpha$  (FRANSEN; VAN DER HEYDEN; RUYSSCHAERT; FIERS, 1986). Por outro lado, a polarização para o perfil Th2 está associada com a expressão de citocinas que favorecem a sobrevivência das células tumorais (GHOSH; KOMSCHLIES; CIPPITELLI; LONGO *et al.*, 1995; HU; URBA; FOX, 1998). Achados mostraram que pacientes com HNSCC apresentavam níveis aumentados das citocinas com perfil Th2 (IL4, IL6 e IL10) em comparação com controles saudáveis (LATHERS; ACHILLE; YOUNG, 2003).

As células Th17, secretam IL-17A pró-inflamatória e exibem funções duplas no microambiente tumoral, uma vez que induzem angiogênese e dificultam as respostas antitumorais ao liberar adenosina imunossupressora (BAILEY; NELSON; HIMES; LI *et al.*, 2014). O excesso de células Th17 no tumor está associado a mal prognóstico. Estudos sugerem que a citocina IL-17 tem o potencial de mediar a imunidade pró-tumoral em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (LEE; TUNG-CHIEH CHANG; LIAO; CHEN *et al.*, 2018). Células que expressam IL-17, incluindo células Th17 e Tc17, no sangue periférico podem ser um preditor de prognóstico ruim para pacientes com esse tipo de neoplasia (LEE; TUNG-CHIEH CHANG; LIAO; CHEN *et al.*, 2018). No entanto, em tumores de ovário, IL-17 correlaciona-se com taxas de sobrevivência melhor (BAILEY; NELSON; HIMES; LI *et al.*, 2014). A população de

---

linfócitos Th9 apresenta papel controverso no desenvolvimento tumoral (MICOSSÉ; VON MEYENN; STECK; KIPFER *et al.*, 2019). Estudos mostraram que células Th9 aumentaram significativamente o tráfego de células TCD8<sup>+</sup> para o microambiente tumoral *in vivo*. Células Th9 ativadas secretam IL-9 que desempenha um papel importante em diferentes processos de inflamação além de ter um papel pro-tumoral e antitumoral (LEE; ZHU; BAI; BRADY *et al.*, 2020). Em amostras de pacientes com HNSCC, análises dos níveis séricos de IL-9 demonstraram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos selecionados (BUSSU; GRAZIANI; GALLUS; CITTADINI *et al.*, 2018). Ademais, as células Th9 induzem apoptose das células tumorais e inibem o crescimento do carcinoma espinocelular em camundongos (MIAO; ZHANG; SUN; YU *et al.*, 2017).

Em relação ao papel das células T reguladoras (Treg), dados da literatura indicam que estas células inibem as respostas antitumorais (SAKAGUCHI; YAMAGUCHI; NOMURA; ONO, 2008), e estão associadas a uma baixa taxa de sobrevivência em diferentes tipos de tumores (KOBAYASHI; HIRAOKA; YAMAGAMI; OJIMA *et al.*, 2007). As células Tregs migram para o microambiente tumoral através de moléculas de sinalização, como quimiocinas e seu receptor (por exemplo, CCL1-CCR8, CCL5-CCR5, CCL22-CCR4, CCL28-CCR10 e CXCL12-CXCR4) (TOGASHI; SHITARA; NISHIKAWA, 2019). As células Tregs promovem o crescimento do tumor e metástases por liberam citocinas imunossupressoras, incluindo TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35, que estão envolvidas em muitas das funções supressoras (FACCIABENE; MOTZ; COUKOS, 2012) a exemplo da inibição da maturação das células dendríticas por TGF- $\beta$  e IL-10 (JANG; HAJDU; LIOT; MILLER *et al.*, 2017). Além disso, as Tregs debilitam a capacidade das células dendríticas como apresentadoras de antígenos ao remover seu complexo peptídeo-MHC de classe II (AKKAYA; OYA; AKKAYA; AL SOUZ *et al.*, 2019). Com isso, as Tregs dificultam indiretamente a ativação das células T, reduzindo o número de células dendríticas maduras e convertendo-as em parceiros tolerogênicos. As células T reguladoras também atuam induzindo o aumento de expressões de vários receptores inibitórios, como PD-1, LAG-3 e TIM-3, através da liberação da citocina IL-35, levando à exaustão de linfócitos infiltrantes tumorais (TURNIS; SAWANT; SZYMCZAK-WORKMAN; ANDREWS *et al.*, 2016). Além disso as Tregs suprimem outras células imunológicas, como basófilos, eosinófilos e mastócitos, bem como a ativação e proliferação de células B (XU; LIU; CHEN; WANG

---

*et al.*, 2016). As células Tregs apresentam um papel imunossupressor importante no desenvolvimento do carcinoma espinocelular (TANCHOT; TERME; PERE; TRAN *et al.*, 2013). Em pacientes portadores de carcinoma espinocelular observou-se aumento no número de células Tregs, tanto no sangue periférico (GASPAROTO; DE SOUZA MALASPINA; BENEVIDES; DE MELO *et al.*, 2010) quanto no microambiente tumoral, e este aumento foi associado com pior prognóstico (LIANG; LIU; SU; ZHANG *et al.*, 2011).

#### **1.4. Macrófago**

Um componente essencial da imunidade inata e que possui um papel central na defesa do hospedeiro, inflamação, remodelação de tecidos e funções metabólicas são os macrófagos (BISWAS; MANTOVANI, 2010; SICA; BRONTE, 2007).

Macrófagos são células mononucleares, de natureza fagocítica, derivadas dos monócitos, possuem uma considerável diversidade fenotípica e plasticidade, que extravasam da circulação para os tecidos cuja origem na medula óssea se dá em condições homeostáticas, mas em condições inflamatórias são gerados através da hematopoese extra medular no baço. (GAUTIER; SHAY; MILLER; GRETER *et al.*, 2012)(BISWAS; MANTOVANI, 2010). Os macrófagos povoam abundantemente os tumores (GHOSN; CASSADO; GOVONI; FUKUHARA *et al.*, 2010), recebem o nome de macrófagos associados ao tumor (TAM) e são comuns em carcinoma de cabeça e pescoço (SICA; MANTOVANI, 2012). Em resposta a infecções persistentes, esses fagócitos sintetizam citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e engajam outras células imunes a sustentar a inflamação crônica, um dos marcadores da iniciação e progressão tumoral (BALKWILL; MANTOVANI, 2012).

O microambiente tumoral hipóxico também exerce influência sobre os TAM, moldando-os metabolicamente às características pró-angiogênicas (HENZE; MAZZONE, 2016; MURDOCH; MUTHANA; COFFELT; LEWIS, 2008). Os macrófagos possuem importante papel na angiogênese, secretando fator de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês *vascular endothelial growth factor*), fator de necrose tumoral alfa, IL-1  $\beta$ , IL-8, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF do inglês *platelet derived growth factor*), fator de crescimento de fibroblastos (FGF do inglês *fibroblast growth factor*) (QIAN; POLLARD, 2010). Além dessas, secretam também enzimas como COX-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), MMPs-1,-2,-

---

---

3,-9 e -12, proteases de catepsina e plasmina - ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, (GOICHEVA; WANG; GADEA; SHREE *et al.*, 2010; ZHANG; SUD; MIZUTANI; GYETKO *et al.*, 2011). Os TAM desencadeiam a degradação de componentes da membrana basal e matriz extracelular e regulam o aumento da densidade vascular, processo conhecido como “troca angiogênica” importante no processo requerido para transição a um estado maligno do tumor (LIN; LI; GNATOVSKIY; DENG *et al.*, 2006).

Macrófagos são células dinâmicas que modulam seus fenótipos e funções em resposta a uma variedade de fatores regulado pelo microambiente circundante (SHAPOURI-MOGHADDAM; MOHAMMADIAN; VAZINI; TAGHADOSI *et al.*, 2018)(YUNNA; MENGRU; LEI; WEIDONG, 2020). Os macrófagos de fenótipo M1 ou classicamente ativados, são considerados macrófagos com fenótipo pró-inflamatório e antitumoral (EVRARD; SZTURZ; TIJERAS-RABALLAND; ASTORGUES-XERRI *et al.*, 2019). Este fenótipo é induzido por citocinas do perfil Th1 como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e o lipopolissacarídeo (LPS) que se ligam aos receptores do tipo TOLL (TLR, do inglês *Toll-Like Receptor*) e produzem citocinas pró-inflamatórias IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, iNOS intermediário reativo do nitrogênio (RNI). (MURRAY; ALLEN; BISWAS; FISHER *et al.*, 2014). Ademais, M1 secretam quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células TCD4<sup>+</sup> de fenótipo Th1, como CXCL9 e CXCL10 e participam da remoção de patógenos durante uma infecção, através da ativação de NADPH e geram espécie reativa de oxigênio (ROS) (SHAPOURI-MOGHADDAM; MOHAMMADIAN; VAZINI; TAGHADOSI *et al.*, 2018). Fenotipicamente macrófagos M1 expressam altos níveis do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II), CD68, CD80 e CD86 (MOSSER; EDWARDS, 2008). Dentre os efeitos antitumorais dos macrófagos M1, destaca-se o fato destas células mediar diretamente a citotoxicidade para eliminar células tumorais, sendo esse processo lento (geralmente requer 1 a 3 dias) e envolve vários mecanismos (PAN, 2012)(BERNSMEIER; VAN DER MERWE; PÉRIANIN, 2020). Por outro lado, M1 estão associados à citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC, do inglês *antibody dependente cell cytotoxicity*), matando células tumorais, em um processo mais rápido, com a participação de anticorpos com antígenos específicos (BRUNS; BÜTTNER; FABRI; MOUGIAKAKOS *et al.*, 2015).

Macrófagos M2 ou alternativamente ativados, são divididos em quatro tipos M2a, M2b, M2c e M2d e adquirem esse fenótipo em resposta às citocinas do tipo Th2, como IL4, IL-10, IL-13, através da sinalização via STAT6, via STAT3. IL-10 polariza

---

macrófagos com fenótipo M2. (SHAPOURI-MOGHADDAM; MOHAMMADIAN; VAZINI; TAGHADOSI *et al.*, 2018). Os macrófagos de fenótipo M2 produzem altos níveis de IL-10, TGF- $\beta$ , VEGFs e MMPs que direta ou indiretamente, aumentam a inflamação local, promovendo assim a progressão e metástase tumoral e apresentam atividade de reparação de tecidos e cicatrização de feridas (BELGIOVINE; D'INCALCI; ALLAVENA; FRAPOLLI, 2016). A função promotora de tumores dos macrófagos M2 está relacionada à capacidade de secretar fatores pró-angiogênicos e de crescimento além de suprimir a função efetora das células T, liberando citocinas imunossupressoras (LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020). Os macrófagos M2 participam da imunossupressão de células imunes através da liberação de PGE2, que induzem linfócitos T reguladores (MANTOVANI; MARCHESI; MALESCI; LAGHI *et al.*, 2017).

Os macrófagos associados ao tumor geralmente compartilham as mesmas características dos macrófagos com fenótipo do tipo M2 (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MANTOVANI; ALLAVENA; SICA; BALKWILL, 2008) e os macrófagos associados ao tumor com fenótipo M2 podem promover invasão e metástase das células tumorais (POLLARD, 2004; WANG; CAO; ZHANG; NAKAMURA *et al.*, 2015). Além disso, um infiltrado inflamatório com a presença de macrófagos expressando CD68 - glicoproteína transmembrana do tipo I expressa em monócitos e macrófagos presente nos tecidos - e CD163 - glicoproteína de superfície celular expressa exclusivamente em células de linhagem monocíticas, sendo expressos em macrófagos que residem em tecidos - positivo apresentam relação com um mau prognóstico (BECK; ESPINOSA; EDRIS; LI *et al.*, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Ademais, estudos relatam que em tumores sólidos como câncer de pâncreas, mama, ovário, gástrico, bexiga e tireóide, a presença de TAMs se correlaciona com mau prognóstico (KURAHARA; SHINCHI; MATAKI; MAEMURA *et al.*, 2011; SHABO; STÅL; OLSSON; DORÉ *et al.*, 2008). A relevância dos TAMs em tumores sólidos também foi verificada em carcinoma espinocelular (HU; HE; ZHU; YANG *et al.*, 2016). A presença de macrófagos M2 no microambiente tumoral não tem sido associada com resultados clínicos favoráveis em carcinoma espinocelular, câncer de próstata, mama, pâncreas, e bexiga (ALVES; DIEL; LAMERS, 2018; CAMPBELL; TONLAAR; GARWOOD; HUO *et al.*, 2011; HANADA; NAKAGAWA; EMOTO; NOMURA *et al.*, 2000). Por outro lado, a alta densidade de macrófagos se correlaciona com um resultado favorável no câncer colorretal (FORSSELL; OBERG; HENRIKSSON;

---

STENLING *et al.*, 2007). A significância prognóstica dos TAMs em carcinoma espinocelular oral correlacionou a presença de TAMs com parâmetros de sobrevida, seja diretamente com a sobrevida global e sobrevida livre de progressões, doenças e recorrências ou indiretamente com fatores clínico-patológicos associados ao desfecho da doença (KUMAR; KNOPS; SWENDSEID; MARTINEZ-OUTSCHOOM *et al.*, 2019).

Evidências acumulativas indicam que os TAMs podem induzir células cancerígenas a se submeterem à conversão epitélio mesenquimal (BONDE; TISCHLER; KUMAR; SOLTERMANN *et al.*, 2012; FU; DAI; SONG; ZHANG *et al.*, 2015). Fatores que participam dessa transição epitélio mesenquimal como as citocinas IL-6 e TNF podem ser liberados pelos macrófagos e aumentam o processo metastático (YADAV; KUMAR; DATTA; TEKNOS *et al.*, 2011). Dados demonstraram que TNF  $\alpha$  foi significativa e positivamente relacionada com atividades invasivas e metastáticas em carcinoma espinocelular oral (TANG; TAO; FANG; DENG *et al.*, 2017). Além disso, TNF- $\alpha$  induz atividade promotora da transição epitélio mesenquimal em células de câncer de mama, sugerindo fortemente a associação entre inflamação e a aquisição do novo fenótipo mesenquimal (ZHOU; NITSCHKE; XIONG; ZHANG *et al.*, 2008). Interessantemente, estudos relataram um aumento na morfologia de fibroblastos e de marcadores mesenquimais como a vimentina em células de câncer pancreático quando em co-cultura com TAMs polarizados em M2, assim como o aumento das atividades proteolíticas de metaloproteinase como MMP2 e MMP9 e consequente proliferação e migração das células. Esse mesmo estudo mostrou uma diminuição da expressão de marcadores epiteliais (LIU; XU; SHI; HUANG *et al.*, 2013).

### **1.5. IL-33**

Um dos mediadores centrais que se destaca como importante elo entre as células neoplásicas e as outras células do microambiente tumoral são as citocinas. Dentre as citocinas, a interleucina (IL-33) é conhecida pelo seu papel dicotômico na contribuição ao desenvolvimento de tumores (FOURNIÉ; POUPOT, 2018). IL-33 é uma citocina pró-inflamatória, membro da superfamília de citocinas IL-1 e expressa por células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, órgãos linfoides e células da glia além de diversas células neoplásicas (PICHERY; MIREY; MERCIER; LEFRANCAIS *et al.*, 2012). Além disso, IL-33 pode

---



ser encontrada em quase todos os órgãos humanos devido à sua ampla expressão em células endoteliais (MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008). IL-33 é expressa constitutivamente em muitos tecidos e por uma ampla variedade de células, no entanto é também induzida em resposta a vários estímulos em células epiteliais, miofibroblastos, adipócitos, células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos predominantemente como uma citocina pró-inflamatória. IL-33 foi originalmente descrita como um indutor de respostas imunes tipo 2, ativando células *T Helper 2* (Th2) e mastócitos. Evidências mostraram também que esta citocina estimula potentemente as células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2s), células T reguladoras (Treg), células Th1, células TCD8<sup>+</sup> e células assassinas naturais (NK) (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016).

IL-33 é uma proteína de 30 kDa que funciona duplamente como um fator de transcrição e uma citocina (PASTORELLI; DE SALVO; VECCHI; PIZARRO, 2013) e uma vez que IL-33 não contém uma sequência de sinal e, portanto, não é secretada como uma citocina convencional. Normalmente, essa proteína nuclear necessita da morte celular necrótica, necroptótica ou quando se depara com algum patógeno para sua liberação no meio externo atuando como um alarme (LUCARINI; ZICCHEDDU; MACCHIA; LA SORSA *et al.*, 2017; SHLOMOVITZ; ERLICH; SPEIR; ZARGARIAN *et al.*, 2019). Pode ocorrer também através da ativação celular por meio da sinalização de ATP, induzindo a liberação de IL-33 na ausência de morte celular (KOUZAKI; IJIMA; KOBAYASHI; O'GRADY *et al.*, 2011). A ligação de IL-33 ocorre com seu receptor único, ST2 e co-receptor, proteína acessória do receptor de IL-1 (IL-1RAcP, também conhecido como IL1RAP), que consiste em várias formas, entre elas o receptor ST2L (transmembrana) e sST2 (solúvel) (LINGEL; WEISS; NIEBUHR; PAN *et al.*, 2009). A forma ST2L é expressa em linfócitos Th2, macrófagos, células NK, eosinófilos, basófilos, células T regulatórias, linfócitos B, células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2) (CHEN; WU; TSAI; LI *et al.*, 2021). O complexo IL-33-ST2 adota uma conformação rígida, fornecendo uma plataforma para o recrutamento de IL-1RAcP. A justaposição dos domínios citoplasmáticos Toll/IL-1R (TIR) de ST2 e IL-1RAcP no complexo ternário resulta então na ativação das vias de sinalização intracelular. Essas vias de sinalização intracelulares fazem com que o eixo IL-33/ST2 desencadeie uma cascata de sinalização intracelular e promova a produção de citocinas do perfil Th2, através do recrutamento de MyD88, e subsequente ativação da sinalização de NF-κB e MAPK (p38, JNK e ERK1/2) (EISSMANN; BUCHERT; ERNST, 2020; OBOKI;

---

OHNO; KAJIWARA; SAITO *et al.*, 2010). A forma sST2 é principalmente expressa em fibroblastos, células epiteliais e cancerígenas e leva à inativação da citocina (LIEW, 2012; TAGO; NODA; HAYAKAWA; IWAHANA *et al.*, 2001).

IL-33 apresenta natureza pleiotrópica, que se reflete na homeostase metabólica e tecidual, infecção, inflamação, câncer e doenças do sistema nervoso central. Embora exista relatos de que IL-33 desempenha papéis pró-tumorigênicos ou antitumorigênicos no desenvolvimento do câncer, ambas as funções de IL-33 modulam o TME, desempenhando um papel importante no recrutamento de células imunes que impactam o fenótipo tumoral e a malignidade (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016). O papel da IL-33 nos processos tumorigênicos clássicos, como EMT, proliferação, migração e invasão, já foi amplamente estudado (MILLAR; O'DONNELL; MCINNES; BRINT, 2017). Em relação à metástase de células tumorais, os ensaios *in vitro* mostraram uma capacidade direta de IL-33 para estimular a migração e invasão da linha celular de câncer de pulmão A549 (YANG; GAO; WANG; XU *et al.*, 2018). A expressão do receptor da IL-33, ST2L, também foi implicada na metástase (LARSEN; MINAYA; VAISH; PEÑA, 2018). Células com baixo grau de metástases, mas não células com alto grau metastático, derivadas de carcinoma de pulmão de Lewis, expressaram ST2L funcional. IL-33 foi visto como fator que aumenta a morte celular de células ST2L-positivas de baixo grau metastático, mas não das células ST2L-negativas de alto grau metastático, sugerindo que IL-33 aumenta a progressão do câncer de pulmão ao selecionar mais células malignas no microambiente tumoral (LARSEN; MINAYA; VAISH; PEÑA, 2018).

Embora a IL-33 esteja envolvida em diversos tipos de doenças inflamatórias, negativa ou positivamente, incluindo doença inflamatória intestinal, asma, doenças alérgicas e aterosclerose, sua função na tumorigênese depende do tipo de célula tumoral e do contexto em que se encontra (GAO; WANG; YANG; ZHAO *et al.*, 2015). Estudo com modelo de camundongo com câncer de mama, mostrou que o eixo IL-33/ST2 promoveu a diminuição da imunidade antitumoral inata, levando ao acúmulo de células imunossupressoras (JOVANOVIC; PEJNOVIC; RADOSAVLJEVIC; PANTIC *et al.*, 2014). Pesquisas também mostraram uma correlação entre uma quantidade significativamente elevada de IL-33 no soro de pacientes e um prognóstico ruim em diversos tipos de câncer como o HNSCC, glioma, câncer gástrico, câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma hepatocelular, leioma uterino, câncer de pulmão, câncer colorretal, câncer de mama e carcinoma de células renais quando

---

comparados a tecidos saudáveis. (CHEN; NIEH; JAO; WU *et al.*, 2013; HU; FU; ZHANG; ZHANG, 2013; LIU; SHEN; HU; HUANG *et al.*, 2014; LIU; ZHU; LU; BIAN *et al.*, 2014; SANTULLI; EVEN; CHOUZENOUX; MILLISCHER *et al.*, 2013; SUN; BEN; TU; DONG *et al.*, 2011; WANG; CHEN; BU; HAN *et al.*, 2016; WU; WU; CHENG; HONG *et al.*, 2018; ZHANG; WANG; JI; DING *et al.*, 2017; ZHANG; LIU; CHU; YE *et al.*, 2012). Da mesma forma, pacientes com carcinoma espinocelular de língua que apresentam mal prognósticos também expressavam altos níveis de expressão de IL-33 (ISHIKAWA; YAGI-NAKANISHI; NAKANISHI; KONDO *et al.*, 2014). Estudo recente demonstrou que a via de sinalização IL-33/ST2 potencializa o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas em camundongos (AMÔR; DE OLIVEIRA; GASPAROTO; VILAS BOAS *et al.*, 2018). Anderson e colaboradores demonstraram a relação entre o aumento da expressão de IL-33 produzida por fibroblastos associados ao câncer e a transição de macrófagos com fenótipos M1 para macrófagos com fenótipos M2, gerando metástase guiada pelo estroma via eixo IL-33-NF- $\kappa$ B-MMP9-laminina (ANDERSSON; YANG; HOSAKA; ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, células do carcinoma de cabeça e pescoço sofreram migração e invasão por efeitos autócrinos e parácrinos na sinalização de IL-33, promovido pelos fibroblastos associados ao câncer (CHEN; NIEH; JAO; WU *et al.*, 2013). Por outro lado, estudos mostraram que a expressão aumentada da IL-33 no processo metastático de melanoma e câncer de mama possui ação inibitória, aumentando a produção de IFN- $\gamma$  pelas células TCD8<sup>+</sup> e células NK nos tecidos tumorais (GAO; WANG; YANG; ZHAO *et al.*, 2015). Em adenoma e adenocarcinoma, com baixo grau de diferenciação, de pacientes com câncer colorretal, os níveis de IL33/ST2 apresentam-se baixos, mostrando características protetoras (ZHANG; DAVIS; SHAH; HUGES *et al.*, 2017). Além disso a depleção de ST2 em ratos atenuou o desenvolvimento tumoral, aumentando citocinas com o perfil Th1/Th17 e atividades das células NK (JOVANOVIC; RADOSAVLJEVIC; MITROVIC; JURANIC *et al.*, 2011). Verificou-se que IL-33 pode ser um satisfatório adjuvante da vacina de HPV, aumentando respostas com perfil Th1 e CD8<sup>+</sup> (VILLARREAL; WISE; WALTERS; REUSCHEL *et al.*, 2014).

Um tema importante e emergente no campo de estudo dos efeitos antitumorogênicos da IL-33 é a capacidade dessa citocina de induzir a resposta de perfil Th1. Durante algum tempo o foco de pesquisa sobre o papel da via de sinalização IL-33/ST2 esteve relacionado à expressão e envolvimento em respostas

---

do tipo Th2. Gao e colaboradores investigaram o efeito do aumento da expressão de IL-33 em células de melanoma B16 e células de câncer de mama 4T1 (GAO; WANG; YANG; ZHAO *et al.*, 2015). O aumento de expressão de IL33 nessas células resultou em grande diminuição da taxa de crescimento do tumor. A introdução de IL-33 em tumores metastáticos reduziu os níveis de células tumorais circulantes e aumentou o reconhecimento imunológico contra tumores metastáticos *in vivo* (SARANCHOVA; HAN; HUANG; FENNINGER *et al.*, 2016). Coletivamente, esses dados indicam que quando altos níveis de IL-33 são administrados, efeitos antitumorais potentes são observados. Tomados em conjunto, não pode haver dúvida de que, embora a IL-33 conduza a tumorigênese em certos tipos de câncer e células, muita cautela deve ser exercida em relação ao futuro desenvolvimento desta citocina como um alvo terapêutico. Baseado no exposto, a hipótese a ser testada é se no carcinoma espinocelular, IL-33 e o meio condicionado de macrófagos poderiam interferir na atividade e biologia das células tumorais.

## **2 OBJETIVO**

---

---



## **2 OBJETIVO**

- O presente estudo se propôs a avaliar os efeitos de IL-33 e do meio condicionado de macrófagos na ativação de células tumorais da linhagem SCC-25 e Detroit 562.





# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

---



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 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, sob o protocolo de pesquisa número 37644714.7.0000.5475. Parte dos experimentos foi realizado no Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles (CA) e, desta forma, também obtivemos aprovação pelo Comitê de Ética do Cedars-Sinai Medical Center, número 00045523, para o uso de sangue periférico de indivíduos do grupo controle. 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.

#### **3.2 Casuística e seleção da amostra.**

Neste estudo foram selecionados espécimes cirúrgicos de carcinoma espinocelular (n=14), obtidos no período de 2001 a 2006 e provenientes dos arquivos do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL). Os critérios diagnósticos empregados para a classificação em carcinoma espinocelular foram: lâminas histológicas e respectivos blocos de parafina bem como os respectivos laudos anatomopatológicos. Os prontuários com dados incompletos e espécimes cirúrgicos de carcinoma espinocelular com material insuficiente para a realização das reações de imunohistoquímica foram excluídas da casuística. As idades dos pacientes variaram entre 58 e 91 anos (média de  $76,14 \pm 10,25$  anos), sendo que 9 amostras pertenciam a pacientes do sexo masculino e 5 amostras a pacientes do sexo feminino. Nesta pesquisa também foi utilizado amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Os controles saudáveis foram selecionados entre funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru e do Cedars-Sinai Medical Center Los Angeles (CA). Os doadores saudáveis foram informados sobre a investigação com explicação detalhada de sua participação. Prestados esclarecimentos acerca dos procedimentos, os sujeitos da pesquisa foram assegurados da liberdade de opção de não participarem do estudo.

---

### 3.3 Análise histopatológica

Os espécimes cirúrgicos de carcinoma espinocelular, provenientes dos arquivos da Divisão de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima, foram fixadas em paraformoldeído 10%, pH7.4, em temperatura ambiente, pelo tempo máximo de 6 horas. O passo seguinte foi a desidratação gradativa em álcool, seguida de xilol e incluídas em parafina usando técnicas padrão. Cortes longitudinais (5  $\mu$ m de espessura) foram obtidos através de um micrótomo, montados em lâminas (Sigma) e corados com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados por dois patologistas (WANG; YU; CHEN; PENG *et al.*, 2016). A análise histopatológica foi realizada através da observação de cortes seriados em microscopia óptica, visando basicamente o estadiamento (grau de diferenciação tumoral), a análise da presença e da localização de células inflamatórias no microambiente tumoral, assim como as características histológicas do tecido tumoral. Todas as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico e as microfotografias foram recolhidas com uma câmera digital (Leica DFC310 FX, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), nos aumentos de 50X, 100X, 200X e 400X.

As amostras selecionadas foram subdivididas em: bem diferenciado (n=5) (Grau I), moderadamente diferenciado (n=5) (Grau II) e pouco diferenciado (n=4) (Grau III), de acordo com o sistema de classificação originalmente descrito por Broders (BRODERS, 1920) e adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Levou-se em conta, através de uma avaliação subjetiva, o grau de queratinização, pleomorfismo celular e nuclear além das atividades mitóticas (WOOLGAR, 2006). Carcinoma bem diferenciado (Grau I) apresentou arquitetura do tecido semelhante ao do epitélio normal, presença de pontes intercelulares, queratinização e poucas mitoses atípicas. O pleomorfismo celular e nuclear são mínimos assim como as células multinucleadas, sendo possível observar a formação de queratina condensada, dando origem as pérolas córneas. Células tendem a crescer lentamente e apresentam metástases tardias (BRODERS, 1920; PINDBORG; JORGEN; ORGANIZATION, 1997). Carcinomas moderadamente diferenciados (Grau II) apresentam menos queratinização e mais pleomorfismo nuclear e celular, quando comparamos com o Grau I. Há formação de cristas epiteliais e a presença de pontes intercelulares são menos evidentes. Em carcinoma com células pouco diferenciadas (Grau III), dificilmente se nota a presença de queratinização e as pontes intercelulares são

---

escassas. Atividades mitóticas são frequentes, presença de mitoses atípicas assim como o pleomorfismo nuclear e celular e células multinucleadas. Crescimento rápido e metástases precoces (BRODERS, 1920; PINDBORG; JORGEN; ORGANIZATION, 1997).

### **3.4 Imunohistoquímica**

A detecção da presença de macrófagos CD68<sup>+</sup> (M1) e CD163<sup>+</sup>(M2) em amostras de pacientes com carcinoma espinocelular foi realizada por imunohistoquímica, utilizando-se anticorpos específicos anti-CD68 e anti-CD163, através do método da imunoperoxidase por meio da avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, Vector, Burlingame). A reação de imunohistoquímica teve início com a desparafinização das lâminas em rede de 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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-CD68 (IR60961-2) (Agilent, Santa Clara-CA) e anti-CD163 (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 Mayers por 50 segundos, lavadas em água corrente durante cinco minutos ou até a água não ficar mais corada. Realizou-se a desidratação dos espécimes em concentrações graduais de álcool (70% e absoluto) em duas trocas rápidas cada, em seguida realizamos a imersão em xilol duas vezes, por três minutos cada. A montagem das lâminas se deu com a resina Permound (Fisher Scientific) e lamínulas.

