



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

CAMILA DA SILVA SOUZA

**EXPRESSÃO DE microRNAs E DISTRIBUIÇÃO DE
PROTEÍNAS RELACIONADOS À ATIVAÇÃO DE
MACRÓFAGOS M2 EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
DE BOCA**

Salvador, BA
2017

CAMILA DA SILVA SOUZA

**EXPRESSÃO DE microRNAs E DISTRIBUIÇÃO DE
PROTEÍNAS RELACIONADOS À ATIVAÇÃO DE
MACRÓFAGOS M2 EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Jean Nunes dos Santos
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Deise Souza Vilas Bôas

Salvador, BA
2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

S0729 Souza, Camila da Silva
Expressão de miRNAs e Distribuição de Proteínas Relacionados à
Ativação de Macrófagos M2 em Carcinoma Escamocelular de Boca /
Camila da Silva Souza. -- Salvador, 2017.
97 f. : il

Orientador: Jean Nunes dos Santos.
Coorientadora: Deise Souza Vilas Bôas.
Dissertação (Mestrado - Pós-graduação em Imunologia) --
Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2017.

1. Carcinoma escamocelular de boca. 2. miRNAs. 3.
Macrófagos. I. Santos, Jean Nunes dos. II. Vilas Bôas, Deise
Souza . III. Título.

Aos meus heróis, **José Marcos e Ivanete Claudia**, os quais nunca mediram esforços para contribuir à minha formação. Que sempre me deram condições de me dedicar integralmente aos estudos. E que com destreza e sabedoria moldaram o meu ser.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a Dr^a. **Deise Souza Vilas Boas**, que com maestria e empenho me conduziu ao longo dessa jornada; pelo imenso prazer em ser sua co-orientanda e desfrutar da sua notável competência, dedicação, comprometimento e ética profissional; por me fazer enxergar o lado positivo das coisas em todas as situações; por vibrar comigo a cada conquista; pelos conselhos, incentivo e confiança; por cada segundo dedicado à minha formação como Mestre; pelo cuidado, carinho, amor e amizade imensuráveis; por ter me dado a honra de desenvolver este trabalho; e por ter contribuído substancialmente para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos **alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Imunopatologia**: Clarice Lira, Deyse Carvalho, Jéssica Teles, Kellyane Dias e Rafael Mercuri, por caminharem comigo ao longo dos últimos anos; pela ajuda crucial na execução deste trabalho; pela grande dedicação e empenho às nossas atividades; pelas experiências laboratoriais compartilhadas e crescimento mútuo; pelas palavras de apoio, torcida e pelos inúmeros momentos de alegrias.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr^o **Alex Torres**, pela orientação durante o meu estágio/tirocínio docente; pela imensa generosidade e confiança passada em sala de aula; pela competência profissional.

Aos **alunos de Histologia Humana da UFBA** que fizeram parte das minhas primeiras turmas como docente substituta, por me fazer ter a certeza de que estou no caminho certo; pela plenitude que me proporcionaram em sala de aula; por confiarem em meu trabalho; pelo carinho e pela dedicação.

Aos **Anjos, Deuses e Santos**, pela proteção.

À minha tia **Arinalva Maria**, pela preocupação e cuidado desde a mais tenra idade; pelo incentivo e conselhos; por despertar em mim o interesse intelectual.

Ao Dr. **Aristides Maltez Filho**, presidente da Liga Baiana Contra o Câncer - HAM, por ter disponibilizado a infra-estrutura do HAM para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas **amigas**, Bárbara Wanna, Dandara Santos e Juliana Paixão, pela amizade pura e sincera; pelo bom sentimento que compartilhamos mesmo com toda a minha ausência; pela admiração, torcida, incentivo e boas vibrações que emanam.

Ao alcalóide do grupo das xantinas, de fórmula química $C_8H_{10}N_4O_2$, popularmente conhecido como **caféina**, pela atuação imprescindível sobre o meu sistema nervoso central.

À Prof^a. Dr^a. **Camila Alexandrina Figueirêdo** e ao Prof. Dr. **Ryan Costa**, que tão gentilmente cederam o Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular do ICS/UFBA para execução da etapa final de biologia molecular; por disponibilizar sua equipe para auxiliar no uso do QuantStudio.

À Prof^a. Dr^a. **Caroline Brandi**, pela disponibilidade em auxiliar quanto ao uso do Qubit.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, na pessoa da Prof^a. Dr^a **Clarissa Araújo Gurgel Rocha**, por disponibilizar a sua equipe para realizar a quantificação do RNA extraído.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq** pela concessão da bolsa de Mestrado que colaborou para a realização deste trabalho.

À **equipe** do Laboratório de Alergia e Acarologia, em especial, Fabian Salazar, Filipe Bevenuto, Gisela Oviedo, Leonardo Santiago, Márcia Barbosa, Rogério Torres e Sara Santos, pela presteza quanto ao uso da centrífuga e do microdrop.

Ao **Departamento de Biomorfologia**, por permitir meu ingresso na equipe de Docentes de Histologia Humana; por permitir a realização do meu Estágio e Tirocínio docente.

Às **Funcionárias da Secretaria do PPGIm** (Aline, Dilcéia e Jussi), pela gentileza e prontidão; pelo carinho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB**, pela concessão do auxílio que financiou o desenvolvimento dos experimentos incluídos neste trabalho.

À minha mãe **Ivanete Claudia**, meu maior exemplo de mulher guerreira. Por seu apoio em todos os momentos de minha vida; pelos sacrifícios, cuidado, dedicação, orações e incentivo; por sempre me fazer acreditar que sou capaz de chegar onde eu quiser.

Ao meu orientador prof^o Dr^o **Jean Nunes dos Santos**, pela oportunidade de ter ingresso na pós-graduação em Imunologia; pela competência profissional e pelo auxílio.

Ao meu pai **José Marcos**, pela dedicação ao cumprir de forma tão honrosa o seu papel de pai. Pelos sacrifícios diários, empenho e proteção, por ter permitido que eu chegasse até aqui e me tornado cada vez mais forte, por sempre dá motivos para eu nunca desistisse.

À **Milca Silva**, pela imensa generosidade e disponibilidade; pela ajuda imensurável; pela competência profissional.

Às **minhas tias** Irlanda Vaz e Arivalda Cerqueira, pela disposição em me ajudar sempre quando precisei; pela torcida; por todo amor.

Aos **Monitores de Histologia da UFBA**, Géssica, Igor, Jailson, Jeane, Lorena, Margarete, Matheus, Nathália, Silvana, Paloma, Tâmara, Sara, Raísa, Raissa, por fazerem parte de um dos meus momentos mais lindos desses últimos anos; por permitirem meu crescimento como docente; pelo auxílio durante as aulas práticas; pelo interesse demonstrado durante as nossas reuniões.

À Prof^a. Dr^a. **Neuza Maria Alcântara Neves** e ao Prof. Dr. **Luís Gustavo Pacheco**, por disponibilizarem o Laboratório de Alergia e Acarologia para a realização das centrifugações na etapa de extração do RNA e quantificação do RNA total.

À minha querida e amada **Thauana Cunha**, por todo bem que me proporciona. Pelos longos anos de amizade e companheirismo; por viver comigo cada lágrima derramada e cada sorriso alargado; pelo incentivo, conselhos, paciência, amor e torcida.

Ao meu irmão **Lincoln Souza**, por me acompanhar ao longo desses 26 anos; por dar motivos para me tornar uma pessoa forte.

Aos **professores de Histologia humana da UFBA**, por me abraçarem durante a minha passagem como professora substituta e durante o estágio/tirocínio docente; pelo apoio, auxílio e carinho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia**, por contribuir para o meu crescimento acadêmico e profissional.

À **Rafael Fonseca**, pela amizade e torcida; pelo apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. **Roberto Meyer** e à Prof^a. Dr^a. **Songeli Menezes**, por ter colocado à disposição o Laboratório de Imunologia do ICS/UFBA (ANEXO 1) para o armazenamento das amostras.

Ao meu irmão **Rodrigo Souza**, por me fazer querer ser uma pessoa sempre melhor; pelo amor.

À Prof^a. Dr^a. **Silvia Lima Costa**, por disponibilizar o Laboratório de Neuroquímica para a confecção das pranchas; pela generosidade em resolver as questões burocráticas viabilizando a minha defesa de dissertação em tempo hábil para a seleção do doutorado; por ter aceitado fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Victor Diogenes Amaral da Silva**, pela imensa generosidade e pela disposição em nos ensinar a manusear o microscópio para a realização das fotográficas das lâminas de IHQ.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

SOUZA, Camila da Silva. EXPRESSÃO DE microRNAs E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADOS À ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS M2 EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA. 97f. 2017. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Os macrófagos M2 são as principais células imunes com função pró-tumoral no microambiente de tumores sólidos. A abordagem de microRNAs (miRNAs) reguladores da função de macrófagos em carcinoma escamocelular de boca (CEB) requer investigação. O objetivo deste trabalho foi examinar em CEB o padrão de expressão de miRNAs relacionados com funções relacionadas aos macrófagos M2, em relação à distribuição tumoral destas células e à classificação histopatológica dos tumores. Após microdissecção, a expressão de miRNAs foi investigada por qRT-PCR em 35 amostras de CEB parafinizadas. Adicionalmente, a semi-quantificação de macrófagos totais (CD68+) e M2 (CD163+ e CD204+) no estroma periparenquimal e no compartimento intraparenquimal foi realizada em amostras correspondentes por imunohistoquímica. As amostras investigadas mostraram expressão desregulada dos miR-511-5p (84,85%), miR-511-3p (81,25%), miR-143-3p (60%) e let-7c-5p (60%). Particularmente, o miR-511-5p exibiu expressão aumentada em 72,73% dos casos. Além disso, os níveis dos miRNAs se apresentaram correlacionados positivamente entre si ($p < 0,05$). Não foi demonstrada associação entre a expressão dos miRNAs e a classificação histopatológica dos tumores. Todos os casos apresentaram presença de macrófagos CD68+, CD163+ e CD204+, com infiltração maciça no estroma periparenquimal. As subpopulações de macrófagos foram positivamente correlacionadas entre si em ambas as microlocalizações ($p < 0,05$), sem diferenças significantes entre a contagem de macrófagos CD68+, CD163+ e CD204+. O número de macrófagos CD68+ no estroma periparenquimal mostrou-se elevado em tumores moderadamente/pouco diferenciados ($p = 0,017$). No entanto, não foi observada correlação entre o número de macrófagos e a expressão dos miRNAs. Nossos dados sugerem que a expressão aumentada do miRNA-511-5p apresenta envolvimento na tumorigênese do CEB. Além disso, semelhanças observadas na infiltração das subpopulações investigadas corroboram com a evidência atual de que no microambiente do CEB os macrófagos apresentam ativação predominantemente alternativa.

Palavras-chave: Carcinoma escamocelular de boca. microRNAs. Macrófagos.

ABSTRACT

SOUZA, Camila da Silva. EXPRESSION OF microRNAs AND DISTRIBUTION OF PROTEINS RELATED TO THE ACTIVATION OF M2 MACROPHAGES IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA. 97f. 2017. Dissertation (Master's degree) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

M2 macrophages are the main immune cells with protumoral function in solid tumor microenvironment. The approach of microRNAs (miRNAs) regulating macrophages function on oral squamous cell carcinoma (OSCC) requires investigation. The purpose of this study was to study in OSCC the expression pattern of miRNAs related to M2 macrophages functions in relation to tumoral distribution of these cells and histopathological grading of tumors. After microdissection, expression of miRNAs was investigated by qRT-PCR in 35 paraffin embedded OSCC samples. Additionally, semi-quantification of total (CD68+) and M2 (CD163+ and CD204+) macrophages in periparenchymal stroma and intraparenchymal compartment were performed in corresponding samples by immunohistochemistry. The investigated samples showed deregulated expression of miR-511-5p (84.85%), miR-511-3p (81.25%), miR-143-3p (60%) and let-7c-5p (60%). Particularly, miR-511-5p exhibited overexpression in 72.73% of the cases. In addition, miRNAs levels were positively correlated ($p < 0.05$). No association between miRNAs expression and histopathological grading of tumors was demonstrated. All cases exhibited presence CD68+, CD163+ and CD204+ macrophages, with massive infiltration in the periparenchymal stroma. The subpopulations of macrophages were positively correlated in both microlocalizations ($p < 0.05$), with no differences between the CD68+, CD163+ and CD204+ macrophages counting. The number of CD68+ macrophages in the periparenchymal stroma was elevated in moderately/poorly differentiated tumors ($p = 0.017$). However, no correlation was observed between number of macrophages and miRNAs expression. Our data suggest that overexpression of miRNA-511-5p presents involvement in OSCC tumorigenesis. Moreover, similarities observed in infiltration of investigated subpopulations corroborates to the current evidence that in OSCC microenvironment the macrophages predominantly express alternative activation.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, microRNAs, macrophages.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ago	do inglês, <i>Argonaute</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>
BUB1B	do inglês, <i>Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B</i>
BV8	do inglês, <i>Prokineticin-2</i>
CCL	do inglês, <i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
<i>CCND1</i>	do inglês, <i>Cyclin D1 gene</i>
CD	do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>
CEB	Carcinoma Escamocelular de Boca
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	do Inglês <i>Cyclooxygenase-2</i>
<i>CSF-1</i>	do inglês, <i>Colony Stimulating Factor 1</i>
DAB	do inglês, <i>3-3' Diamino- Benzidine Tetrahydrochloride</i>
DGCR8	do inglês, <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
Dicer	do inglês, <i>Endoribonuclease Dicer</i>
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>cDNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
<i>Drosha</i>	Ribonuclease III
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EGF	do inglês, <i>Epidermal Growth Factor</i>
FcγRI CD64	do inglês, <i>high-affinity human IgG receptor FcγRI</i>
FcγRIII CD16	do inglês, <i>Low Affinity IgG Receptors FcγRII</i>
FGF	do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
H/E	Hematoxilina/Eosina
HAM	Hospital Aristides Maltez
HMGA2	do inglês, <i>high mobility group AT-hook 2</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IL	do inglês, <i>Interleukin</i>
INF-γ	Interferon Gama

iNOS	Óxido nítrico sintase
IRF4	do inglês, <i>interferon regulatory factor 4</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MACC1	do inglês, <i>MET transcriptional regulator</i>
MDM2	do inglês, Mouse double minute 2 homolog
MHC	do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	Micro RNA
MMP	do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MRC1	do inglês, <i>Mannose Receptor, C Type 1</i>
MYC	do inglês, <i>myelocytomatosis oncogene</i>
NF-kB	do inglês, <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
PACT	proteína ativadora de PKR
PDGF	do inglês, <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDL2	do inglês, <i>Programmed Cell Death Protein 1 ligand 2</i>
pH	do inglês, <i>Potencial Hidrogeniônico ou Potencial Hidrogênio Iônico</i>
PKR	do inglês, <i>protein kinase R</i>
pre-RNA	do inglês, <i>miRNA precursors</i>
pri-miRNA	do inglês Primary miRNA transcripts
PROK2	do inglês, protein called prokineticin 2.
QKI-5	do inglês, quaking I-5 protein
qRT-PCR	do inglês, <i>Real Time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain</i>
RALBP1	do inglês, ralA binding protein 1
RELM α	do inglês, resistin-like molecule alpha
RISC	complexo silenciador induzido por RNA
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
Rock2	proteína cinase associada a Rho-2
SCARD	do inglês, <i>class D scavenger receptors</i>