---

### **3.5 Análise e quantificação das imunomarcações**

A imunomarcação para CD68 e CD163 foi quantificada digitalmente conforme descrito previamente (CHANG; KAO; LIANG; CHENG *et al.*, 2010; KELNER; RODRIGUES; BUFALINO; FONSECA *et al.*, 2015). As lâminas foram digitalizadas em imagens de alta resolução usando o escaneador de lâminas histológicas Aperio Scanscope CS (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, EUA). O sistema Aperio é capaz de detectar, contar e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Utilizou-se o algoritmo Positive Pixel Count v9 para avaliar CD68 e CD163. A coloração para a molécula CD68 e CD163 foi quantificada em termos de porcentagem de positividade e de acordo com a intensidade em que a coloração foi detectada, como segue: fraca (marcada como 1), moderada (marcada como 2) e forte (marcada como 3). A pontuação final para cada amostra de tecido tumoral foi calculada como a soma das porcentagens de cada categoria multiplicada por seus escores de intensidade usando a seguinte fórmula:  $[(\% \text{ fraco} \times 1) + (\% \text{ moderado} \times 2) + (\% \text{ forte} \times 3)]$ . Os resultados variaram de 100 a 300. O valor da expressão mediana para cada proteína foi usado para dividir os tumores em dois grupos, abaixo e acima da mediana, exibindo níveis de expressão baixos e altos, respectivamente. O software TMA Lab (Aperio Technologies Inc.) foi usado como ferramenta auxiliar durante as análises.

### **3.6 Isolamento dos Leucócitos**

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa e 40 mL coletados em tubo contendo anticoagulante, em sistema fechado, por profissional habilitado. 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), proporção de 2:1, em tubos Sepmate™-50 (Stemcell Technologies Canada, Vancouver, BC, CA) centrifugada a 1200xg por 10 minutos, em temperatura ambiente. 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 ressuspenso 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 2%. Em seguida, as células foram submetidas à separação para o isolamento de monócitos.

---

### **3.7 Obtenção dos monócitos**

Após determinarmos o número de células, realizou-se a separação dos monócitos através da seleção positiva com auxílio de *Beads* magnéticas (Milteneý Biotec, Auburn, CA, USA). Inicialmente realizamos a separação de células CD3<sup>+</sup> do PBMC obtido de indivíduos sadios. Para a separação das células CD3<sup>+</sup> o PBMC foi ressuspensado em 160 µL de tampão contendo 40 µL de “beads” anti-CD3, e incubadas em gelo por 15 min. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas 300xg por 10 minutos e o *pellet* ressuspensado em 500 µL de tampão. Para a separação, a suspensão celular foi adicionada à coluna de separação (Milteneý Biotec, Auburn, CA, USA), devidamente conectada ao suporte magnético (MACS Separator, Milteneý Biotec, Auburn, CA, USA), aguardando-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, foi considerada uma suspensão enriquecida em monócitos totais, designada como CD14<sup>+</sup>. Em seguida, realizou-se a separação das células CD14<sup>+</sup>, para tal, as células foram ressuspensas em 160 µL de tampão contendo 40 µL de “beads” anti-CD14, e incubadas em gelo por 15 min. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 300xg por 10 minutos e o *pellet* ressuspensado em 500 µL de tampão. Para a separação, a suspensão celular foi adicionada à coluna de separação MACS Column (Milteneý Biotec, Auburn, CA, USA), devidamente conectada ao suporte magnético (MACS Separator, (Milteneý Biotec, Auburn, CA, USA), aguardando-se a eluição por gravidade. Para a obtenção das células CD14<sup>+</sup>, 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 x g 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 2 %.

---

---

### **3.8 Cultura de monócitos e diferenciação de macrófagos**

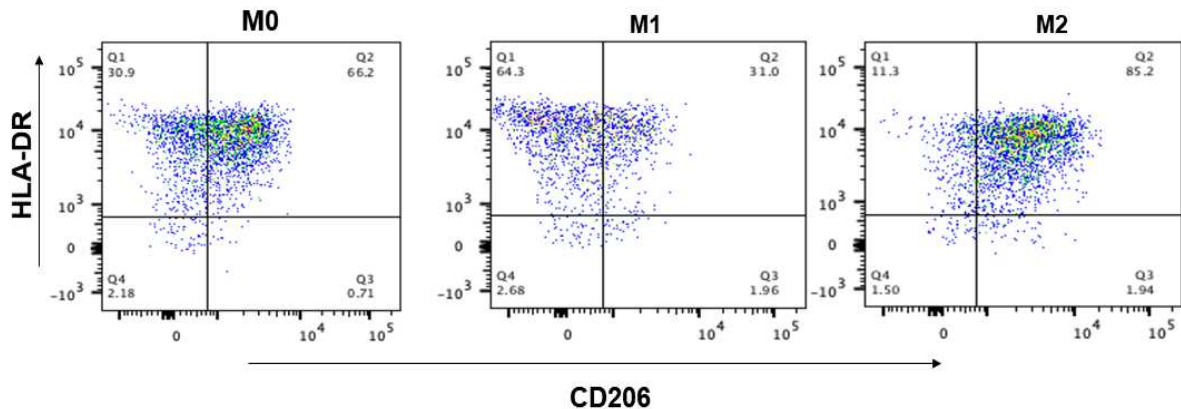
As células CD14<sup>+</sup> foram inicialmente cultivadas em placa de cultura de 6 poços (Corning Kennebunk, ME, USA), com a densidade de  $1,5 \times 10^6$  células por poço, na presença de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico e incubado por 24 horas. Após este período, o sobrenadante dos monócitos foi coletado e centrifugado a 300xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram cultivadas por mais 03 dias em presença de meio RPMI suplementando com 20ng/mL de recombinante humana M-CSF (R&D Systems). Para a diferenciação de macrófagos M1 foi utilizado LPS (1 µg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) e IFN- $\gamma$  recombinante (200 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Para a diferenciação de macrófagos M2 foi utilizado as citocinas recombinantes IL-4 (30 ng/mL) e IL-13 (30 ng/mL), todos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). A cultura foi realizada em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal e antibiótico e mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A diferenciação de macrófagos M1 e M2 foi confirmada por citometria de fluxo.

### **3.9 Citometria de fluxo**

Macrófagos foram coletados usando Cell Scraper (Sarstedt, Newton, USA) centrifugados a 300xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em meio RPMI completo e as células distribuídas em tubos de citometria. Os receptores de Fc foram bloqueados e as células incubadas com 1µL de Human TruStain FcX (Biolegend) em 200 µL de tampão por 15 minutos a 4°C. Para marcação de superfície,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas por 30 minutos, com uma concentração ideal pré-titulada ( $\leq 0.5c$ ) de anticorpo monoclonal conjugado com fluorocromo. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-CD206 Alexa-fluor 488 (BioLegend, San Diego, CA), anti-HLADR APC (BioLegend, San Diego, CA), anti-CD86 PE (BioLegend, San Diego, CA), anti-CD68 Pacific Blue (BioLegend, San Diego, CA), anti-CD64 PC CY7 (BioLegend, San Diego, CA). Após o período de incubação com os anticorpos, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 300µL de PBS por tubo para aquisição. As amostras foram adquiridas em FACS Calibur (BD biosciences, San Jose, CA) e as análises foram realizadas usando o programa FlowJow (Tree Star).

---





**Figura 1. Caracterização de macrófagos quanto à expressão de HLA-DR e CD206.**

Monócitos CD14<sup>+</sup> foram cultivados na densidade de  $1,5 \times 10^6$  células por poço, na presença de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos e mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período, para a diferenciação de macrófagos M1 foi adicionado a cultura LPS (1 µg/mL) e IFN- $\gamma$  (200 ng/mL). Para a diferenciação de macrófagos M2 foi utilizado as citocinas recombinantes IL-4 (30 ng/mL) e IL-13 (30 ng/mL). A cultura foi realizada em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal e antibióticos e mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Em seguida, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. Os macrófagos foram primeiramente selecionados de acordo com a expressão da molécula CD68 e então analisamos quanto à expressão do receptor de manose (CD206) e molécula HLA-DR.

### 3.10 Cultura de células tumorais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas duas linhagens 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 cm<sup>2</sup> inicialmente, em meio DMEM: F12 (ATCC® 30-2006™), contendo 1.2g/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 garrafa de 25 cm<sup>2</sup> inicialmente, no 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 CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. O meio de cultura de ambas as linhagens celulares foi trocado a cada 2 dias até que as células atingissem uma confluência de aproximadamente 90% da área quando eram tripsinizadas (Trypsin-EDTA- 1X Corning® NY, USA) e subcultivadas em proporção dependente do planejamento de cada ensaio a ser realizado.

### 3.11 Ensaio de migração celular no Incucyte®.

Empregou-se para avaliar a dinâmica de migração celular, o método de *Scratch*. Esse método baseia-se na criação de um risco (scratch) em uma monocamada de células com características aderentes. Após a adição dos estímulos as células irão se mover a fim de fechar a abertura feita e reestabelecer as interações

---

célula-célula. Para o ensaio de migração, placas de 96 poços foram previamente tratadas com 100µL 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  $4 \times 10^4$  células da linhagem SCC-25 e  $5 \times 10^4$  células da linhagem Detroit 562, foram distribuídas em placas de 96 poços, contendo meio de cultura suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS). Todas as linhagens foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após, 16 horas, o meio foi retirado e substituído por um meio com 0,1% de BSA durante 4 horas (*fasting*). Após confluência, uma ferida artificial (*scratch*) foi realizada utilizando o Incucyte® WoundMaker® (capaz de realizar feridas iguais nos 96 poços, simultaneamente) e os poços foram lavados com PBS para remover as células não aderidas. Neste momento, foi adicionado o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 e M2, IL-33 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, marca Essen Bioscience), durante 48 horas. Imagens foram capturadas e enviadas para um disco rígido externo conectado à rede, que reuniu e processou os dados das imagens. Com esse dispositivo, foi possível acompanhar, em tempo real, o andamento dos ensaios que aconteciam dentro da incubadora, onde foram capturadas imagens em um intervalo de tempo de 2 horas. Essas imagens foram enviadas para um software próprio (IncuCyte® ZOOM Software-Essen BioScience), para serem analisadas.

### **3.12 Ensaio de proliferação celular no Incucyte®.**

As diferentes linhagens de células tumorais, na densidade de  $1 \times 10^4$  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 CO<sub>2</sub>. 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 meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 e M2, IL-33, 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).

---

### 3.13 Ensaio de invasão no Transwell.

Para complementar os estudos de migração, avaliamos a capacidade do meio condicionado dos macrófagos M1 e M2 e da citocina IL-33 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 $\mu$ L de BME (*Basement membrane extract*) (Cultrex, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) na diluição de 1:20. As células na densidade de  $1 \times 10^5$  células foram distribuídas na câmara superior e, na porção inferior, foi adicionado 400 $\mu$ L do meio condicionado das culturas dos macrófagos e IL-33 em diferentes concentrações (10,50 e 100ng/mL). As células foram incubadas por 48 horas. As células que atravessaram a barreira do BME foram fixadas em formaldeído 4% por 10 minutos e coradas com cristal violeta. Células foram fotografadas em microscópio EVOS M5000 (Invitrogen MA, USA) (5 campos por *transwell*).

### 3.14 Extração do RNA total

O RNA total das células foi isolado utilizando-se 1mL de Trizol® Reagent ((Life Technologies, Invitrogen, Carsbad, CA, USA) e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, a suspensão foi transferida para tubos eppendorfs, onde adicionamos 200 $\mu$ L de clorofórmio por tubo. As amostras foram homogeneizadas por 15 segundos vigorosamente e incubadas a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Após a incubação nos certificamos de que havia 2 fases no tubo (fase clara, aquosa e o Trizol). Centrifugamos a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Após o término da centrifugação a fase clara foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500 $\mu$ L de álcool isopropílico a cada 1 mL de Trizol. Amostras foram incubadas por 10 minutos. Após a incubação, foram centrifugadas a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 2 vezes com 1 mL de álcool 75%, 7.500xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram em temperatura ambiente aproximadamente 20 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram dissolvidos em 10 $\mu$ L de água *RNAase-free*. Determinamos a concentração de RNA usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

---

### 3.15 Síntese de cDNA através da Transcrição Reversa

Uma vez obtido o mRNA total das células, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA). Para cada reação foram utilizados 3µg de RNA total, diluídas em 12,1µL de DEPC H<sub>2</sub>O 5µL de tampão de enzima (5x; Invitrogen MA, USA), 0,5µL de Oligo dT 12-18 a (0,5mg/ml; Invitrogen MA, USA), 0,1µL de cada dNTP (100mM; Invitrogen MA, USA), 0,5µL MMLV RT Invitrogen MA, USA), 1µL DTT (0,1M; Invitrogen MA, USA), completando 25µL 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 e 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.

### 3.16 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). Primers e sondas para IL-33 (Hs00369211), ST2 (Hs00545033) foram obtidos do fornecedor (*TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems*) além dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM*, *SYP* cujas sequencias são informações protegidas pelo fabricante (GURURAJAN; CAVASSANI; SIEVERT; DUAN *et al* 2015). O gene 18S5 (Hs03928990) foi utilizado como gene endógeno de referência. 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 genes*) 18S e as análises para cada primer através da quantificação relativa ao grupo controle ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ).

---

---

### **3.17 Análise de expressão gênica *in silico* por bioinformática**

Dados da expressão gênica foram analisadas utilizando a ferramenta “Gene Expression Profile Interactive Analysis (GEPIA)” (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) (TANG; LI; KANG; GAO *et al.*, 2017). Esta análise teve o objetivo de avaliar a expressão gênica de CD163 e CD68 em amostras de pacientes com carcinoma espinocelular, bem como a sobrevida geral de pacientes, de acordo com a baixa ou alta expressão de genes selecionados. Todos os dados foram processados em janeiro e fevereiro de 2021, utilizando amostras pareadas e não pareadas para comparar o nível de expressão de CD163 e CD68 entre as amostras de tecidos normais e tumorais.

### **3.18 Análise estatística**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Graph Pad Prism, versão 8.3 para Macintosh (Graph Pad Software, San Diego, CA USA). Utilizamos o teste One-way ANOVA, Turkey’s teste de múltiplas comparações, e o teste Shapiro-Wilk foi empregado para verificar a normalidade ou não da distribuição dos dados. Test t student ou Mann Whitney, não pareados com distribuição normal e não normal respectivamente também foram utilizados. Resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM dos resultados obtidos para cada grupo. 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 significativos.

## **4 RESULTADOS**

---

---





## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão de CD68 e CD163 em amostras de carcinoma espinocelular

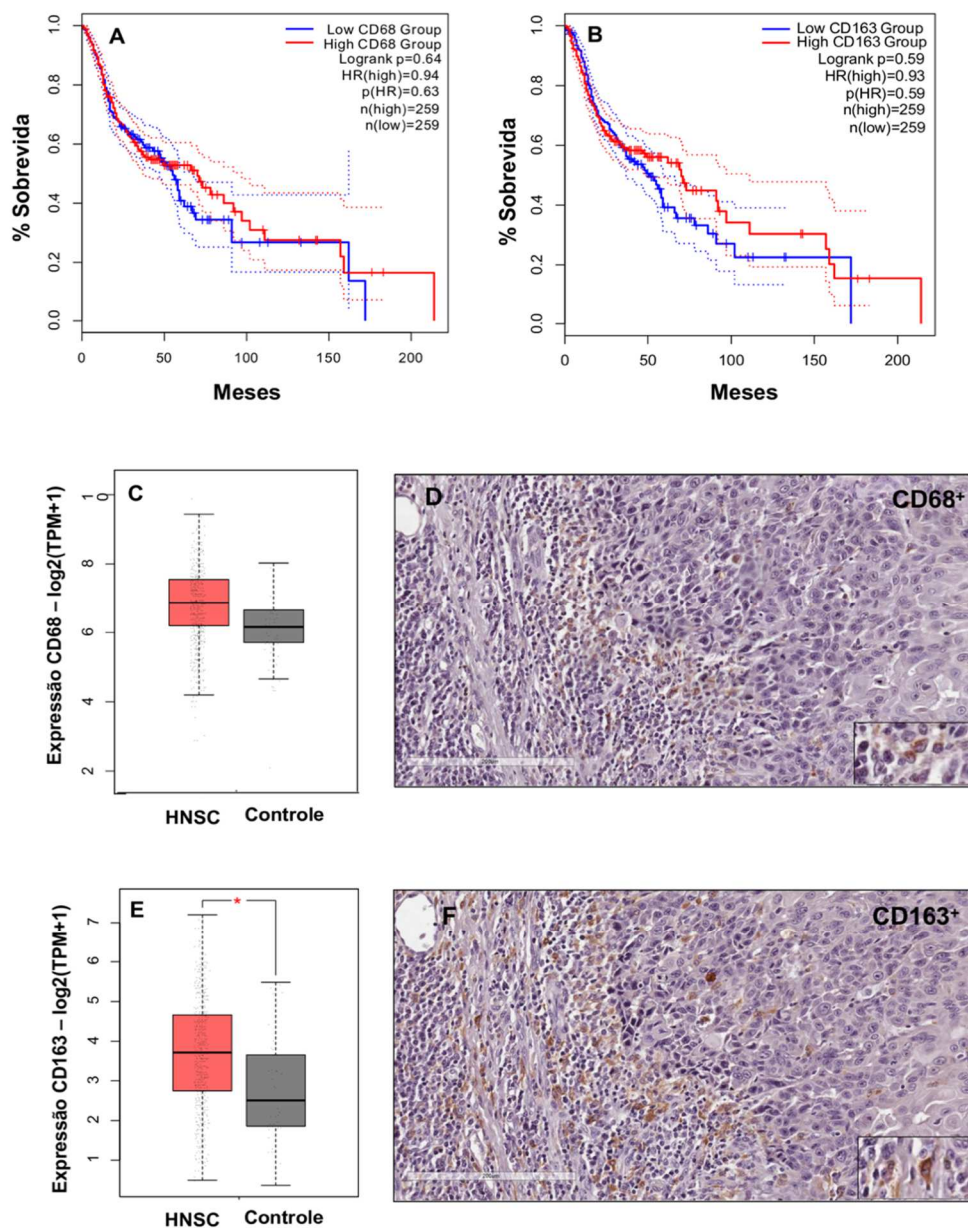
Sabe-se que os macrófagos associados ao tumor podem ser distinguidos nos subtipos M1 e M2. Os biomarcadores CD68 e CD163 são frequentemente empregados para detectar estes diferentes fenótipos em amostras de tecido neoplásico. Particularmente, a molécula CD68 marca a população de macrófagos M1, enquanto a molécula CD163 é empregada, principalmente, para a detecção de macrófagos M2 (ALMATROODI; MCDONALD; DARBY; POUNIOTIS, 2016). Apesar da grande controvérsia que existe sobre esse assunto, estudos indicam a correlação de CD163 (M2) com baixa sobrevida em pacientes portadores de carcinoma espinocelular (TROIANO; CAPONIO; ADIPIETRO; TEPEDINO *et al.*, 2019).

Com base nessas informações, investigamos se a expressão de CD68 e CD163, marcadores específicos para macrófagos M1 e M2, respectivamente, constitui fator prognóstico para o carcinoma espinocelular. Para tal, inicialmente empregamos a plataforma GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Anylisis*), uma ferramenta que acessa dados públicos de expressão gênica por *microarray* e informações clínicas.

Os dados da análise *in sillico* da expressão de CD68 em amostras de pacientes portadores de carcinoma espinocelular e sua correlação com a sobrevida global evidenciou *que* o alto nível de expressão de CD14 se correlaciona com maior sobrevida dos pacientes, contudo, estes dados não foram estatisticamente significantes (Figura 2A). Em relação à expressão de CD163 em pacientes portadores de carcinoma espinocelular, altos níveis de expressão de CD163 são observados em pacientes com maior sobrevida e esses dados foram estatisticamente significativos (Figura 2B) ( $p=0,59$ ).

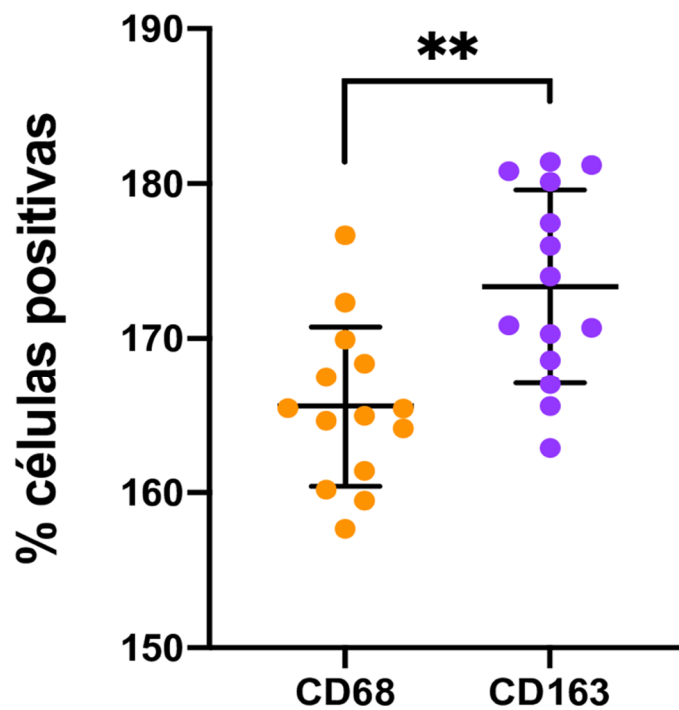
De acordo com a análise do banco de dados público, amostras de pacientes portadores de carcinoma espinocelular apresenta alta expressão de CD68, contudo, não foi observada diferença estatisticamente, quando comparado aos dados de amostras de indivíduos sadios (Figura 2C).

---



**Figura 2 - Expressão de CD68 e CD163 em carcinoma espinocelular.** A análise de expressão gênica foi realizada usando a ferramenta GEPIA e o banco de dados público TCGA. **(A)** Curvas de sobrevivência em pacientes com carcinoma espinocelular e a correlação com a expressão de CD68. **(B)** Curvas de sobrevivência em pacientes com carcinoma espinocelular e a correlação com a expressão de CD163. **(C)** Análise de bioinformática comparativa da expressão de CD68 entre amostras de tecido sadio (n=44, barra cinza) e de carcinoma espinocelular (n=519, barra vermelha). **(D)** Fotomicrografia de amostra representativa de carcinoma espinocelular evidenciando a presença de células marcadas para CD68. **(E)** Análise de bioinformática comparativa de expressão de CD163 entre amostras de tecido sadio (n=44, barra cinza) e de carcinoma espinocelular (n=519, barra vermelha) em dados públicos do GEPIA (\* $p < 0,05$ ). **(F)** Fotomicrografia de amostra representativa de carcinoma espinocelular evidenciando a presença de células marcadas para CD163. Teste Log-rank.  $P < 0,5$ .

Estes dados foram confirmados por nossas análises de imunohistoquímica que evidenciaram a presença de células positivas para CD68 em amostras de pacientes portadores de carcinoma espinocelular (Figura 2D). De modo contrário, em amostras de pacientes portadores de carcinoma espinocelular observa-se alta expressão de CD163, sendo observada diferença estatisticamente, quando comparado aos dados de amostras de indivíduos sadios ( $p < 0,05$ ) (Figura 2E). As análises de imunohistoquímica também evidenciaram alta imunorreatividade para CD163 em amostras de carcinoma espinocelular (Figura 2F), e a percentagem de células CD163<sup>+</sup> foi superior a percentagem de células CD68<sup>+</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Quantificação da expressão de CD68 e CD163 em amostras de carcinoma espinocelular.** As barras representam a média  $\pm$  SD de células marcadas positivamente para CD68<sup>+</sup> e CD163<sup>+</sup> em amostras de carcinoma espinocelular. \*\* $p < 0,01$ . Test t.

#### **4.2 Células da linhagem tumoral SCC-25 quando estimuladas com o meio condicionado de macrófagos M1 apresentaram menor motilidade e atividade proliferativa.**

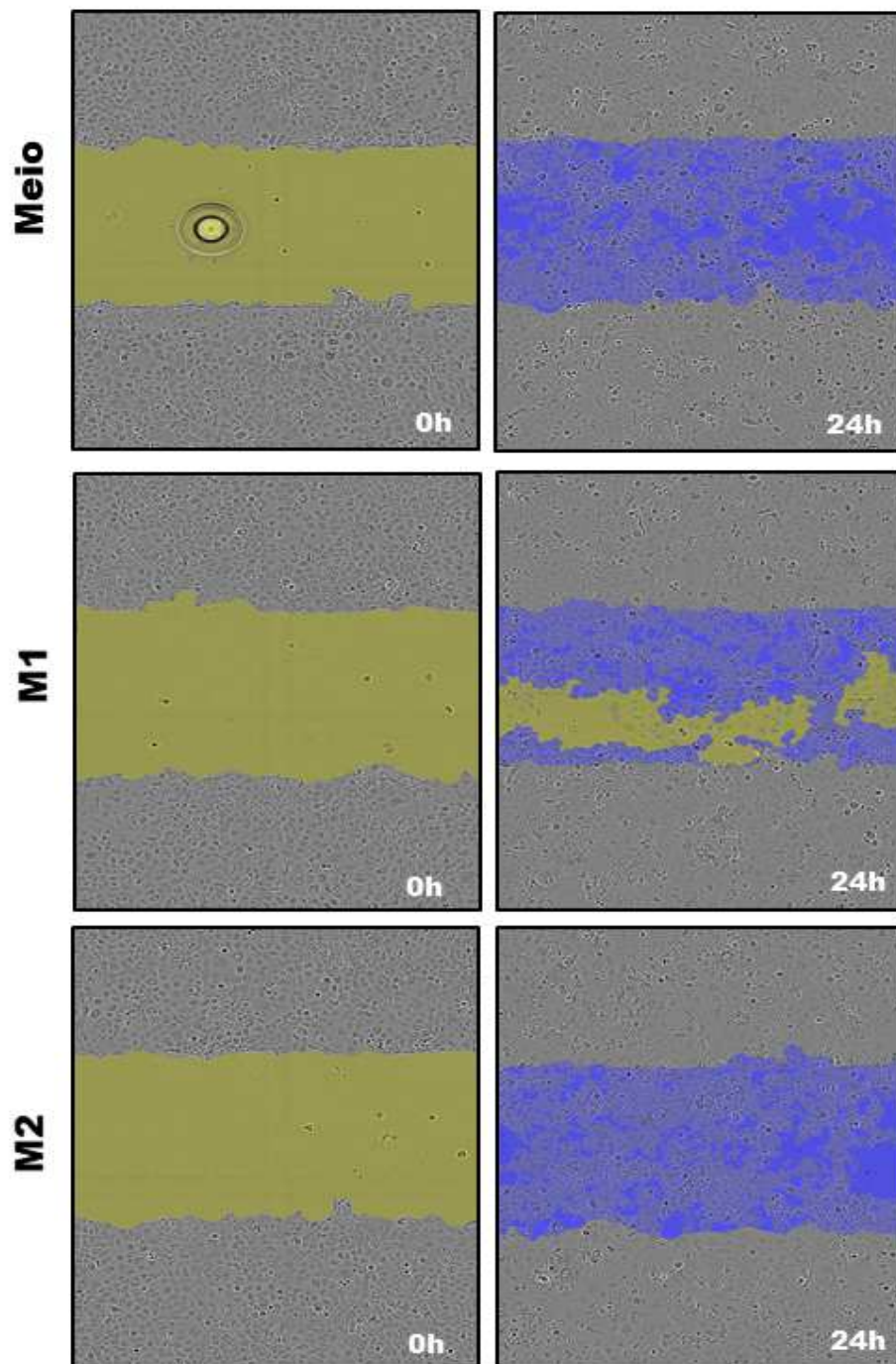
Dados da literatura indicam que os macrófagos e seus produtos de secreção desempenham importante papel no processo de carcinogênese, promovendo a disseminação e metástase tumoral (MANTOVANI; SCHIOPPA; PORTA; ALLAVENA *et al.*, 2006). Inicialmente, determinamos a capacidade de migração/motilidade das duas linhagens de células HNSCC que testamos em nosso estudo e descobrimos que as linhagens eram móveis e tinham capacidade migratória relativamente semelhante (Figura 4-6).

Nestes ensaios também verificamos o efeito do meio condicionado de macrófagos M1 e M2 na motilidade de células da linhagem SCC-25. Na figura 3A são apresentadas as fotomicrografias, obtidas em tempo real, da cultura de células da linhagem SCC-25 cultivadas na presença e/ou ausência do meio condicionado de macrófagos de fenótipo M1 e/ou macrófagos de fenótipo M2. Estes resultados acompanhados no gráfico, em tempo real (Figura 5A), evidenciaram que as células da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com meio condicionado da cultura de macrófagos M1 apresentaram aumento significativo da motilidade nas primeiras 10 horas do ensaio (Figura 5A e 5B). No entanto, no decorrer do experimento, verificamos que as taxas de motilidade foram semelhantes, principalmente após 24 horas de cultura, e observou-se confluência superior a 90% (Figura 5C). As células da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos M2 apresentaram níveis de motilidade e porcentagem de confluência semelhantes aos observados para as células cultivadas na presença apenas de meio de cultura (Figura 5).

Em seguida, analisamos a influência do meio condicionado de macrófagos na proliferação de células da linhagem SCC-25 (Figura 6). Os resultados evidenciaram que estas células apresentaram atividade proliferativa, principalmente após as 20h de cultivo. Os resultados evidenciaram ainda que as células da linhagem SCC-25 cultivadas na presença do meio condicionado da cultura de macrófagos M1 apresentaram menor taxa de proliferação em comparação as células cultivadas na presença apenas do meio de cultura (Figura 6B).