Skp2	do inglês, <i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SPARC	do inglês, <i>secreted protein acidic and cysteine rich</i>
SR-A	do inglês, <i>class A scavenger receptors</i>
STAT	do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	do inglês, <i>Tumor-associated macrophages</i>
TAR	do inglês, <i>transactivating response</i>
TCR	do inglês, <i>T Cell Receptor</i>
TGF- β	do inglês, <i>Transforming Growth Factor $-\beta$</i>
TH1	do inglês, <i>T helper 1</i>
TH17	do inglês, <i>T helper 17</i>
TIE2	do inglês, <i>Angiopoietin receptor</i>
TLR	do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR	receptor do fator de necrose tumoral
TNM	Sistema de estadiamento clínico
TP53	do inglês, <i>Tumor Protein P53</i>
TRBP	proteína TAR de ligação ao RNA
Treg	Linfócitos T Regulatórios
TRIB2	do inglês, <i>Tribbles Pseudokinase 2</i>
UTR	do inglês, <i>Untranslated Region</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem representativa apresentando lâminas contendo cortes de CEB corados em H/E delimitados para posterior utilização como modelo para a realização das microdissecções que antecederam a extração do RNA..... **51**
- Figura 2.** Imagens representativas da distribuição de células CD68+ (**A, D, G e J**), CD163+ (**B, E, H e K**) e CD204+ (**C, F, I e L**) em CEB evidenciadas por IHQ. Em **A, B, C, D, E e F**, o padrão geral de distribuição das diferentes subpopulações de TAM (CD68+, CD163+ e CD204+) no CEB. Em **G, H e I**, demonstra a elevada infiltração no estroma periparenquimal de macrófagos CD68+, CD163+ e CD204+, respectivamente. A infiltração no estroma periparenquimal da subpopulação M2 de macrófagos CD163+ apresenta em alguns casos distribuição mais elevada em relação à subpopulação M2 CD204+ (**E, F, H e I**). Elevada infiltração intraparenquimal de células CD68+, CD163+ e CD204+ estão demonstradas em **J, K e L**..... **57**
- Figura 3.** Infiltração de células CD68+, CD163+ e CD204+ na região intraparenquimal e no estroma periparenquimal em relação a graduação histopatológica em CEB. As diferentes barras categorizam as marcações CD68+ (em azul), CD163+ (em amarelo) e CD204+ (em cinza) nas duas diferentes microlocalizações. A altura das barras demonstra a mediana de expressão para cada marcador. A linha vermelha tracejada separa o grupo de tumores bem diferenciados e moderadamente/pouco diferenciados..... **58**
- Figura 4.** Expressão do miR-511-5p em 32 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão <0,5) e aumentada (> 2,0) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica..... **59**
- Figura 5.** Expressão do miR-511-3p em 14 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão <0,5) e aumentada (> 2,0) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica..... **59**
- Figura 6.** Expressão do miR-143-3p em 35 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão <0,5) e aumentada (> 2,0) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica..... **60**
- Figura 7.** Expressão do let-7c em 28 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão <0,5) e aumentada (> 2,0) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica. **60**
- Figura 8.** Percentual do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p nas amostras de CEB de acordo com o padrão de expressão. As diferentes barras categorizam os miRNAs como superexpresso (em preto), expressão normal (em amarelo) e subexpresso (em azul), seguindo a legenda. A altura das barras demonstra o percentual de expressão para cada grupo de miRNA..... **61**

Figura 9. Número de alvos do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p experimentalmente comprovados e mencionados no miRTarBase (PAPADOPOULOS et al., 2009). As cores não sobrepostas exibem o número de alvos de cada miRNA específico, miR-511-5p (rosa), miR-511-3p (verde), miR-143-3p (azul) e let-7c-5p (amarelo). As cores sobrepostas exibem intersecções entre o número de alvos que são regulados por mais de um miRNA.....

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Dados pertinentes referentes aos anticorpos primários e ao procedimento de recuperação antigênica.....	49
Quadro 2..	Dados referentes aos ensaios <i>TaqMan® microRNA Assays (Applied Biosystem by Life Technologies)</i> investigados no estudo.....	53
Tabela 1.	Correlação entre a expressão dos marcadores CD68, CD163 e CD204 nas amostras de CEB.....	56
Tabela 2.	Correlação entre a expressão relativa do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c nas amostras de CEB.....	62
Tabela 3.	Associação entre o padrão de expressão dos miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c e a graduação histopatológica de 35 amostras de CEB ^a	62
Tabela 4.	Correlação entre os níveis de infiltrado de células CD68+, CD163+ e CD204+ e os níveis de expressão dos miRNAs investigados nas amostras de CEB.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Carcinoma escamocelular de boca	21
2.2	Inflamação e microambiente tumoral	23
2.3	Macrófagos	24
2.3.1	Definição, origem e função	24
2.3.2	Macrófagos e progressão do tumor	27
2.3.3	Marcadores de macrófagos	28
2.4	miRNAs	32
2.4.1	Definição, biogênese e mecanismo de ação	32
2.4.2	miRNAs e câncer	35
2.4.3	miR-511-5p	36
2.4.4	miR-511-3p	37
2.3.5	let-7c	39
2.3.2	miR-143-3p	42
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	44
4	CAPÍTULO 1: ARTIGO ORIGINAL	45
4.1	INTRODUÇÃO	45
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.2.1	Pacientes e amostras biológicas	47
4.2.2	Exame Histopatológico	47
4.2.3	Técnica Imunohistoquímica	48
4.2.4	Avaliação da marcação imunohistoquímica	50
4.2.5	Microdissecção das amostras	50
4.2.6	Isolamento do RNA e síntese do cDNA	51
4.2.7	Amplificação do cDNA e análise da expressão	52
4.2.8	Análise Estatística	54
4.3	RESULTADOS	55

4.3.1	Infiltração dos macrófagos CD68+ e CD204+ em CEB	55
4.3.2	Expressão dos miRNAs investigados em CEB	58
4.4	DISCUSSÃO	64
5	CONCLUSÃO GERAL	72
	REFERÊNCIAS GERAIS	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

O câncer oral representa a décima segunda neoplasia maligna mais comum no mundo, com taxas elevadas de morbi-mortalidade e baixo índice de sobrevivência dos pacientes (FERLAY *et al.*, 2015; TORRE *et al.*, 2015), sendo o carcinoma escamocelular de boca (CEB) o mais frequente (JOHNSON *et al.*, 1991), representando mais de 90% dos casos de câncer na região oral (MOORE, 2000; BHARGAVA *et al.*, 2010). Constitui uma das poucas doenças orais que manifestam sério risco de morte no Ocidente (PARKIN *et al.*, 2005), e o Brasil concentra uma das maiores taxas mundiais de incidência (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os microRNAs (miRNAs) compõem uma abundante classe de pequenos RNAs não codificadores de proteínas que desempenham papéis significativos na modulação da expressão gênica (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; BARTEL, 2009). A expressão desregulada dessas moléculas vem sendo associada à patogênese de diversas doenças humanas, incluindo o câncer (MANIKANDAN *et al.*, 2015). Inclusive, a expressão exacerbada de miRNAs oncogênicos ou a subregulação de miRNAs considerados supressores tumorais tem demonstrado atuação crítica na tumorigênese (VASUDEVAN *et al.*, 2007). O envolvimento dos miRNAs no câncer (IORIO *et al.*, 2012) indica a sua atuação promissora não apenas como biomarcadores no diagnóstico clínico e prognóstico, mas como potenciais alvos terapêuticos para esta doença (HAMMOND, 2015).

Admite-se que a determinação da assinatura de expressão de miRNAs específicos em determinadas células e/ou tecidos neoplásicos humanos poderá fornecer um importante valor preditivo da doença (CALIN *et al.*, 2005; SQUADRITO *et al.*, 2013). No entanto, grande parcela dos estudos em CEB descrevem os perfis de miRNAs no tecido tumoral total, incluindo não apenas as células malignas e as células do microambiente tumoral, mas outros tecidos (tecido muscular, glândulas, etc.), os quais apresentam expressões de miRNAs em níveis variados (LINDSAY, 2008; MITRA *et al.*, 2012; O'CONNELL *et al.*, 2012; SQUADRITO *et al.*, 2013).

Portanto, a escolha de miRNAs que sejam específicos de uma subpopulação de interesse e o tratamento de microdissecação tecidual é de fundamental importância nesses estudos.

O conceito de polarização dos macrófagos para o perfil de ativação clássico (M1) e/ou alternativo (M2) ainda é bastante relevante entre os imunologistas (SCHULTZE, 2015). Os macrófagos M1 estão intrinsecamente envolvidos na defesa do organismo contra células cancerígenas. Dispõem de elevada atividade fagocítica e de apresentação antigênica, e grande capacidade citotóxica para células advindas de tumores (HEUSINKVELD e VAN DER BURG, 2011). Adicionalmente, contribuem para a ativação de células Th1, importantes efetoras da resposta imune antitumoral adaptativa (ZHANG *et al.*, 2007; ALLAVENA *et al.*, 2008; PINA *et al.*, 2008; WYNN *et al.*, 2013). Por outro lado, os macrófagos M2 apresentam baixa capacidade de apresentar antígenos, poucas propriedades inflamatórias, suprimem a imunidade adaptativa mediada pelas células T *helper* (Th) 1 (ALLAVENA *et al.*, 2008), promovem a neo-vascularização e o remodelamento da matriz extracelular, beneficiando a sobrevivência e propagação das células malignas (WYCKOFF *et al.*, 2007; ALLAVENA *et al.*, 2008; SICA *et al.*, 2012).

Alguns estudos envolvendo o microambiente tumoral nos últimos anos tem focado nas alterações patológicas e desafios relacionados às modificações no estado funcional dos macrófagos (HUME, 2012; WYNN *et al.*, 2013). Contudo, ainda pouco se sabe sobre os perfis de controle transcricional e pós-transcricional relacionados com a diferenciação funcional destas células (HUME, 2008). Sendo assim, a compreensão desses perfis em relação aos macrófagos é fundamental para um melhor entendimento da variedade funcional dessas células (GAUTIER *et al.*, 2012; SCHULZ *et al.*, 2012; SCHULTZE *et al.*, 2015) e do seu papel na tumorigênese. Dentro do nosso conhecimento, até o presente momento nenhum estudo publicado investigou em CEB o perfil de expressão de miRNAs relacionados à ativação de macrófagos. Destarte, neste trabalho propusemos investigar em CEB o padrão de expressão de miRNAs reguladores da polarização/ativação de macrófagos M2 em relação à distribuição macrofágica no tumor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

Entre as alterações malignas que acometem a boca, evidencia-se o carcinoma escamocelular de boca (CEB), que é definido como um tumor maligno originado primariamente de anormalidades do epitélio de revestimento do lábio ou da cavidade oral (BRENER *et al.*, 2007), representando mais de 90% dos casos de câncer originados na boca (BHARGAVA, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2014). Trata-se de uma doença multifatorial e de alta incidência no mundo (RIBEIRO *et al.*, 2009; ZINI *et al.*, 2010; FELLER; LEMMER, 2012; SHENOI *et al.*, 2015). Segundo a estimativa mais recente do GLOBOCAN, as neoplasias orais e de lábio representaram em 2012 aproximadamente 300.373 dos novos casos de câncer em todo mundo, com prevalência de dois terços entre os homens (FERLAY *et al.*, 2015). No Brasil, a distribuição do câncer de boca é dada de forma heterogênea entre os diferentes estados e capitais, correspondendo à quinta principal localização de câncer em homens e décima segunda em mulheres (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Configura-se como uma doença com elevada agressividade, devido à grande capacidade das células neoplásicas malignas realizarem invasão local e se disseminarem (MORENO-LÓPES *et al.*, 2000). Os principais fatores de riscos associados com o surgimento do CEB são o uso de tabaco e álcool (DE MORAIS *et al.*, 2016), infecções virais (JAIN, 2016; KHOT *et al.*, 2016; ANANTHARAMAN *et al.*, 2017) e bacterianas (GHOLIZADEH *et al.*, 2016), deficiências nutricionais, exposição a agentes cancerígenos ambientais, maus hábitos de higiene oral e predisposição a instabilidades genéticas (DHOLAM E CHOUKSEY, 2016).

A origem do CEB normalmente advém de anormalidades do epitélio de revestimento oral, tais como a displasia oral. A displasia oral varia de uma desordem potencialmente maligna até uma lesão de alto grau (carcinoma *in situ*) (KUJAN *et al.*, 2007). Quanto mais acentuada a displasia maiores são as chances das células atípicas invadirem o tecido conjuntivo adjacente, caracterizando a malignidade propriamente dita (ALBERTS *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005).

Os aspectos histopatológicos do CEB são bastante variados, e as células malignas podem apresentar padrões morfológicos distintos, tais como: pleomorfismo e hipercromasia nuclear, alteração na relação núcleo/citoplasma, aumento das mitoses típicas e atípicas, perda da diferenciação celular e outros (ALBERTS *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005). De acordo com o grau de diferenciação celular e organização tecidual os tumores são classificados histopatologicamente em altamente, moderadamente ou pobremente diferenciados (BARNES *et al.*, 2005). Contudo, as noções trazidas pela classificação histopatológica fornecem apenas subsídios complementares para otimizar as informações viabilizadas pelo sistema de estadiamento patológico do tumor (LOURENÇO *et al.*, 2007).

O Sistema TNM, desenvolvido inicialmente por Pierre Denoix, descreve a extensão anatômica de tumores malignos com base na avaliação da dimensão do tumor primário (T0 a T4), ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N0 a N3) e a ausência ou presença de metástase à distância (M0 ou M1), de modo que os números indicam a extensão da doença maligna. Assim, os tumores são agrupados em estádios clínicos que podem variar do I ao IV (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Há muitos anos o sistema de estadiamento do tumor tem sido o método padrão de classificação utilizado para caracterizar os tumores, aconselhar uma estratégia terapêutica mais adequada e estimar a sobrevida do paciente (PATEL e SHAH, 2005). O diagnóstico tardio e a presença de metástases linfonodais são aspectos determinantes na qualidade do prognóstico (POSNER, 2005), sendo que o status dos linfonodos cervicais desempenha um papel decisivo na escolha do tratamento (MAMELLE *et al.*, 1994). Portanto, se faz necessário identificar novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos para auxiliar na detecção precoce da doença e na identificação de pacientes que necessitam de tratamentos mais agressivos, além de vislumbrar melhorias nas atuais estratégias terapêuticas.

2.2 INFLAMAÇÃO E MICROAMBIENTE TUMORAL

A conexão entre a inflamação e o câncer foi observada desde 1863 por Rudolf Virchow, ao identificar a presença de leucócitos distribuídos em tecidos neoplásicos (BALKWIL e MANTOVANI, 2001). Diferentes elementos do infiltrado inflamatório presentes no microambiente do tumor podem atuar em conjunto com as células neoplásicas (DAYAN *et al.*, 2012) e, com inúmeras confirmações moleculares e teciduais, sabe-se que o processo inflamatório se constitui em um componente indispensável à progressão tumoral (COUSSENS e WERB, 2002; MANTOVANI *et al.* 2008; BINDEA *et al.*, 2010; DAYAN *et al.*, 2012). No CEB, assim como em outros tumores sólidos a resposta imune antitumoral é geralmente insuficiente (OCHSENBEIN, 2005; MÜLLER-RICHTER *et al.*, 2009) e há algum tempo acredita-se que o microambiente do tumor é um forte determinante no desenvolvimento da doença (HENDRIX *et al.*, 2007). O microambiente tumoral, coordenado por células inflamatórias em conjunto com sinalizadores moleculares, atua favorecendo a proliferação, sobrevivência e migração celular, com destaque à promoção da angiogênese, invasão e metástase (ALLAVENA *et al.*, 2008; FUKUDA *et al.*, 2012).

O microambiente povoado pelas células malignas é composto predominantemente por componentes celulares, mediadores químicos e tecidos de suporte, como os vasos sanguíneos (ALLAVENA *et al.*, 2008). O componente celular apresenta grande heterogeneidade, com presença de células inflamatórias, fibroblastos associados ao tumor, células musculares lisas e endoteliais (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). No entanto, as células inflamatórias constituem as principais fontes de citocinas (interleucinas (ILs), quimiocinas, fatores de crescimento e fatores pró-angiogênicos) e enzimas que corroboram para o crescimento e progressão tumoral (DAYAN *et al.*, 2012). Entre os componentes celulares inflamatórios destacam-se os macrófagos (MANTOVANI *et al.*, 1992; KAWAMURA *et al.*, 2009; KOMOHARA *et al.*, 2011; DE PALMA *et al.*, 2013) os quais apresentam a capacidade de produzir e responder aos diferentes tipos de mediadores.