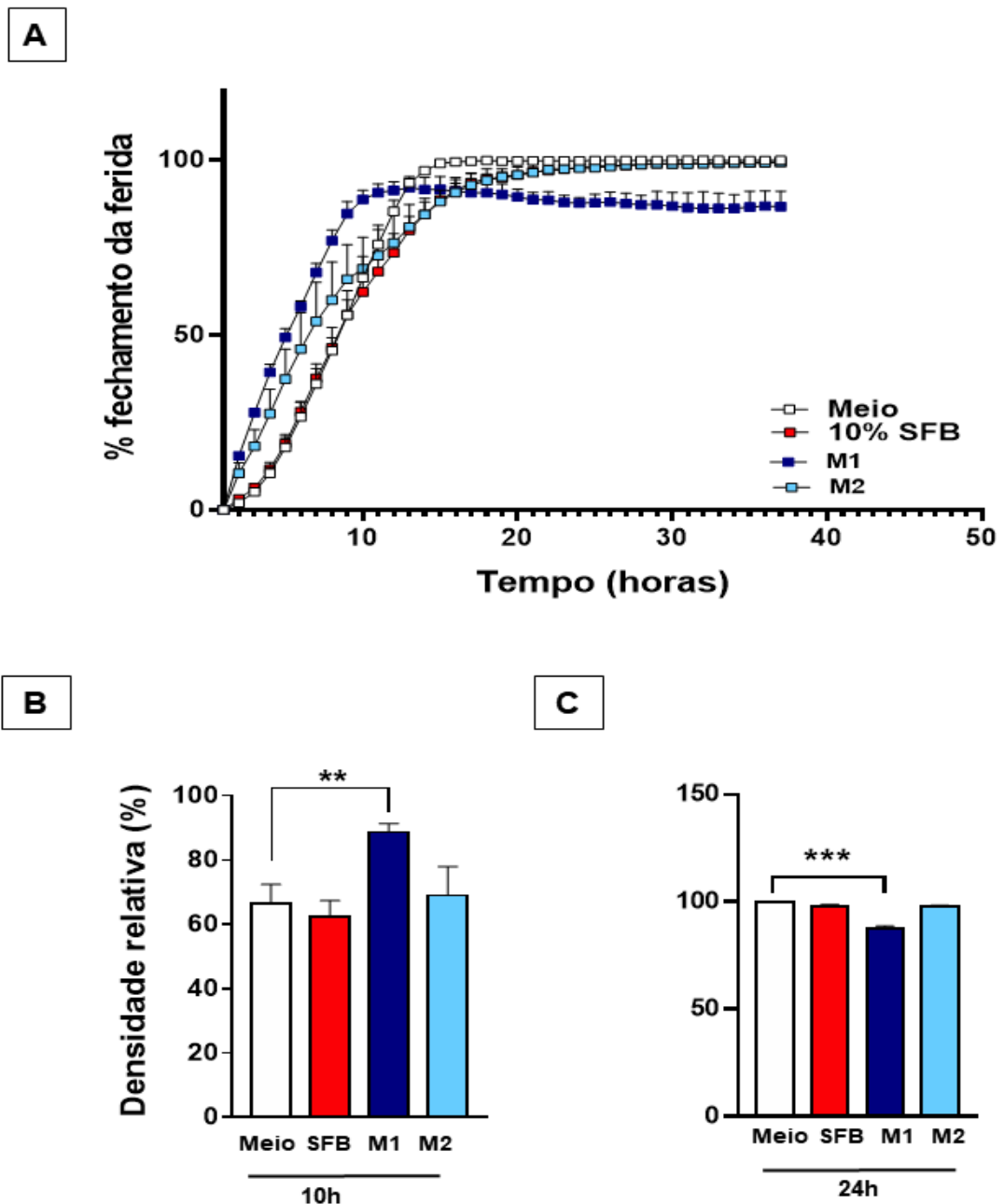
---

---

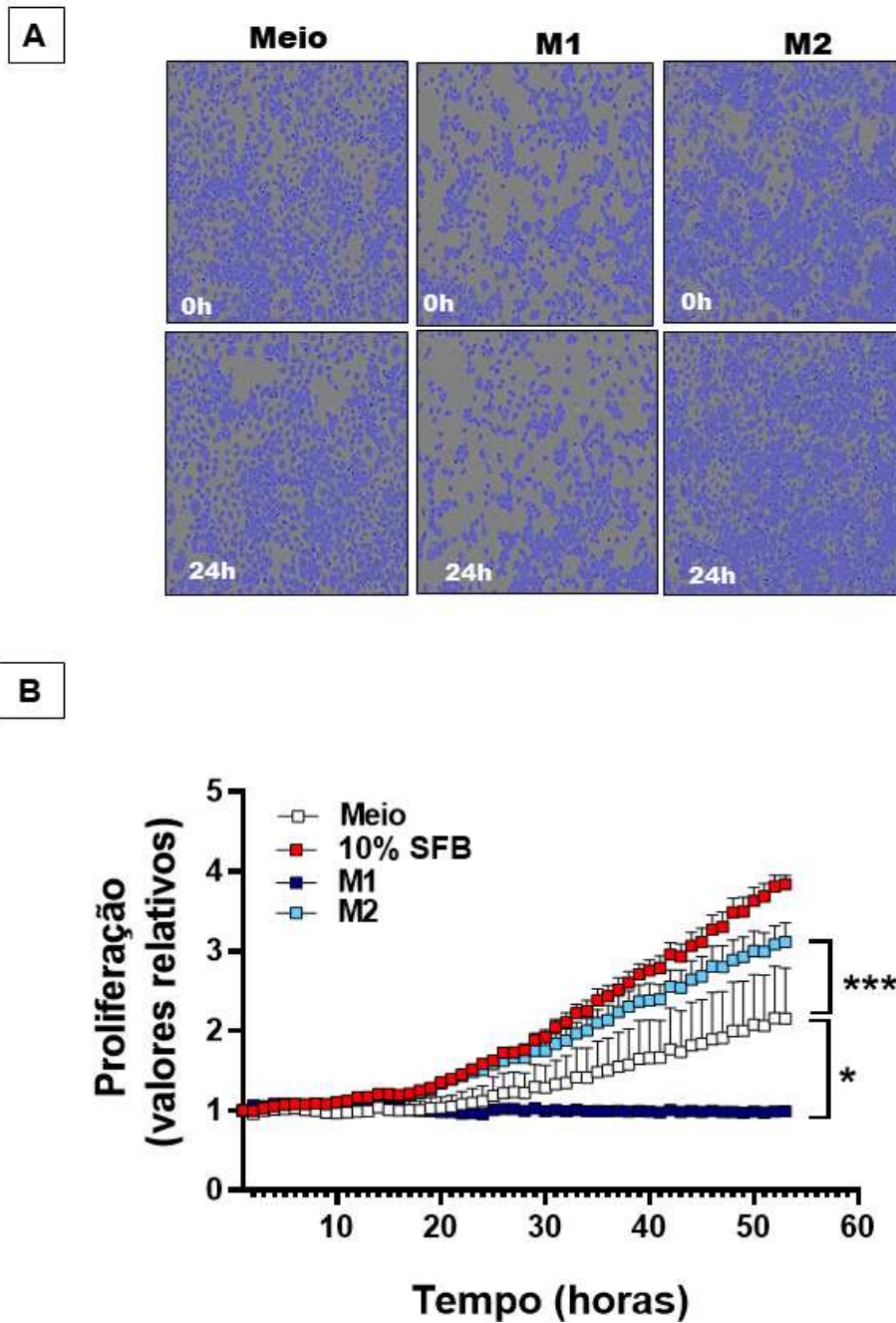


**Figura 4. Fotomicrografia do ensaio de fechamento de ferida de células da linhagem tumoral SCC-25.** Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de fechamento da ferida. As imagens foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. Em amarelo está representada a ferida e em azul as camadas de confluência a partir das bordas.

---



**Figura 5. Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos. (A)** O gráfico ilustra a progressão densidade e confluência da ferida durante o período de 40 horas. **(B)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 10h. **(C)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 24h. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,0001$ . M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2; SFB: células cultivadas com o soro bovino fetal a 10%. One-way ANOVA.



**Figura 6. Resposta proliferativa da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos. (A)** Imagens de microscopia de contraste de fase mostrando a cultura das células SCC-25. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. **(B)** O gráfico ilustra a progressão da resposta proliferativa durante o período de 55 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2. One-Way ANOVA.



De modo relevante, as células da linhagem SCC-25 cultivadas na presença do meio condicionado da cultura dos macrófagos M2 apresentaram aumento na taxa de proliferação quando comparado com as células cultivadas na presença de meio somente (Figura 6B).

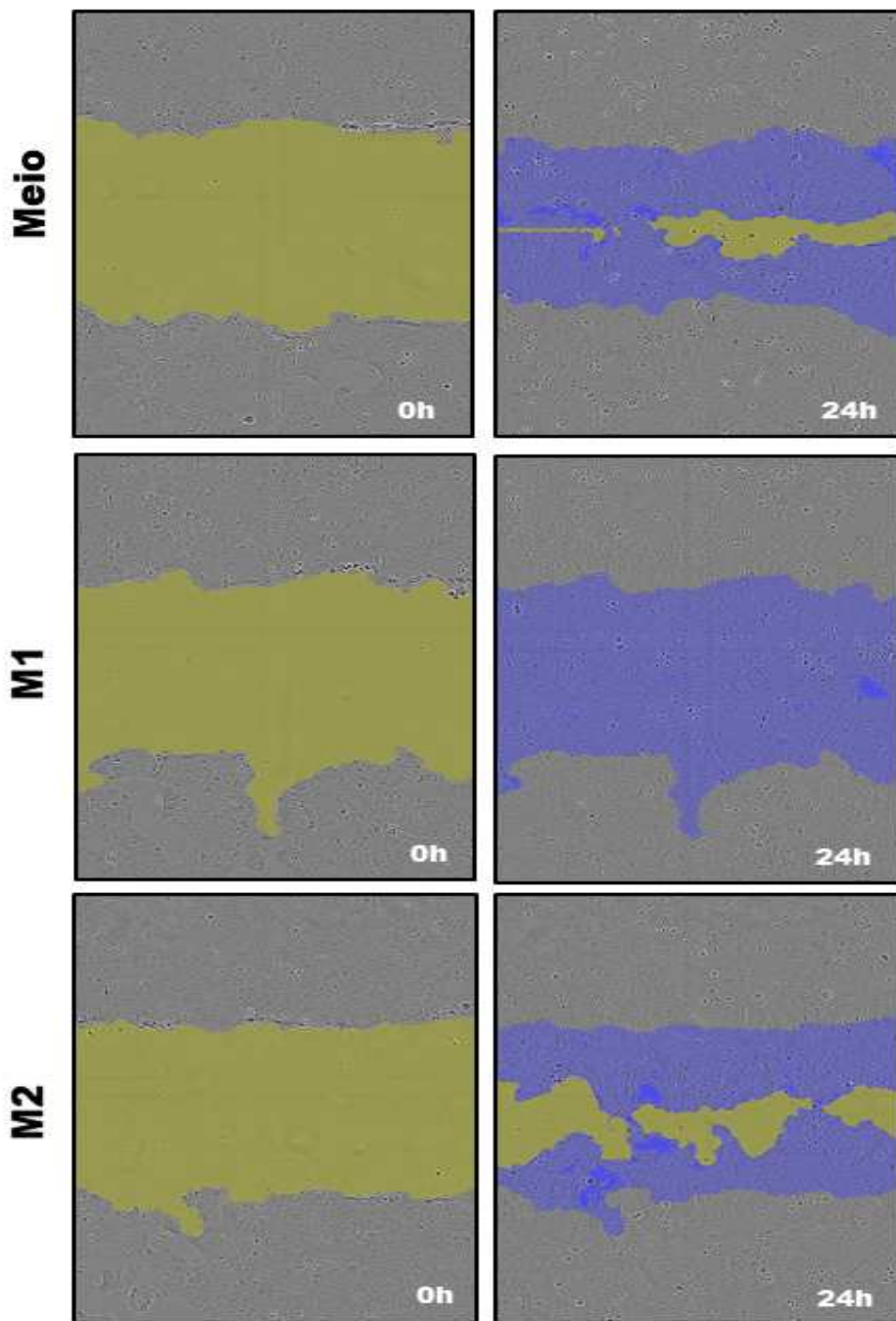
#### **4.3 Células da linhagem tumoral Detroit 562 quando estimuladas com o meio condicionado de macrófagos M1 apresentaram maior motilidade.**

Em relação a motilidade das células da linhagem tumoral Detroit 562, o efeito do meio condicionado de macrófagos de fenótipo M1 e M2 na motilidade destas células são apresentados nas fotomicrografias obtidas em tempo real (Figura 7). As imagens evidenciam que as células da linhagem Detroit 562, expostas ao meio condicionado da cultura de macrófagos M1 apresentaram uma confluência progressiva, contudo, os níveis de motilidade foram maiores aos observados para as células cultivadas na presença do meio de cultura, no período de 24 horas (Figura 8). Estes resultados acompanhados no gráfico, em tempo real evidenciaram que as células da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com meio condicionado da cultura de macrófagos M1 apresentaram aumento da motilidade, principalmente após 10 horas de cultura, em comparação com as células cultivadas na presença apenas de meio (Figura 8A e 8B), esta diferença não se manteve estatisticamente significativa no período de 24 horas (Figura 8A e 8C). No entanto, no decorrer do experimento, verificamos que as taxas de motilidade foram semelhantes, principalmente após 30 horas de cultura, e observou-se confluência superior 95% (Figura 8A). Por outro lado, o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2 não alterou o perfil de confluência e a motilidade das células da linhagem Detroit 562, quando comparado com as células cultivadas na presença do meio (Figura 8).

Para as células da linhagem Detroit 563, o ensaio de proliferação evidenciou que as taxas foram diferentes ao observado para as células da linhagem SCC-25. Após aproximadamente 24 horas de exposição ao meio condicionado de macrófagos M1, a proliferação celular teve aumento progressivo (Figura 9).

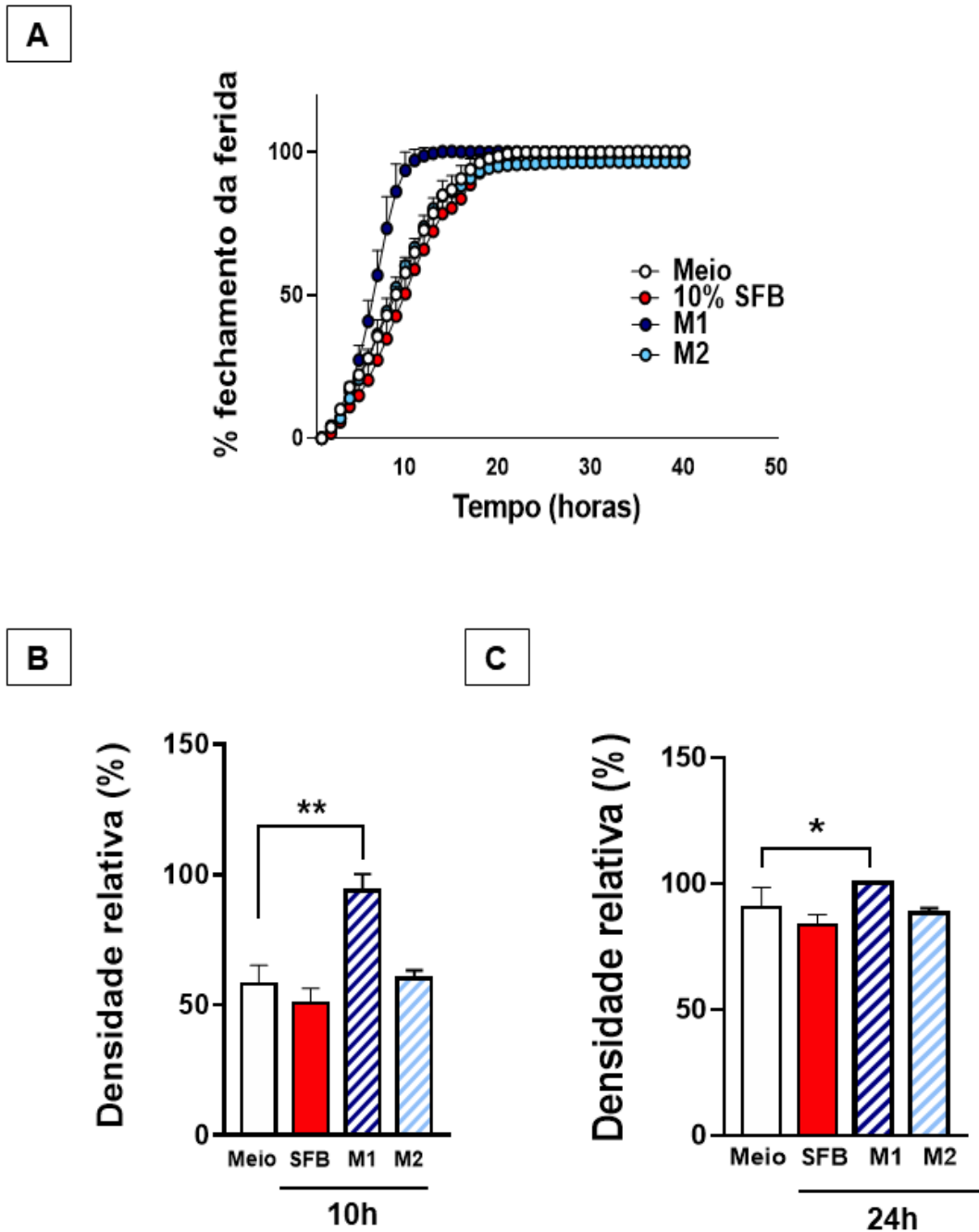
---

---

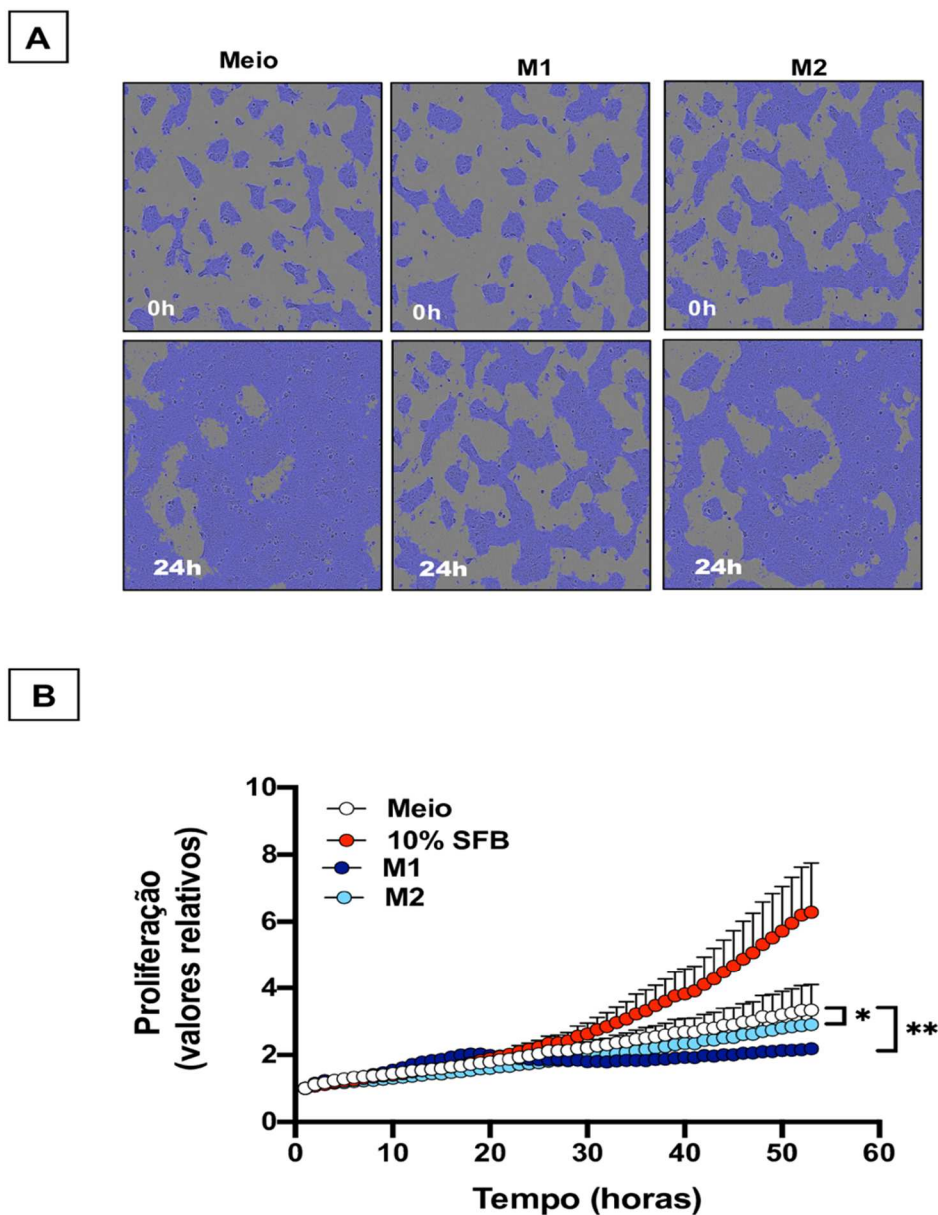


**Figura 7. Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562.** Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de fechamento da ferida. As imagens no foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. Em amarelo é representada a ferida e em azul as camadas de confluência a partir das bordas. M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2.

---



**Figura 8. Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos. (A)** O gráfico ilustra a progressão densidade e confluência da ferida durante o período de 40 horas. **(B)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 10h. **(C)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 24h. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2; SFB: células cultivadas com soro bovino fetal a 10% (controle positivo). One-Way ANOVA.



**Figura 9. Resposta proliferativa da linhagem tumoral Detroit 562 estimulada com o meio condicionado da cultura de macrófagos. (A)** Imagens de microscopia de contraste de fase mostrando a cultura das células Detroit 562. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. **(B)** O gráfico ilustra a progressão da resposta proliferativa durante o período de 40 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ . M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2. One-Way ANOVA.

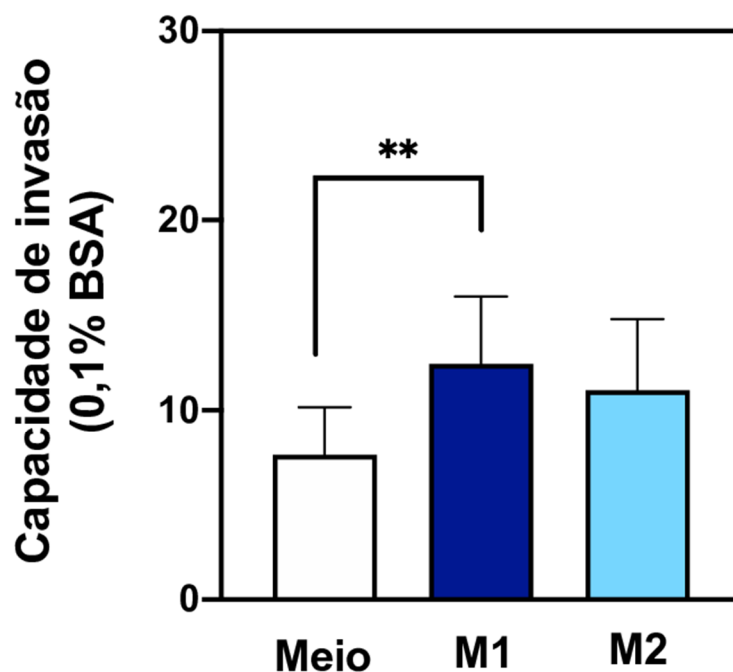
Entretanto, a taxa relativa de proliferação das células da linhagem Detroit 562, expostas ao meio condicionado de macrófagos M2 foi maior em relação ao meio condicionado de macrófagos M1 (Figura 9B). A exposição ao controle positivo (SBF à 10%) induziu a progressão da resposta proliferativa das células da linhagem Detroit 562, durante o período de 55 horas (Figura 9B).

#### **4.4 Invasão/migração, *in vitro*, das células da linhagem tumoral SCC-25 é induzida pelo meio condicionado da cultura de macrófagos.**

Estudos demonstraram que macrófagos presentes no microambiente tumoral podem favorecer a invasão das células tumorais. Contudo, o papel de macrófagos em mediar a invasão de células da linhagem SCC-25 e Detroit 562 ainda não foi completamente esclarecido. Assim, analisamos a capacidade de invasão destas duas linhagens celulares de atravessar filtros revestidos de Matrigel. Os resultados evidenciaram que as células da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com meio condicionado da cultura de macrófagos M1 e M2 apresentaram aumento da capacidade invasiva em comparação com as células cultivadas na ausência deste estímulo (Figura 10). Contudo, apenas os resultados observados após a exposição ao meio condicionado de macrófagos M1 apresentaram diferenças estatísticas significativas. De modo relevante, as células da linhagem Detroit 562 não apresentaram capacidade de atravessar a membrana revestida de Matrigel, mesmo após a estimulação com o controle positivo (dado não apresentado). Assim, houve uma forte correlação entre o meio condicionado de macrófagos de fenótipo M1 e a capacidade invasiva de células da linhagem SCC-25.

---

---



**Figura 10.** Ensaio de invasão e migração em *transwell* para células da linhagem **SCC-25** estimuladas com o meio condicionado da cultura de macrófagos. As barras representam o número de células que atravessaram a membrana. **\*\* $p < 0,001$** . Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2. One-Way ANOVA.

---

#### **4.5 Avaliação dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25.**

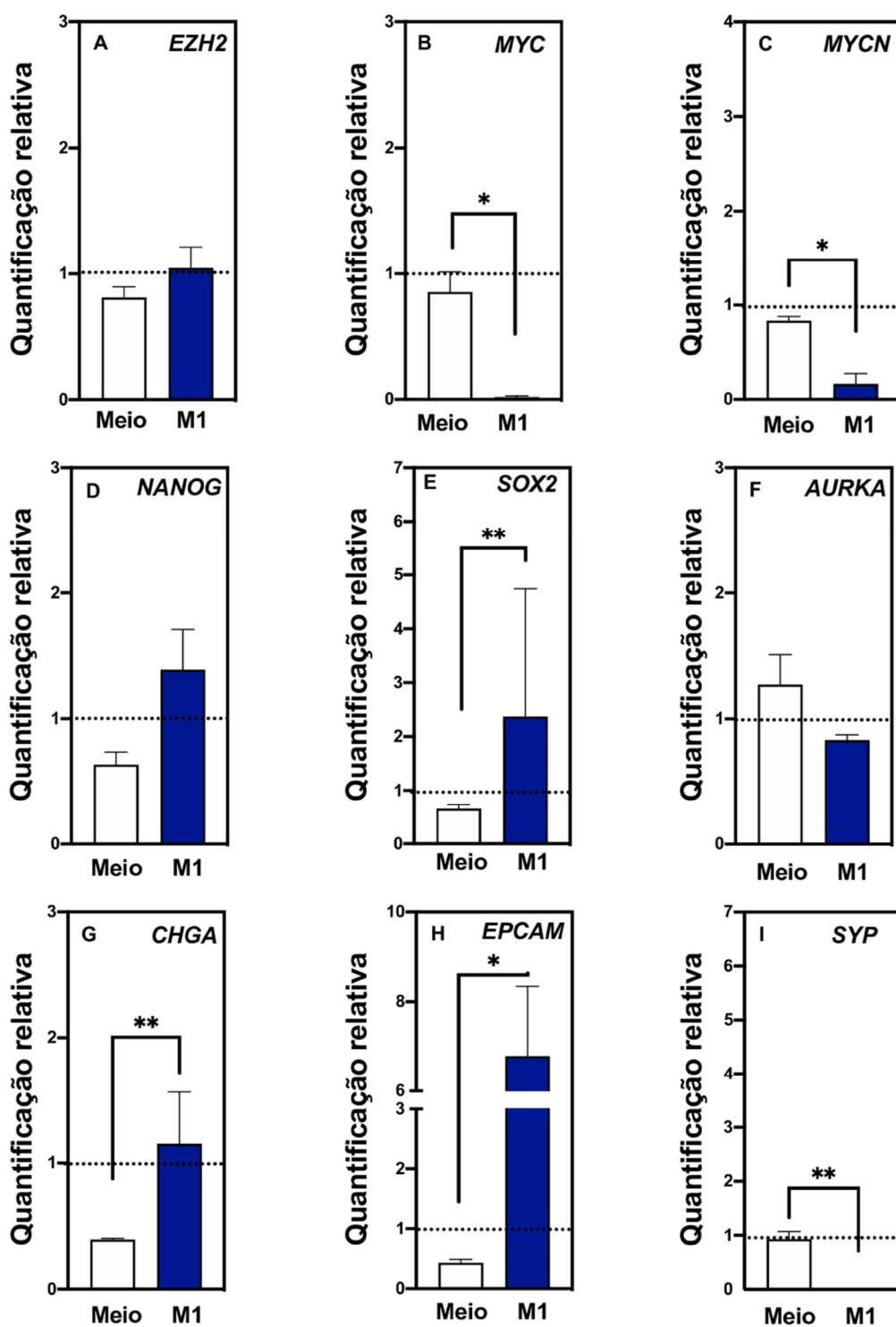
Em seguida, procuramos investigar alguns mecanismos de sinalização intracelular que seriam importantes para essa função do meio condicionado de macrófagos em facilitar a motilidade e invasão das células da linhagem SCC-25. Para tal, analisamos a expressão de *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM*, e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 após 24h de estimulação com o meio condicionado de macrófagos (Figure 11-12).

Os resultados evidenciaram que o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 promoveu aumento significativo da expressão dos genes *SOX2* (Figura 11E), *CHGA* (Figura 11G) e *EPCAM* (Figura 11H) em células da linhagem SCC-25. Por outro lado, a estimulação como o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 levou a diminuição significativa da expressão dos genes *MYC* (Figura 11B), *MYCN* (Figura 11C), e *SYP* (Figura 11I), quando comparada às células estimuladas com o meio. Os resultados evidenciaram ainda que a estimulação das células com o meio condicionado da cultura de macrófagos M1 não alterou de forma significativa a expressão dos genes *EZH2* (Figura 11A), *NANOG* (Figura 11D) e *AURKA* (Figura 11F).

Em relação ao estímulo com o meio condicionado de macrófagos M2, os resultados evidenciaram que este estímulo induziu aumento significativo da expressão dos genes *NANOG* (Figura 12D), *SOX2* (Figura 12E), e *EPCAM* (Figura 12H) em células da linhagem tumoral SCC-25. Ao mesmo tempo que induziu de modo significativo a diminuição da expressão dos genes *MYC* (Figura 12B), *AURKA* (Figura 12F), *CHGA* (Figura 12G) e *SYP* (Figura 12I). O meio condicionado da cultura de macrófagos M2 não alterou de forma significativa a expressão dos genes *EZH2* (Figura 12A), *MYCN* (Figura 12C).

---

---



**Figura 11.** Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 por PCR em tempo real. As células da linhagem tumoral foram estimuladas com o meio condicionado da cultura dos macrófagos de fenótipo M1 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. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ . Test t.



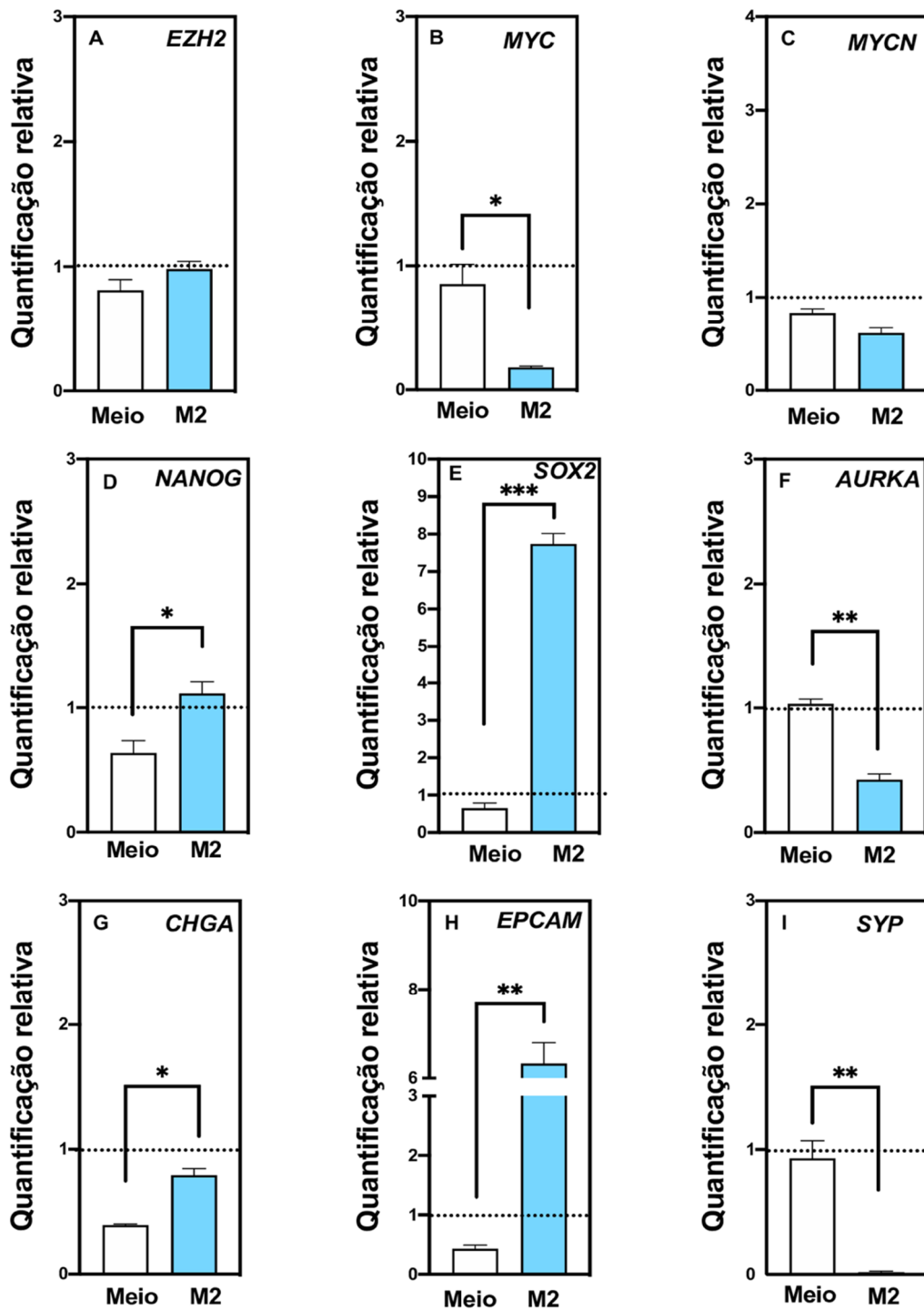


Figura 12. Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 por PCR em tempo real. As células da linhagem tumoral SCC25 foram estimuladas com o meio condicionado da cultura dos macrófagos de fenótipo M2 e o cDNA foi empregado 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. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ . Test t.

#### **4.6 Avaliação dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral Detroit 562.**

Com relação aos resultados de expressão dos genes pelas células da linhagem tumoral Detroit 562, os resultados demonstraram que o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 induziu aumento da expressão dos genes *EZH2* (Figura 13A), *MYCN* (Figura 13C), *NANOG* (Figura 13D), *SOX2* (Figura 13E), *AURKA* (Figura 13F) e *CHGA* (Figura 13G). Por outro lado, verificamos diminuição significativa da expressão do gene *MYC* (Figura 13B), enquanto a expressão dos outros genes não foi alterada significativamente, quando comparado com o meio. De modo relevante, o estímulo com o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2 promoveu aumento da expressão do gene *EZH2* (Figura 14A), *NANOG* (Figura 14D) e *AURKA* (Figura 14F) quando comparados ao controle. Por outro lado, promoveu uma diminuição da expressão dos genes *MYC* (Figura 14B), *MYCN* (Figura 14C), *SOX2* (Figura 14E), *CHGA* (Figura 14G), *EPCAM* (Figura 14H) e *SYP* (Figura 14I).

#### **4.7 IL-33 altera a motilidade e a atividade proliferativa de células da linhagem tumoral SCC-25.**

Dados da literatura indicam que a ativação da via de sinalização IL-33/ST2L pode desencadear a polarização de macrófagos de fenótipo M2 e facilitar a progressão tumoral (YU; HU; SHEN; DONG *et al.*, 2015). Ademais, estudo de nosso grupo demonstrou que IL-33 é importante para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular (AMÔR; DE OLIVEIRA; GASPAROTO; VILAS BOAS *et al.*, 2018). Considerando essas informações, avaliamos o efeito da citocina IL-33 na migração/motilidade das células da linhagem tumoral SCC-25 (Figura 15-16).

Na figura 15 são apresentadas as fotomicrografias, obtidas em tempo real, da cultura de células da linhagem SCC-25 cultivadas na presença e/ou ausência de IL-33

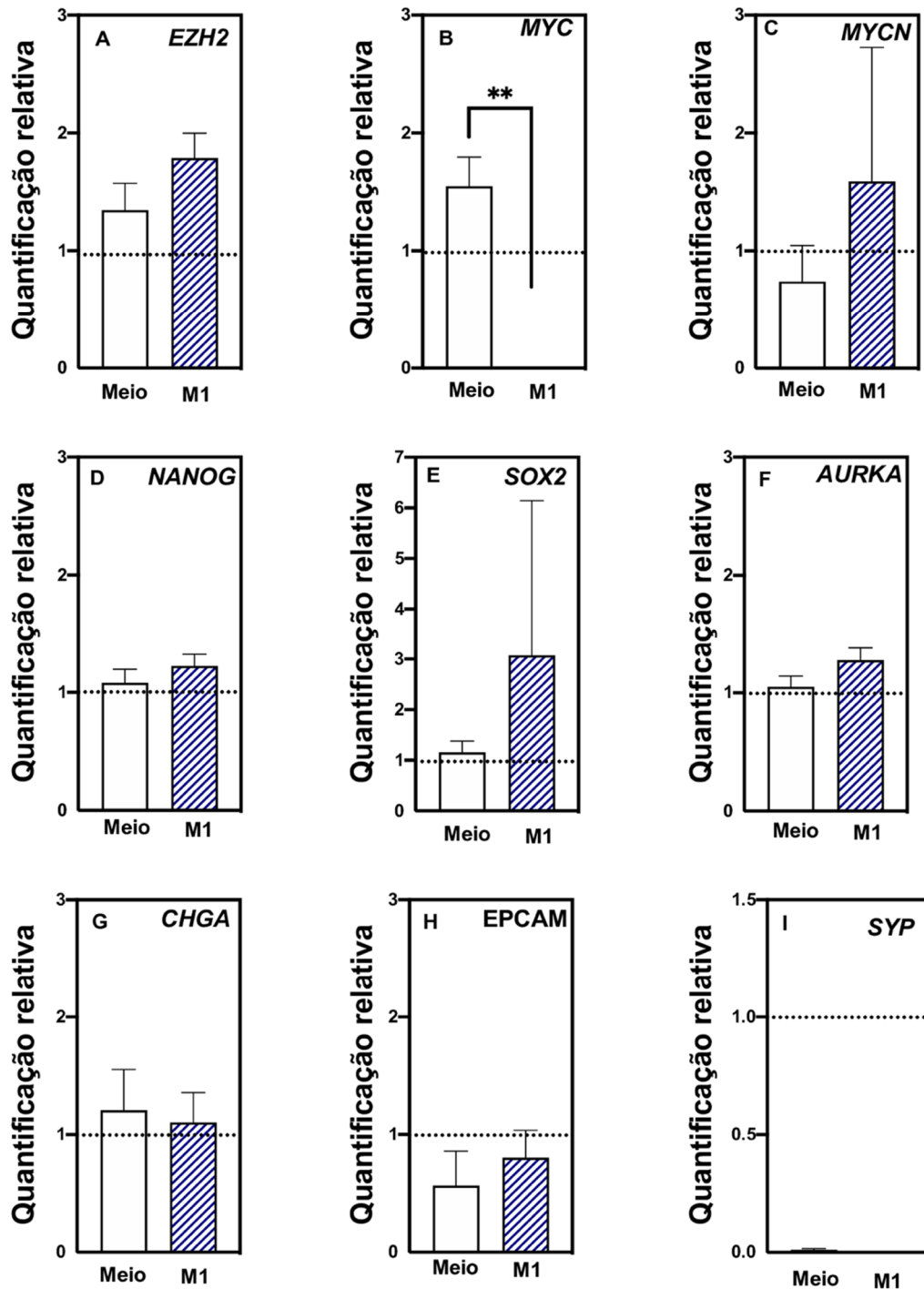
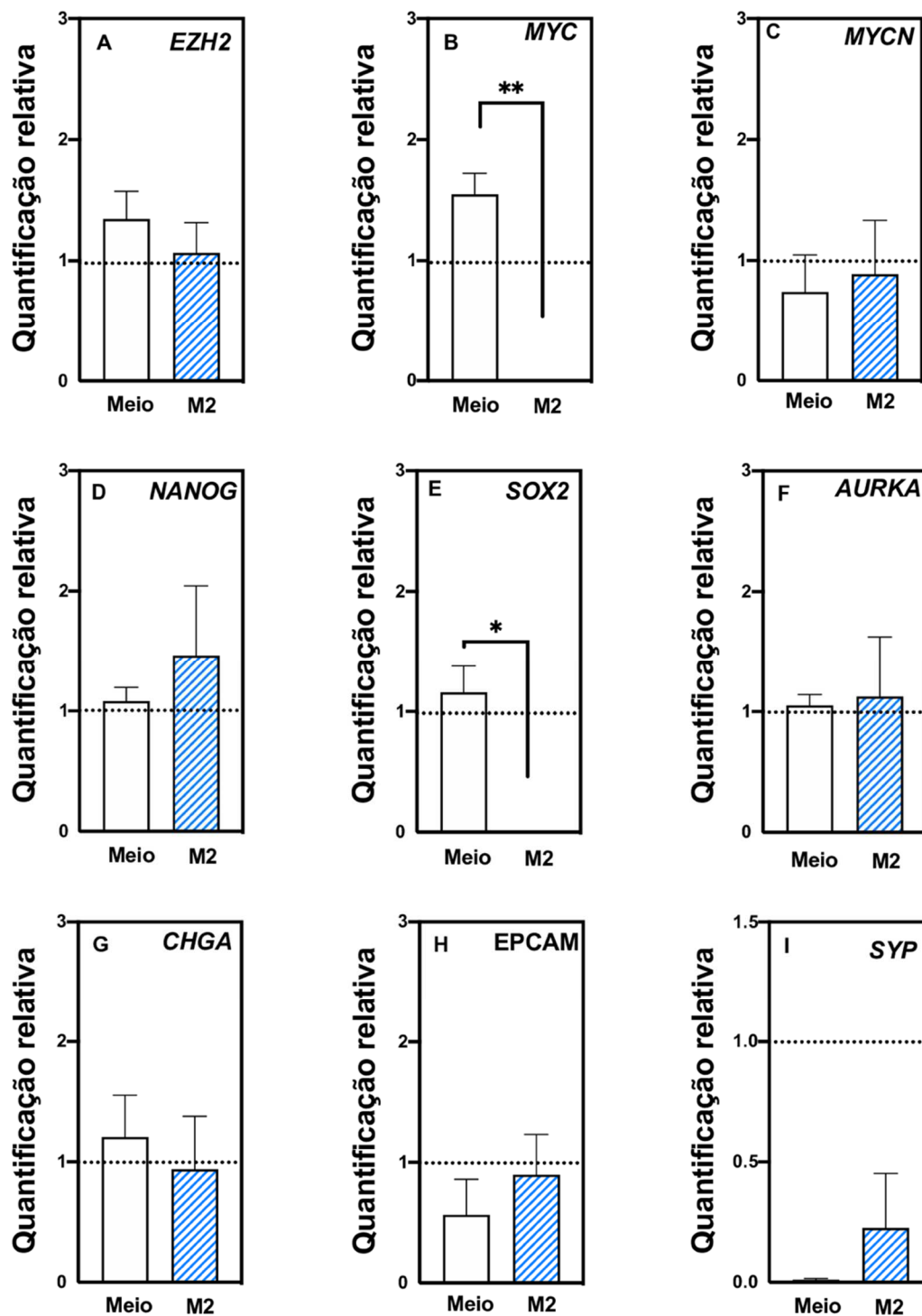
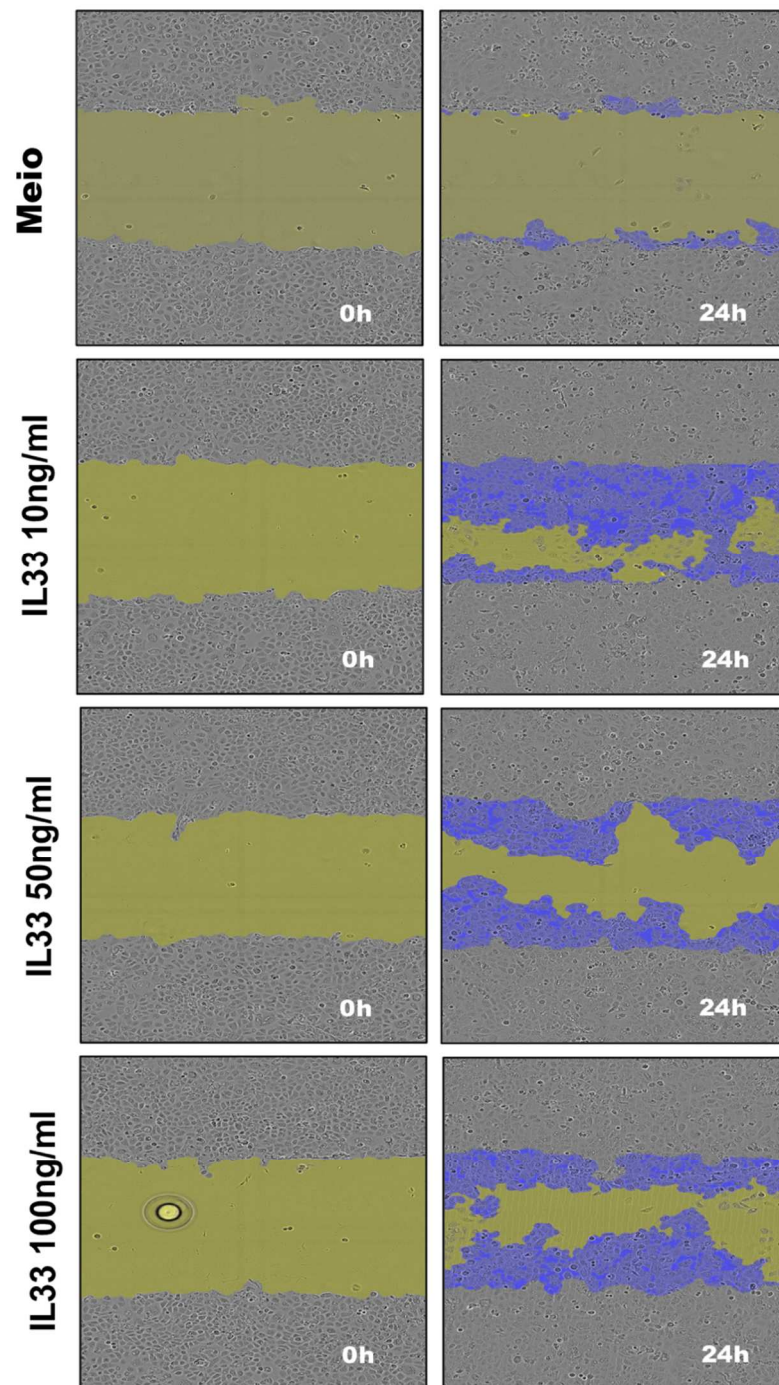


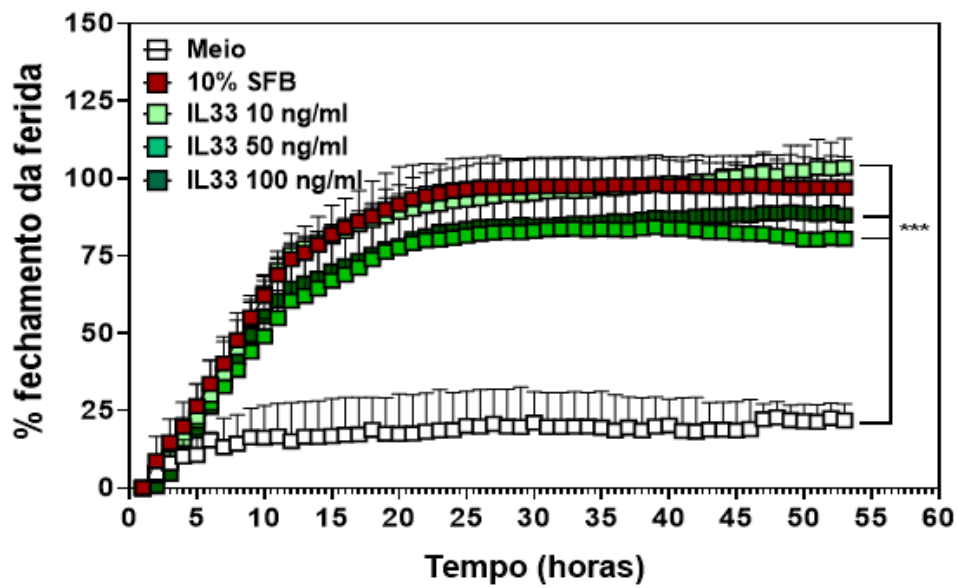
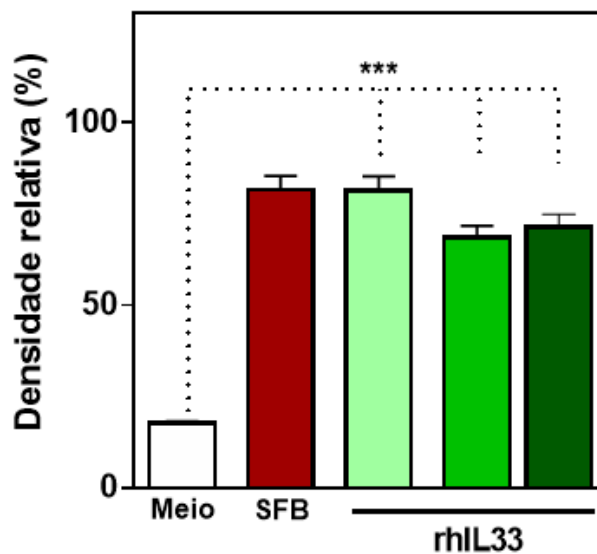
Figura 13. Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral Detroit 562 por PCR em tempo real. As células da linhagem tumoral Detroit foram estimuladas com o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 e o cDNA foi empregado 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. \*\* $p < 0,001$ . Test t.



**Figura 14.** Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral Detroit 562 por PCR em tempo real. As células da linhagem Detroit 562 foram estimuladas com o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2 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. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Test t.



**Figura 15. Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral SCC-25.** Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de fechamento da ferida. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. Em amarelo é representada a ferida e em azul as camadas de confluência a partir das bordas.

**A****B**

**Figura 16. Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33. (A)** O gráfico ilustra a progressão densidade e confluência da ferida durante o período de 55 horas. **(B)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 24h. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$ . One-Way ANOVA.

(10, 50 ou 100ng/ml). Estes resultados acompanhados no gráfico, em tempo real (Figura 16A), evidenciaram que as células da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com as diferentes concentrações de IL-33 apresentaram aumento significativo da motilidade, após 24 horas de cultura, em comparação as células cultivadas na ausência deste estímulo, de maneira dose-depende (Figura 16). De modo relevante, no período superior a 50 horas de cultura, a citocina IL-33 na concentração de 10 ng/ml induziu maior motilidade das células, quando comparado ao controle positivo do ensaio (SBF 10%), atingindo 100% de confluência. Enquanto as outras concentrações de IL-33, no decorrer do experimento, induziram taxas de motilidade semelhantes e confluência superior a 75% (Figura 16) e estes valores foram estatisticamente significantes quando comparado as células cultivadas na presença apenas de meio de cultura (Figura 16).

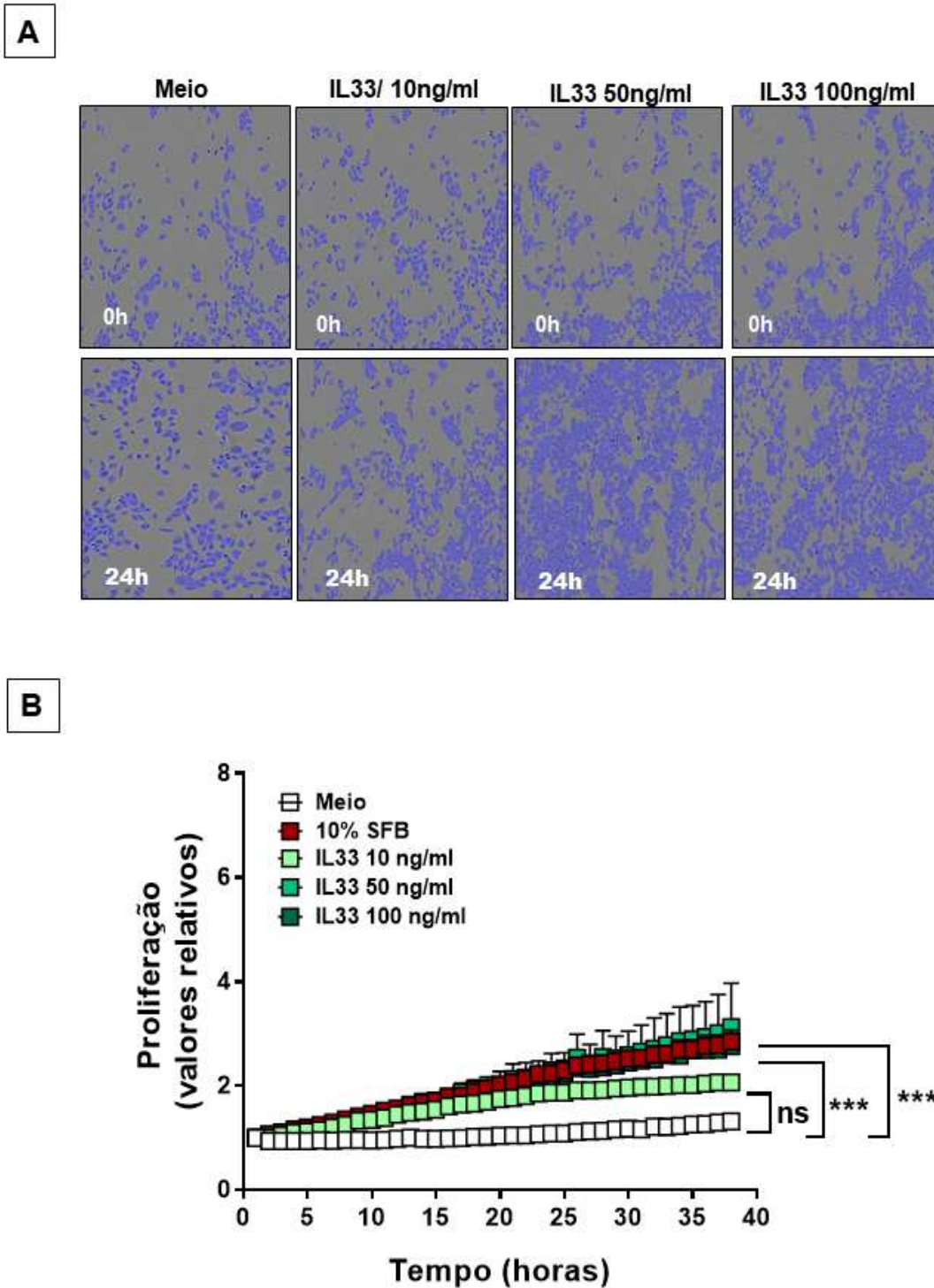
Em seguida, analisamos a influência IL-33 na proliferação de células da linhagem SCC-25 (Figura 17). Os resultados evidenciaram que estas células cultivadas na presença da citocina IL-33, na concentração de 50 e 100ng/mL, apresentaram aumento na taxa de proliferação quando comparado com as células cultivadas na presença de meio somente (Figura 17). Os resultados evidenciaram ainda que as células da linhagem SCC-25 cultivadas na presença IL33 na concentração de 10ng/mL apresentaram taxa de proliferação semelhante ao observado para as células cultivadas na presença apenas do meio de cultura (Figura 17B).

#### **4.8 Células da linhagem tumoral Detroit 562 quando estimuladas com IL-33 apresentaram maior motilidade e atividade proliferativa.**

As imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial demonstram o progresso de fechamento da ferida após a estimulação das células da linhagem tumoral Detroit 562 com IL-33 (10, 50 e 100ng/ml) (Figura 18). Ao analisarmos o efeito de IL-33 na motilidade de células da linhagem Detroit 562, os resultados demonstraram que as células da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com IL-33 apresentaram motilidade progressiva, mas, não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de IL-33 (Figura 19), em comparação as células cultivadas na ausência deste estímulo.

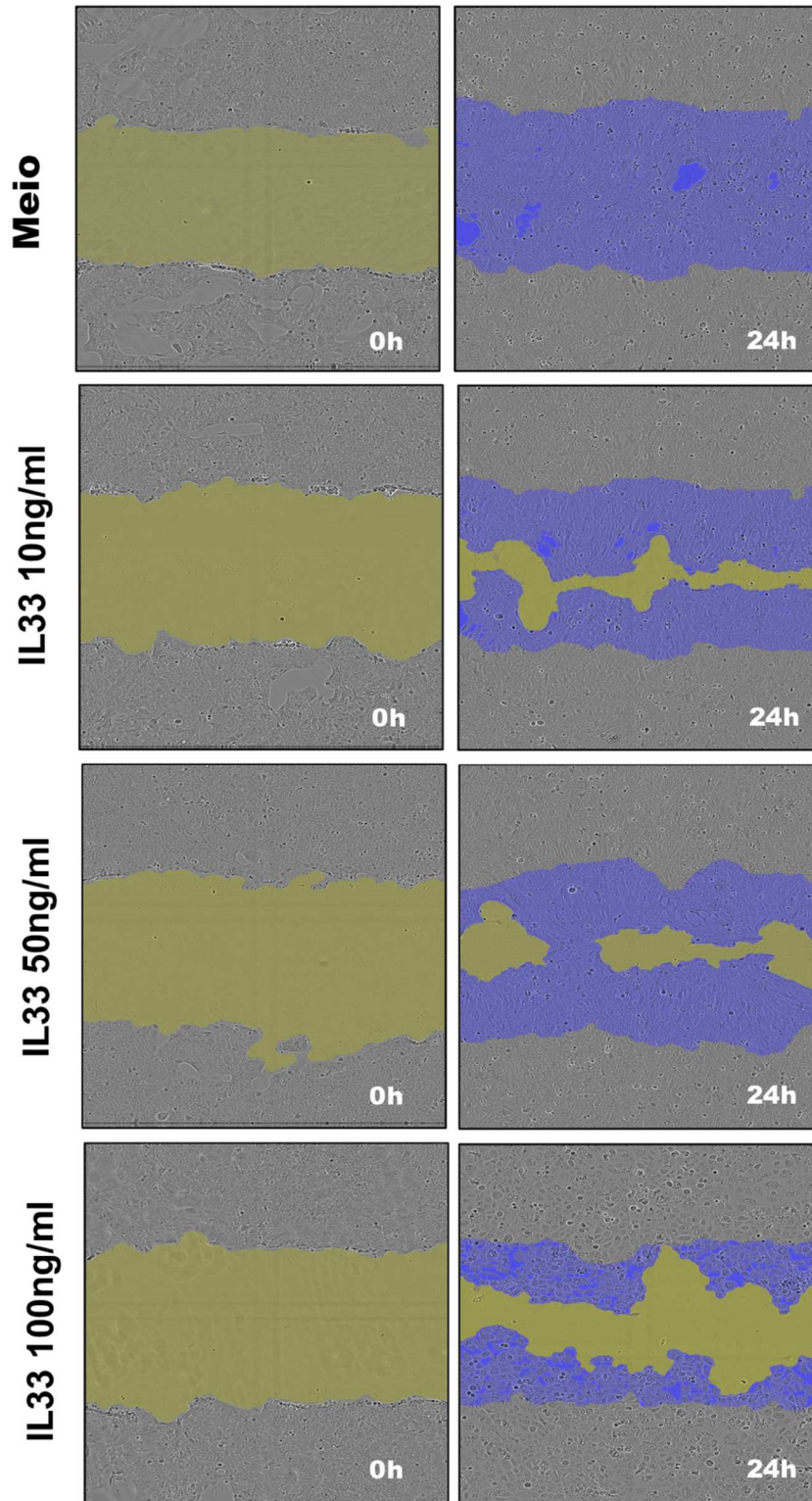
---

---

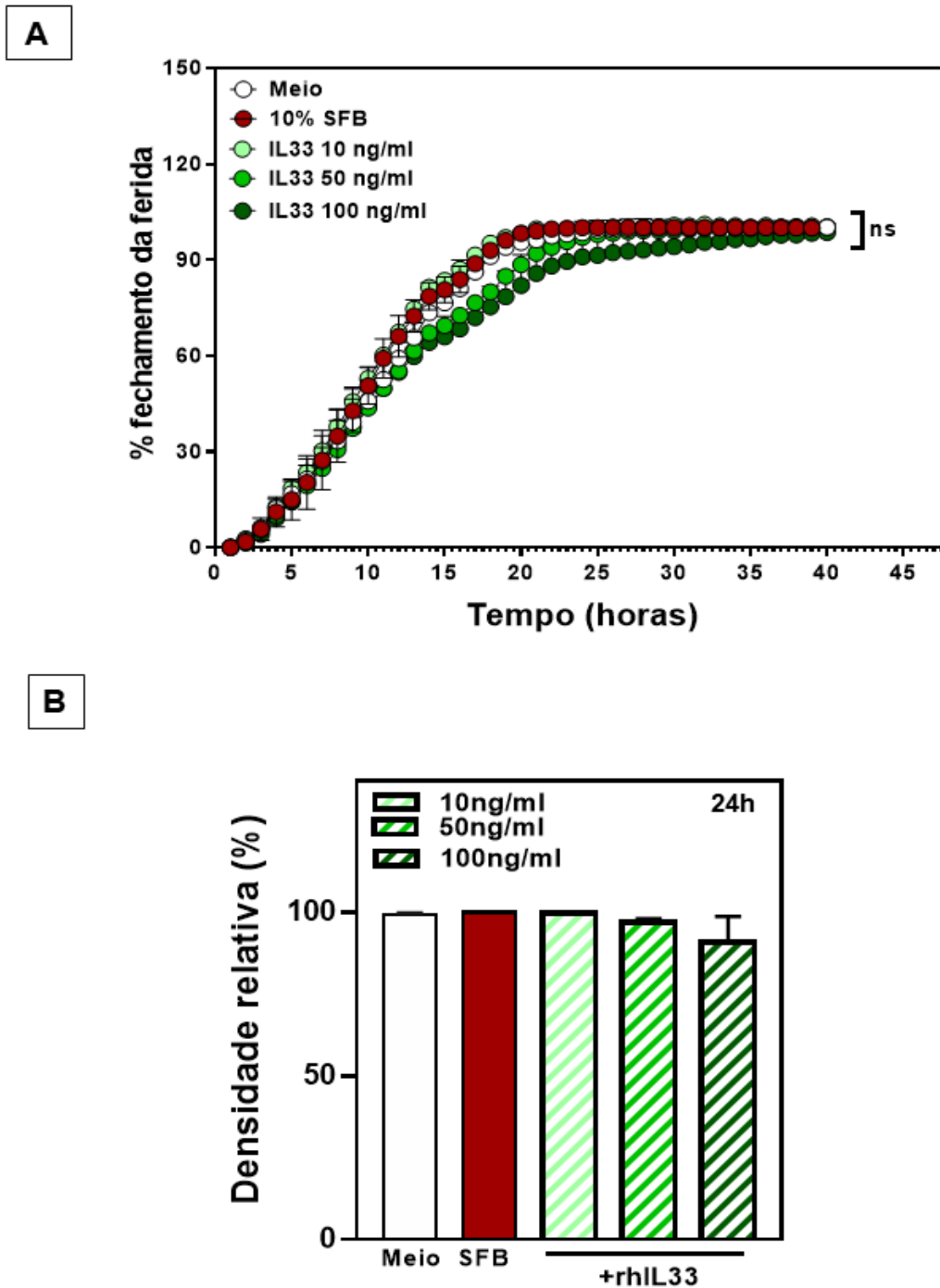


**Figura 17. Resposta proliferativa da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33. (A)** Imagens de microscopia de contraste de fase mostrando a cultura das células SCC-25. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. **(B)** O gráfico ilustra a progressão da resposta proliferativa durante o período de 40 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos. \*\*\* $p < 0,0001$ . One-Way ANOVA.