2.3 MACRÓFAGOS

2.3.1 Definição, origem e função

A identificação inicial dos macrófagos ocorreu por parte do cientista Ilya Ilyich Mechnikov, que pela enorme contribuição à imunologia foi merecedor do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina juntamente com Paul Ehrlich em 1908 (BROWN, 1995; SCHMALSTIEG *et al.*, 2008). Os macrófagos constituem uma população heterogênea de células mielóides inatas que foram originalmente descritas como células de natureza fagocítica (WYNN *et al.*, 2013). Até então, são definidas como membros do sistema mononuclear fagocítico, que incluem os fagócitos profissionais e os seus progenitores. Em mamíferos adultos, estas células estão distribuídas em praticamente todos os tecidos, exibindo diferentes localizações anatômicas, grande variedade morfológica e funcional (GAUTIER *et al.*, 2012).

Durante muitos anos acreditava-se que a origem dos macrófagos teciduais era exclusiva de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea do feto e em estágios tardios de órgãos hematopoiéticos em adultos. Estas células originam os monócitos, precursores dos macrófagos que circulam no sangue periférico, os quais em resposta aos estímulos inflamatórios se dirigem aos tecidos através de um processo de migração denominado diapedese (TAKAHASHI *et al.*, 1996) e sofrem diferenciação específica, dependendo da sinalização tecidual (WYCKOFF *et al.*, 2007; SICA *et al.*, 2012). No entanto, já se sabe que macrófagos também podem ser originados a partir de células progenitoras que residem nos tecidos, assim como, pela proliferação de macrófagos locais (JENKINS *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2012).

Os macrófagos exibem alta plasticidade fenotípica e comumente são divididos em duas populações: macrófagos inflamatórios classicamente ativados (ou M1) e macrófagos alternativamente ativados (ou M2), com base na expressão de receptores de superfície, produção de mediadores, reatividade ao microambiente (GORDON *et al.*, 2003; WYCKOFF *et al.*, 2007; SICA & MANTOVANI, 2012) e variações no perfil de expressão gênica (GAUTIER *et al.*, 2012; HUME, 2012). Tratam-se de células altamente especializadas e com grande diversidade funcional e, por vezes, extremamente versáteis, participando desde a defesa do organismo

contra agentes patogênicos até o desenvolvimento, manutenção da homeostasia e reparo dos tecidos em praticamente todo o organismo (GEISSMANN *et al.*, 2010).

Nas fases iniciais da inflamação comumente os macrófagos exibem um fenótipo pró-inflamatório e são chamados de macrófagos M1 (MURRAY & WYNN, 2011), considerados potentes efetores na defesa contra patógenos e células malignas. Essa ativação é dada pela ação do interferon-gama (IFN- γ) e/ou após o acoplamento ao receptor do tipo *toll* (TLR), conduzindo à ativação das vias metabólicas do fator nuclear kappa B (NF-kB) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) 1 (WYNN *et al.*, 2013). Conseqüentemente, culmina na liberação de diversos mediadores químicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e azoto, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 e IL-6, corroborando com os mecanismos antimicrobianos e antitumorais (MURRAY & WYNN, 2011). A transdução de sinal pelo NF-kB resulta também na síntese de IL-12 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KARIN & GRETEN, 2005).

Os macrófagos M1 possuem alta habilidade de apresentação antigênica devido a expressão elevada do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (GORDON, 2003). Além disso, sua grande capacidade citotóxica, tanto às células que englobaram micro-organismos quanto para as advindas de tumores, é desinente principalmente da expressão de intermediários tóxicos na sua superfície (ZHANG *et al.*, 2007; ALLAVENA *et al.*, 2008; PINA *et al.*, 2008). Há também produção de IL-12 e IL-23 pelos macrófagos M1, conduzindo à diferenciação e expansão de células T *helper* (Th) 1 e Th17 (células T auxiliares que expressam IFN- γ e IL-17) que corroboram com a inflamação (SICA & MANTOVANI, 2012).

Por sua vez, os macrófagos M2 ou imunossupressores apresentam baixa habilidade na apresentação de antígenos (ALLAVENA *et al.*, 2008), e contribuem para um microambiente imunossupressor através da síntese de diversos mediadores químicos e pela forte atração de células T regulatórias (LIU *et al.*, 2011). Em adição, expressam inúmeras proteínas imunoreguladoras, tais como arginase-1, molécula semelhante à resistina alfa (RELM- α), proteína da morte celular programada 1 ligante 2 (PDL2) e IL-10, que controlam a grandeza e extensão das respostas imunológicas (WYNN *et al.*, 2013). Além disso, são capazes de suprimir efeitos

citotóxicos pela inibição da proliferação de células T CD8+ (KRYCZEK *et al.*, 2006; KUANG *et al.*, 2009), impedir a resposta imune do tipo Th1, promover a neovascularização e o remodelamento da matriz extracelular e, assim, beneficiam a sobrevivência e propagação das células malignas (WYCKOFF *et al.*, 2007; ALLAVENA *et al.*, 2008; SICA *et al.*, 2012), enquanto suprimem a imunidade antitumoral (WYNN *et al.*, 2013). Particularmente, no câncer oral já foi identificada não apenas a elevada infiltração de macrófagos em diferentes graduações de malignidade (VILAS BÔAS *et al.*, 2010), mas a presença dessas células também já foi associada com o mau prognóstico dos pacientes (DAYAN *et al.*, 2012; MARCUS *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2008; COSTEA *et al.*, 2013).

A indução da polarização dos macrófagos para o perfil M2 pode ocorrer pela ação conjunta de citocinas do tipo Th2, como IL-10 e IL-4 ou IL-13, que possuem um sinal de STAT3 e STAT6, respectivamente (HAGEMANN *et al.*, 2008; SICA & MANTOVANI, 2012), pelos níveis reduzidos de IL-12 (ALLAVENA *et al.*, 2008), pela atuação das células T reguladoras produtoras de IL-10, pelo acoplamento ao receptor Fc γ , englobamento de células apoptóticas e pela ação de prostaglandinas (WYNN *et al.*, 2013). O fator de transcrição STAT3 é um dos principais alvos da IL-10, conduzindo à supressão das respostas inflamatórias (YU *et al.*, 2007). Este fator de transcrição age em oposição ao NF- κ B e, conseqüentemente, ambos participam do controle do estado inflamatório das células mielóides (KARIN & GRETEN, 2005; YU *et al.*, 2007).

A depuração de organismos invasores ou células tumorais pelos macrófagos além de trazer efeitos benéficos para o organismo também pode provocar danos aos tecidos. Destarte, a mudança para um fenótipo anti-inflamatório e/ou a apoptose dos macrófagos inflamatórios são importantes para atenuar a resposta inflamatória e evitar o potencial dano tecidual (MURRAY & WYNN, 2011). Portanto, a resposta inflamatória dos macrófagos deve ser controlada de maneira eficiente para que não se torne patogênica e contribua à progressão de comorbidades (SINDRILARU *et al.*, 2011; KRAUSGRUBER *et al.*, 2011). E os mecanismos que controlam as mudanças na polarização dos macrófagos têm um grande impacto na progressão e resolução de inúmeras doenças inflamatórias crônicas, incluindo o câncer (WYNN *et al.*, 2013).

2.3.2 Macrófagos e progressão do tumor

Existem múltiplos fatores que podem contribuir à indução do tumor (ZAIDI *et al.*, 2011; BISWAS *et al.*, 2013) e cada vez mais a inflamação é reconhecida como a causa de muitos tipos de câncer (MANTOVANI & SICA, 2010). Embora os mecanismos pró-inflamatórios forneçam diversos efeitos protetores ao organismo (WYNN *et al.*, 2013), a síntese inicial de mediadores inflamatórios e ROS pelos macrófagos inflamatórios auxilia no estabelecimento da inflamação crônica e pode promover danos ao DNA, transformação maligna e sobrevivência das células neoplásicas, conduzindo à iniciação e promoção da doença (ZAIDI *et al.*, 2011; BALKWILL & MANTOVANI, 2012; BISWAS *et al.*, 2013). No processo de iniciação tumoral, a via de sinalização de NF- κ B é fundamental para o estabelecimento do fenótipo inflamatório (KARIN & GRETEN, 2005). Além disso, a falha nos mecanismos que controlam negativamente a resposta inflamatória também conduz à persistência da inflamação criando um microambiente promotor do tumor (QIAN & POLLARD, 2010).

Por outro lado, como nas fases iniciais da tumorigênese os tumores são provavelmente mais imunogênicos, as células malignas possivelmente promovem um microambiente imunossupressor, com o intuito de escapar da vigilância imunológica, favorecendo a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 (LÚCIO *et al.*, 2016). O estabelecimento de um ambiente imunossupressor comumente leva à promoção da malignidade e progressão tumoral, e estudos clínicos e experimentais apontam atividades pró-tumorais dos macrófagos através da promoção da iniciação, progressão e metástase do tumor (QIAN & POLLARD, 2010). Embora no microambiente tumoral os macrófagos contribuam para uma dinâmica extremamente complexa, podendo assumir ambos os perfis de polarização e, por vezes, compartilhar características dos distintos subtipos, os denominados Macrófagos Associados ao Tumor (TAM) apresentam maior semelhança global com os macrófagos M2, contribuindo fortemente com a promoção da malignidade (COFFELT, HUGHES e LEWIS, 2009; OJALVO *et al.*, 2009; QIAN & POLLARD, 2010; OJALVO *et al.*, 2010).

Em tumores bem estabelecidos, os TAM estimulam a angiogênese, importante para o suprimento e o crescimento tumoral, induzem a invasão e intravasamento, corroborando com o estabelecimento de metástases (QIAN & POLLARD, 2010; DENARDO *et al.*, 2010; HANAHAN e COUSSENS, 2012). No processo de remodelamento tecidual os TAM atuam através da síntese de proteases e outras enzimas que também contribuem no processo, tais como a lisil oxidase e a proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC) (MASON & JOYCE, 2011; HANAHAN & COUSSENS, 2012). A catepsina B, metaloproteinase de matriz (MMP) 2, MMP7 e MMP9 correspondem a algumas das principais proteases que clivam a matriz extracelular e facilitam a invasão e metástase das células malignas (KESSENBROCK *et al.*, 2010; MASON & JOYCE, 2011).

Foi sugerido que a presença do fator estimulador de colônia (CSF) 1, IL-4 e IL-13 no microambiente tumoral contribui para as atividades pró-tumorais dos macrófagos (DENARDO *et al.*, 2010). A síntese de CSF1 e do fator de crescimento epidérmico (EGF) pelas células malignas e TAM, respectivamente, auxiliam na invasão e intravasamento do tumor já vistos em câncer de mama (CONDEELIS e POLLARD, 2006). Em adição, o CSF1 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) contribuem para a atração dos macrófagos pró-angiogênicos (LIN *et al.*, 2007). Além disso, a secreção de extensa variedade de moléculas pró-angiogênicas pelos TAM, tais como a proteína secretada BV8 (PROK2) (SHOJAEI *et al.*, 2007), VEGF, TNF, IL-1 β , IL-8, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (QIAN & POLLARD, 2010; MURDOCH *et al.*, 2008; STOCKMANN *et al.*, 2008) contribui para o aumento da densidade vascular que é fundamental para a transição das células tumorais para o estado maligno (LIN *et al.*, 2006). Ademais, a expressão do receptor de angiopoietina (TIE2) pelos TAM é essencial à promoção da angiogênese tumoral (MAZZIERI *et al.*, 2011; MURDOCH *et al.*, 2008).

2.3.3 Marcadores de macrófagos

As investigações de macrófagos nos tecidos são realizadas pelo reconhecimento de marcadores particulares, os quais nem sempre estão totalmente

restritos a esse tipo celular, mas que são amplamente utilizados de forma combinada (LAVIN E MERAD, 2013) e/ou isolada à identificação dessas células (KOMOHARA *et al.*, 2015). Entre os marcadores expressos pelos macrófagos nós temos os receptores Csf1 CD115, o FcγRI CD64 e o FcγRIII CD16, e os receptores do tipo *scavenger*: CD68 (LAVIN E MERAD, 2013), CD163, CD204 e CD206 (KOMOHARA *et al.*, 2006; KAKU *et al.*, 2014; KOMOHARA, JINUSHI, TAKEYA, 2014; KOMOHARA *et al.*, 2015).

Desde a descoberta e purificação dos receptores *scavenger*, também conhecidos como receptores de limpeza, diversas classificações para os membros pertencentes a este grupo foram propostas, e a classificação mais atual consiste em oito classes (A-H) de receptores *scavenger*. Trata-se de uma grande família de receptores de superfície celular com estruturas diversas, expressos principalmente em células da linhagem mielóide, que interagem com uma vasta quantidade de ligantes e desempenham diversas funções biológicas, incluindo endocitose, fagocitose, adesão e sinalização, podendo conduzir à eliminação de substâncias nocivas ou degradadas (MURPHY *et al.*, 2005; PRABHUDAS *et al.*, 2014). Na superfície dos macrófagos há um grande repertório de receptores *scavenger*, devido ao envolvimento primário dessas células na depuração de agentes patogênicos, partículas citotóxicas e células mortas (PENBERTHY e RAVICHANDRAN, 2016). Portanto, a investigação imunohistoquímica de macrófagos no microambiente tumoral comumente ocorre através da marcação desses receptores na superfície celular (OHTAKI *et al.*, 2010; KOMOHARA *et al.*, 2015; ESSA *et al.*, 2016).

O CD68 consiste em uma glicoproteína transmembranar do tipo I, altamente glicosilada (HOLNESS & SIMMONS, 1993), pertencente ao grupo de receptores *scavenger* do tipo D (SCARD) (MOORE & FREEMAN, 2006). Este receptor é reconhecido como uma molécula pan-macrofágica (GOTTFRIED *et al.*, 2008), apresentando expressão elevada em células da linhagem de fagócitos mononucleares, tais como macrófagos, microglia, osteoclastos e células dendríticas mielóides (GREAVES & GORDON, 2002). Ademais, há também uma expressão ínfima desse marcador nas células linfóides, células não hematopoiéticas, tais como fibroblastos e células endoteliais, e nas células tumorais (GOTTFRIED *et al.*, 2008).

O papel do CD68 na célula durante as respostas imunológicas ainda não está claramente elucidado (BAROIS *et al.*, 2002; CHISTIakov *et al.*, 2016). Até o momento, não foi demonstrado o envolvimento desta molécula nas respostas imunológicas inata ou adaptativa, e acredita-se que não exista atuação desse receptor na defesa do organismo contra agentes patogênicos virais e/ou bacterianos (SONG *et al.*, 2011). Embora a superfície dos macrófagos exiba expressão afluente do CD68 (VAN DER KOOIJ *et al.*, 1997), esta molécula encontra-se preferencialmente localizada no compartimento endossomal/lisossomal da célula (HOLNESS & SIMMONS, 1993), sugerindo um possível papel no transporte de peptídeos e processamento antigênico (BAROIS *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2011).

Considerando que o microambiente tumoral é abundantemente povoado por macrófagos (SOEDA *et al.*, 2008; KAWAMURA *et al.*, 2009; KOMOHARA *et al.*, 2011; SICA & MANTOVANI, 2012; DE PALMA *et al.*, 2013), diversas pesquisas consideram a positividade ao CD68 indicativo do reconhecimento dessas células no microambiente do tumor (KOMOHARA *et al.*, 2015). E ainda hoje a identificação deste marcador é considerada uma ferramenta preciosa para investigar o grau de malignidade do tumor, estágio e potencial metastático (CHISTIakov *et al.*, 2016). Porém, levando em consideração que o microambiente tumoral exibe subpopulações de macrófagos com atividades antitumorais (TAGLIABUE *et al.*, 1979) e/ou protumorais (BINGLE *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2002; POLLARD, 2004), o emprego de anticorpos anti-CD68 nas análises imunohistoquímicas permite o reconhecimento tanto de macrófagos M1 quanto M2 (OHRI *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2014). Portanto, o uso exclusivo desse marcador não deve ser adotado como parâmetro para associações entre a quantidade de macrófagos M1 ou M2 com as características clínico-patológicas dos pacientes, necessitando o emprego de marcadores específicos à subpopulação de interesse (HEUSINKVELD & VAN DER BURG, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2013; ESSA *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014; KOMOHARA *et al.*, 2015).