**Figura 18. Fotomicrografias do ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562.** Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de fechamento da ferida. As imagens foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h de cultivo. Em amarelo é representada a ferida e em azul as camadas de confluência a partir das bordas.



**Figura 19. Ensaio de fechamento de ferida da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33. (A)** O gráfico ilustra a progressão densidade e confluência da ferida durante o período de 45 horas. **(B)** Densidade relativa da confluência da ferida em porcentagem após 24h. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos. One-Way ANOVA.

Posteriormente, analisamos a influência IL-33 na proliferação destas células (Figura 20). Os resultados evidenciaram que as células da linhagem Detroit 562 cultivadas na presença da citocina IL-33, na concentração de 50 e 100ng/ml, apresentaram aumento na taxa de proliferação quando comparado com as células cultivadas na presença de meio ou SBD 10% (Figura 20). Ademais, as células cultivadas na presença IL33 na concentração de 10ng/ml apresentaram taxa de proliferação semelhante ao observado para as células cultivadas com meio de cultura (Figura 20B).

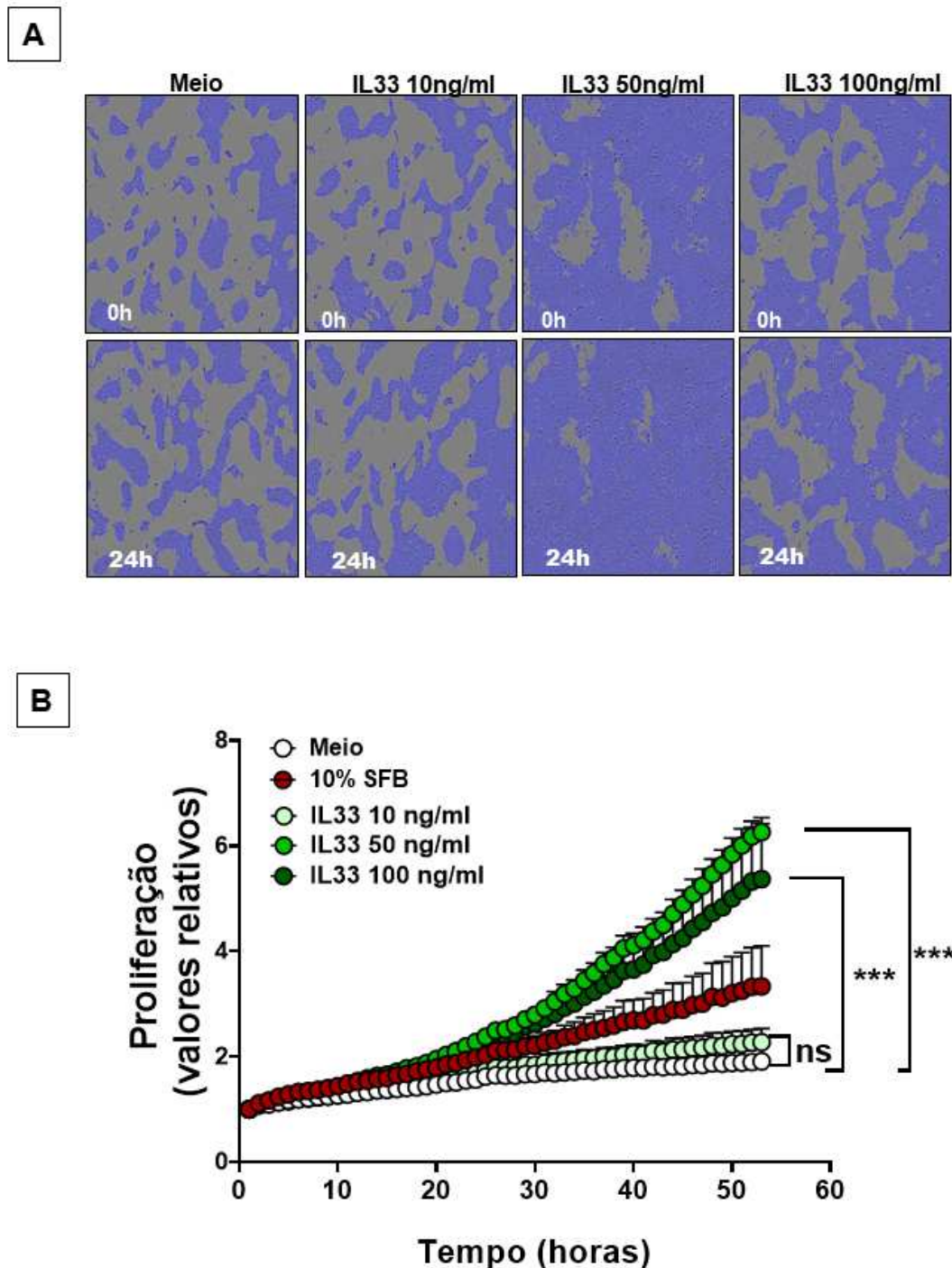
#### **4.9 Invasão/migração, *in vitro*, das células da linhagem tumoral SCC-25 é induzida por IL-33.**

Dados da literatura indica que IL-33 promove a proliferação e invasão de células da linhagem celular de câncer de ovário (TONG; BARBOUR; HOU; GAO *et al.*, 2016). Contudo, o papel de IL33 em mediar a invasão de células da linhagem SCC-25 e Detroit 562 ainda não foi completamente esclarecido. Considerando estes dados, a próxima etapa foi analisar o efeito de IL33 na capacidade de invasão destas duas linhagens celulares (Figura 21).

Os dados apresentados demonstraram que as células da linhagem tumoral SCC-25 estimuladas com a citocina IL-33 apresentaram aumento da capacidade invasiva em comparação com as células cultivadas na presença de meio (Figura 21). Contudo, apenas os resultados obtidos após a exposição à citocina IL-33 na concentração de 100 ng/ml apresentaram diferenças estatísticas significativas. Como comentado previamente, as células da linhagem Detroit 562 não apresentaram capacidade de atravessar a membrana revestida de Matrigel, mesmo após a estimulação com diferentes concentrações da citocina IL-33 (dado não apresentado). Estes dados indicam correlação entre a sinalização mediada pela citocina IL-33 e a capacidade invasiva de células da linhagem SCC-25.

---

---



**Figura 20. Resposta proliferativa da linhagem tumoral Detroit 562 estimuladas com diferentes concentrações da citocina IL-33. (A)** Imagens de microscopia de contraste de fase mostrando a cultura das células Detroit 562. As imagens no quadro superior foram adquiridas em tempo 0h e as do quadro inferior após 24h. **(B)** O gráfico ilustra a progressão da resposta proliferativa durante o período de 60 horas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$ . One-Way ANOVA.

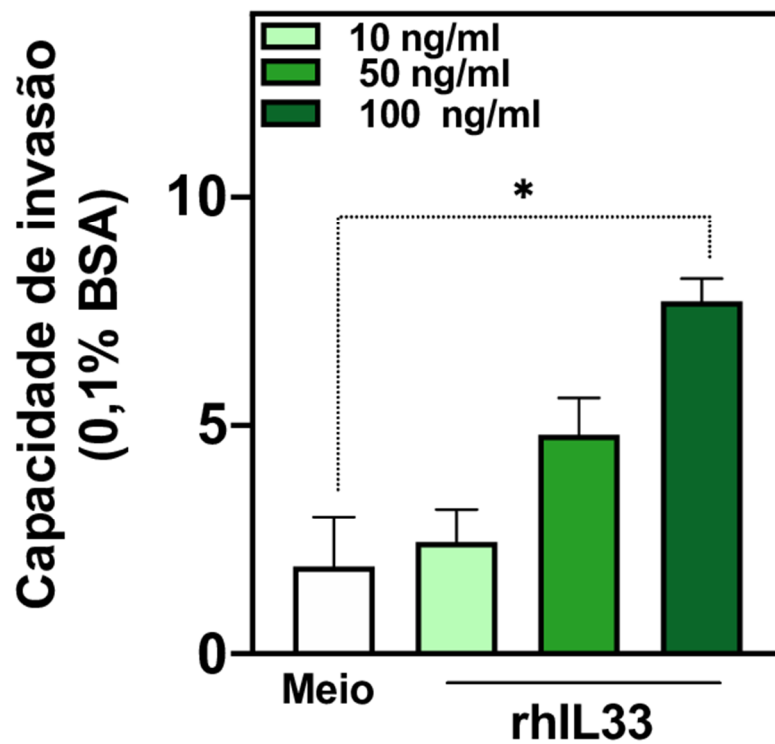


Figura 21. Ensaio de invasão e migração em *transwell* para células da linhagem SCC-25 estimuladas com a citocina IL-33. (A) As barras representam o número de células que atravessaram a membrana. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ . One-Way ANOVA.

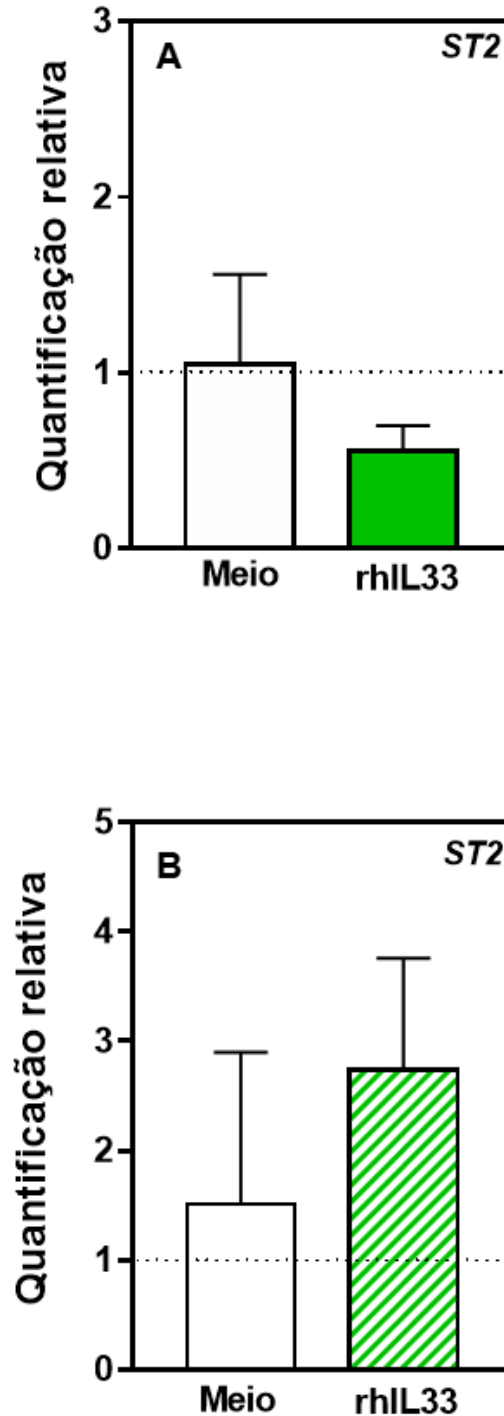
#### **4.10 IL-33 diminuiu a expressão do receptor ST2 na linhagem de células tumorais SCC-25.**

A função biológica da IL-33 depende da expressão do receptor ST2 na membrana das células alvo (KAKKAR; LEE, 2008). Nesse sentido, avaliamos por RT-qPCR a expressão dessa molécula nas células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562. Apesar de não haver diferença estatística significativa, os resultados evidenciaram diminuição na expressão de *ST2* em células da linhagem SCC-25 após estímulo com IL-33 na concentração de 50ng/ml (Figura 22A). Em relação as células da linhagem tumoral Detroit 562, os resultados evidenciaram aumento da expressão de *ST2* após a estimulação com IL-33, apesar de não termos observada diferença estatística significativa (Figura 22B).

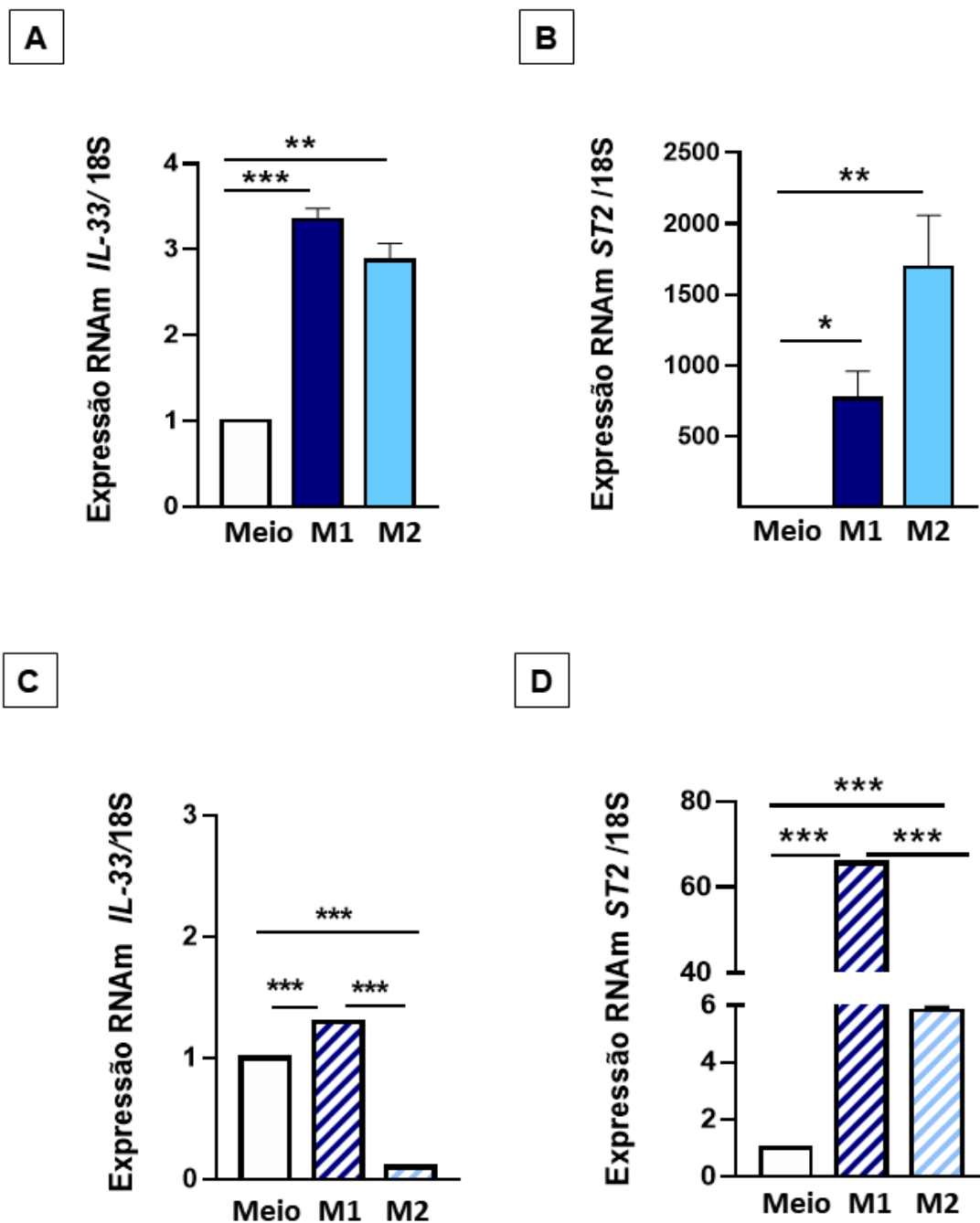
Com o objetivo de verificar se o meio condicionado dos macrófagos M1 e M2 alteraria a expressão do gene *IL-33* e *ST2* nas linhagens tumorais SCC-25 e Detroit 562, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que do meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 induziu aumento da expressão *IL-33* (Figura 23A) e *ST2* (Figura 23B) por células da linhagem SCC-25. Contudo, detectamos diferença estatística significativa apenas para a expressão de *IL-33*. Com relação a estimulação com o meio condicionado de macrófagos M2, encontramos indução da expressão de *IL-33* e *ST2* e esta diferença estatística foi significativa (Figura 23A e 23B).

Ao analisarmos a expressão de *IL33* e *ST2* em células da linhagem Detroit 562, os resultados evidenciaram que o meio condicionado dos macrófagos M1 induziu aumento da expressão destes genes (Figura 23C e 23D), quando comparado as células estimuladas com meio. De modo relevante, o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2 induziu aumento na expressão de *ST2* e diminui a expressão de *IL-33* por células da linhagem Detroit 562, e estes valores apresentaram diferença estatística significativa (Figura 23C e 23D).

---



**Figura 22. Expressão do gene ST2 em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562 por PCR em tempo real.** As células da linhagem tumoral SCC-25 (A) e Detroit 562 (B) foram estimuladas com IL-33 (50ng/mL) e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada tratamento, indicando o valor de mediana. Test t.



**Figura 23.** Expressão dos genes *IL-33* e *ST2* em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562 por PCR em tempo real. As células da linhagem tumoral SCC-25 (A-B) e Detroit 562 (C-D) foram estimuladas com o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 e M2 e o cDNA foi empregado em ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para cada gene mostrado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada tratamento, indicando o valor de mediana. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . M1: meio condicionado da cultura de macrófagos M1; M2: meio condicionado da cultura de macrófagos M2. One-Way ANOVA.



#### **4.11 Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562.**

Por fim, avaliamos o efeito de IL-33 na expressão *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562, por PCR em tempo real.

Os resultados evidenciaram que IL33 induziu aumento a expressão de *NANOG* em células da linhagem tumoral SCC-25, contudo, estes valores não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 24B). De modo contrário, IL33 induziu diminuição estatística significativa da expressão de *MYC* em células da linhagem tumoral SCC-25 (Figura 24C). Os resultados evidenciaram ainda que IL-33 não alterou de forma significativa a expressão dos genes *SOX2* (Figura 24A), *MYCN* (Figura 24D), *SYP* (Figura 24E) *EPCAM* (Figura 24F) *EZH2* (Figura 24G), *CHGA* (Figura 24H), e *AURKA* (Figura 24I).

Em relação os resultados observados para as células da linhagem tumoral Detroit 562, a citocina IL-33 induziu aumento da expressão do gene *NANOG* (Figura 25B) e estes valores não apresentaram diferença estatística significativa. Por outro lado, IL-33 induziu diminuição estatística significativa da expressão dos genes *SOX2* (Figura 25A), *MYC* (Figura 25C), *SYP* (Figura 25E) e *EZH2* (Figura 25G), quando comparado ao meio. Ademais, a estimulação com a citocina IL-33 não alterou de forma significativa a expressão dos genes *MYCN* (Figura 25D), *EPCAM* (Figura 25F), *CHGA* (Figura 25H) e *AURKA* (Figura 25I).

---

---

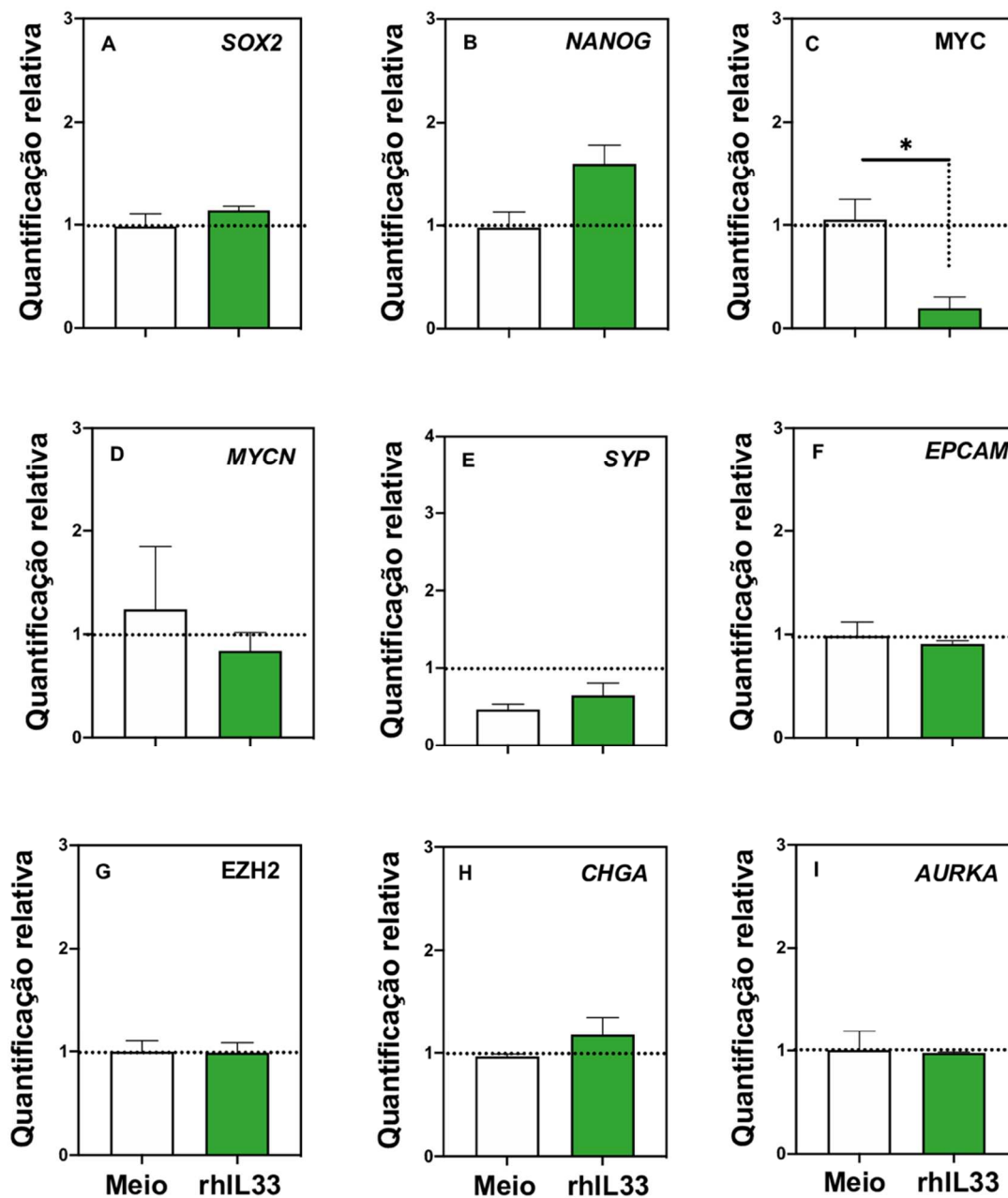


Figura 24. Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25 por PCR em tempo real. As células foram estimuladas com IL-33 e o cDNA foi empregado em ensaios de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para cada gene analisado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada tratamento, indicando o valor de mediana. \* $p < 0,05$ . Test t.

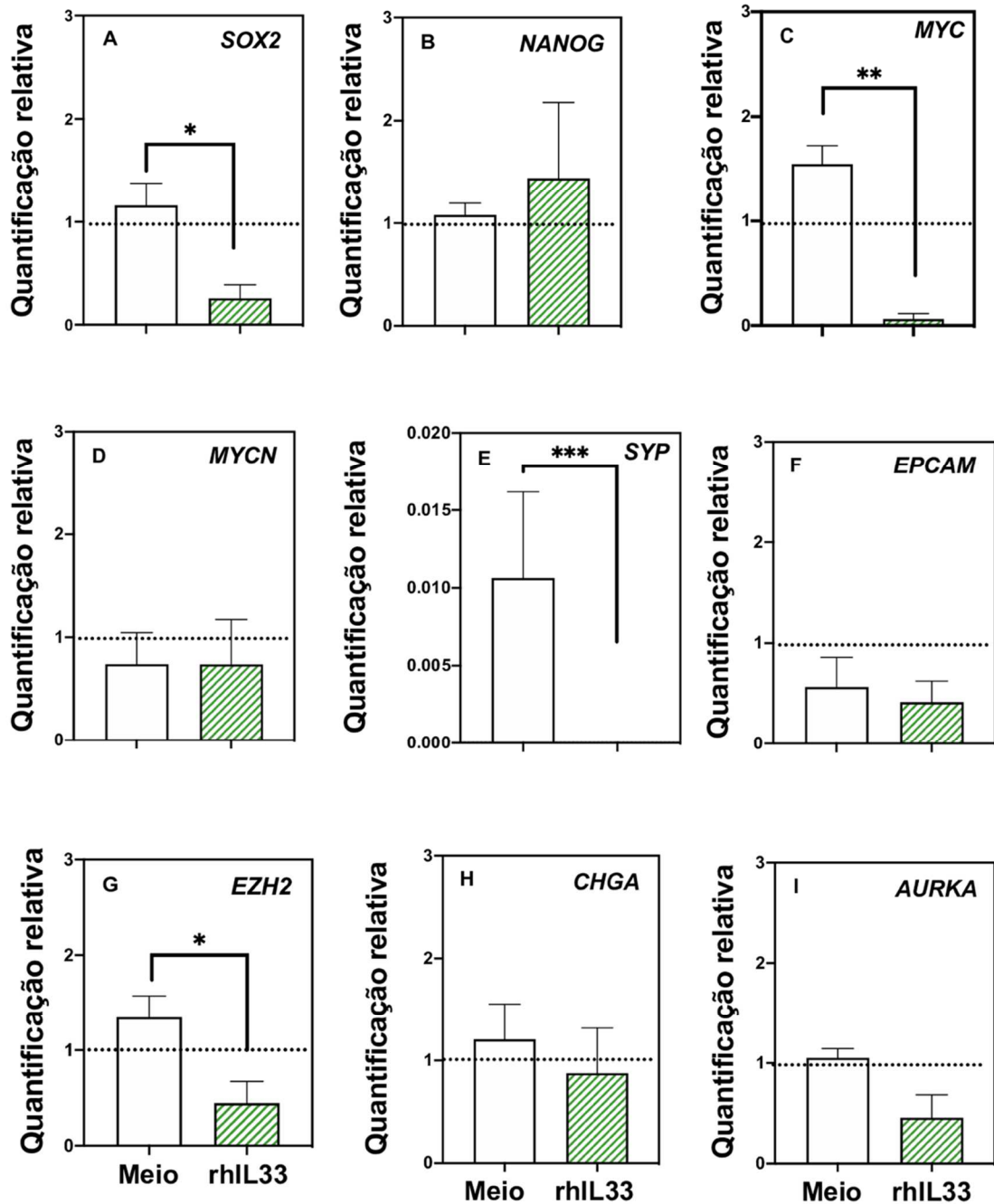


Figura 25. Expressão dos genes *EZH2*, *MYC*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP* em células da linhagem tumoral Detroit 562 por PCR em tempo real. As células foram estimuladas com IL-33 e o cDNA foi empregado em ensaios de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para cada gene analisado. Os valores de expressão de cada gene estão mostrados para cada tratamento, indicando o valor de mediana. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ . Test t.



# **5 DISCUSSÃO**

---

---



## 5 DISCUSSÃO

A presença de células do sistema imune no microambiente tumoral é uma evidência da resposta do hospedeiro contra o tumor. Dentre as células que compõem esse infiltrado inflamatório, os macrófagos são as células predominantes e dados indicam que são um dos componentes mais importantes do microambiente tumoral. Os macrófagos são células do sistema imune inato, dotadas de alta plasticidade e que se diferenciam dos monócitos clássicos circulantes após extravasamento para os tecidos (GORDON; TAYLOR, 2005). Os macrófagos podem detectar e responder a infecções e lesões nos tecidos, desempenhando um papel fundamental na homeostase no reparo e remodelamento tecidual (DENARDO; RUFFELL, 2019; GINHOUX; GUILLIAMS, 2016; LAVIN; MORTHA; RAHMAN; MERAD, 2015; SOLINAS; SCHIAREA; LIGUORI; FABBRI *et al.*, 2010; VAN FURTH; COHN, 1968).

Durante a carcinogênese, os macrófagos com perfil antitumoral exibem a polarização para o fenótipo M1 e desempenham papel relevante na eliminação de células neoplásicas. Devido fatores presentes no microambiente tumoral, os macrófagos associados ao tumor podem adquirir o fenótipo semelhante a M2, ou seja, pro-tumoral (MANTOVANI; MARCHESI; MALESCI; LAGHI *et al.*, 2017). Os macrófagos M2 promovem a progressão tumoral, estimulando a angiogênese e linfangiogênese, a proliferação de células neoplásicas e a transição epitelial-mesenquimal, e dados indicam que essas células poderiam ainda limitar a eficácia das terapias pois induzem um microambiente imunossupressor e promovem a metástase (DENARDO; BRENNAN; REXHEPAJ; RUFFELL *et al.*, 2011; MANTOVANI; MARCHESI; MALESCI; LAGHI *et al.*, 2017; QIAN; ZHANG; LI; HE *et al.*, 2015). Estudos apontam fortemente a intrínseca relação entre macrófagos associados ao tumor e à progressão do câncer em muitos tipos de neoplasias, incluindo câncer de fígado, mama, estômago e pulmão (CHEN; ZHANG; WANG; ZHANG, 2017; KONG; ZHU; XU; ZHANG *et al.*, 2013; YUAN; HSIAO; CHEN; CHEN *et al.*, 2015). Entretanto, poucos dados são encontrados correlacionando macrófagos M1 e M2 e o carcinoma espinocelular. Portanto, no presente trabalho foi avaliado se os fatores derivados de macrófagos poderiam interferir com a atividade de células neoplásicas, especificamente de carcinoma espinocelular. No presente estudo,

---

verificou-se que macrófagos com fenótipo M2 possuem uma maior influência na progressão *in vitro* do carcinoma espinocelular, assim como a citocina IL-33.

Inicialmente analisamos o efeito do meio condicionado da cultura de macrófagos M1, na linhagem de células tumorais SCC-25. Os dados evidenciaram que o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1, promoveram uma diminuição da capacidade migratória e proliferativa nesta linhagem tumoral. De modo similar, estudos demonstraram que o meio condicionado de macrófagos M1 também levou a inibição da proliferação de células da linhagem celular de câncer de cólon, através da indução de apoptose (BUHTOJAROV; SONDEL; WIGGINTON; BUHTOJAROVA *et al.*, 2011; ENGSTRÖM A; ERLANDSSON A; DELBRO D, 2014 ). Em adição, Yuan e colaboradores avaliando o tratamento com o meio condicionado de macrófagos M1, verificaram uma diminuição significativa da viabilidade e proliferação de células de carcinoma pulmonar humano, redução da angiogênese *in vitro* e *in vivo*, bem como a capacidade de invasão. Além disso, relatou fatores como a apoptose e a senescência na contribuição do efeito antitumoral dos macrófagos M1 (YUAN; HSIAO; CHEN; CHEN *et al.*, 2015). Apesar dos importantes achados sobre apoptose e sua contribuição nos efeitos antitumorais de M1, em nosso estudo não analisamos a apoptose das células. Dados da literatura indicam que a linhagem celular SCC-25 apresenta comportamento menos agressivo e sem desenvolvimento de metástases regionais ou distantes (CHEN; LIN; CHIA; LIN *et al.*, 2009). Chen e colaboradores demonstraram que essas células induziram a formação de tumores em camundongos com imunodeficiência combinada grave, mas não em camundongos atímicos (CHEN; LIN; CHIA; LIN *et al.*, 2009). Em nosso estudo, o sobrenadante da cultura de macrófagos M1 estimulou a invasão das células da linhagem tumoral SCC-25. Dados de outros estudos demonstraram que as interações com macrófagos podem aumentar a capacidade de invasão e a atividade de degradação da matriz das células cancerosas (MANTOVANI; SCHIOPPA; PORTA; ALLAVENA *et al.*, 2006). Ademais, o sobrenadante da cultura de macrófagos M1 estimulou a expressão de *IL-33* e seu receptor *ST2*, assim como em genes relacionados à plasticidade tumoral *SOX2*, *NANOG*, *CHGA* e *EPCAM* em células da linhagem tumoral SCC-25. No entanto houve diminuição da expressão de *MYCN*, *AURKA*. A expressão de *SOX2*, *NANOG* e *EPCAM* em células tumorais pode induzir a proliferação, migração e invasão de células tumorais e manter a capacidade de auto renovação das células-tronco tumorais (LIU; LIN; ZHAO; YANG *et al.*, 2013) (GONG; LIAO; GUO; QIN *et al.*, 2012;

---



HU; XU; LIANG; ZHANG *et al.*, 2016; MENG; ZHENG; WANG; LIU *et al.*, 2010; SIU; WONG; KONG; CHAN *et al.*, 2013). A regulação positiva da expressão desses genes como verificado em nossos estudos, tem sido associada à transição epitélio mesenquimal (PATRIARCA; MACCHI; MARSCHNER; MELLSTEDT, 2012). A expressão de *SOX2* é regulada positivamente no HNSCC e está associada ao desenvolvimento, transformação, metástase tumoral e linfonodos (CURTARELLI; GONÇALVES; DOS SANTOS; SAVI *et al.*, 2018). A expressão do gene *CHGA* está relacionado com a diferenciação neuroendócrina e estudos relataram a associação desse gene com mal prognóstico em carcinoma de células escamosas (NISMAN; HECHING; BIRAN; BARAK *et al.*, 2006; REKHTMAN, 2010). Em carcinoma hepatocelular, as células co-cultivadas com macrófagos do fenótipo M1, apresentaram inibição da via de sinalização IL-6/STAT3, ocasionando redução da viabilidade, proliferação, invasão, migração e resistência às drogas (YIN; MA; LIN; LU *et al.*, 2018). Portanto, a ideia de explorar a plasticidade dos macrófagos por meio da reprogramação do seu fenótipo emerge como uma abordagem terapêutica potencial para o tratamento do câncer.

Em relação ao efeito do meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 na linhagem de células tumorais Detroit 562, os nossos resultados demonstraram que este mediou efeitos diversos na linhagem celular Detroit 562. Os resultados mostraram o aumento da motilidade destas células na linhagem celular Detroit 562. No entanto, o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 levou a diminuição da proliferação desta linhagem celular. Ademais, regulou positivamente a expressão do receptor ST2, assim como promoveu aumento da expressão dos genes *EZH2*, *MYCN*, *NANOG*, *SOX2*, *AURKA* e *CHGA*. No entanto o gene *EPCAM*, teve sua expressão reduzida. *EZH2* pode regular a angiogênese tumoral, apoptose, EMT (ZHOU; REN; KONG; CAI *et al.*, 2015), migração e invasão celular (WANG; LIU; CHEN; HUANG *et al.*, 2013). Pouco se sabe sobre o aumento da expressão de *MYCN* no carcinoma espinocelular. Sabe-se que o nível de *MYC* em tecidos de carcinoma epidermóide de esôfago é significativamente maior do que em tecidos não cancerosos (XIN; XIN; SHI; SONG *et al.*, 2018). O gene *AURKA* atua na formação do fuso mitótico e na segregação cromossômica (NIKONOVA; ASTSATUROV; SEREBRIISKII; DUNBRACK *et al.*, 2013). Ademais, a modulação positiva do gene *AURKA* possui efeitos oncogênicos (ZHENG; YUE; LI; HE *et al.*, 2016).

---

Dados da literatura indicam que a presença de macrófagos M2 no microambiente tumoral está relacionado a mal prognóstico em pacientes portadores de glioma, linfoma, carcinoma de células renais e carcinoma espinocelular (HASITA; KOMOHARA; OKABE; MASUDA *et al.*, 2010; KOMOHARA; HASITA; OHNISHI; FUJIWARA *et al.*, 2011; KOMOHARA; OHNISHI; KURATSU; TAKEYA, 2008; NIINO; KOMOHARA; MURAYAMA; AOKI *et al.*, 2010). Assim, também investigamos o efeito do meio condicionado da cultura de macrófagos M2 na linhagem tumoral SCC-25. Os resultados obtidos demonstraram que o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2, promoveu um aumento da motilidade, resposta proliferativa e invasiva, levando a uma progressão do câncer. Estudos *in vitro* em câncer de pulmão mostrou que a infiltração de macrófagos M2 no estroma tumoral estava associado com prognósticos ruins, assim como em amostras de câncer de mama (GWAK; JANG; KIM; SEO *et al.*, 2015; WU; WU; ZHAO; HUANG *et al.*, 2016). Além disso, no microambiente tumoral do carcinoma espinocelular a presença de macrófagos M2 tem sido associado a resultados clínicos desfavoráveis (ALVES; DIEL; LAMERS, 2018).

Nessa mesma linhagem tumoral, foi observado que o meio condicionado da cultura de macrófagos M2 promoveram aumento das expressões dos genes *IL-33* e *ST2*, assim como dos genes *NANOG* e *EPCAM*. Contrariamente, promoveu a diminuição das expressões gênicas de *MYC*, *MYCN*, *AURKA* e *CHGA* quando comparada ao controle. *MYC* contribui para a promoção da proliferação descontrolada e exerce efeitos na adesão celular, metabolismo, angiogênese e instabilidade genômica (EISENMAN, 2001). O meio condicionado da cultura dos macrófagos M2, influenciou regulação negativa na expressão de *MYC* nas células tumorais, levando ao acúmulo das células na fase G0/G1 do ciclo celular e interrompendo seu crescimento com consequente apoptose (HOFFMAN; LIEBERMANN, 2008). Na linhagem tumoral Detroit 562, verificamos diminuição da motilidade destas células tumorais após o estímulo do meio condicionado de macrófagos M2. No entanto, o contrário foi verificado em relação à proliferação celular, uma vez que meio condicionado da cultura dos macrófagos M2 estimulou a proliferação destas células. Isso indica que a competência funcional dos macrófagos varia dependendo do tipo de tumores e seus respectivos microambientes.

Estudos mostraram que o meio condicionado coletado de macrófagos M2 promoveu a mobilidade, migração e invasão de células de câncer colorretal com a ajuda de exossomos derivados de macrófagos M2 (LAN; SUN; XU; LIU *et al.*, 2019).

---

Ademais, Hagemann e colaboradores em seus estudos verificaram que o co-cultivo com macrófagos aumentam a capacidade de invasão de células cancerosas de mama fracamente invasivas devido à regulação positiva dependente de TNF- $\alpha$  de metaloproteases de matriz (HAGEMANN; ROBINSON; SCHULZ; TRÜMPER *et al.*, 2004). Outros achados da literatura mostraram que, o meio condicionado de macrófagos M2 induz EMT e aumenta drasticamente a capacidade de migração e invasão no HNSCC, o que revela que a alteração secretora específica após a polarização M2 de macrófagos pode contribuir para a metástase do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (MENG; LI; LI; GAO *et al.*, 2015).

Diminuição da expressão de IL-33 foram observadas. O meio condicionado dos macrófagos M2 modulou a expressão de IL-33 nas células tumorais Detroit 562, sugerindo diminuição dos efeitos pró-tumorais. Estudos mostraram que a expressão diminuída da IL-33 no câncer colorretal, tem relação com características protetoras (LARSEN; MINAYA; VAISH; PEÑA, 2018). No entanto, outros estudos reportaram uma maior expressão gênica de IL-33 em tecidos de glioma e glioblastoma do que em tecido cerebral normal, se correlaciona com menor sobrevida global e livre de progressão e sobrevida global que indivíduos que apresentam mesmo tumor com baixa expressão dessa citocina (ZHANG; WANG; JI; DING *et al.*, 2017).

Observou-se também a diminuição da expressão dos genes *MYCN*, *CHGA*, *EPCAM* e *SYP*. Por outro lado, verificamos aumento das expressões gênicas de *EZH2*, *NANOG*, *AURKA*, quando comparados ao controle. Pouco se sabe sobre a expressão da Sinaptofisina (*SYP*) no carcinoma espinocelular. A baixa expressão do gene *SYP* pode indicar certa propensão à especialização neuroendócrina dentro da capacidade de diferenciação pluripotente dessas células. Essa diversidade está bem dentro do espectro de diferenciação de muitas células-tronco e tumores, especialmente aqueles de origem epitelial (LEUBE, 1994). Em nossos estudos, a diminuição da expressão do gene *SYP*, após estimulação com o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2, pode indicar certa propensão à especialização neuroendócrina dentro da capacidade de diferenciação pluripotente das células Detroit 562. Os genes *MYC* e *SOX2* não apresentaram expressões gênicas significativas, após estímulo com o meio condicionado dos macrófagos M2 na linhagem tumoral Detroit 562. De fato, o resultado do nosso estudo sugere que o meio condicionado da cultura dos macrófagos M2, influencia a motilidade, proliferação e invasão das células de carcinoma espinocelular.

---

IL-33 tem sido correlacionada com a progressão de vários tipos de neoplasias e associada com baixa sobrevida de pacientes (HATZIOANNOU; BANOS; SAKELAROPOULOS; FEDONIDIS *et al.*, 2020). A próxima etapa do nosso estudo foi avaliar os efeitos de IL-33 em influenciar a atividade de células tumorais *in vitro*. Sabe-se que o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço abrange tumores de diferentes locais, e que nestes tecidos podem ser observadas diferenças quanto à expressão de citocinas. Amostras tumorais de pacientes com carcinoma de células escamosas da laringe, apresentaram uma alta expressão de IL-33, sendo um fator de prognóstico desfavorável. Já em pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe, verificou-se que o nível de expressão de IL-33 não teve valor prognóstico. Por outro lado, em amostras tumorais de pacientes com carcinoma espinocelular da cavidade oral, a alta expressão de IL-33, sugeria estar associado a uma maior sobrevida (PENG; SUN; CHEN; WEN, 2020). De modo relevante, dados da literatura indicam que em macrófagos, IL-33 desempenha papel na polarização para macrófagos M2 alternativamente ativados (HE; YIN; YUAN; LIU *et al.*, 2017; KUROWSKA-STOLARSKA; STOLARSKI; KEWIN; MURPHY *et al.*, 2009). Ademais, dados da literatura indicam que IL-33 regula a invasividade da linhagem tumoral celular FADU, uma linhagem celular de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CHEN; NIEH; JAO; WU *et al.*, 2013), mas não há dados disponíveis sobre o efeito desta citocina no comportamento de células da linhagem tumoral SCC25.

Em nossos estudos, os resultados demonstraram que a IL-33 promove a proliferação, migração e invasão das células SCC-25. Ademais, não observamos, nesta linhagem tumoral, significância estatística em relação ao estímulo com IL-33 nas expressões de *ST2*, contudo, observamos aumento dos genes relacionados a plasticidade tumoral, *SOX2*, *NANOG*, *CHGA*. Por outro lado, os genes *MYC*, *MYCN*, *SYP*, *EPCAM* e *AURKA* quando estimulados com IL-33 apresentaram diminuição de suas expressões gênicas.

Estudos demonstraram que o tratamento com IL-33 recombinante induziu o fenótipo EMT e a expressão gênica de certos fatores, incluindo CXCR4 e IGF-1, que são conhecidos por estarem envolvidos na indução de EMT via efetores PI3K-Akt a jusante em carcinomas de células escamosas orais (CHEN; NIEH; JAO; WU *et al.*, 2013). Trabalhos provaram com sucesso que a IL-33 facilita consideravelmente a expressão do aumento de MMP2 e MMP9 através da via de sinalização AKT, exacerbando a progressão do câncer de pulmão (YANG; GAO; WANG; XU *et al.*,

---

2018). Além disso, IL-33 acelera o desenvolvimento e metástase do câncer de ovário por meio da modulação da ativação das vias de sinalização JNK e ERK (TONG; BARBOUR; HOU; GAO *et al.*, 2016). Dados mostraram que IL-33 facilita a transformação de células epiteliais e a tumorigênese por meio da via de sinalização IL-33/ST2/COT (*Cancer Osaka thyroid*) no câncer de mama (KIM; LIM; KIM; YUN *et al.*, 2015). Contudo, estudos sugeriram que IL-33 poderia conter o desenvolvimento de câncer de pulmão por indução de IFN- $\gamma$  e células TCD8<sup>+</sup>, células NK, eosinófilos e recrutamento de células dendríticas (DOMINGUEZ; YE; GENG; CHEN *et al.*, 2017). Os mecanismos moleculares subjacentes à indução de EMT mediada por IL-33 via MAPKs, NF- $\kappa$ B e JNK-cJun, precisam, no entanto, ser dissecados em estudos adicionais.

Estudos *in vitro* observaram que IL33 desempenha papel importante em contribuir para a invasão da linhagem FADU, um tipo de linhagem de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CHEN; NIEH; JAO; WU *et al.*, 2013), e dados de estudos clínicos indicam que a citocina IL33 está associada a mal prognóstico (ISHIKAWA; YAGI-NAKANISHI; NAKANISHI; KONDO *et al.*, 2014). Mostramos através de nossos dados, que a estimulação das células tumorais com IL-33 aumentou significativamente a migração e proliferação das células da linha celular Detroit 562. A sinalização via IL-33 regulou positivamente a ativação das células Detroit 562. Dados da literatura indicam que IL-33 promove a migração e invasão de células neoplásicas de tumores gástricos (YU; HU; SHEN; DONG *et al.*, 2015). Zhang e colaboradores demonstraram que IL-33 promoveu a migração e invasão de células de glioma (ZHANG; WANG; YAN; LI *et al.*, 2017). Por outro lado, a eliminação do ST2 minimizou esse efeito, concluindo que o ST2 tem um papel importante no desenvolvimento do câncer (CUI; YUAN; LI; GOLL *et al.*, 2020). Em nosso estudo, a expressão de *IL-33* e *ST2* em células da linhagem Detroit 562 não foi alterada após a estimulação com IL-33. Outros estudos observaram que essa citocina inflamatória desempenha um papel importante em contribuir para a invasão do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CHEN; NIEH; JAO; WU *et al.*, 2013), e está associada a um prognóstico mal prognóstico (ISHIKAWA; YAGI-NAKANISHI; NAKANISHI; KONDO *et al.*, 2014). Compreender as características imunológicas dos tecidos tumorais é uma ferramenta essencial na projeção das abordagens imunoterapêuticas.

---

As análises mostraram aumento da expressão do gene *NANOG* e uma diminuição significativa do gene *SOX2* e *SYP*. A regulação positiva da expressão gênica de *NANOG* está ligada a tumorigenicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, enquanto que a diminuição da expressão do gene *SOX2* está relacionada com inibições de migrações celulares e a diminuição da expressão do gene *SYP* se relaciona com uma certa propensão para a especialização neuroendócrina dentro da capacidade de diferenciação pluripotencial do espectro de células tronco e tumores, especialmente de origem epitelial, no entanto, muito pouco se sabe sobre a expressão de *SYP* no carcinoma espinocelular (GONG; LI; JETER; FAN *et al.*, 2015; LEUBE, 1994; XIANG; LIAO; CHENG; ZHOU *et al.*, 2011). Estudos correlacionaram a elevada expressão de *NANOG* com mau prognóstico em vários tipos de câncer como por exemplo em carcinoma espinocelular oral, mama entre outros (NAGATA; SHIMADA; SEKINE; MORIYAMA *et al.*, 2017; ZHAO; LIU; CHEN; FANG *et al.*, 2018), por outro lado, sua regulação negativa induz diferenciação de células tronco (DARR; MAYSHAR; BENVENISTY, 2006). A associação da expressão de *SOX2* com a progressão de várias células cancerosas foi relatada (HERREROS-VILLANUEVA; ZHANG; KOENIG; ABEL *et al.*, 2013; LIU; YANG; XU; LIU *et al.*, 2014), mas o papel de *SOX2* nesses cânceres permanece controverso. Estudos relataram que *SOX2* promove a migração e invasão de células cancerosas da laringe por indução de MMP2 via PI3K/AKT alvo mecânico da via da rapamicina (YANG; HUI; WANG; YANG *et al.*, 2014). Por outro lado, outros estudos indicaram que o aumento da expressão de *SOX2* está associada a uma melhor sobrevida global em pacientes com câncer de pulmão de células escamosas tratados com radioterapia adjuvante (HUSSENET; DALI; EXINGER; MONGA *et al.*, 2010; YOON; PARK; LEE; KEUM *et al.*, 2016).

Assim sendo, os achados laboratoriais do presente estudo, indicaram que tanto o meio condicionado da cultura dos macrófagos M1 e M2 quanto a ativação do IL-33/ST2 "*pathway*" possuem ter uma influência direta na progressão tumoral. Porém, para se entender o real significado dessa intrínseca relação, estudos adicionais dever ser realizados. Enfoques em estratégias terapêuticas para combater o câncer devem incorporar abordagens baseadas na atração e polarização de macrófagos M1, bloqueio de suas funções efetoras pró-tumorais, bem como na reprogramação de macrófagos M2 para a forma M1, assim como terapias anti-IL-33 para um melhor prognóstico dos portadores de tumores.

---

## **6 CONCLUSÃO**

---

---





## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que:

- O meio condicionado de macrófagos M1 promoveu a diminuição da migração e proliferação das células da linhagem tumoral SCC-25, *in vitro*, assim como a diminuição da expressão dos genes *MYC*, *MYCN* e *SYP*. Este mesmo estímulo induziu à invasão das células da linhagem tumoral SCC-25, *in vitro*, assim como o aumento da expressão de *SOX2*, *CHGA*, *EPCAM*, *IL-33* e *ST2*.
  - Em células da linhagem tumoral Detroit 562, o meio condicionado de macrófagos M1 promoveu a diminuição da proliferação e expressão de *MYC*. Por outro lado, este estímulo promoveu o aumento da migração destas células, assim como da expressão dos genes *IL-33* e *ST2*.
  - O meio condicionado de macrófagos M2 promoveu a diminuição da expressão dos genes *MYC*, *AURKA*, *SYP* em células da linhagem tumoral SCC-25, *in vitro*. Este mesmo estímulo induziu aumento nas taxas de migração, proliferação e invasão destas células, além de induzir a expressão de *SOX2*, *NANOG*, *CHGA*, *EPCAM*, *IL-33* e *ST2*.
  - Em células da linhagem tumoral Detroit 562, o meio condicionado de macrófagos M2 promoveu diminuição da migração e proliferação das células da linhagem tumoral Detroit 562, *in vitro*, assim como a diminuição da expressão dos genes *MYC*, *SOX2* e *IL-33*. Por outro lado, promove o aumento da expressão do gene *ST2*.
  - O estímulo com diferentes concentrações de *IL-33* induziu o aumento da migração, proliferação e invasão das células da linhagem tumoral SCC-25, *in vitro*. Por outro lado, diminuiu a expressão dos genes *ST2* e *MYC*.
- 
-

- Em células da linhagem tumoral Detroit 562, o estímulo com IL-33 induziu aumento da migração e proliferação destas células, assim como aumento da expressão de *ST2*. Ao mesmo tempo que induziu a diminuição da expressão dos genes *MYC*, *SOX2*, *SYP* e *EZH2*.

## **REFERÊNCIAS**

---

---

---

---



**REFERÊNCIAS**

- ADAMS, S.; GRAY, R. J.; DEMARIA, S.; GOLDSTEIN, L. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. **J Clin Oncol**, 32, n. 27, p. 2959-2966, Sep 2014.
- AFFERNI, C.; BUCCIONE, C.; ANDREONE, S.; GALDIERO, M. R. *et al.* The Pleiotropic Immunomodulatory Functions of IL-33 and Its Implications in Tumor Immunity. **Front Immunol**, 9, p. 2601, 2018.
- AKAMATSU, S.; INOUE, T.; OGAWA, O.; GLEAVE, M. E. Clinical and molecular features of treatment-related neuroendocrine prostate cancer. **Int J Urol**, 25, n. 4, p. 345-351, 04 2018.
- AKKAYA, B.; OYA, Y.; AKKAYA, M.; AL SOUZ, J. *et al.* Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. **Nat Immunol**, 20, n. 2, p. 218-231, 02 2019.
- ALAMOUD, K. A.; KUKURUZINSKA, M. A. Emerging insights into Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in head and neck cancer. *J. Dent. Res.* 67: 665–673 p. 2018.
- ALBINI, A.; BRUNO, A.; NOONAN, D. M.; MORTARA, L. Contribution to Tumor Angiogenesis From Innate Immune Cells Within the Tumor Microenvironment: Implications for Immunotherapy. **Front Immunol**, 9, p. 527, 2018.
- ALMATROODI, S. A.; MCDONALD, C. F.; DARBY, I. A.; POUNIOTIS, D. S. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC. **Cancer Microenviron**, 9, n. 1, p. 1-11, Apr 2016.
- ALVES, A. M.; DIEL, L. F.; LAMERS, M. L. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **J Oral Pathol Med**, 47, n. 5, p. 460-467, May 2018.
- AMÔR, N. G.; DE OLIVEIRA, C. E.; GASPAROTO, T. H.; VILAS BOAS, V. 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**, 9, n. 56, p. 30894-30904, Jul 2018.
- ANDERSSON, P.; YANG, Y.; HOSAKA, K.; ZHANG, Y. *et al.* Molecular mechanisms of IL-33-mediated stromal interactions in cancer metastasis. **JCI Insight**, 3, n. 20, 10 2018.
- ANDREWS, D. M.; SULLIVAN, L. C.; BASCHUK, N.; CHAN, C. J. *et al.* Recognition of the nonclassical MHC class I molecule H2-M3 by the receptor Ly49A regulates the licensing and activation of NK cells. **Nat Immunol**, 13, n. 12, p. 1171-1177, Dec 2012.
- 
-

ANGELL, H.; GALON, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. **Curr Opin Immunol**, 25, n. 2, p. 261-267, Apr 2013.

ARNOLD, I. C.; ARTOLA-BORÁN, M.; TALLÓN DE LARA, P.; KYBURZ, A. *et al.* Eosinophils suppress Th1 responses and restrict bacterially induced gastrointestinal inflammation. **J Exp Med**, 215, n. 8, p. 2055-2072, 08 2018.

ARVANITIS, C.; FELSHER, D. W. Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. **Semin Cancer Biol**, 16, n. 4, p. 313-317, Aug 2006.

BACHMANN, I. M.; HALVORSEN, O. J.; COLLETT, K.; STEFANSSON, I. M. *et al.* EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. **J Clin Oncol**, 24, n. 2, p. 268-273, Jan 2006.

BAILEY, S. R.; NELSON, M. H.; HIMES, R. A.; LI, Z. *et al.* Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Front Immunol**, 5, p. 276, 2014.

BALERMPAS, P.; MICHEL, Y.; WAGENBLAST, J.; SEITZ, O. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. **Br J Cancer**, 110, n. 2, p. 501-509, Jan 2014.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, 22, n. 1, p. 33-40, Feb 2012.

BANDOLA-SIMON, J.; ROCHE, P. A. Dysfunction of antigen processing and presentation by dendritic cells in cancer. **Mol Immunol**, 113, p. 31-37, 09 2019.

BAO, K.; REINHARDT, R. L. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. **Cytokine**, 75, n. 1, p. 25-37, Sep 2015.

BARAM, D.; VADAY, G. G.; SALAMON, P.; DRUCKER, I. *et al.* Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. **J Immunol**, 167, n. 7, p. 4008-4016, Oct 2001.

BECK, A. H.; ESPINOSA, I.; EDRIS, B.; LI, R. *et al.* The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, 15, n. 3, p. 778-787, Feb 2009.

BELGIOVINE, C.; D'INCALCI, M.; ALLAVENA, P.; FRAPOLLI, R. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. **Cell Mol Life Sci**, 73, n. 13, p. 2411-2424, Jul 2016.

BERNSMEIER, C.; VAN DER MERWE, S.; PÉRIANIN, A. Innate immune cells in cirrhosis. **J Hepatol**, 73, n. 1, p. 186-201, 07 2020.

---

---

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, 11, n. 10, p. 889-896, Oct 2010.

BLOT, W. J.; MCLAUGHLIN, J. K.; WINN, D. M.; AUSTIN, D. F. *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, 48, n. 11, p. 3282-3287, Jun 1988.

BONDE, A. K.; TISCHLER, V.; KUMAR, S.; SOLTERMANN, A. *et al.* Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. **BMC Cancer**, 12, p. 35, Jan 2012.

BRACKEN, A. P.; PASINI, D.; CAPRA, M.; PROSPERINI, E. *et al.* EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. **EMBO J**, 22, n. 20, p. 5323-5335, Oct 2003.

BRAY, F. E. A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.** 68 , 394–424 2018.

BRODERS, A. C. SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE LIP: A STUDY OF FIVE HUNDRED AND THIRTY-SEVEN CASES. **Journal of the American Medical Association**, 74, p. 656-664, 1920.

BROČIĆ, M.; KOZOMARA, R.; CERVIĆ, S.; JOVIĆ, N. *et al.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in patients with carcinoma of the mouth floor and tongue. **Vojnosanit Pregl**, 66, n. 6, p. 440-448, Jun 2009.

BRUNS, H.; BÜTTNER, M.; FABRI, M.; MOUGIAKAKOS, D. *et al.* Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. **Sci Transl Med**, 7, n. 282, p. 282ra247, Apr 2015.

BUHTOJAROV, I. N.; SONDEL, P. M.; WIGGINTON, J. M.; BUHTOJAROVA, T. N. *et al.* Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. **Immunology**, 132, n. 2, p. 226-239, Feb 2011.

BURRELL, R. A.; SWANTON, C. Re-Evaluating Clonal Dominance in Cancer Evolution. **Trends Cancer**, 2, n. 5, p. 263-276, 05 2016.

BUSSU, F.; GRAZIANI, C.; GALLUS, R.; CITTADINI, A. *et al.* IFN- $\gamma$  and other serum cytokines in head and neck squamous cell carcinomas. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, 38, n. 2, p. 94-102, Apr 2018.

CAMPBELL, M. J.; TONLAAR, N. Y.; GARWOOD, E. R.; HUO, D. *et al.* Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. **Breast Cancer Res Treat**, 128, n. 3, p. 703-711, Aug 2011.

---

---

CANNING, M.; GUO, G.; YU, M.; MYINT, C. *et al.* Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. **Front Cell Dev Biol**, 7, p. 52, 2019.

CAO, W.; FENG, Z.; CUI, Z.; ZHANG, C. *et al.* Up-regulation of enhancer of zeste homolog 2 is associated positively with cyclin D1 overexpression and poor clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer**, 118, n. 11, p. 2858-2871, Jun 2012.

CAO, W.; RIBEIRO, R. E. O.; LIU, D.; SAINTIGNY, P. *et al.* EZH2 promotes malignant behaviors via cell cycle dysregulation and its mRNA level associates with prognosis of patient with non-small cell lung cancer. **PLoS One**, 7, n. 12, p. e52984, 2012.

CAO, Y.; ZHONG, W.; SUN, Y. Improvement of antiangiogenic cancer therapy by understanding the mechanisms of angiogenic factor interplay and drug resistance. **Semin Cancer Biol**, 19, n. 5, p. 338-343, Oct 2009.

CARTER, D. R.; SUTTON, S. K.; PAJIC, M.; MURRAY, J. *et al.* Glutathione biosynthesis is upregulated at the initiation of MYCN-driven neuroblastoma tumorigenesis. **Mol Oncol**, 10, n. 6, p. 866-878, 06 2016.

CASTELLSAGUÉ, X.; ALEMANY, L.; QUER, M.; HALEC, G. *et al.* HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. **J Natl Cancer Inst**, 108, n. 6, p. djv403, Jun 2016.

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 2, p. 112-123, Feb 2016.

CHAFFER, C. L.; THOMPSON, E. W.; WILLIAMS, E. D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. **Cells Tissues Organs**, 185, n. 1-3, p. 7-19, 2007.

CHANAT, E.; HUTTNER, W. B. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. **J Cell Biol**, 115, n. 6, p. 1505-1519, Dec 1991.

CHANG, B.; PARK, M. J.; CHOI, S. I.; IN, K. H. *et al.* NANOG as an adverse predictive marker in advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. **Onco Targets Ther**, 10, p. 4625-4633, 2017.

CHANG, K. P.; KAO, H. K.; LIANG, Y.; CHENG, M. H. *et al.* Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. **Ann Surg Oncol**, 17, n. 7, p. 1945-1956, Jul 2010.

CHASE, A.; CROSS, N. C. Aberrations of EZH2 in cancer. **Clin Cancer Res**, 17, n. 9, p. 2613-2618, May 2011.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M.; HERNANDEZ, B. Y. *et al.* Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol**, 29, n. 32, p. 4294-4301, Nov 2011.

---

---



CHEN, L.; DIAO, L.; YANG, Y.; YI, X. *et al.* CD38-Mediated Immunosuppression as a Mechanism of Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Blockade. **Cancer Discov**, 8, n. 9, p. 1156-1175, 09 2018.