O CD204 corresponde a um dos principais receptores *scavenger* expresso em macrófagos humanos e pertence à classe A desses receptores, SR-A ou SCARA1 (PLATT & GORDON, 2001; TOMOKIYO *et al.*, 2002). O SR-A/CD204 foi o primeiro membro clonado e molecularmente caracterizado da família (PLATT & GORDON,

2001; MURPHY *et al.*, 2005) e desempenha importantes papéis na inflamação, imunidade inata e defesa do hospedeiro (KELLEY *et al.*, 2014). Atua na adesão celular (FRASER *et al.*, 1993) e seu envolvimento nas interações célula-célula, entre macrófagos e células malignas já foi demonstrado (NEYEN *et al.*, 2013). Além disso, participa do reconhecimento de padrões moleculares no sistema imune inato, ligando-se a uma grande diversidade de ligantes polianiônicos, incluindo moléculas quimicamente modificadas, em particular lipoproteínas modificadas (PLATT & GORDON, 2001) e constituintes chaves da parede de bactérias (KRIEGER *et al.*, 1993; PEARSON, 1996; PLATT & GORDON, 2001; PEISER; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2002; MUKHOPADHYAY & GORDON, 2004; PLUDDMANN, MUKHOPADHYAY, GORDON, 2011). Em adição, o CD204 também está envolvido na apresentação antigênica, na homeostase do organismo e na patogênese de desordens neurodegenerativas (GORDON, 2002; WILKINSON *et al.*, 2012).

A expressão do CD204 está mais restrita aos macrófagos alternativamente ativados (GORDON, 2003; KOMOHARA *et al.*, 2014) e estudos imunohistoquímicos de neoplasias malignas identificaram que a expressão elevada do CD204 está limitada aos TAM, associando essa expressão com um potencial maligno elevado das células tumorais (KOMOHARA *et al.*, 2008; KOMOHARA *et al.*, 2011; YOSHIKAWA *et al.*, 2012; SHIGEOKA *et al.*, 2013; HIRAYAMA *et al.*, 2012).

Outro marcador específico e valioso para a identificação de macrófagos imunorreguladores é o CD163 (GRAVERSEN *et al.*, 2002). A positividade a esta molécula já foi demonstrada em diferentes neoplasias malignas e associada a presença de macrófagos no microambiente tumoral (COMITO *et al.*, 2014; MANIECKI *et al.*, 2012), incluindo no CEB (FUJITA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; WEBER *et al.*, 2015; LUCIO *et al.*, 2016; VALVERDE *et al.*, 2016; WEBER *et al.*, 2016). Esta molécula pertence a classe B da superfamília de receptores scavenger ricos em cisteína (SRCR-SF) (SARRIAS *et al.*, 2004; FABRIEK *et al.*, 2005), e está presente especificamente na superfície de monócitos e macrófagos (SANCHEZ *et al.*, 1999; AKILA *et al.*, 2012). O aumento da expressão do CD163 faz parte da maturação do monócito para macrófago fagocítico e, assim, os macrófagos teciduais apresentam maior expressão da molécula (SANCHEZ *et al.*, 1999). Ademais, o aumento da expressão do CD163 é fortemente influenciado pela

IL-6, IL-10 e glicocorticoides, o contrário ocorre na presença de LPS e IFN- γ (HÖGGER *et al.*, 1998; RITTER *et al.*, 1999).

As funções biológicas mais conhecidas do CD163 estão na depuração da hemoglobina livre complexada a haptoglobina (KRISTIANSEN *et al.*, 2001; GRAVENSEN *et al.*, 2002; MOESTRUP *et al.*, 2004; GUETTA *et al.*, 2007) e desempenhando papéis imunorreguladores. Durante a resposta anti-inflamatória os monócitos que expressam CD163 são atraídos para o sítio da inflamação (ZWADLO *et al.*, 1987; RESNICK *et al.*, 1994; MOESTRUP *et al.*, 2004; BÄCHLI *et al.*, 2006) e acredita-se que esta molécula esteja envolvida na adesão dos monócitos às células endoteliais (BRUCE *et al.*, 2005; BUECHLER *et al.*, 2000; VILA *et al.*, 2000; WENZEL *et al.*, 2006). Assim, tecidos inflamados comumente apresentam grande infiltração de macrófagos CD163+ que participam na modulação negativa da resposta inflamatória (WEAVER *et al.*, 2007).

2.4 MICRORNAS

2.4.1 Definição, biogênese e mecanismo de ação

Os microRNAs (miRNAs) constituem uma abundante classe de pequenos RNAs não codificantes de proteínas que induzem o silenciamento gênico em nível pós-transcricional (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; BARTEL, 2009). Os primeiros estudos que identificaram a função reguladora de miRNAs foram realizados em nematódeos do gênero e espécie *Caenorhabditis elegans*, revelando a capacidade dessas moléculas em bloquear a síntese proteica (WIGHTMAN *et al.*, 1993; OLSEN e AMBROS 1999; SEGGERSON *et al.*, 2002). Atualmente, centenas de miRNAs já foram identificados em diferentes genomas animais, incluindo mais de 2000 miRNAs em humanos (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2004; GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006).

As regiões do genoma que codificam determinados miRNAs normalmente diferem das regiões que codificam os mRNAs regulados por estas moléculas, indicando que estes derivam de unidades de transcrição independentes (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2001; LEE e AMBROS, 2001). Além disso, aproximadamente um quarto dos miRNAs humanos não são transcritos a partir de

seus próprios promotores, sendo provenientes de regiões intrônicas de pré-mRNAs e, conseqüentemente, o seu processamento é dado em conjunto com os mRNAs previstos (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2003).

A maquinaria de processamento dos miRNAs está presente na maioria dos eucariotos, indicando a grande conservação da regulação da expressão gênica pelos miRNAs ao longo da evolução (BARTEL, 2009). O processo de maturação dessas moléculas envolve uma via metabólica complexa que se inicia no núcleo e se estende até o citoplasma celular (CATALANOTTO, COGONI, ZARDO, 2016), levando à conversão do transcrito primário do miRNA (pri-miRNA) em um miRNA maduro com aproximadamente 22 nucleotídeos. Embora existam dois caminhos que conduzam à biogênese do miRNA, a via canônica é a responsável pela síntese da grande maioria das famílias de miRNAs (HAMMOND *et al.*, 2015).

A via canônica se inicia no núcleo celular com a atuação da RNA polimerase II ao transcrever uma longa fita de tamanho variável do pri-miRNA a partir de um determinado gene específico ou íntron. Os pri-miRNAs são grandes moléculas que formam ganchos sucessivos com uma extremidade 5' 7mG cap e uma cauda 3' poli-A e, por vezes, contém várias sequências para a geração de miRNAs distintos. Após a sua síntese, o pri-miRNA é processado pelo complexo microprocessador, formado por uma nuclease da família da RNase III (Drosha), pela proteína de ligação ao RNA de cadeia dupla (Pasha) e pelo Gene da região 8 da região da síndrome de *Digeorge* (DGCR8). Como resultado, há formação do miRNA precursor em forma de um único gancho, o pré-miRNA. A seguir, o transportador de membrana, exportina 5, conduz o pré-miRNA para o citoplasma da célula (DENLI *et al.*, 2004). No citoplasma, a endonuclease Dicer, juntamente com seus cofatores, a proteína TAR de ligação ao RNA (TRBP) e a proteína ativadora de PKR (PACT), dão continuidade ao processamento do pré-miRNA, clivando-o e gerando um miRNA de dupla fita ou duplex (CHENDRIMADA *et al.*, 2005; KOK *et al.*, 2007; MACRAE *et al.*, 2008).

As duas fitas do miRNA duplex são então separadas e, comumente, apenas uma delas é potencialmente selecionada para atuar como um miRNA funcional, enquanto a outra é geralmente degradada. A fita é selecionada com base na estabilidade da extremidade 5'. O miRNA, agora maduro, é então incorporado ao

complexo silenciador induzido por RNA (RISC), dirigindo-se aos mRNA alvos e conduzindo diretamente ou indiretamente a repressão da tradução (DIEDERICHS e HABER, 2007; RANA, 2007; HAMMOND *et al.*, 2015). Ainda não está clara a estrutura exata do complexo RISC, mas sabe-se da existência da proteína essencial argonaute (Ago), existindo quatro membros desta família em humanos (Ago1-4) (TABARA *et al.*, 1999; HAMMOND *et al.*, 2001). Em alguns casos, ambas as fitas do miRNA duplex geram miRNAs maduros (LAGOS-QUINTANA *et al.* 2001; LAU *et al.*, 2001; LEE e AMBROS, 2001) e são então carregados pelo complexo RISC para desempenharem seus papéis. Assim, os miRNAs originados a partir da extremidade 5' ou 3' são denominados como "5p" ou "3p", respectivamente (YANG *et al.*, 2011).

Embora a biossíntese de grande parte dos miRNAs ocorra através da via canônica, alguns miRNAs são formados a partir da via alternativa, principalmente os miRNAs originados de regiões intrônicas (mirtrons) (BEREZIKOV *et al.*, 2007; OKAMURA *et al.*, 2007; RUBY *et al.*, 2007; BABIARZ *et al.*, 2008). Nesta via, as extremidades do pré-miRNA são geradas por clivagem em eventos de *splicing*. Posteriormente, o produto é levado para o citoplasma para ser processado pela endonuclease Dicer e, em seguida, prossegue com as demais etapas da via canônica. Adicionalmente, existem alguns miRNAs que se originam em um processo independente de Dicer (CHELOUFI *et al.*, 2010; CIFUENTES *et al.*, 2010; YANG e LAI, 2010). Neste caso, após a clivagem por Drosha, o pré-miRNA formado se liga diretamente ao Ago2 no complexo RISC (DIEDERICHS e HABER, 2007).

O mecanismo de silenciamento de genes é determinado pelo nível de complementaridade entre miRNA e seu alvo, podendo ocorrer a inibição da tradução quando a complementaridade é incompleta, ou a clivagem do mRNA com posterior degradação quando a complementaridade é completa (BARTEL, 2004; PERRON & PROVOST, 2008). Enquanto nas plantas o pareamento entre miRNA e mRNA costuma ocorrer de forma perfeita (RHOADES *et al.* 2002), nos animais a complementaridade entre bases nitrogenadas ocorre de forma imperfeita (REINHART *et al.*, 2000). Conseqüentemente, como no organismo humano os miRNAs possuem pequenas sequências de nucleotídeos que não exibem obrigatoriedade de interação completa com o mRNA, um único miRNA é capaz de silenciar simultaneamente dezenas a centenas de genes por meio de ligação direta

às regiões não traduzidas (3'-UTR) do mRNA alvo. Além disso, miRNAs distintos podem cooperar na regulação de um único gene alvo (LEE *et al.*, 1993; BARTEL, 2004; GRIMSON *et al.*, 2007; CROCE *et al.*, 2009).

2.4.2 miRNA e câncer

Embora grande parte das funções biológicas dos miRNAs permaneçam incertas, é sabido que pelo menos 20-30% de todo o genoma humano é potencialmente regulado por estas moléculas (LEWIS *et al.*, 2005). miRNAs controlam inúmeros processos biológicos, com destaque para os processos de proliferação, diferenciação, apoptose e metabolismo celular (BRENNECKE *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003; DI LEVA *et al.*, 2006, BARTEL, 2009). A expressão dos miRNAs ocorre de forma constitutiva ou pode ser influenciada pelo desenvolvimento (LEE *et al.*, 1993; LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002; REINHART *et al.* 2002).

Algumas células e/ou tecidos apresentam padrões de expressão de miRNAs, que podem estar desregulados em condições patológicas, a exemplo do câncer (BARTEL, 2009; CROCE, 2009; KASINSKI & FOLGA, 2011). Esta desregulação pode ser proveniente de condições diversas, tais como deficiências genéticas adquiridas na maquinaria de processamento do miRNA (KUMAR *et al.*, 2007), mutações no DNA, alterações no número cópias, alterações epigenéticas e desregulação na transcrição (CROCE, 2009; RYAN *et al.*, 2010; KASINSKI & SLACK, 2011), além de sinais celulares dinâmicos (SMALHEISER, 2008).

Calin *et al.* (2002) documentaram pela primeira vez evidências da diminuição da expressão de miRNAs no câncer, em consequência da supressão cromossômica 13q14.3 na leucemia linfocítica crônica de células B. Desde então, diversos miRNAs já foram classificados funcionalmente como proto-oncogenes ou supressores de tumor (WONG *et al.*, 2008; KOZAKI *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2007; HEBERT *et al.*, 2007; CROCE, 2009; CHEN *et al.*, 2012) e a expressão alterada dessas moléculas vem sendo descrita em diversas neoplasias malignas (BUFALINO *et al.*, 2015; HILLY *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2016; WENG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016). A elevação

da expressão de miRNAs oncogênicos e/ou a diminuição da expressão de miRNAs supressores tumorais já foi identificada em alguns tumores sólidos e hematológicos, apontando a influência dessas moléculas no processo de desenvolvimento, invasão local e metástase do tumor (CALIN *et al.*, 2005; YANAIHARA *et al.*, 2006; CROCE, 2009; RYAN *et al.*, 2010; KASINSKI & SLACK, 2011).

2.4.3 miR-511-5p

O miRNA-511 é um miRNA intrônico identificado em humanos e camundongos, e que está localizado no quinto intron do gene *MRC1* dos TAM (SQUADRITO *et al.*, 2012). Portanto, durante a transcrição do *MRC1*, há também a síntese desse miRNA (SQUADRITO *et al.*, 2012; MONIKA *et al.*, 2016). Neste processo há formação de dois miRNAs maduros, o miR-511-5p e miR-511-3p, provenientes da terminação 5' e 3' dos seus pré-miRNAs, respectivamente (SQUADRITO *et al.*, 2012). Diante disso, macrófagos (GORDON e MARTINEZ, 2010) e células dendríticas (TAYLOR *et al.*, 2005) que exibem elevada expressão do CD206, comumente exibem de forma elevada o miR-511 (TSEREL *et al.*, 2011).

Segundo o miRDB, em humanos um total de 617 genes foram preditos como alvos do miR-511-5p (WONG & WANG, 2015). Alguns desses genes desempenham papéis na qualidade de oncogenes e outros atuam como supressores tumorais, sendo que 124 deles já foram experimentalmente validados e mencionados no miRTarBase (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). Um exemplo é o *TRIB2*, um oncogene reconhecidamente associado a diversas malignidades humanas (YOKOYAMA e NAKAMURA, 2011), cuja elevação na expressão contribui para a patogênese da leucemia mielóide (KEESHAN *et al.*, 2006) e à proliferação de células malignas em adenocarcinoma pulmonar (ZHANG *et al.*, 2012). Outro alvo desse miRNA é o *TRIM24* que está envolvido na iniciação tumoral e na progressão maligna em diversas neoplasias (FANG *et al.*, 2017).

Recentemente, em modelo de leucemia mielóide aguda utilizando linhagens de monoblastos humanos, Katrin *et al.* (2016) identificaram a capacidade do miR-511-5p de indiretamente induzir a superexpressão do ligante de quimiocina (*CCL*) 2,

MMP9 e *IL1B*, assim como de forma direta regular negativamente a expressão do *PDGFA* e do *CCND1*. Assim, acredita-se que os papéis antitumorais do miR-511-5p na tumorigênese estão voltados para a regulação de alvos envolvidos em processos de quimiotaxia à vigilância imunológica (LEGDEUR *et al.*, 2001), mobilização de células progenitoras hematopoiéticas (PRUIJT *et al.*, 1999), angiogênese, proliferação das células malignas e metástase (TRIPURANI *et al.*, 2013) e, especificamente dentro do contexto de interesse do nosso trabalho, diferenciação de monócitos (CHAN *et al.*, 1997; REIKVAM *et al.*, 2010) e migração de macrófagos (GONG *et al.*, 2008).

Tserel *et al.* (2011) identificaram através de ensaios *ex vivo* com macrófagos e células dendríticas derivadas da medula óssea uma potente modulação positiva da expressão do TLR-4 desempenhada pelo miR-511-5p. O envolvimento de TLRs no desenvolvimento de neoplasias tem sido descrito na literatura, sendo influenciado pela extensão e duração da ativação desses receptores. Embora a ativação exacerbada dos TLRs favoreça um perfil de resposta anti-tumoral, a ativação desses receptores em menor proporção e de forma crônica favorece um estado pró-tumoral (PRADERE *et al.*, 2014). Além disso, as próprias células malignas podem controlar a expressão dos TLRs nas superfícies das células imunes (RICH *et al.*, 2014). Em linhagens de CEB humano já foi descrita a correlação entre alto nível de expressão do TLR4 com lesões histopatologicamente bem diferenciadas (SUN *et al.*, 2012), indicando um possível envolvimento anti-tumoral deste receptor para esta lesão.