CHEN, S. F.; NIEH, S.; JAO, S. W.; WU, M. Z. *et al.* The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. **J Pathol**, 231, n. 2, p. 180-189, Oct 2013.

CHEN, W. Y.; WU, Y. H.; TSAI, T. H.; LI, R. F. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells contribute to IL-33-mediated alleviation of cardiac fibrosis. **Theranostics**, 11, n. 6, p. 2594-2611, 2021.

CHEN, Y.; HUANG, Y.; ZHU, L.; CHEN, M. *et al.* SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, 142, n. 6, p. 1221-1230, Jun 2016.

CHEN, Y.; SHI, L.; ZHANG, L.; LI, R. *et al.* The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. **J Biol Chem**, 283, n. 26, p. 17969-17978, Jun 2008.

CHEN, Y.; ZHANG, S.; WANG, Q.; ZHANG, X. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. **J Hematol Oncol**, 10, n. 1, p. 36, 02 2017.

CHEN, Y. W.; LIN, G. J.; CHIA, W. T.; LIN, C. K. *et al.* Triptolide exerts anti-tumor effect on oral cancer and KB cells in vitro and in vivo. **Oral Oncol**, 45, n. 7, p. 562-568, Jul 2009.

CHO, Y. A.; YOON, H. J.; LEE, J. I.; HONG, S. P. *et al.* Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, 47, n. 12, p. 1148-1153, Dec 2011.

CONTEDUCA, V.; BURGIO, S. L.; MENNA, C.; CARRETTA, E. *et al.* Chromogranin A is a potential prognostic marker in prostate cancer patients treated with enzalutamide. **Prostate**, 74, n. 16, p. 1691-1696, Dec 2014.

CORTI, A. Chromogranin A and the tumor microenvironment. **Cell Mol Neurobiol**, 30, n. 8, p. 1163-1170, Nov 2010.

CRISTINA, V.; HERRERA-GÓMEZ, R. G.; SZTURZ, P.; ESPELI, V. *et al.* Immunotherapies and Future Combination Strategies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Int J Mol Sci**, 20, n. 21, Oct 2019.

CUI, G.; YUAN, A.; LI, Z.; GOLL, R. *et al.* ST2 and regulatory T cells in the colorectal adenoma/carcinoma microenvironment: implications for diseases progression and prognosis. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 5892, 04 2020.

CURRY, J. M.; SPRANDIO, J.; COGNETTI, D.; LUGINBUHL, A. *et al.* Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. **Semin Oncol**, 41, n. 2, p. 217-234, Apr 2014.

---

CURTARELLI, R. B.; GONÇALVES, J. M.; DOS SANTOS, L. G. P.; SAVI, M. G. *et al.* Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. **Stem Cell Rev Rep**, 14, n. 6, p. 769-784, Dec 2018.

D'AMICO, M. A.; GHINASSI, B.; IZZICUPO, P.; MANZOLI, L. *et al.* Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. **Endocr Connect**, 3, n. 2, p. R45-54, 2014.

DARR, H.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. **Development**, 133, n. 6, p. 1193-1201, Mar 2006.

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. **Biochem Biophys Res Commun**, 507, n. 1-4, p. 83-90, 12 2018.

DE NUNZIO, C.; ALBISINNI, S.; PRESICCE, F.; LOMBARDO, R. *et al.* Serum levels of chromogranin A are not predictive of high-grade, poorly differentiated prostate cancer: results from an Italian biopsy cohort. **Urol Oncol**, 32, n. 2, p. 80-84, Feb 2014.

DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, 17, n. 8, p. 457-474, 08 2017.

DENARDO, D. G.; BRENNAN, D. J.; REXHEPAJ, E.; RUFFELL, B. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discov**, 1, n. 1, p. 54-67, Jun 2011.

DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, 19, n. 6, p. 369-382, 06 2019.

DEPINHO, R. A.; SCHREIBER-AGUS, N.; ALT, F. W. myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. **Adv Cancer Res**, 57, p. 1-46, 1991.

DISTEL, L. V.; FICKENSCHER, R.; DIETEL, K.; HUNG, A. *et al.* Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. **Oral Oncol**, 45, n. 10, p. e167-174, Oct 2009.

DOMINGUEZ, D.; YE, C.; GENG, Z.; CHEN, S. *et al.* Exogenous IL-33 Restores Dendritic Cell Activation and Maturation in Established Cancer. **J Immunol**, 198, n. 3, p. 1365-1375, 02 2017.

DONSKOV, F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. **Semin Cancer Biol**, 23, n. 3, p. 200-207, Jun 2013.

DOST GUNAY, F. S.; KIRMIZI, B. A.; ENSARI, A.; İCLI, F. *et al.* Tumor-associated Macrophages and Neuroendocrine Differentiation Decrease the Efficacy of Bevacizumab Plus Chemotherapy in Patients With Advanced Colorectal Cancer. **Clin Colorectal Cancer**, 18, n. 2, p. e244-e250, 06 2019.

---

DVORAK, A. M. Degranulation and recovery from degranulation of basophils and mast cells. **Chem Immunol Allergy**, 85, p. 205-251, 2005.

EISENMAN, R. N. Deconstructing myc. **Genes Dev**, 15, n. 16, p. 2023-2030, Aug 2001.

EISSMANN, M. F.; BUCHERT, M.; ERNST, M. IL33 and Mast Cells-The Key Regulators of Immune Responses in Gastrointestinal Cancers? **Front Immunol**, 11, p. 1389, 2020.

ENGSTRÖM A; ERLANDSSON A; DELBRO D, W. J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *Int J Oncol*. 44(2): 385-392 p. 2014

ERNST, T.; CHASE, A. J.; SCORE, J.; HIDALGO-CURTIS, C. E. *et al*. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. **Nat Genet**, 42, n. 8, p. 722-726, Aug 2010.

EVAN, G. I.; CHRISTOPHOROU, M.; LAWLOR, E. A.; RINGSHAUSEN, I. *et al*. Oncogene-dependent tumor suppression: using the dark side of the force for cancer therapy. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 70, p. 263-273, 2005.

EVRARD, D.; SZTURZ, P.; TIJERAS-RABALLAND, A.; ASTORGUES-XERRI, L. *et al*. Macrophages in the microenvironment of head and neck cancer: potential targets for cancer therapy. **Oral Oncol**, 88, p. 29-38, 01 2019.

FACCHINI, L. M.; PENN, L. Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. **FASEB J**, 12, n. 9, p. 633-651, Jun 1998.

FACCIABENE, A.; MOTZ, G. T.; COUKOS, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. **Cancer Res**, 72, n. 9, p. 2162-2171, May 2012.

FELLER, L.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Inflammation in the context of oral cancer. **Oral Oncol**, 49, n. 9, p. 887-892, Sep 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S. *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136, n. 5, p. E359-386, Mar 2015.

FILIPAZZI, P.; HUBER, V.; RIVOLTINI, L. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. **Cancer Immunol Immunother**, 61, n. 2, p. 255-263, Feb 2012.

FITZMAURICE, C.; ALLEN, C.; BARBER, R. M.; BARREGARD, L. *et al*. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncol**, 3, n. 4, p. 524-548, Apr 2017.

---

---

FORSSELL, J.; OBERG, A.; HENRIKSSON, M. L.; STENLING, R. *et al.* High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. **Clin Cancer Res**, 13, n. 5, p. 1472-1479, Mar 2007.

FOURNIÉ, J. J.; POUPOT, M. The Pro-tumorigenic IL-33 Involved in Antitumor Immunity: A Yin and Yang Cytokine. **Front Immunol**, 9, p. 2506, 2018.

FOY, J. P.; PICKERING, C. R.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V. A.; JELINEK, J. *et al.* New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development. **Cancer Prev Res (Phila)**, 8, n. 11, p. 1027-1035, Nov 2015.

FRANSEN, L.; VAN DER HEYDEN, J.; RUYSSCHAERT, R.; FIERS, W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. **Eur J Cancer Clin Oncol**, 22, n. 4, p. 419-426, Apr 1986.

FREEDMAN, N. D.; PARK, Y.; SUBAR, A. F.; HOLLENBECK, A. R. *et al.* Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. **Int J Cancer**, 122, n. 10, p. 2330-2336, May 2008.

FRIDLENDER, Z. G.; SUN, J.; KIM, S.; KAPOOR, V. *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, 16, n. 3, p. 183-194, Sep 2009.

FU, X. T.; DAI, Z.; SONG, K.; ZHANG, Z. J. *et al.* Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. **Int J Oncol**, 46, n. 2, p. 587-596, Feb 2015.

FUNG, S. Y.; LAM, J. W.; CHAN, K. C. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. **Chin Clin Oncol**, 5, n. 2, p. 18, Apr 2016.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat Immunol**, 12, n. 11, p. 1035-1044, Oct 2011.

GAO, X.; WANG, X.; YANG, Q.; ZHAO, X. *et al.* Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. **J Immunol**, 194, n. 1, p. 438-445, Jan 2015.

GARRITY, T.; PANDIT, R.; WRIGHT, M. A.; BENEFIELD, J. *et al.* Increased presence of CD34+ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. **Int J Cancer**, 73, n. 5, p. 663-669, Nov 1997.

GASPAROTO, T. H.; DE SOUZA MALASPINA, T. S.; BENEVIDES, L.; DE MELO, E. J. *et al.* Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. **Cancer Immunol Immunother**, 59, n. 6, p. 819-828, Jun 2010.

GASTL, G.; SPIZZO, G.; OBRIST, P.; DÜNSER, M. *et al.* Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. **Lancet**, 356, n. 9246, p. 1981-1982, Dec 2000.

---

GAUTIER, E. L.; SHAY, T.; MILLER, J.; GRETER, M. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nat Immunol**, 13, n. 11, p. 1118-1128, Nov 2012.

GHANTOUS, Y.; ABU ELNAAJ, I. [GLOBAL INCIDENCE AND RISK FACTORS OF ORAL CANCER]. **Harefuah**, 156, n. 10, p. 645-649, Oct 2017.

GHOSH, P.; KOMSCHLIES, K. L.; CIPPITELLI, M.; LONGO, D. L. *et al.* Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. **J Natl Cancer Inst**, 87, n. 19, p. 1478-1483, Oct 1995.

GHOSN, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 6, p. 2568-2573, Feb 2010.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Immunity**, 44, n. 3, p. 439-449, Mar 2016.

GLASNER, A.; GHADIALLY, H.; GUR, C.; STANIETSKY, N. *et al.* Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. **J Immunol**, 188, n. 6, p. 2509-2515, Mar 2012.

GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes Dev**, 14, n. 14, p. 1693-1711, Jul 2000.

GOCHEVA, V.; WANG, H. W.; GADEA, B. B.; SHREE, T. *et al.* IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. **Genes Dev**, 24, n. 3, p. 241-255, Feb 2010.

GOLDSMITH, M. M.; BELCHIS, D. A.; CRESSON, D. H.; MERRITT, W. D. *et al.* The importance of the eosinophil in head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 106, n. 1, p. 27-33, Jan 1992.

GONG, C.; LIAO, H.; GUO, F.; QIN, L. *et al.* Implication of expression of Nanog in prostate cancer cells and their stem cells. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 32, n. 2, p. 242-246, Apr 2012.

GONG, L.; CUMPIAN, A. M.; CAETANO, M. S.; OCHOA, C. E. *et al.* Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase. **Mol Cancer**, 12, n. 1, p. 154, Dec 2013.

GONG, S.; LI, Q.; JETER, C. R.; FAN, Q. *et al.* Regulation of NANOG in cancer cells. **Mol Carcinog**, 54, n. 9, p. 679-687, Sep 2015.

GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes Dev**, 32, n. 19-20, p. 1267-1284, 10 2018.

---

GOOS, J. A.; COUPE, V. M.; DIOSDADO, B.; DELIS-VAN DIEMEN, P. M. *et al.* Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis. **Br J Cancer**, 109, n. 9, p. 2445-2452, Oct 2013.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005.

GRIMM, M.; RIETH, J.; HOEFERT, S.; KRIMMEL, M. *et al.* Standardized pretreatment inflammatory laboratory markers and calculated ratios in patients with oral squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 273, n. 10, p. 3371-3384, Oct 2016.

GRUBELNIK, G.; BOŠTJANČIČ, E.; PAVLIČ, A.; KOS, M. *et al.* NANOG expression in human development and cancerogenesis. **Exp Biol Med (Maywood)**, 245, n. 5, p. 456-464, 03 2020.

GUO, S.; LI, X.; ROHR, J.; WANG, Y. *et al.* EZH2 overexpression in different immunophenotypes of breast carcinoma and association with clinicopathologic features. **Diagn Pathol**, 11, p. 41, Apr 2016.

GUO, Z.; WANG, Y.; XIANG, S.; WANG, S. *et al.* Chromogranin A is a predictor of prognosis in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Manag Res**, 11, p. 2747-2758, 2019.

GWAK, J. M.; JANG, M. H.; KIM, D. I.; SEO, A. N. *et al.* Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. **PLoS One**, 10, n. 4, p. e0125728, 2015.

HA, P. K.; CALIFANO, J. A. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **Lancet Oncol**, 7, n. 1, p. 77-82, Jan 2006.

HAGEMANN, T.; ROBINSON, S. C.; SCHULZ, M.; TRÜMPER, L. *et al.* Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. **Carcinogenesis**, 25, n. 8, p. 1543-1549, Aug 2004.

HANADA, T.; NAKAGAWA, M.; EMOTO, A.; NOMURA, T. *et al.* Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. **Int J Urol**, 7, n. 7, p. 263-269, Jul 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HANNA, G. J.; LIU, H.; JONES, R. E.; BACAY, A. F. *et al.* Defining an inflamed tumor immunophenotype in recurrent, metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, 67, p. 61-69, 04 2017.

HASITA, H.; KOMOHARA, Y.; OKABE, H.; MASUDA, T. *et al.* Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Sci**, 101, n. 8, p. 1913-1919, Aug 2010.

---

- HATZIOANNOU, A.; BANOS, A.; SAKELAROPOULOS, T.; FEDONIDIS, C. *et al.* An intrinsic role of IL-33 in T. **Nat Immunol**, 21, n. 1, p. 75-85, 01 2020.
- HE, R.; YIN, H.; YUAN, B.; LIU, T. *et al.* IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. **Mol Immunol**, 90, p. 42-49, 10 2017.
- HENZE, A. T.; MAZZONE, M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. **J Clin Invest**, 126, n. 10, p. 3672-3679, 10 2016.
- HERREROS-VILLANUEVA, M.; ZHANG, J. S.; KOENIG, A.; ABEL, E. V. *et al.* SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. **Oncogenesis**, 2, p. e61, Aug 2013.
- HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. **Oncogene**, 27, n. 50, p. 6462-6472, Oct 2008.
- HOUGHTON, A. M.; RZYMKIEWICZ, D. M.; JI, H.; GREGORY, A. D. *et al.* Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. **Nat Med**, 16, n. 2, p. 219-223, Feb 2010.
- HSIA, J. Y.; CHEN, J. T.; CHEN, C. Y.; HSU, C. P. *et al.* Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. **Chang Gung Med J**, 28, n. 5, p. 335-340, May 2005.
- HU, C.; XU, L.; LIANG, S.; ZHANG, Z. *et al.* Lentivirus-mediated shRNA targeting Nanog inhibits cell proliferation and attenuates cancer stem cell activities in breast cancer. **J Drug Target**, 24, n. 5, p. 422-432, 2016.
- HU, H. M.; URBA, W. J.; FOX, B. A. Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile. **J Immunol**, 161, n. 6, p. 3033-3041, Sep 1998.
- HU, L. A.; FU, Y.; ZHANG, D. N.; ZHANG, J. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non- small cell lung cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, 14, n. 4, p. 2563-2566, 2013.
- HU, Y.; HE, M. Y.; ZHU, L. F.; YANG, C. C. *et al.* Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res**, 35, p. 12, Jan 2016.
- HUSSENET, T.; DALI, S.; EXINGER, J.; MONGA, B. *et al.* SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. **PLoS One**, 5, n. 1, p. e8960, Jan 2010.
- IANNELLO, A.; THOMPSON, T. W.; ARDOLINO, M.; MARCUS, A. *et al.* Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. **Curr Opin Immunol**, 38, p. 52-58, Feb 2016.
- 
-

ISHIKAWA, K.; YAGI-NAKANISHI, S.; NAKANISHI, Y.; KONDO, S. *et al.* Expression of interleukin-33 is correlated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. **Auris Nasus Larynx**, 41, n. 6, p. 552-557, Dec 2014.

JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; SEIDI, K.; MONHEMI, H.; ADLI, A. D. F. *et al.* RGD delivery of truncated coagulase to tumor vasculature affords local thrombotic activity to induce infarction of tumors in mice. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 8126, 08 2017.

JANG, J. E.; HAJDU, C. H.; LIOT, C.; MILLER, G. *et al.* Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. **Cell Rep**, 20, n. 3, p. 558-571, 07 2017.

JI, J.; ZHENG, P. S. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. **Hum Pathol**, 41, n. 10, p. 1438-1447, Oct 2010.

JI, W.; JIANG, Z. Effect of shRNA-mediated inhibition of Nanog gene expression on the behavior of human gastric cancer cells. **Oncol Lett**, 6, n. 2, p. 367-374, Aug 2013.

JIA, X.; LI, X.; XU, Y.; ZHANG, S. *et al.* SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. **J Mol Cell Biol**, 3, n. 4, p. 230-238, Aug 2011.

JIANG, T.; WANG, Y.; ZHOU, F.; GAO, G. *et al.* Prognostic value of high EZH2 expression in patients with different types of cancer: a systematic review with meta-analysis. **Oncotarget**, 7, n. 4, p. 4584-4597, Jan 2016.

JOHNSON, D. E.; O'KEEFE, R. A.; GRANDIS, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, 15, n. 4, p. 234-248, 04 2018.

JOVANOVIĆ, I.; RADOSAVLJEVIĆ, G.; MITROVIĆ, M.; JURANIĆ, V. L. *et al.* ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. **Eur J Immunol**, 41, n. 7, p. 1902-1912, Jul 2011.

JOVANOVIĆ, I. P.; PEJNOVIĆ, N. N.; RADOSAVLJEVIĆ, G. D.; PANTIĆ, J. M. *et al.* Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. **Int J Cancer**, 134, n. 7, p. 1669-1682, Apr 2014.

KAKKAR, R.; LEE, R. T. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. **Nat Rev Drug Discov**, 7, n. 10, p. 827-840, Oct 2008.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, 112, n. 12, p. 1776-1784, Dec 2003.

KANDALAFT, L. E.; POWELL, D. J.; SINGH, N.; COUKOS, G. Immunotherapy for ovarian cancer: what's next? **J Clin Oncol**, 29, n. 7, p. 925-933, Mar 2011.

KARAKASHEVA, T. A.; DOMINGUEZ, G. A.; HASHIMOTO, A.; LIN, E. W. *et al.* CD38+ M-MDSC expansion characterizes a subset of advanced colorectal cancer patients. **JCI Insight**, 3, n. 6, 03 2018.

---



KARAKASHEVA, T. A.; LIN, E. W.; TANG, Q.; QIAO, E. *et al.* IL-6 Mediates Cross-Talk between Tumor Cells and Activated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. **Cancer Res**, 78, n. 17, p. 4957-4970, 09 2018.

KARAM, S. D.; RABEN, D. Radioimmunotherapy for the treatment of head and neck cancer. **Lancet Oncol**, 20, n. 8, p. e404-e416, 08 2019.

KARASUYAMA, H.; MUKAI, K.; OBATA, K.; TSUJIMURA, Y. *et al.* Nonredundant roles of basophils in immunity. **Annu Rev Immunol**, 29, p. 45-69, 2011.

KARLHOFFER, F. M.; RIBAUDO, R. K.; YOKOYAMA, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. **Nature**, 358, n. 6381, p. 66-70, Jul 1992.

KATOH, H.; WANG, D.; DAIKOKU, T.; SUN, H. *et al.* CXCR2-expressing myeloid-derived suppressor cells are essential to promote colitis-associated tumorigenesis. **Cancer Cell**, 24, n. 5, p. 631-644, Nov 2013.

KECK, M. K.; ZUO, Z.; KHATTRI, A.; STRICKER, T. P. *et al.* Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. **Clin Cancer Res**, 21, n. 4, p. 870-881, Feb 2015.

KEENE, J. A.; FORMAN, J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. **J Exp Med**, 155, n. 3, p. 768-782, Mar 1982.

KEIZMAN, D.; ISH-SHALOM, M.; HUANG, P.; EISENBERGER, M. A. *et al.* The association of pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio with response rate, progression free survival and overall survival of patients treated with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma. **Eur J Cancer**, 48, n. 2, p. 202-208, Jan 2012.

KELNER, N.; RODRIGUES, P. C.; BUFALINO, A.; FONSECA, F. P. *et al.* Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. **Head Neck**, 37, n. 4, p. 479-486, Apr 2015.

KENNEDY, R.; CELIS, E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. **Immunol Rev**, 222, p. 129-144, Apr 2008.

KHAN, A. N. H.; EMMONS, T. R.; WONG, J. T.; ALQASSIM, E. *et al.* Quantification of Early-Stage Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Requires Excluding Basophils. **Cancer Immunol Res**, 8, n. 6, p. 819-828, 06 2020.

KHOU, S.; POPA, A.; LUCI, C.; BIHL, F. *et al.* Tumor-Associated Neutrophils Dampen Adaptive Immunity and Promote Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Development. **Cancers (Basel)**, 12, n. 7, Jul 2020.

KIM, J. Y.; LIM, S. C.; KIM, G.; YUN, H. J. *et al.* Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. **Oncogene**, 34, n. 38, p. 4928-4938, Sep 2015.

---

KLEIST, B.; POETSCH, M. Neuroendocrine differentiation: The mysterious fellow of colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, 21, n. 41, p. 11740-11747, Nov 2015.

KOBAYASHI, N.; HIRAOKA, N.; YAMAGAMI, W.; OJIMA, H. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. **Clin Cancer Res**, 13, n. 3, p. 902-911, Feb 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 3, p. 159-175, Mar 2013.

KOMOHARA, Y.; HASITA, H.; OHNISHI, K.; FUJIWARA, Y. *et al.* Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Sci**, 102, n. 7, p. 1424-1431, Jul 2011.

KOMOHARA, Y.; OHNISHI, K.; KURATSU, J.; TAKEYA, M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **J Pathol**, 216, n. 1, p. 15-24, Sep 2008.

KONG, L. Q.; ZHU, X. D.; XU, H. X.; ZHANG, J. B. *et al.* The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e59771, 2013.

KORSHUNOV, A.; REMKE, M.; KOOL, M.; HIELSCHER, T. *et al.* Biological and clinical heterogeneity of MYCN-amplified medulloblastoma. **Acta Neuropathol**, 123, n. 4, p. 515-527, Apr 2012.

KOUZAKI, H.; IJIMA, K.; KOBAYASHI, T.; O'GRADY, S. M. *et al.* The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. **J Immunol**, 186, n. 7, p. 4375-4387, Apr 2011.

KRECICKI, T.; FRACZEK, M.; JELEN, M.; ZATONSKI, T. *et al.* Expression of c-myc oncoprotein in laryngeal squamous cell carcinoma. **Acta Otolaryngol**, 124, n. 5, p. 634-637, Jun 2004.

KUMAR, A. T.; KNOPS, A.; SWENDSEID, B.; MARTINEZ-OUTSCHOOM, U. *et al.* Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophage Content in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. **Front Oncol**, 9, p. 656, 2019.

KURAHARA, H.; SHINCHI, H.; MATAKI, Y.; MAEMURA, K. *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. **J Surg Res**, 167, n. 2, p. e211-219, May 2011.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; STOLARSKI, B.; KEWIN, P.; MURPHY, G. *et al.* IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **J Immunol**, 183, n. 10, p. 6469-6477, Nov 2009.

LAMBERT, A. W.; WEINBERG, R. A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. **Nat Rev Cancer**, Feb 2021.

---

---

- LAN, J.; SUN, L.; XU, F.; LIU, L. *et al.* M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer. **Cancer Res**, 79, n. 1, p. 146-158, 01 2019.
- LARSEN, K. M.; MINAYA, M. K.; VAISH, V.; PEÑA, M. M. O. The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. **Int J Mol Sci**, 19, n. 9, Sep 2018.
- LATHERS, D. M.; ACHILLE, N. J.; YOUNG, M. R. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Hum Immunol**, 64, n. 12, p. 1160-1166, Dec 2003.
- LAVIN, Y.; MORTHA, A.; RAHMAN, A.; MERAD, M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 12, p. 731-744, 12 2015.
- LEE, J. E.; ZHU, Z.; BAI, Q.; BRADY, T. J. *et al.* The Role of Interleukin-9 in Cancer. **Pathol Oncol Res**, 26, n. 4, p. 2017-2022, Oct 2020.
- LEE, M. H.; TUNG-CHIEH CHANG, J.; LIAO, C. T.; CHEN, Y. S. *et al.* Interleukin 17 and peripheral IL-17-expressing T cells are negatively correlated with the overall survival of head and neck cancer patients. **Oncotarget**, 9, n. 11, p. 9825-9837, Feb 2018.
- LEUBE, R. E. Expression of the synaptophysin gene family is not restricted to neuronal and neuroendocrine differentiation in rat and human. **Differentiation**, 56, n. 3, p. 163-171, May 1994.
- LI, H.; VAN DER LEUN, A. M.; YOFÉ, I.; LUBLING, Y. *et al.* Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. **Cell**, 181, n. 3, p. 747, Apr 2020.
- LI, X. L.; EISHI, Y.; BAI, Y. Q.; SAKAI, H. *et al.* Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. **Int J Oncol**, 24, n. 2, p. 257-263, Feb 2004.
- LIANG, Y. J.; LIU, H. C.; SU, Y. X.; ZHANG, T. H. *et al.* Foxp3 expressed by tongue squamous cell carcinoma cells correlates with clinicopathologic features and overall survival in tongue squamous cell carcinoma patients. **Oral Oncol**, 47, n. 7, p. 566-570, Jul 2011.
- LIEW, F. Y. IL-33: a Janus cytokine. **Ann Rheum Dis**, 71 Suppl 2, p. i101-104, Apr 2012.
- LIEW, F. Y.; GIRARD, J. P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 11, p. 676-689, 11 2016.
- LIN, E. Y.; LI, J. F.; GNATOVSKIY, L.; DENG, Y. *et al.* Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer Res**, 66, n. 23, p. 11238-11246, Dec 2006.
- 
-

LINDBERG, K.; RHEINWALD, J. G. Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. **Differentiation**, 45, n. 3, p. 230-241, Dec 1990.

LINGEL, A.; WEISS, T. M.; NIEBUHR, M.; PAN, B. *et al.* Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. **Structure**, 17, n. 10, p. 1398-1410, Oct 2009.

LIU, C. Y.; XU, J. Y.; SHI, X. Y.; HUANG, W. *et al.* M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Lab Invest**, 93, n. 7, p. 844-854, Jul 2013.

LIU, J.; SHEN, J. X.; HU, J. L.; HUANG, W. H. *et al.* Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. **Front Immunol**, 5, p. 141, 2014.

LIU, K.; LIN, B.; ZHAO, M.; YANG, X. *et al.* The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. **Cell Signal**, 25, n. 5, p. 1264-1271, May 2013.

LIU, R. B.; ENGELS, B.; ARINA, A.; SCHREIBER, K. *et al.* Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors. **Cancer Res**, 72, n. 8, p. 1964-1974, Apr 2012.

LIU, X.; ZHU, L.; LU, X.; BIAN, H. *et al.* IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 453, n. 3, p. 486-492, Oct 2014.

LIU, X. F.; YANG, W. T.; XU, R.; LIU, J. T. *et al.* Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. **PLoS One**, 9, n. 1, p. e87092, 2014.

LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. **Annu Rev Pathol**, 15, p. 123-147, 01 2020.

LOH, Y. P.; CHENG, Y.; MAHATA, S. K.; CORTI, A. *et al.* Chromogranin A and derived peptides in health and disease. **J Mol Neurosci**, 48, n. 2, p. 347-356, Oct 2012.

LONG, K. B.; HORNICK, J. L. SOX2 is highly expressed in squamous cell carcinomas of the gastrointestinal tract. **Hum Pathol**, 40, n. 12, p. 1768-1773, Dec 2009.

LUCARINI, V.; ZICCHEDDU, G.; MACCHIA, I.; LA SORSA, V. *et al.* IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. **Oncoimmunology**, 6, n. 6, p. e1317420, 2017.

LUI, V. W.; PEYSER, N. D.; NG, P. K.; HRITZ, J. *et al.* Frequent mutation of receptor protein tyrosine phosphatases provides a mechanism for STAT3 hyperactivation in head and neck cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 3, p. 1114-1119, Jan 2014.

LUO, H.; JIANG, Y.; MA, S.; CHANG, H. *et al.* EZH2 promotes invasion and metastasis of laryngeal squamous cells carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through H3K27me3. **Biochem Biophys Res Commun**, 479, n. 2, p. 253-259, Oct 2016.

---

LÄTTI, S.; LESKINEN, M.; SHIOTA, N.; WANG, Y. *et al.* Mast cell-mediated apoptosis of endothelial cells in vitro: a paracrine mechanism involving TNF-alpha-mediated down-regulation of bcl-2 expression. **J Cell Physiol**, 195, n. 1, p. 130-138, Apr 2003.

MAGGIONI, D.; PIGNATARO, L.; GARAVELLO, W. T-helper and T-regulatory cells modulation in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology**, 6, n. 7, p. e1325066, 2017 2017.

MAIER, H.; DIETZ, A.; GEWELKE, U.; HELLER, W. D. *et al.* Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. **Clin Invest**, 70, n. 3-4, p. 320-327, 1992 Mar-Apr 1992.

MAIMELA, N. R.; LIU, S.; ZHANG, Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. **Comput Struct Biotechnol J**, 17, p. 1-13, 2019.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, 454, n. 7203, p. 436-444, Jul 2008.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; MALESCI, A.; LAGHI, L. *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nat Rev Clin Oncol**, 14, n. 7, p. 399-416, Jul 2017.

MANTOVANI, A.; SCHIOPPA, T.; PORTA, C.; ALLAVENA, P. *et al.* Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. **Cancer Metastasis Rev**, 25, n. 3, p. 315-322, Sep 2006.

MARCU, K. B.; BOSSONE, S. A.; PATEL, A. J. myc function and regulation. **Annu Rev Biochem**, 61, p. 809-860, 1992.

MARCUS, A.; GOWEN, B. G.; THOMPSON, T. W.; IANNELLO, A. *et al.* Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. **Adv Immunol**, 122, p. 91-128, 2014.

MARCUS, A.; MAO, A. J.; LENSINK-VASAN, M.; WANG, L. *et al.* Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. **Immunity**, 49, n. 4, p. 754-763.e754, 10 2018.

MARTÍNEZ-LOSTAO, L.; ANEL, A.; PARDO, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? **Clin Cancer Res**, 21, n. 22, p. 5047-5056, Nov 2015.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nat Rev Cancer**, 12, n. 5, p. 323-334, Apr 2012.

MASSAGUÉ, J.; GOMIS, R. R. The logic of TGFbeta signaling. **FEBS Lett**, 580, n. 12, p. 2811-2820, May 2006.

MASTRONIKOLIS, N.; RAGOS, V.; KYRODIMOS, E.; CHRYSOVERGIS, A. *et al.* Mechanisms of C-myc oncogenic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **J BUON**, 24, n. 6, p. 2242-2244, 2019 Nov-Dec 2019.

---

MATHSYARAJA, H.; EISENMAN, R. N. Parsing Myc Paralogs in Oncogenesis. **Cancer Cell**, 29, n. 1, p. 1-2, Jan 2016.

MATO PRADO, M.; FRAMPTON, A. E.; STEBBING, J.; KRELL, J. Gene of the month: NANOG. **J Clin Pathol**, 68, n. 10, p. 763-765, Oct 2015.

MEISSNER, M.; REICHERT, T. E.; KUNKEL, M.; GOODING, W. *et al.* Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. **Clin Cancer Res**, 11, n. 7, p. 2552-2560, Apr 2005.

MELSSSEN, M.; SLINGLUFF, C. L. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. **Curr Opin Immunol**, 47, p. 85-92, Aug 2017.

MENG, F.; LI, W.; LI, C.; GAO, Z. *et al.* CCL18 promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of pancreatic cancer cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Int J Oncol**, 46, n. 3, p. 1109-1120, Mar 2015.

MENG, H. M.; ZHENG, P.; WANG, X. Y.; LIU, C. *et al.* Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. **Cancer Biol Ther**, 9, n. 4, p. 295-302, Feb 2010.

MIAO, B. P.; ZHANG, R. S.; SUN, H. J.; YU, Y. P. *et al.* Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by Staphylococcal enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion. **Cell Mol Immunol**, 14, n. 4, p. 371-379, Apr 2017.

MICOSSÉ, C.; VON MEYENN, L.; STECK, O.; KIPFER, E. *et al.* Human "T. **Sci Immunol**, 4, n. 31, 01 2019.

MILLAR, N. L.; O'DONNELL, C.; MCINNES, I. B.; BRINT, E. Wounds that heal and wounds that don't - The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. **Semin Cell Dev Biol**, 61, p. 41-50, 01 2017.

MISHRA, A.; MEHEROTRA, R. Head and neck cancer: global burden and regional trends in India. **Asian Pac J Cancer Prev**, 15, n. 2, p. 537-550, 2014.

MORANDI, F.; HORENSTEIN, A. L.; COSTA, F.; GIULIANI, N. *et al.* CD38: A Target for Immunotherapeutic Approaches in Multiple Myeloma. **Front Immunol**, 9, p. 2722, 2018.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, 8, n. 12, p. 958-969, Dec 2008.

MOUSSION, C.; ORTEGA, N.; GIRARD, J. P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? **PLoS One**, 3, n. 10, p. e3331, Oct 2008.

MOWEN, K. A.; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunol Rev**, 202, p. 203-222, Dec 2004.

---

---

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; COFFELT, S. B.; LEWIS, C. E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, 8, n. 8, p. 618-631, Aug 2008.

MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, 41, n. 1, p. 14-20, Jul 2014.

NAGATA, T.; SHIMADA, Y.; SEKINE, S.; MORIYAMA, M. *et al.* KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. **Breast Cancer**, 24, n. 2, p. 326-335, Mar 2017.

NETWORK, C. G. A. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, 517, n. 7536, p. 576-582, Jan 2015.

NEUMANN, J.; BAHR, F.; HORST, D.; KRIEGL, L. *et al.* SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. **BMC Cancer**, 11, p. 518, Dec 2011.

NIINO, D.; KOMOHARA, Y.; MURAYAMA, T.; AOKI, R. *et al.* Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). **Pathol Int**, 60, n. 4, p. 278-283, Apr 2010.

NIKOLOSKI, G.; LANGEMEIJER, S. M.; KUIPER, R. P.; KNOPS, R. *et al.* Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. **Nat Genet**, 42, n. 8, p. 665-667, Aug 2010.

NIKONOVA, A. S.; ASTSATUROV, I.; SEREBRIISKII, I. G.; DUNBRACK, R. L. *et al.* Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. **Cell Mol Life Sci**, 70, n. 4, p. 661-687, Feb 2013.

NISMAN, B.; HECHING, N.; BIRAN, H.; BARAK, V. *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 Biol**, 27, n. 1, p. 8-16, 2006.

NOMAN, M. Z.; DESANTIS, G.; JANJI, B.; HASMIM, M. *et al.* PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. **J Exp Med**, 211, n. 5, p. 781-790, May 2014.

NORRBY, K.; JAKOBSSON, A.; SÖRBO, J. Mast-cell secretion and angiogenesis, a quantitative study in rats and mice. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, 57, n. 4, p. 251-256, 1989.

NOWELL, P. C. Tumors as clonal proliferation. **Virchows Arch B Cell Pathol**, 29, n. 1-2, p. 145-150, Nov 1978.

OBOKI, K.; OHNO, T.; KAJIWARA, N.; SAITO, H. *et al.* IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. **Allergol Int**, 59, n. 2, p. 143-160, Jun 2010.

---

---

OGAWARA, H.; HANDA, H.; YAMAZAKI, T.; TODA, T. *et al.* High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. **Leuk Res**, 29, n. 2, p. 135-140, Feb 2005.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista de Medicina: SE-Artigos Médicos*. v.89 2010.

OSSENDORP, F.; TOES, R. E.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H. *et al.* Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. **Immunol Lett**, 74, n. 1, p. 75-79, Sep 2000.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol**, 4, p. 49-70, 2009.

PAN, X. Q. The mechanism of the anticancer function of M1 macrophages and their use in the clinic. **Chin J Cancer**, 31, n. 12, p. 557-563, Dec 2012.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nat Rev Immunol**, 18, n. 2, p. 134-147, 02 2018.

PASTORELLI, L.; DE SALVO, C.; VECCHI, M.; PIZARRO, T. T. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. **Mediators Inflamm**, 2013, p. 608187, 2013.

PATRIARCA, C.; MACCHI, R. M.; MARSCHNER, A. K.; MELLSTEDT, H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. **Cancer Treat Rev**, 38, n. 1, p. 68-75, Feb 2012.

PENG, L.; SUN, W.; CHEN, L.; WEN, W. P. The Role of Interleukin-33 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Determined by Its Cellular Sources in the Tumor Microenvironment. **Front Oncol**, 10, p. 588454, 2020.

PERRI, F.; IONNA, F.; LONGO, F.; DELLA VITTORIA SCARPATI, G. *et al.* Immune Response Against Head and Neck Cancer: Biological Mechanisms and Implication on Therapy. **Transl Oncol**, 13, n. 2, p. 262-274, Feb 2020.

PEYSER, N. D.; DU, Y.; LI, H.; LUI, V. *et al.* Loss-of-Function PTPRD Mutations Lead to Increased STAT3 Activation and Sensitivity to STAT3 Inhibition in Head and Neck Cancer. **PLoS One**, 10, n. 8, p. e0135750, 2015.

PICHERY, M.; MIREY, E.; MERCIER, P.; LEFRANCAIS, E. *et al.* Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. **J Immunol**, 188, n. 7, p. 3488-3495, Apr 2012.

PINDBORG; JORGEN, J.; ORGANIZATION, W. H. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa Springer, New York 1997.

PLUQUET, O.; GALMICHE, A. Impact and Relevance of the Unfolded Protein Response in HNSCC. **Int J Mol Sci**, 20, n. 11, May 2019.

---

---



POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat Rev Cancer**, 4, n. 1, p. 71-78, 01 2004.

PRADEU, T.; JAEGER, S.; VIVIER, E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? **Nat Rev Immunol**, 13, n. 10, p. 764-769, 10 2013.

PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, 111, n. 2 Suppl, p. S486-494, Feb 2003.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, 141, n. 1, p. 39-51, Apr 2010.

QIAN, B. Z.; ZHANG, H.; LI, J.; HE, T. *et al.* FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. **J Exp Med**, 212, n. 9, p. 1433-1448, Aug 2015.

RAAPHORST, F. M.; MEIJER, C. J.; FIERET, E.; BLOKZIJL, T. *et al.* Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene. **Neoplasia**, 5, n. 6, p. 481-488, 2003 Nov-Dec 2003.

REKHTMAN, N. Neuroendocrine tumors of the lung: an update. **Arch Pathol Lab Med**, 134, n. 11, p. 1628-1638, Nov 2010.

REN, P.; YUE, M.; XIAO, D.; XIU, R. *et al.* ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation. **J Pathol**, 235, n. 1, p. 90-100, Jan 2015.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, 414, n. 6859, p. 105-111, Nov 2001.

RIOS-DORIA, J.; DURHAM, N.; WETZEL, L.; ROTHSTEIN, R. *et al.* Doxil synergizes with cancer immunotherapies to enhance antitumor responses in syngeneic mouse models. **Neoplasia**, 17, n. 8, p. 661-670, Aug 2015.

ROBERTS, E. W.; BROZ, M. L.; BINNEWIES, M.; HEADLEY, M. B. *et al.* Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. **Cancer Cell**, 30, n. 2, p. 324-336, 08 2016.

ROCHE, J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. **Cancers (Basel)**, 10, n. 2, Feb 2018.

SAIGUSA, S.; MOHRI, Y.; OHI, M.; TOIYAMA, Y. *et al.* Podoplanin and SOX2 expression in esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy. **Oncol Rep**, 26, n. 5, p. 1069-1074, Nov 2011.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, 133, n. 5, p. 775-787, May 2008.

---

---

SAMET, J. M.; CHIU, W. A.; COGLIANO, V.; JINOT, J. *et al.* The IARC Monographs: Updated Procedures for Modern and Transparent Evidence Synthesis in Cancer Hazard Identification. **J Natl Cancer Inst**, 112, n. 1, p. 30-37, 01 2020.

SANTULLI, P.; EVEN, M.; CHOUZENOUX, S.; MILLISCHER, A. E. *et al.* Profibrotic interleukin-33 is correlated with uterine leiomyoma tumour burden. **Hum Reprod**, 28, n. 8, p. 2126-2133, Aug 2013.

SARANCHOVA, I.; HAN, J.; HUANG, H.; FENNINGER, F. *et al.* Discovery of a Metastatic Immune Escape Mechanism Initiated by the Loss of Expression of the Tumour Biomarker Interleukin-33. **Sci Rep**, 6, p. 30555, 09 2016.

SARKAR, A.; HOCHEDLINGER, K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. **Cell Stem Cell**, 12, n. 1, p. 15-30, Jan 2013.

SCHARTINGER, V. H.; FALKEIS, C.; LAIMER, K.; SPRINZL, G. M. *et al.* Neuroendocrine differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. **J Laryngol Otol**, 126, n. 12, p. 1261-1270, Dec 2012.

SCHAUB, F. X.; DHANKANI, V.; BERGER, A. C.; TRIVEDI, M. *et al.* Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. **Cell Syst**, 6, n. 3, p. 282-300.e282, 03 2018.

SCHLEUSENER, J. T.; TAZELAAR, H. D.; JUNG, S. H.; CHA, S. S. *et al.* Neuroendocrine differentiation is an independent prognostic factor in chemotherapy-treated nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, 77, n. 7, p. 1284-1291, Apr 1996.

SCHRAMM, A.; KÖSTER, J.; ASSENOV, Y.; ALTHOFF, K. *et al.* Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. **Nat Genet**, 47, n. 8, p. 872-877, Aug 2015.

SCHWAB, M.; ALITALO, K.; KLEMPNAUER, K. H.; VARMUS, H. E. *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. **Nature**, 305, n. 5931, p. 245-248, 1983 Sep 15-21 1983.

SEKTIOGLU, I. M.; CARRETERO, R.; BULBUC, N.; BALD, T. *et al.* Basophils Promote Tumor Rejection via Chemotaxis and Infiltration of CD8<sup>+</sup> T Cells. **Cancer Res**, 77, n. 2, p. 291-302, 01 2017.

SHABO, I.; STÅL, O.; OLSSON, H.; DORÉ, S. *et al.* Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. **Int J Cancer**, 123, n. 4, p. 780-786, Aug 2008.

SHAH, S. P.; ROTH, A.; GOYA, R.; OLOUMI, A. *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, 486, n. 7403, p. 395-399, Apr 2012.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, 233, n. 9, p. 6425-6440, 09 2018.

---

SHARMA, A.; KHAN, R.; JOSHI, S.; KUMAR, L. *et al.* Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. **Leuk Lymphoma**, 51, n. 5, p. 920-927, May 2010.

SHARMA, M.; DAS, M.; STEPHEN-VICTOR, E.; GALEOTTI, C. *et al.* Regulatory T cells induce activation rather than suppression of human basophils. **Sci Immunol**, 3, n. 23, 05 2018.

SHIGEMATSU, K.; NISHIDA, N.; SAKAI, H.; IGAWA, T. *et al.* Synaptophysin immunoreactivity in adrenocortical adenomas: a correlation between synaptophysin and CYP17A1 expression. **Eur J Endocrinol**, 161, n. 6, p. 939-945, Dec 2009.

SHLOMOVITZ, I.; ERLICH, Z.; SPEIR, M.; ZARGARIAN, S. *et al.* Necroptosis directly induces the release of full-length biologically active IL-33 in vitro and in an inflammatory disease model. **FEBS J**, 286, n. 3, p. 507-522, 02 2019.

SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **J Clin Invest**, 117, n. 5, p. 1155-1166, May 2007.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, 122, n. 3, p. 787-795, Mar 2012.

SIMON, J. A.; LANGE, C. A. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. **Mutat Res**, 647, n. 1-2, p. 21-29, Dec 2008.

SIMON, S. C. S.; UTIKAL, J.; UMANSKY, V. Opposing roles of eosinophils in cancer. **Cancer Immunol Immunother**, 68, n. 5, p. 823-833, May 2019.

SIU, M. K.; WONG, E. S.; KONG, D. S.; CHAN, H. Y. *et al.* Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers. **Oncogene**, 32, n. 30, p. 3500-3509, Jul 2013.

SMITH, D. P.; BATH, M. L.; HARRIS, A. W.; CORY, S. T-cell lymphomas mask slower developing B-lymphoid and myeloid tumours in transgenic mice with broad haemopoietic expression of MYC. **Oncogene**, 24, n. 22, p. 3544-3553, May 2005.

SOLINAS, G.; SCHIAREA, S.; LIGUORI, M.; FABBRI, M. *et al.* Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. **J Immunol**, 185, n. 1, p. 642-652, Jul 2010.

SPIZZO, G.; FONG, D.; WURM, M.; ENSINGER, C. *et al.* EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. **J Clin Pathol**, 64, n. 5, p. 415-420, May 2011.

STANKOVIC, B.; BJØRHOVDE, H. A. K.; SKARSHAUG, R.; AAMODT, H. *et al.* Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. **Front Immunol**, 9, p. 3101, 2018.

---

---

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol**, 30, p. 1-22, 2012.

SUN, J.; ZHENG, G.; GU, Z.; GUO, Z. MiR-137 inhibits proliferation and angiogenesis of human glioblastoma cells by targeting EZH2. **J Neurooncol**, 122, n. 3, p. 481-489, May 2015.

SUN, P.; BEN, Q.; TU, S.; DONG, W. *et al.* Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. **Dig Dis Sci**, 56, n. 12, p. 3596-3601, Dec 2011.

SUNDARESAN, V.; REEVE, J. G.; STENNING, S.; STEWART, S. *et al.* Neuroendocrine differentiation and clinical behaviour in non-small cell lung tumours. **Br J Cancer**, 64, n. 2, p. 333-338, Aug 1991.

SURMAN, D. R.; DUDLEY, M. E.; OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. **J Immunol**, 164, n. 2, p. 562-565, Jan 2000.

TAGO, K.; NODA, T.; HAYAKAWA, M.; IWAHANA, H. *et al.* Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. **Biochem Biophys Res Commun**, 285, n. 5, p. 1377-1383, Aug 2001.

TAN, B. T.; PARK, C. Y.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. **Lab Invest**, 86, n. 12, p. 1203-1207, Dec 2006.

TANCHOT, C.; TERME, M.; PERE, H.; TRAN, T. *et al.* Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. **Cancer Microenviron**, 6, n. 2, p. 147-157, Aug 2013.

TANG, D.; TAO, D.; FANG, Y.; DENG, C. *et al.* TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Med Sci Monit Basic Res**, 23, p. 141-149, Apr 2017.

TANG, Z.; LI, C.; KANG, B.; GAO, G. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. **Nucleic Acids Res**, 45, n. W1, p. W98-W102, 07 2017.

TAUBE, J. M.; GALON, J.; SHOLL, L. M.; RODIG, S. J. *et al.* Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. **Mod Pathol**, 31, n. 2, p. 214-234, 02 2018.

TEEUWSEN, M.; FODDE, R. Cell Heterogeneity and Phenotypic Plasticity in Metastasis Formation: The Case of Colon Cancer. **Cancers (Basel)**, 11, n. 9, Sep 2019.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, 2, n. 6, p. 442-454, Jun 2002.

---

---

TOGASHI, Y.; SHITARA, K.; NISHIKAWA, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. **Nat Rev Clin Oncol**, 16, n. 6, p. 356-371, 06 2019.

TOHME, S.; YAZDANI, H. O.; AL-KHAFAJI, A. B.; CHIDI, A. P. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. **Cancer Res**, 76, n. 6, p. 1367-1380, Mar 2016.

TONG, X.; BARBOUR, M.; HOU, K.; GAO, C. *et al.* Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. **Mol Oncol**, 10, n. 1, p. 113-125, Jan 2016.

TRELLAKIS, S.; FARJAH, H.; BRUDEREK, K.; DUMITRU, C. A. *et al.* Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. **Int J Immunopathol Pharmacol**, 24, n. 3, p. 683-693, 2011 Jul-Sep 2011.

TROIANO, G.; CAPONIO, V. C. A.; ADIPIETRO, I.; TEPEDINO, M. *et al.* Prognostic significance of CD68. **Oral Oncol**, 93, p. 66-75, 06 2019.

TSAI, M. S.; CHEN, W. C.; LU, C. H.; CHEN, M. F. The prognosis of head and neck squamous cell carcinoma related to immunosuppressive tumor microenvironment regulated by IL-6 signaling. **Oral Oncol**, 91, p. 47-55, 04 2019.

TURNIS, M. E.; SAWANT, D. V.; SZYMCZAK-WORKMAN, A. L.; ANDREWS, L. P. *et al.* Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. **Immunity**, 44, n. 2, p. 316-329, Feb 2016.

VAIOPOULOS, A.G.; ATHANASOULA, K.Ch.; PAPAVALASSILIOU, A.G. Epigenetic modifications in colorectal cancer: molecular insights and therapeutic challenges. **Biochim Biophys Acta**. 1842, p.971-80, 2014.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J Exp Med**, 128, n. 3, p. 415-435, Sep 1968.

VARRICCHI, G.; LOFFREDO, S.; GALDIERO, M. R.; MARONE, G. *et al.* Innate effector cells in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Curr Opin Immunol**, 53, p. 152-160, 08 2018.

VASQUEZ-DUNDELL, D.; PAN, F.; ZENG, Q.; GORBOUNOV, M. *et al.* STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. **J Clin Invest**, 123, n. 4, p. 1580-1589, Apr 2013.

VELLEUER, E.; DIETRICH, R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. **Mol Cell Pediatr**, 1, n. 1, p. 9, Dec 2014.

VILLARREAL, D. O.; WISE, M. C.; WALTERS, J. N.; REUSCHEL, E. L. *et al.* Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. **Cancer Res**, 74, n. 6, p. 1789-1800, Mar 2014.

---

---

VITA, M.; HENRIKSSON, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Semin Cancer Biol**, 16, n. 4, p. 318-330, Aug 2006.

VIVIER, E.; ARTIS, D.; COLONNA, M.; DIEFENBACH, A. *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. **Cell**, 174, n. 5, p. 1054-1066, 08 2018.

VOEHRINGER, D. The role of basophils in helminth infection. **Trends Parasitol**, 25, n. 12, p. 551-556, Dec 2009.

VOSKOBOINIK, I.; SMYTH, M. J.; TRAPANI, J. A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 12, p. 940-952, Dec 2006.

WANG, C.; CHEN, Z.; BU, X.; HAN, Y. *et al.* IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, 479, n. 3, p. 461-468, Oct 2016.

WANG, C.; LIU, X.; CHEN, Z.; HUANG, H. *et al.* Polycomb group protein EZH2-mediated E-cadherin repression promotes metastasis of oral tongue squamous cell carcinoma. **Mol Carcinog**, 52, n. 3, p. 229-236, Mar 2013.

WANG, H.; MANNAVA, S.; GRACHTCHOUK, V.; ZHUANG, D. *et al.* c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. **Oncogene**, 27, n. 13, p. 1905-1915, Mar 2008.

WANG, J.; CAO, Z.; ZHANG, X. M.; NAKAMURA, M. *et al.* Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development. **Cancer Res**, 75, n. 2, p. 306-315, Jan 2015.

WANG, Q.; YU, W. N.; CHEN, X.; PENG, X. D. *et al.* Spontaneous Hepatocellular Carcinoma after the Combined Deletion of Akt Isoforms. **Cancer Cell**, 29, n. 4, p. 523-535, Apr 2016.

WANG, T. T.; ZHAO, Y. L.; PENG, L. S.; CHEN, N. *et al.* Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. **Gut**, 66, n. 11, p. 1900-1911, 11 2017.

WANG, Z.; VALERA, J. C.; ZHAO, X.; CHEN, Q. *et al.* mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, 36, n. 3, p. 491-502, 09 2017.

WCULEK, S. K.; CUETO, F. J.; MUJAL, A. M.; MELERO, I. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 1, p. 7-24, 01 2020.

WEI, Y.; ZHANG, X.; WANG, G.; ZHOU, Y. *et al.* The impacts of pretreatment circulating eosinophils and basophils on prognosis of stage I -III colorectal cancer. **Asia Pac J Clin Oncol**, 14, n. 5, p. e243-e251, Oct 2018.

WEINA, K.; UTIKAL, J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. **Clin Transl Med**, 3, p. 19, 2014.

---

---

WEISBROD, A. B.; ZHANG, L.; JAIN, M.; BARAK, S. *et al.* Altered PTEN, ATRX, CHGA, CHGB, and TP53 expression are associated with aggressive VHL-associated pancreatic neuroendocrine tumors. **Horm Cancer**, 4, n. 3, p. 165-175, Jun 2013.

WENT, P.; VASEI, M.; BUBENDORF, L.; TERRACCIANO, L. *et al.* Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. **Br J Cancer**, 94, n. 1, p. 128-135, Jan 2006.

WENT, P. T.; LUGLI, A.; MEIER, S.; BUNDI, M. *et al.* Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. **Hum Pathol**, 35, n. 1, p. 122-128, Jan 2004.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. **Cell**, 41, n. 3, p. 1017-1028, Jul 1985.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W. W.; KUHN, C.; MOLL, R. *et al.* Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 10, p. 3500-3504, May 1986.

WINDON, M. J.; D'SOUZA, G.; RETTIG, E. M.; WESTRA, W. H. *et al.* Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. **Cancer**, 124, n. 14, p. 2993-2999, 07 2018.

WINTER, M. J.; NAGTEGAAL, I. D.; VAN KRIEKEN, J. H.; LITVINOV, S. V. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. **Am J Pathol**, 163, n. 6, p. 2139-2148, Dec 2003.

WONG, I. C.; NG, Y. K.; LUI, V. W. Cancers of the lung, head and neck on the rise: perspectives on the genotoxicity of air pollution. **Chin J Cancer**, 33, n. 10, p. 476-480, Oct 2014.

WOOLGAR, J. A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, 42, n. 3, p. 229-239, Mar 2006.

WU, C. H.; VAN RIGGELEN, J.; YETIL, A.; FAN, A. C. *et al.* Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 32, p. 13028-13033, Aug 2007.

WU, C. W.; WU, Y. G.; CHENG, C.; HONG, Z. D. *et al.* Interleukin-33 Predicts Poor Prognosis and Promotes Renal Cell Carcinoma Cell Growth Through its Receptor ST2 and the JNK Signaling Pathway. **Cell Physiol Biochem**, 47, n. 1, p. 191-200, 2018.

WU, P.; WU, D.; ZHAO, L.; HUANG, L. *et al.* Inverse role of distinct subsets and distribution of macrophage in lung cancer prognosis: a meta-analysis. **Oncotarget**, 7, n. 26, p. 40451-40460, Jun 2016.

WYSS, A.; HASHIBE, M.; CHUANG, S. C.; LEE, Y. C. *et al.* Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Am J Epidemiol**, 178, n. 5, p. 679-690, Sep 2013.

---

---

XIANG, R.; LIAO, D.; CHENG, T.; ZHOU, H. *et al.* Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. **Br J Cancer**, 104, n. 9, p. 1410-1417, Apr 2011.

XIN, Z.; XIN, G.; SHI, M.; SONG, L. *et al.* Inhibition of MUC1-C entering nuclear suppresses MYC expression and attenuates malignant growth in esophageal squamous cell carcinoma. **Onco Targets Ther**, 11, p. 4125-4136, 2018.

XU, A.; LIU, Y.; CHEN, W.; WANG, J. *et al.* TGF- $\beta$ -Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism. **J Immunol**, 196, n. 9, p. 3631-3641, 05 2016.

YADAV, A.; KUMAR, B.; DATTA, J.; TEKNOS, T. N. *et al.* IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. **Mol Cancer Res**, 9, n. 12, p. 1658-1667, Dec 2011.

YANAMOTO, S.; KAWASAKI, G.; YOSHITOMI, I.; IWAMOTO, T. *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 Oncol**, 43, n. 9, p. 869-877, Oct 2007.

YANG, N.; HUI, L.; WANG, Y.; YANG, H. *et al.* SOX2 promotes the migration and invasion of laryngeal cancer cells by induction of MMP-2 via the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Oncol Rep**, 31, n. 6, p. 2651-2659, Jun 2014.

YANG, Y.; NIU, C. S.; CHENG, C. D. Pin1-Nanog expression in human glioma is correlated with advanced tumor progression. **Oncol Rep**, 30, n. 2, p. 560-566, Aug 2013.

YANG, Z.; GAO, X.; WANG, J.; XU, L. *et al.* Interleukin-33 enhanced the migration and invasiveness of human lung cancer cells. **Onco Targets Ther**, 11, p. 843-849, 2018.

YIN, Z.; MA, T.; LIN, Y.; LU, X. *et al.* IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma. **J Cell Biochem**, 119, n. 11, p. 9419-9432, 11 2018.

YOON, H. I.; PARK, K. H.; LEE, E. J.; KEUM, K. C. *et al.* Overexpression of SOX2 Is Associated with Better Overall Survival in Squamous Cell Lung Cancer Patients Treated with Adjuvant Radiotherapy. **Cancer Res Treat**, 48, n. 2, p. 473-482, Apr 2016.

YOUN, J. I.; NAGARAJ, S.; COLLAZO, M.; GABRILOVICH, D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **J Immunol**, 181, n. 8, p. 5791-5802, Oct 2008.

YOUNG, J. D.; PETERSON, C. G.; VENGE, P.; COHN, Z. A. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. **Nature**, 321, n. 6070, p. 613-616, 1986 Jun 5-11 1986.

---

---



YOUNG, M. R.; WRIGHT, M. A.; LOZANO, Y.; PRECHEL, M. M. *et al.* Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells. **Int J Cancer**, 74, n. 1, p. 69-74, Feb 1997.

YU, L.; YANG, F.; ZHANG, F.; GUO, D. *et al.* CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production. **Cell Death Dis**, 9, n. 9, p. 905, 09 2018.

YU, X. X.; HU, Z.; SHEN, X.; DONG, L. Y. *et al.* IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. **Dig Dis Sci**, 60, n. 5, p. 1265-1272, May 2015.

YUAN, A.; HSIAO, Y. J.; CHEN, H. Y.; CHEN, H. W. *et al.* Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. **Sci Rep**, 5, p. 14273, Sep 2015.

YUNNA, C.; MENGRU, H.; LEI, W.; WEIDONG, C. Macrophage M1/M2 polarization. **Eur J Pharmacol**, 877, p. 173090, Jun 2020.

ZAMBLE, D. B.; MIKATA, Y.; ENG, C. H.; SANDMAN, K. E. *et al.* Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. **J Inorg Biochem**, 91, n. 3, p. 451-462, Aug 2002.

ZHANG, J.; SUD, S.; MIZUTANI, K.; GYETKO, M. R. *et al.* Activation of urokinase plasminogen activator and its receptor axis is essential for macrophage infiltration in a prostate cancer mouse model. **Neoplasia**, 13, n. 1, p. 23-30, Jan 2011.

ZHANG, J.; WANG, P.; JI, W.; DING, Y. *et al.* Overexpression of interleukin-33 is associated with poor prognosis of patients with glioma. **Int J Neurosci**, 127, n. 3, p. 210-217, Mar 2017.

ZHANG, J. F.; WANG, P.; YAN, Y. J.; LI, Y. *et al.* IL-33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 via the ST2-NF- $\kappa$ B pathway. **Oncol Rep**, 38, n. 4, p. 2033-2042, Oct 2017.

ZHANG, P.; LIU, X. K.; CHU, Z.; YE, J. C. *et al.* Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. **J Int Med Res**, 40, n. 5, p. 1654-1661, 2012.

ZHAO, L.; LIU, J.; CHEN, S.; FANG, C. *et al.* Prognostic significance of NANOG expression in solid tumors: a meta-analysis. **Onco Targets Ther**, 11, p. 5515-5526, 2018.

ZHAO, M.; HU, X.; XU, Y.; WU, C. *et al.* Targeting of EZH2 inhibits epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma via regulating the STAT3/VEGFR2 axis. **Int J Oncol**, 55, n. 5, p. 1165-1175, Nov 2019.

ZHAO, W.; LI, Y.; ZHANG, X. Stemness-Related Markers in Cancer. **Cancer Transl Med**, 3, n. 3, p. 87-95, 2017.

---

---

ZHENG, F.; YUE, C.; LI, G.; HE, B. *et al.* Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype. **Nat Commun**, 7, p. 10180, Jan 2016.

ZHOU, C.; NITSCHKE, A. M.; XIONG, W.; ZHANG, Q. *et al.* Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype. **Breast Cancer Res**, 10, n. 6, p. R105, 2008.

ZHOU, X.; REN, Y.; KONG, L.; CAI, G. *et al.* Targeting EZH2 regulates tumor growth and apoptosis through modulating mitochondria dependent cell-death pathway in HNSCC. **Oncotarget**, 6, n. 32, p. 33720-33732, Oct 2015.

ZHU, X.; ZHANG, F.; ZHANG, W.; HE, J. *et al.* Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. **J Surg Oncol**, 108, n. 6, p. 387-397, Nov 2013.

---

---