2.4.4 miR-511-3p

Em humanos, um total de 183 genes alvos do miR-511-3p foram preditos através de duas ferramentas distintas, o *Targetscan* (LEWIS *et al.*, 2005) e o *DIANA microT* (MARAGKAKIS *et al.*, 2009). Estes alvos estão principalmente envolvidos com os processos biológicos relacionados com a morfogênese celular, metabolismo e transcrição (HUANG *et al.*, 2009; SQUADRITO *et al.*, 2012). Atualmente, o número de genes preditos do miR-511-3p aumentou para um total de 383 genes alvos segundo o miRDB (WONG e WANG, 2015). Destes, quase que totalidade dos alvos

já foram experimentalmente validados e mencionados no miRTarBase (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009).

Após ensaios *in vitro* e *in vivo* investigando ambas as cadeias do miR-511, Squadrito *et al.* (2012) sugeriram que apenas o miR-511-3p corresponde à cadeia ativa do miRNA-511, que está presente preferencialmente em TAM MRC1+. Além disso, observaram *in vivo* uma produção muito mais acentuada do miR-511-3p em relação ao miR-511-5p em TAM MRC1+ obtidos em ensaios envolvendo células tumorais mamárias. Em adição, a produção do miRNA-511-3p foi 10 vezes maior em TAM MRC1+ do que TAM CD11c+, indicando que a síntese desse miRNA é fortemente influenciada pela transcrição do MRC1.

A transcrição do gene *Mrc1* e consequente produção do miR-511-3p em TAM MRC1+ atenua as funções pró-tumorais dessas células por um processo de *feedback* negativo. Segundo os autores, isto ocorreria como consequência do silenciamento direto e/ou indireto de programas gênicos pró-tumorais pelo miR-511-3p, influenciando negativamente o crescimento do tumor (SQUADRITO *et al.*, 2012). O estroma tumoral perivascular é abundantemente povoado por TAM MRC1+, os quais auxiliam no processo de morfogênese vascular no microambiente do tumor (MAZZIERI *et al.*, 2011; SQUADRITO & DE PALMA, 2011). Os TAM MRC1+ exibem diversos genes relacionados com a síntese de proteínas da matriz extracelular, incluindo a proteína colágeno, os quais são potencialmente modulados negativamente pela superexpressão do miR-511-3p nessas células, influenciando na dinâmica da matriz (SQUADRITO *et al.*, 2012).

O miR-511-3p tanto em camundongos quanto em humanos regula diretamente a proteína cinase associada a Rho-2 (Rock2) *in vitro*, levando à baixos níveis tanto da proteína quanto do mRNA em TAM MRC1+ (SQUADRITO *et al.*, 2012). A Rock2 corresponde ao principal alvo predito (WONG & WANG, 2015) e experimentalmente comprovado do miRNA (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). Trata-se de uma molécula importante para a regulação da contração do citoesqueleto celular (SAMUEL *et al.*, 2011) e para a fosforilação do IRF4, um fator de transcrição que promove a ativação alternativa de macrófagos. A sua ativação constitutiva em células epiteliais conduz à maior produção de colágeno e rigidez tecidual

(SQUADRITO *et al.*, 2012). Conseqüentemente, ambos os processos corroboram à proliferação e invasão das células neoplásicas e com o aumento da malignidade (LEVENTAL *et al.*, 2009; EGEBLAD *et al.*, 2010). Apesar das proteínas fibrosas da matriz extracelular serem produzidas especialmente por fibroblastos e por células epidérmicas (KALLURI e ZEISBERG, 2006; EGEBLAD *et al.*, 2010), estudos *in vitro* apontam que os macrófagos também podem expressar esses componentes em cultura (SCHNOOR *et al.*, 2008).

A expressão elevada do miR-511-3p em células derivadas da medula óssea está associada com a desregulação da angiogênese tumoral, levando às alterações na arquitetura da rede microvascular no microambiente do tumor, com a formação de vasos tortuosos semelhantes a glomérulos, e com a inibição do crescimento tumoral (SQUADRITO *et al.*, 2012).

2.4.5 let-7c

O primeiro miRNA descoberto em espécies de nematódeos foi o let-7, através da identificação do seu papel na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*, classificando-o como um miRNA heterocrônico (REINHART *et al.*, 2000). Trata-se de um miRNA com nível elevado de conservação evolutiva, presente em muitas espécies de animais, desde os nematódeos até os humanos (PASQUINELLI *et al.*, 2000; HERTEL *et al.*, 2012; HOSUK *et al.*, 2016). No entanto, diferentes espécies podem apresentar isoformas distintas do let-7, de modo que os animais superiores apresentam múltiplas isoformas desse miRNA.

Nos humanos, a família let-7 é formada por nove membros maduros com sequências diferentes (let-7a, -7b, -7c, -7d, -7e, -7f, -7g, -7i e miR-98). Estes são codificados em 12 locais genômicos distintos e, por vezes, alguns encontram-se agrupados, conduzindo à sua codificação juntamente com outros membros da família ou com outros miRNAs não relacionados. As sequências gênicas dos miRNAs let-7g e let-7i estão acomodadas individualmente em diferentes cromossomos. No entanto, os demais membros da família let-7 estão distribuídos

em quatro grupos (*clusters* 1 a 4, com alguns subgrupos). O let-7c pertence ao *cluster* 1-b juntamente com as sequências para a codificação de outros miRNAs (EMMIRICH *et al.*, 2014), além disso, a biogênese do let-7c ocorre pela via canônica sem a participação de etapas adicionais (HEO *et al.*, 2012; HILLY *et al.*, 2016).

Devido a conservação do let-7 ao longo da evolução, acredita-se que esse miRNA atue desempenhando papéis essenciais em processos biológicos de diferentes espécies (PASQUINELLI *et al.*, 2000; HERTEL *et al.*, 2012). Embora seja um miRNA onipresente nas células dos mamíferos adultos (SEMPERE *et al.*, 2004), a expressão de cada membro da família let-7 é rigorosamente controlada na dependência do contexto (HOSUK *et al.*, 2016). Por vezes, determinados subconjuntos dessa família podem estar enriquecidos em tecidos, linhagens celulares e/ou neoplasias específicas, porém escassos em outras condições (BOYERINAS *et al.*, 2010; CHIU *et al.*, 2014). Embora o envolvimento do let-7c na polarização de macrófagos para o perfil M2 já tenha sido descrito na literatura, nenhuma investigação buscou identificar a expressão do let-7c nos TAM (BANERJEE *et al.*, 2013).

Em humanos, 622 genes alvos do let-7c-5p já foram experimentalmente validados através de diferentes técnicas e mencionados no miRTarBase (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). Alguns desses genes desempenham papéis importantes como oncogenes (tais como E2F5, RAS, HMGA2 e MYC), na modulação do ciclo celular e na regulação da divisão das células (NADIMINTY *et al.*, 2012). Ademais, outros alvos do let-7c envolvidos com o ciclo celular também já foram preditos, tais como o TP53 (MDM4), o Skp2 e o BUB1B (XIONG *et al.*, 2014). Portanto, a desregulação do let-7c pode conduzir ao desenvolvimento e/ou progressão de neoplasias, e a sua performance sobre a inibição do crescimento tumoral ou metástase (ZHAO *et al.*, 2013; NADIMINTY *et al.*, 2012) faz desse miRNA uma molécula promissora como marcador molecular e como potencial agente terapêutico no tratamento de neoplasias (NADIMINTY *et al.*, 2012).

A desregulação do let-7c-5p tem sido sugerida em variadas neoplasias malignas humanas (XIONG *et al.*, 2014). Em pacientes portadores de câncer prostático Chen *et al.* (2012) e Knyazev *et al.* (2016) identificaram a diminuição

plasmática da expressão do hsa-let-7c-5p em comparação com pacientes com hiperplasia da próstata. Em amostras teciduais do mesmo tipo de câncer, Ren *et al.* (2014) também identificaram a subexpressão desse miRNA e associaram positivamente com a capacidade de desenvolver metástases. Ademais, a mesma subregulação foi observada em amostras teciduais de câncer pancreático (ALI *et al.*, 2012), carcinoma endometrial (XIONG *et al.*, 2014), sarcomas endometriais (KOWALEWSKA *et al.*, 2013), entre outros tipos de neoplasias malignas. Em carcinoma de nasofaringe Wang *et al.* (2014) associaram a subexpressão do let-7c plasmático com um pior prognóstico. Em culturas com linhagens de células humanas a regulação negativa do hsa-let-7c-5p foi vista em câncer de pulmão de células não pequenas (ZHAO *et al.*, 2014), câncer de próstata (NADIMINTY *et al.*, 2012) e em células pancreáticas cancerígenas resistentes a gemcitabina, sugerindo o seu papel como supressor tumoral (LI *et al.*, 2009).

No entanto, para o CEB o único trabalho publicado demonstrando o envolvimento do let-7c na doença se restringe aos tumores de língua. Nesse estudo, Hilly *et al.* (2016) identificaram a superexpressão do let-7c em amostras teciduais malignas de pacientes jovens. Ademais, constataram que tumores mais agressivos apresentam maior expressão desse miRNA. Levando em consideração ao perfil de desregulação do let-7c em outras neoplasias, os autores sugerem que pacientes jovens portadores de carcinoma escamocelular de língua agressivo apresentam um perfil de assinatura para os membros da família let-7 distinto dos pacientes adultos. Assim, indicam a necessidade de comparações entre a expressão desses miRNAs entre pacientes jovens e mais velhos.

O oncogene mielocitomatose (MYC) foi evidenciado como alvo do hsa-let-7c (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). Devido o papel do MYC na regulação do crescimento celular, influenciando tanto na proliferação quanto na apoptose da célula, mutações ou ampliações nesse oncogene têm sido descritas em neoplasias humanas (PELENGARIS *et al.*, 2002). O TP53 é outro gene predito como alvo desse miRNA (XIONG *et al.*, 2014), responsável pela codificação da proteína p53, considerada guardiã do genoma decorrente do papel essencial que exerce na supressão tumoral (LANE, 1992). Adicionalmente, a endonuclease Dicer também foi descrita como alvo do hsa-let-7c-5p (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). De acordo com

Jakymiw *et al.* (2010) o envolvimento do let-7c afetando a biologia de tumores pode ocorrer através da modulação da expressão de Dicer. A subregulação de Dicer foi identificada em câncer de colo de útero (HE *et al.*, 2014) e adenocarcinomas de próstata e de pulmão (CHIOSEA *et al.*, 2006; CHIOSEA *et al.*, 2007).

O CDK4 constitui um importante membro da família cinase dependente de ciclina envolvida na progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (MILIANI *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2014) identificaram o envolvimento da expressão exacerbada dessa molécula com um prognóstico desfavorável em carcinoma de nasofaringe. Foi observado que a repressão de CDK4 conduz ao aumento do supressor tumoral let-7c através da modulação da via de sinalização da transição das células de G1 para S e, conseqüentemente, levou à supressão do crescimento celular via p15/p16/CDK4/E2F1. Ademais, correlacionaram a expressão elevada do CDK4 com a subregulação do let-7c. Em outros tipos de neoplasias já foi descrito o aumento da expressão de CDK4, incluindo no CEB (POOMSAWAT *et al.*, 2010), sugerindo que o CDK4 favorece o início e desenvolvimento de tumores (LIU *et al.*, 2014).

2.4.6 miR-143-3p

O processo de biogênese do miR-143 (3p e 5p) ocorre em conjunto com a do miR-145, uma vez que as sequências gênicas para a codificação de ambos miRNAs estão presentes no mesmo *locus* no cromossomo 5q33 com uma distância de 1,3 kb (LIO *et al.*, 2010). Conseqüentemente, há formação de um único transcrito de pri-miRNA contendo sequências que conduzem à formação de ambos miRNAs maduros (KENT *et al.*, 2010). Estes são expressos abundantemente nos diferentes tecidos do organismo, porém comumente subregulados em neoplasias principalmente influenciando no ciclo celular e sobrevivência da célula (LIO *et al.*, 2010).

Em humanos, um total de 211 genes alvos miR-143-3p foram experimentalmente validados e mencionados no miRTarBase (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009), incluindo genes também regulados pelo miR-143 e que apresentam envolvimento com neoplasias malignas, tais como o CD44v3 (MA *et al.*, 2013),

MACC1 (ZHANG *et al.*, 2012), MMP-13 (WU *et al.*, 2013), K-Ras (CHEN *et al.*, 2009), BCL-2 (ZHANG *et al.*, 2010) e COX2 (WU *et al.*, 2013).

Até o momento nenhum estudo descreveu o envolvimento do miRNA-143-3p no CEB, tampouco no câncer de cabeça e pescoço. No entanto, em outras neoplasias já foi descrita a desregulação dessa molécula. Recentemente He *et al.* (2016) demonstraram a atuação do miR-143-3p como supressor tumoral em câncer de esôfago através da modulação do seu alvo QKI-5. Inicialmente foi identificada a subexpressão desse miRNA nos casos de carcinoma escamocelular de esôfago, associado com o pior prognóstico dos pacientes. Posteriormente, ensaios *in vitro* e *in vivo* permitiram descrever o papel do miR-143-3p sobre o QKI-5 influenciando no processo de proliferação, invasão celular e transição epitélio-mesênquima. Ademais, a subexpressão de miR-143-3p foi identificada em câncer de colorretal (CHEN *et al.* (2015) e de ovário (ZHANG *et al.*, 2016), este último estando associado aos maiores níveis de seu alvo RALBP1. Contrariamente Schee *et al.* (2015) identificaram superexpressão desse miRNA no câncer de colorretal e Ludwig *et al.* (2015) no soro de crianças com neuroblastoma.

Wu *et al.* (2013) identificaram a subregulação tanto o miR-143-5p, quanto do miR-143-3p em linhagens celulares de câncer gástrico. Ao induzir a expressão desses miRNAs nas células malignas observaram um efeito mais acentuado do miR-145-5p na inibição do crescimento celular e na indução de apoptose. Adicionalmente, identificaram que a supressão da COX-2 pelo miR-145-5p foi mais exacerbada, e sugerem que ambos participam da supressão tumoral, porém contribuindo em diferentes proporções.

Um estudo *ex vivo* realizado por Zhang *et al.* (2013) contribuiu para a compreensão da assinatura de expressão de miRNAs envolvidos com a polarização de macrófagos, identificando altos níveis do miR-143-3p em macrófagos M2 ao comparar aos macrófagos M1 após estímulo de macrófagos primários derivados da medula óssea de camundongos. No entanto, associações entre o miR-145-5p e macrófagos 1 e/ou M2 ainda não foram mencionados na literatura.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

3.1 Diferenças na expressão de microRNAs relacionados à ativação de subpopulações de macrófagos influenciam na distribuição dessas células no microambiente tumoral do carcinoma escamocelular de boca.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Investigar a expressão de microRNAs e a distribuição de proteínas relacionadas aos macrófagos M2 em carcinoma escamocelular de boca.

3.2.2 Objetivos específicos

3.2.2.1 Analisar o padrão de expressão dos miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c em carcinoma escamocelular de boca;

3.2.2.2 Semiquantificar a presença de macrófagos CD68+, CD163+ e CD204+ na região intratumoral (periparenquimal e intraparenquimal) do carcinoma escamocelular de boca;

3.2.2.3 Investigar a associação entre o padrão de expressão dos microRNAs e os níveis de células CD68+, CD163+ e CD204+ nas diferentes microlocalizações;

3.2.2.4 Investigar a associação entre o padrão de expressão dos microRNAs e os níveis de células CD68+, CD163+ e CD204+ com a graduação histopatológica dos tumores.

CAPÍTULO 1

4 EXPRESSÃO DE microRNAs ASSOCIADOS AOS MACRÓFAGOS M2 EM RELAÇÃO A DISTRIBUIÇÃO ESTROMAL DE CÉLULAS CD68+, CD163+ E CD204+ EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

4.1 INTRODUÇÃO

O carcinoma escamocelular de boca (CEB) corresponde a mais de 90% das malignidades originadas na cavidade oral (MOORE, 2000; BHARGAVA *et al.*, 2010) e está entre os tumores malignos mais comuns no mundo, com elevados índices de morbi-mortalidade (FERLAY *et al.*, 2015). As pesquisas mais recentes que almejam melhorias no diagnóstico e prognóstico da doença estão voltadas à investigação e identificação de interações celulares e moleculares entre as células tumorais e o seu microambiente (HENDRIX *et al.*, 2007).

As neoplasias malignas comportam em seu microambiente um processo inflamatório crônico característico, sendo os macrófagos um dos componentes celulares mais importantes do microambiente tumoral (SICA & MANTOVANI, 2012; SCHULTZE *et al.*, 2015). Macrófagos são células versáteis que constantemente alteram seu estado funcional em resposta aos desafios do microambiente (WYNN *et al.*, 2013) e são comumente descritos como macrófagos classicamente ativados (M1) ou macrófagos alternativamente ativados (M2) (GORDON *et al.*, 2003; WYCKOFF *et al.*, 2007; SICA & MANTOVANI, 2012). Embora no nicho tumoral os macrófagos cooperem com uma rede extremamente complexa, podendo assumir ambos os fenótipos de polarização, o comportamento dos macrófagos associados ao tumor (TAM) sugere a sua similaridade global aos macrófagos M2, favorecendo a promoção do câncer (COFFELT, HUGHES e LEWIS, 2009; OJALVO *et al.*, 2009; QIAN e POLLARD, 2010; OJALVO *et al.*, 2010).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores de proteínas com aproximadamente 22 nucleotídeos, que exercem papéis importantes na regulação da expressão gênica (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; BARTEL, 2009). A atuação dessas moléculas é dada através da ligação à região não traduzida (3'UTR)

do mRNA alvo (WU *et al.*, 2011) com ação direta ou indireta a depender da complementariedade entre os nucleotídeos (BARTEL, 2004; PERRON e PROVOST, 2008). O envolvimento dos miRNAs no controle de inúmeras condições fisiológicas, tais como proliferação, diferenciação, apoptose e metabolismo celular (BRENNECKE *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003; DI LEVA *et al.*, 2006, BARTEL, 2009) faz dessas moléculas importantes alvos de investigação de diversas lesões, incluindo o câncer.

No microambiente tumoral o perfil de polarização dos macrófagos é um forte influenciador do processo de malignidade e os mecanismos que regem mudanças no estado de polarização dessas células repercutem na progressão ou resolução da doença (WYNN *et al.*, 2013), sendo o delineamento dos perfis transcricionais e pós-transcricionais dos macrófagos algo fundamental para um melhor entendimento da diversidade funcional dessas células (GAUTIER *et al.*, 2012; SCHULZ *et al.*, 2012; SCHULTZE *et al.*, 2015) e do seu papel na tumorigênese. Portanto, tendo em vista que a abordagem de miRNAs reguladores da função de macrófagos no CEB ainda não foi descrita na literatura, o objetivo do nosso estudo foi investigar em CEB o padrão de expressão de diferentes miRNAs envolvidos na ativação de macrófagos M2 em relação à infiltração de diferentes subpopulações macrofágicas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo de uma série de casos que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Aristides Maltez, sob o nº de protocolo 267/10.

4.2.1 Pacientes e amostras biológicas

O presente estudo incluiu 35 amostras de CEB primário oriundas de biópsias excisionais de pacientes não previamente tratados, obtidos dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez (Liga Baiana Contra o Câncer, Salvador, Bahia), no período compreendido entre 2009 e 2011. Ademais, 6 amostras de mucosa gengival de indivíduos saudáveis submetidos a cirurgia de terceiro molar, sem evidência clínica de inflamação, foram obtidas dos arquivos do Centro Baiano de Estudos Odontológicos para a constituição de um *pool* calibrador da etapa de qRT-PCR. Após a remoção cirúrgica todas as amostras foram imediatamente fixadas em formalina tamponada e posteriormente emblocadas em parafina.

4.2.2 Exame Histopatológico

A revisão do diagnóstico foi realizada por um patologista experiente (JNS) que procurou descrever os aspectos mais representativos das lesões, bem como graduá-las. A graduação histológica foi realizada com base na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (BARNES *et al.*, 2005). Os procedimentos para análise histológica foram realizados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA). Para tanto, cortes medindo 5 micrômetros (μm) de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. Posteriormente, os cortes foram submetidos a coloração em hematoxilina-eosina (H/E) e avaliados através de microscopia de luz.

4.2.3 Técnica Imunohistoquímica

Para realização da técnica imunohistoquímica (IHQ) pelo método do polímero indireto em três etapas utilizando o Sistema Advance® (*Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA*), foram realizados cortes de 4µm de espessura a partir do material embebido em formol e embocado em parafina, sendo os cortes estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol durante 10 minutos à temperatura ambiente e re-hidratados em três banhos de álcool absoluto durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Após lavagem em água corrente e banho em água destilada, as lâminas receberam os tratamentos para recuperação antigênica, de acordo com o Quadro 1. Em seguida, foi necessário esperar os cortes atingirem a temperatura ambiente, para, então, serem novamente lavados em água corrente acompanhados de duas passagens em água destilada e do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual foi realizado um banho de 15 minutos, protegido da luz, em solução de peróxido de hidrogênio a 30%.

Após repetir a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram submetidas ao bloqueio dos sítios inespecíficos utilizando o *Protein Block*® (*Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA*) em câmara úmida por 20 minutos. Em seguida, realizou-se a diluição do anticorpo com solução redutora de background (*Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA*). As informações referentes aos anticorpos estão demonstradas no Quadro 1. A incubação do anticorpo foi realizada em câmara úmida à 4°C *overnight*.

A seguir, as lâminas foram imersas em dois banhos da solução de PBS/BSA 1% (solução salina fosfatada/ soro albumina bovina) durante 5 minutos cada banho, para, então, ser aplicado o polímero *horseradish peroxidase* (HRP) (*Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA*) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta etapa foi sucedida por nova imersão em solução de PBS/BSA 1% como já descrito anteriormente, e pela incubação com a enzima HRP (*Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA*) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Para revelação

da reação foi utilizado a DAB (3,3'- diaminobenzidina, *Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA*) em câmara escura por 5 minutos. Em seguida, após nova lavagem água corrente e água destilada por 5 minutos cada, as secções teciduais foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. A diferenciação foi feita rapidamente mergulhando as lâminas em álcool ácido e posteriormente lavando em água corrente e destilada, respectivamente. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com entellan na capela de exaustão. Para o controle positivo das reações foram utilizados tecidos indicados no *datasheet* de cada anticorpo. Para o controle negativo foi realizada a omissão da etapa de incubação com o anticorpo primário.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica		
				Equipamento	Tampão	Temperatura e duração
Mouse Monoclonal Anti-CD68	Dako™	Clone KP1	1:5000	<i>Steamer</i>	Tampão citrato pH6	94°C por 20 minutos
Mouse Monoclonal Anti-CD204	Cosmo Bio	Clone SRA-E5	1:800	<i>Steamer</i>	Tampão citrato pH6	94°C por 40 minutos
Mouse Monoclonal Anti-CD163	Cell Marque	Clone MRQ-26	1:100	<i>Steamer</i>	Tampão Tris/EDTA pH9	94°C por 40 minutos

Quadro 1. Dados pertinentes referentes aos anticorpos primários e ao procedimento de recuperação antigênica.

4.2.4 Avaliação da marcação imunohistoquímica

A análise IHQ foi realizada por um único observador através de microscopia de luz de alta definição (OLYMPUS CX31, Glasgow, Scotch) acoplado a uma câmera digital (OLYMPUS SC30, Glasgow, Scotch). Foram considerados positivos os casos onde as células exibiam marcação de cor castanha. Para todos os marcadores investigados, os cortes foram inicialmente analisados em objetiva de 4X no intuito de identificar áreas com maiores níveis de infiltração das células de interesse. Para cada caso, três campos *hot spots* em objetiva de 40X foram selecionados para a contagem (NI et al., 2015; ESSA et al., 2016). As células CD68+, CD163+ e CD204+ foram analisados exclusivamente no estroma intratumoral, em dois compartimentos distintos: intraparenquimal e periparenquimal. Macrófagos intraparenquimais foram definidos como células marcadas presentes no interior dos ninhos tumorais ou em contato direto com as células tumorais. Macrófagos periparenquimais foram definidos como células marcadas infiltradas nas proximidades dos ninhos tumorais. Células exibindo marcação que estavam presentes no interior de vasos sanguíneos não foram consideradas. Ao final, a média da contagem total absoluta dos três campos foi obtida para cada microlocalização.

4.2.5 Microdissecção das amostras para a etapa de biologia molecular

Inicialmente, 35 cortes de CEB corados em H/E foram utilizados para a identificação das áreas de interesse por um patologista experiente (JNS) que buscou delimitar as regiões tumorais e peritumorais de cada caso, excluindo-se regiões de não interesse, como tecido muscular esquelético, glândula salivar e pele (Figura 1).

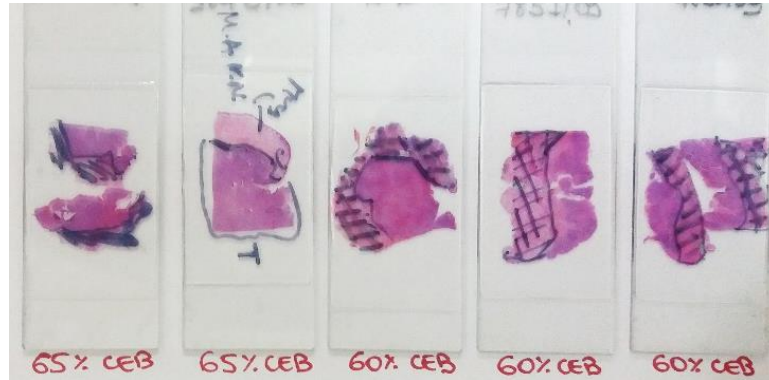


Figura 1. Imagem representativa apresentando lâminas contendo cortes de CEB corados em H/E delimitados para posterior utilização como modelo para a realização das microdissecções que antecederam a extração do RNA.

Posteriormente, foram realizados cortes de 3 μ m de espessura de cada amostra de CEB parafinada (10 cortes para cada caso) e, com base nas delimitações prévias das áreas de interesse, com o uso de bisturi particular e estéril foram realizadas microdissecções manuais dos cortes, coletando em um microtubo o tecido de interesse. Toda a etapa de microdissecção foi realizada mantendo as amostras resfriadas.

4.2.6 Isolamento do RNA e síntese do cDNA

Após as microdissecções, o RNA total foi isolado utilizando-se o Kit *miRNeasy FFPE* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Como amostra calibradora, um *pool* contendo 6 amostras de mucosa bucal saudável também foi utilizado. As amostras foram desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em álcool 96-100%. Posteriormente, a lise celular foi feita através da digestão enzimática pela proteinase K, submetendo as amostras ao banho seco em temperatura de 56 $^{\circ}$ c e 80 $^{\circ}$ c por 15 minutos cada, finalizando com 3 minutos no gelo e uma nova centrifugação. A seguir, em novos microtubos os sobrenadantes foram tratados com DNase e *Buffer RBC*. O isolamento do RNA total foi dado pela técnica de adsorção do RNA à coluna de sílica, precipitando o material genético com o uso do álcool. Por fim, a eluição da amostra foi realizada através com 25 μ L de água livre de RNAses.

A concentração e pureza do RNA foram avaliados usando Nanodrop 1000 (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Posteriormente, 10 nanogramas do RNA total de cada amostra foram reversamente transcritos utilizando-se o *kit TaqMan MicroRNA RT Reverse Transcription (Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific)*, conforme recomendações do fabricante:

A reação foi feita em um volume final de 15,0µl contendo 10 ng de RNA total, 1,5 µl de RT Buffer, 0,15µl de NTP Mix (100 mM), 3,0µl de RT Primer (stem-loop primer, específico para miRNAs maduros), 1,0µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 0,19µl de inibidor de RNase. A reação foi incubada a 16 °C por 30 minutos, 42 °C por 30 minutos e 85 °C por 5 minutos em um termociclador.

4.2.7 Amplificação do cDNA e análise da expressão

O ensaio de amplificação foi realizado para cada amostra, em duplicata técnica, de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, conforme descrição a seguir:

A reação foi feita em um volume final de 20,0 µl contendo 1,33 µl de cDNA, 10,0µl do TaqMan Universal Master Mix 2x (contendo MgCl₂, dATP, dCTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaQGold), 1,0µl de cada ensaio (TaqMan microRNA Assays contendo a sonda e os oligonucleotídeos específicos para os miRNAs estudados). A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, precedidos por um período de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, utilizando o aparelho QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (*Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific*).

A expressão dos miRNAs foi identificada utilizando-se o *TaqMan® microRNA Assays (Applied Biosystem by Life Technologies)*, com as informações contidas no Quadro 2. Os níveis de expressão relativa do miRNA foram normalizados com base na expressão dos miRNAs de referência RNU44 e RNU48 utilizando o *TaqMan® microRNA Assays* código NR_002750 -1094 e NR_002745 – 1006 (*Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific*), respectivamente. A amostra calibradora

consistiu em um *pool* de 6 amostras de mucosa bucal não-neoplásica e com ausência clínica de inflamação.

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado. O nível de expressão foi quantificado relativamente à expressão dos miRNAs de referência e também foi normalizado de acordo com um miRNA calibrador. O resultado final (n_{miRNA}) foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em *n*-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma:

$$n_{miRNA} = 2^{-(\Delta Ct amostra - \Delta Ct calibrador)},$$

onde ΔCt da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do miRNA estudado do valor médio de Ct dos miRNAs de referência.

Assim, os miRNAs que apresentaram valores de expressão relativa entre 0,5 e 2,0 foram considerados com padrão de expressão normal, ao passo que os miRNAs que expressaram valores abaixo de 0,5 foram considerados com padrão subexpresso e acima de 2,0 como padrão superexpresso (NINOMIYA *et al.*, 2013).

miRNA	Nome do assay	ID miRBase	Espécie	Sequência madura	Número de acesso no miRBase
miR-511-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-511-5p	Humana	GUGUCUUUUGCUCUGCAGUCA	MIMAT0002808
miR-511-3p	hsa-miR-511-3p	hsa-miR-511-3p	Humana	AAUGUGUAGCAAAGACAGA	MIMAT0026606
miR-143-3p	hsa-miR-143	hsa-miR-143-3p	Humana	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	MIMAT0000435
let-7c	hsa-let-7c	hsa-let-7c-5p	Humana	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	MIMAT0000064

Quadro 2. Dados referentes aos ensaios *TaqMan® microRNA Assays* (Applied Biosystem by Life Technologies) investigados no estudo.

4.2.8 Análise Estatística

Os níveis de expressão relativa dos miRNAs e as medianas de células positivas aos marcadores investigados foram correlacionados entre si utilizando-se o teste de correlação de *Spearman*. Padrões de expressão de miRNAs (subexpresso, expressão normal e superexpresso) foram associados aos níveis de células positivas aos marcadores investigados utilizando-se o Teste de *Kruskal-Wallis*. A associação entre os níveis de células positivas aos marcadores investigados e a graduação histopatológica (bem ou moderadamente/pobrememente diferenciado) foi realizada utilizando o Teste de *Mann-Whitney*. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre o padrão de expressão dos miRNAs e a graduação histopatológica. Os resultados estatisticamente significativos foram considerados a partir de um $P < 0.05$. Todas as análises foram realizadas com o software SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA)".

4.3 RESULTADOS

Este estudo incluiu 35 amostras parafinizadas de CEB primários com graduações histopatológicas distintas, sendo 20 (57,14%) bem diferenciadas, 10 (28,57%) moderadamente diferenciadas e 5 (14,29%) pouco diferenciadas. Para a identificação dos macrófagos teciduais utilizamos 3 marcadores, incluindo o CD68 (pan macrofágico), CD163 (macrófagos M2) e CD204 (macrófagos M2). A investigação da expressão de miRNAs envolvidos na polarização de macrófagos alternativamente ativados ocorreu pela identificação da expressão relativa do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p. Os casos selecionados para a investigação da expressão tecidual dos marcadores correspondem aos mesmos casos utilizados para a análise da expressão dos miRNAs.

4.3.1 Infiltração de células CD68+, CD163+ e CD204+ em CEB

A técnica de IHQ para os marcadores CD68, CD163 e CD204 foi realizada nas amostras parafinadas de CEB, permitindo a análise semiquantitativa dos marcadores. Todos os casos analisados apresentaram positividade aos três marcadores e a distribuição das células apresentou-se de forma variada na região intratumoral (intraparenquimal e periparenquimal), como demonstrado na Figura 2.

Houve infiltração maciça de células positivas para os três marcadores no estroma periparenquimal, enquanto que no compartimento intraparenquimal o padrão de infiltração variou entre os casos. Observamos correlação positiva entre os marcadores CD68+ e CD204+ no estroma periparenquimal ($p=0,004$; $r=0,627$) e na região intraparenquimal ($p=0,006$; $r=0,609$), entre o CD68+ e CD163 no estroma periparenquimal ($p=0,000$; $r=0,822$) e na região intraparenquimal ($p=0,000$; $r=0,741$), e CD204 e CD163 no estroma periparenquimal ($p=0,000$; $r=0,745$) e na região intraparenquimal ($p=0,000$; $r=0,792$), como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Correlação entre a expressão dos marcadores CD68, CD163 e CD204 nas amostras de CEB.

	Região Intratumoral			Estroma Periparenquimal		
	CD68 (Valor de p)	CD163 (Valor de p)	CD204 (Valor de p)	CD68 (Valor de p)	CD163 (Valor de p)	CD204 (Valor de p)
CD68	-	0,000*	0,006*	-	0,000*	0,004*
CD163	0,000*	-	0,000*	0,000*	-	0,000*

Valores de p são baseados no Teste de Correlação de *Spearman*

*Correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Para as associações entre o grau histopatológico e a quantidade de células positivas para o CD68, CD204 e CD163 nas distintas microlocalizações foi realizado o teste de Mann-Whitney. Apenas as células CD68+ presentes no estroma periparenquimal apresentaram relação com a graduação histopatológica moderadamente/pobrememente diferenciada ($p=0,017$), porém o mesmo não foi observado na área intraparenquimal. A graduação histopatológica não influenciou na presença de células positivas aos demais marcadores em ambas microlocalizações. A mediana de distribuição da marcação positiva aos marcadores CD68, CD163 e CD204 na região intraparenquimal e no estroma periparenquimal em relação a graduação histopatológica em 35 amostras de CEB está demonstrada na Figura 3.

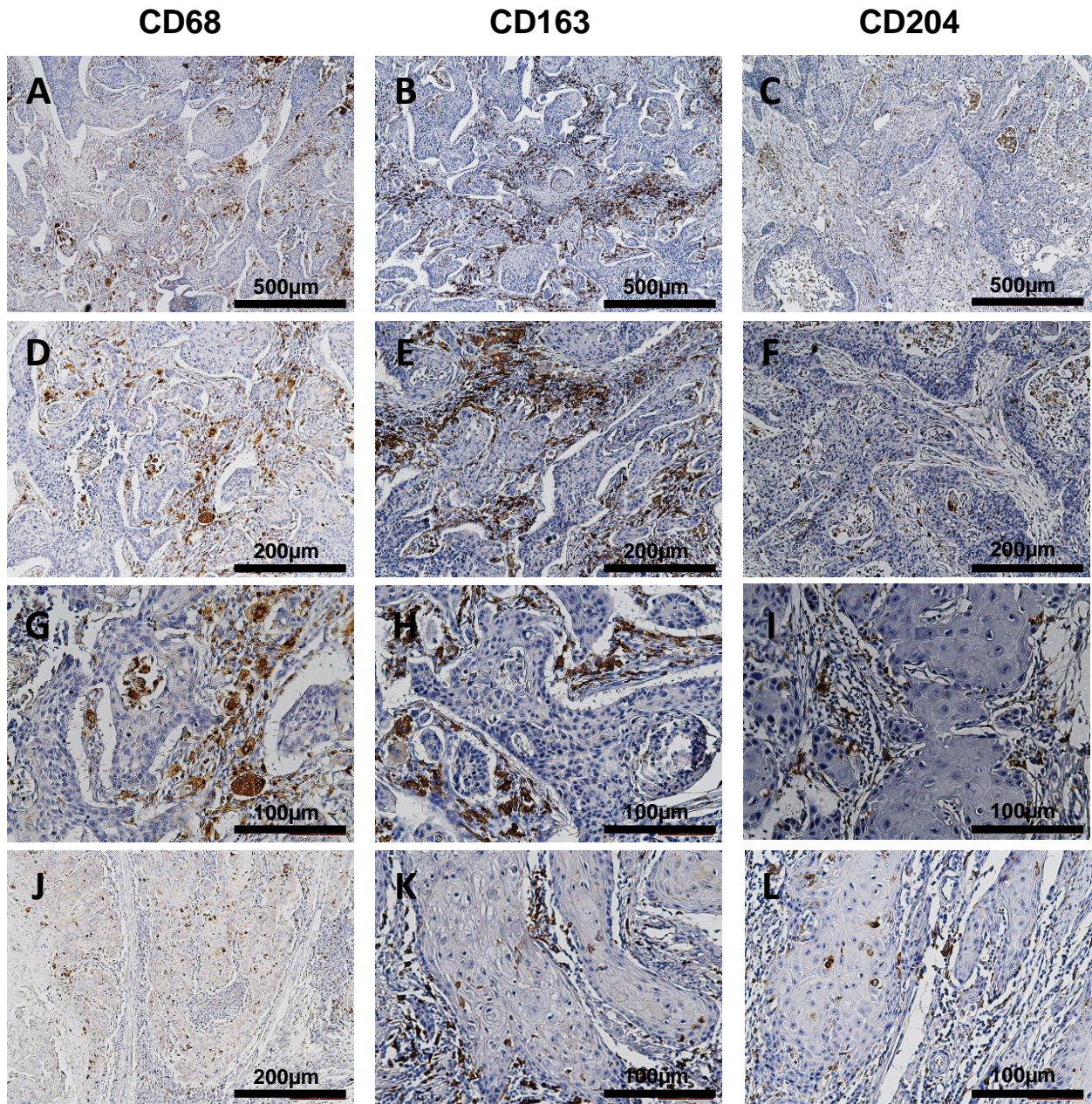


Figura 2. Imagens representativas da distribuição de células CD68+ (A, D, G e J), CD163+ (B, E, H e K) e CD204+ (C, F, I e L) em CEB evidenciadas por IHQ. Em A, B, C, D, E e F, o padrão geral de distribuição das diferentes subpopulações de TAM (CD68+, CD163+ e CD204+) no CEB. Em G, H e I, demonstra a elevada infiltração no estroma periparenquimal de macrófagos CD68+, CD163+ e CD204+, respectivamente. A infiltração no estroma periparenquimal da subpopulação M2 de macrófagos CD163+ apresenta em alguns casos distribuição mais elevada em relação à subpopulação M2 CD204+ (E, F, H e I). Elevada infiltração intraparenquimal de células CD68+, CD163+ e CD204+ estão demonstradas em J, K e L.

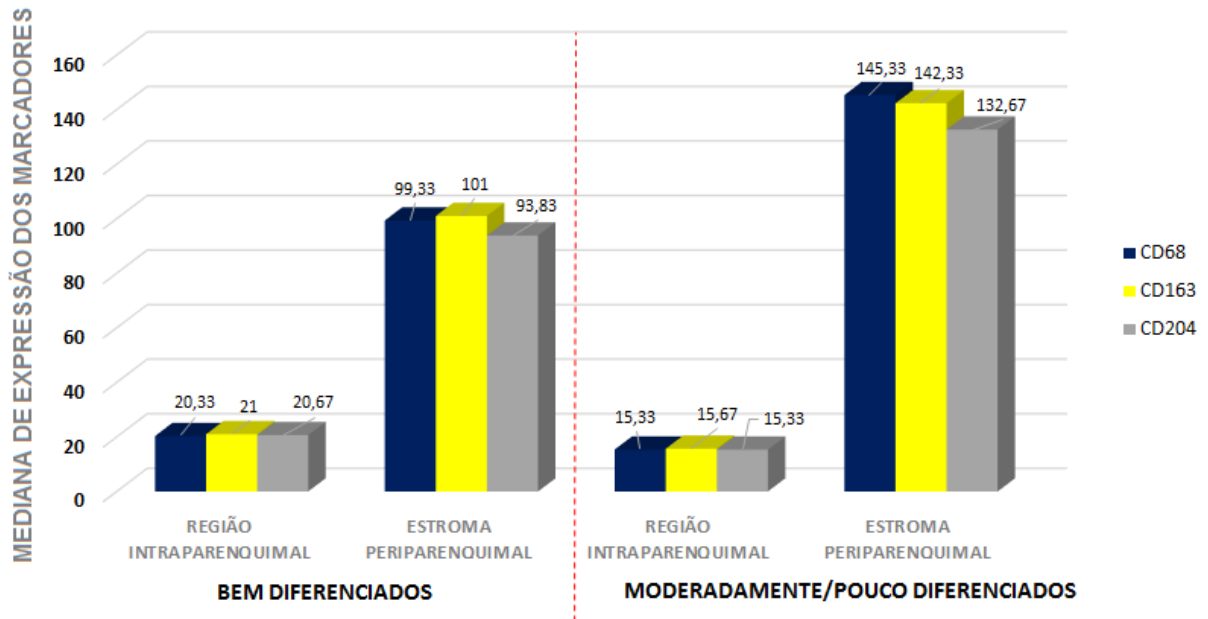


Figura 3. Infiltração de células CD68+, CD163+ e CD204+ na região intraparenquimal e no estroma periparenquimal em relação a graduação histopatológica em CEB. As diferentes barras categorizam as marcações CD68+ (em azul), CD163+ (em amarelo) e CD204+ (em cinza) nas duas diferentes microlocalizações. A altura das barras demonstra a mediana de expressão para cada marcador. A linha vermelha tracejada separa o grupo de tumores bem diferenciados e moderadamente/pouco diferenciados.

4.3.2 Expressão de miRNAs em CEB

A expressão relativa dos miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p foi avaliada por qRT-PCR nas 35 amostras parafinadas de CEB, em duplicata técnica, e normalizada para a expressão dos RNU44 e RNU48 (miRNAs nucleolares de referência), adotando-se o *pool* de mucosa bucal não neoplásica como amostra calibradora. Alguns miRNAs apresentaram níveis de expressão não detectáveis em algumas amostras e, assim, foram excluídos das análises. Os níveis de expressão relativa de cada um dos miRNAs para cada amostra estão demonstrados nas Figuras 4 a 7.

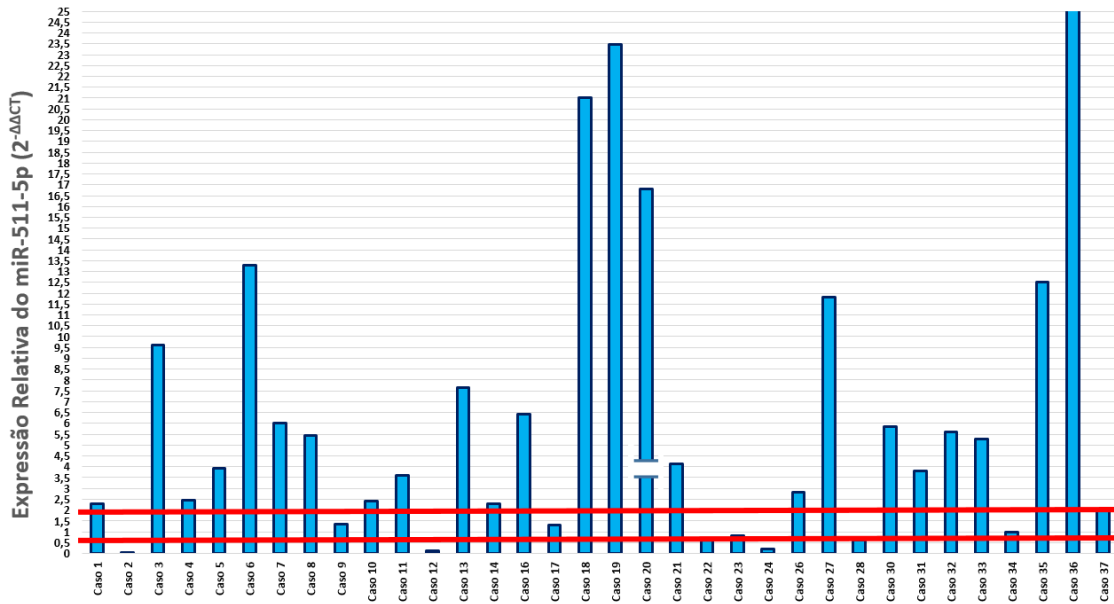


Figura 4. Expressão do miR-511-5p em 32 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão $< 0,5$) e aumentada ($> 2,0$) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica.

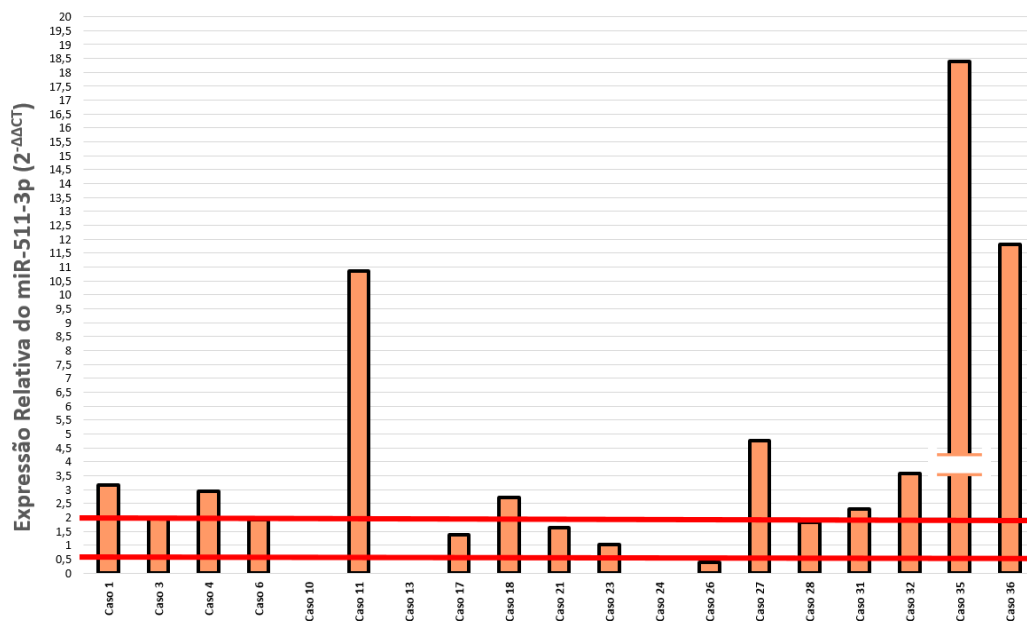


Figura 5. Expressão do miR-511-3p em 14 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão $< 0,5$) e aumentada ($> 2,0$) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica.

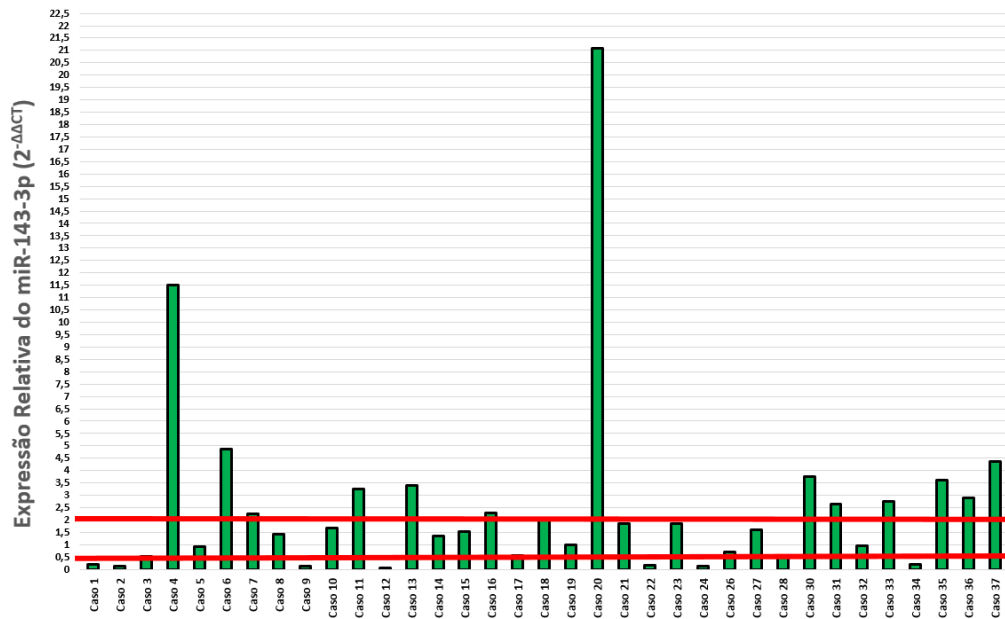


Figura 6. Expressão do miR-143-3p em 35 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão $<0,5$) e aumentada ($> 2,0$) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica.

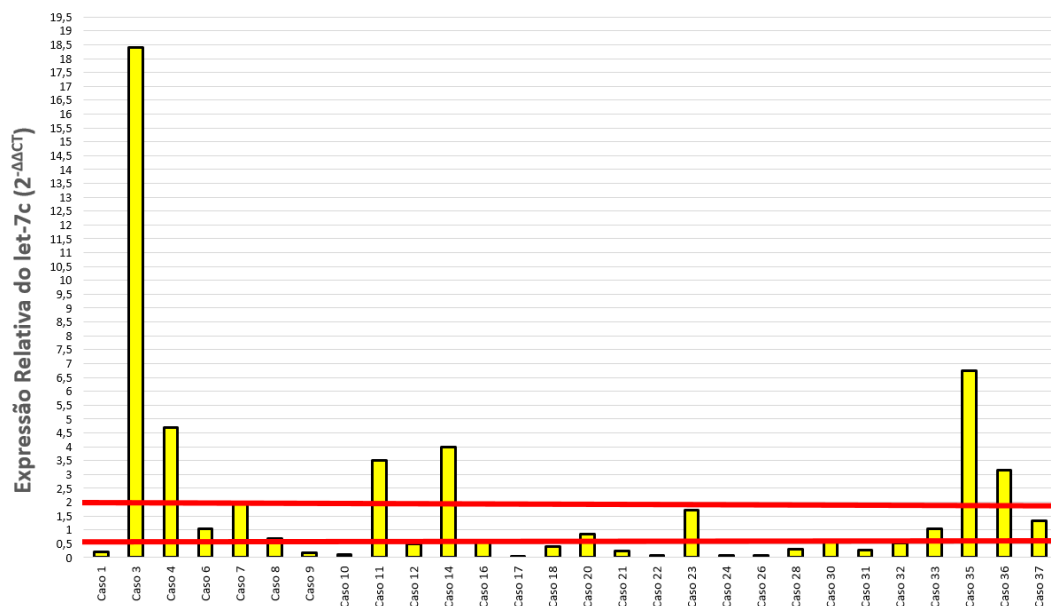


Figura 7. Expressão do let-7c em 28 amostras de CEB. A altura das barras representa a expressão relativa para cada amostra de CEB. As linhas vermelhas (inferior e superior) indicam os limites entre expressão diminuída (expressão $<0,5$) e aumentada ($> 2,0$) do miRNA em relação ao *pool* de mucosa bucal não neoplásica.

Em mais de 50% das amostras de CEB investigadas os 4 miRNAs apresentaram padrões de expressões desregulados e em proporções distintas quando comparados com a mucosa bucal normal. Notoriamente, a expressão aumentada do miR-511-5p (72,73%) e a expressão diminuída do let-7c (40%) foram mais proeminentes em relação aos demais miRNAs. Adicionalmente, o miR-143-3p, miR-511-3p e let-7c foram superexpressos em 40%, 28,13% e 20% das amostras, respectivamente. Ao passo que o miR-143-3p, miR-511-3p e miR-511-5p foram subexpressos em 20%, 12,05% e 9,09%, respectivamente. Os dados estão demonstrados na Figura 8.

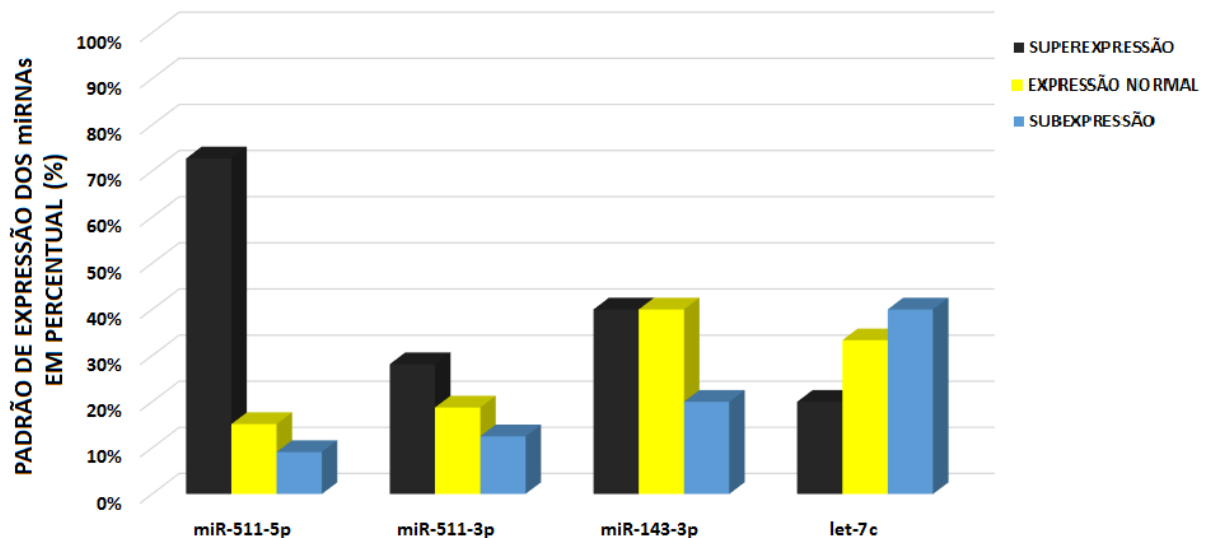


Figure 8. Percentual do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p nas amostras de CEB de acordo com o padrão de expressão. As diferentes barras categorizam os miRNAs como superexpresso (em preto), expressão normal (em amarelo) e subexpresso (em azul), seguindo a legenda. A altura das barras demonstra o percentual de expressão para cada grupo de miRNA.

Foi observada correlação positiva entre os miRNA-511-5p e miR-511-3p ($p=0,035$; $r=0,529$), entre os miRNA-511-5p e let-7c ($p=0,048$; $r=0,341$), entre os miR-511-5p e miR-143-3p ($p=0,000$; $r=0,616$), assim como entre os miR-511-3p e let-7c ($p=0,016$; $r=0,591$), descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Correlação entre a expressão relativa do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c nas amostras de CEB.

	miR-511-5p (valor de p)	miR-511-3p (valor de p)	miR-143-3p (valor de p)
miR-511-5p	-	-	-
miR-511-3p	0,035*	-	-
miR-143-3p	0,000*	0,144	-
let-7c	0,048*	0,016*	0,137

Valores de p são baseados no Teste de Correlação de *Spearman*

*Correlação estatisticamente significante ($p < 0,05$)

O Teste do Qui-quadrado evidenciou que o padrão de expressão dos miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p não foi influenciado pela graduação histopatológica das amostras investigadas de CEB, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Associação entre o padrão de expressão dos miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c e a graduação histopatológica de 35 amostras de CEB^a

Padrão de expressão	n (%)	Graduação Histopatológica ^b n (%)		Valor de P
		Bem diferenciado 20 (57,1)	Moderadamente/pouco diferenciado 15 (42,9)	
miR-511-5p				0,272
Superexpressão	24 (72,73%)	14 (43,7)	10 (31,2)	
Normal	5 (15,15%)	4 (12,5)	1 (3,2)	
Subexpressão	3 (9,09%)	1 (3,2)	2 (6,2)	
miR-511-3p				0,421
Superexpressão	9 (28,13%)	9 (47,4)	0 (0)	
Normal	6 (18,75%)	3 (15,8)	3 (15,8)	
Subexpressão	4 (12,5%)	1 (5,2)	3 (15,8)	
miR-143-3p				0,747
Superexpressão	14 (40%)	9 (25,7)	5 (14,3)	
Normal	14 (40%)	7 (20)	7 (20)	
Subexpressão	7 (20%)	4 (11,4)	3 (8,6)	
Let-7c				0,587
Superexpressão	6 (20%)	4 (14,4)	2 (7,2)	
Expressão Normal	10 (33,33%)	5 (17,8)	5 (17,8)	
Subexpressão	12 (40%)	7 (25)	5 (17,8)	

Valores de P são baseados no Teste do Qui-quadrado

^a Números podem não somar 35 em diferentes categorias por causa da ausência de detecção de alguns miRNAs

^b De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), 2009

O Teste de Correlação de *Spearman* não demonstrou diferenças quanto à presença das células CD68+, CD163+ e CD204+ em relação aos níveis de expressão dos miRNAs investigados (Tabela 4), tampouco o Teste de *Kruskal-Wallis* demonstrou associação entre o padrão de expressão dos miRNAs com a positividade dos marcadores.

Tabela 4. Correlação entre os níveis de infiltrado de células CD68+, CD163+ e CD204+ e os níveis de expressão dos miRNAs investigados nas amostras de CEB.

	INFILTRADO INTRAPARENQUIMAL			INFILTRADO PERIPARENQUIMAL		
	CD68 (valor de p e r)	CD163 (valor de p e r)	CD204 (valor de p e r)	CD68 (valor de p e r)	CD163 (valor de p e r)	CD204 (valor de p e r)
miR-511-5p	0,468 e 0,178	0,561 e -0,142	0,511 e -0,161	0,342 e 0,231	0,689 e 0,098	0,929 e -0,022
miR-511-3p	0,499 e 0,348	0,499 e 0,348	0,499 e 0,348	0,913 e 0,058	0,913 e 0,058	0,913 e 0,058
miR-143-3p	0,361 e 0,222	0,477 e 0,174	0,994 e 0,002	0,289 e 0,256	0,764 e 0,074	0,778 e -0,069
let-7c	0,663 e -0,128	0,533 e -0,182	0,626 e -0,143	0,478 e -0,207	0,742 e -0,097	0,794 e -0,077

Valores de p são baseados no Teste de Correlação de *Spearman*

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a expressão do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c, compreendidos como miRNAs envolvidos na função de macrófagos M2 foi investigada em carcinoma escamocelular de boca (CEB). A noção atual de Macrófagos Associados ao Tumor (TAM) indica que estas células correspondem aos componentes celulares inflamatórios majoritários no microambiente tumoral, os quais podem desempenhar papéis ambíguos na doença, exercendo atividades pró-inflamatórias e/ou anti-inflamatórias (BAAY *et al.*, 2011; CASSETTA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). De acordo com a plasticidade fenotípica, os macrófagos são agrupados em duas subpopulações: macrófagos inflamatórios classicamente ativados (ou M1) e macrófagos alternativamente ativados (ou M2) (GORDON *et al.*, 2003; WYCKOFF *et al.*, 2007; SICA & MANTOVANI, 2012; SCHULTZE, 2015). Embora no microambiente do tumor os macrófagos possam assumir ambos os perfis de polarização, os denominados TAM apresentam maior semelhança global com os macrófagos M2, contribuindo fortemente com a promoção da malignidade (COFFELT, HUGHES e LEWIS, 2009; OJALVO *et al.*, 2009; QIAN e POLLARD, 2010; OJALVO *et al.*, 2010).

Ao considerar que o microambiente tumoral é abundantemente povoado por macrófagos (SOEDA *et al.*, 2008; KAWAMURA *et al.*, 2009; KOMOHARA *et al.*, 2011; SICA & MANTOVANI, 2012; DE PALMA *et al.*, 2013), a positividade ao CD68 é fortemente associada ao reconhecimento dessas células no tumor (KOMOHARA *et al.*, 2015), na qualidade de um marcador pan-macrofágico (GOTTFRIED *et al.*, 2008). Em nosso estudo, todos os espécimes de CEB apresentaram infiltração de macrófagos CD68+, com destaque a infiltração maciça dessas células no estroma periparenquimal, quando comparado a área intraparenquimal. Observamos ainda que o aumento do número de macrófagos CD68+ no estroma periparenquimal influenciou de forma significativa à perda de diferenciação do tumor. Outros estudos também descreveram a presença elevada dessas células no estroma ao redor das ilhas tumorais em diferentes graduações histopatológicas da doença (DAI *et al.*, 2007; EL-ROUBY *et al.*, 2010; LO MUZIO *et al.*, 2010; VILAS BÔAS *et al.*, 2010; NI *et al.*, 2015; BAGUL *et al.*, 2016).

Contudo, devido à influência ambígua que as diferentes subpopulações de macrófagos interferem na biologia do tumor, as investigações do CD68 têm demonstrado resultados controversos no câncer (OHRI *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2014; NI *et al.*, 2015). Portanto, o uso exclusivo desse marcador não é ideal para associações com características clínico-patológicas dos pacientes. Por outro lado, o emprego de marcadores específicos, tais como o CD163, CD204 e/ou CD206 permite o reconhecimento mais restrito de macrófagos M2 (HEUSINKVELD E VAN DER BURG, 2011; KOMOHARA *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2013; ESSA *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2014; KOMOHARA *et al.*, 2015).

A nossa investigação demonstrou que os macrófagos infiltrados no microambiente tumoral estão polarizados preferencialmente para o perfil M2, apresentando positividade aos marcadores CD163 e CD204, no entanto, não foi observada associação com o grau histopatológico do tumor. Recentemente, Essa *et al.* (2016) também descreveram a infiltração maciça de macrófagos M2 no estroma periparenquimal do CEB, apontando que a densidade de células CD68+ foi semelhante ao infiltrado de células CD204+ e CD163+ em amostras seriadas. Todavia, ao nosso conhecimento, somos os primeiros a investigar a infiltração de macrófagos CD204+ em microlocalizações intratumorais distintas, demonstrando que tanto no estroma periparenquimal, quanto na região intraparenquimal a subpopulação de macrófagos é predominantemente M2, com um infiltrado menor nessa última região. Além disso, nos casos moderadamente/pouco diferenciados a infiltração de células CD68+, CD163+ e CD204+ no estroma periparenquimal foi maior em relação aos casos bem diferenciados. Adicionalmente, os marcadores investigados apresentaram correlações positivas entre si em ambas microlocalizações, no entanto, não encontramos quaisquer tipos de correlações entre os marcadores no estroma periparenquimal com os marcadores na região intraparenquimal, atribuindo ao papel dos macrófagos intraparenquimatosos um papel com necessidade de ser ainda explorado.

O predomínio de um determinado subtipo de macrófago interfere direta/indiretamente no comportamento biológico das células malignas e/ou em diferentes mecanismos moleculares de escape imunológico (BAAY *et al.*, 2011;

CASSETTA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). Enquanto Lucio *et al* (2016) observaram que no CEB há um número significativamente maior de macrófagos M2 em relação ao M1 em tumores sem metástase local e em estágios iniciais da doença, Hu *et al.* (2016) observaram que a positividade ao CD163 está associada ao pior prognóstico no CEB. Resultados semelhantes ao de Hu *et al.* (2016) foram observados em outras neoplasias, incluindo carcinoma hepatocelular (KONG *et al.*, 2013), carcinoma de células renais (KOMOHARA *et al.*, 2011) e câncer de bexiga (HANADA *et al.*, 2000). Considerando-se que M1 e M2 são conceitos que refletem extremos de um movimento contínuo de células intermediárias, e que já foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* a transição do perfil M1 para o M2 induzido pelas células tumorais, a compreensão do controle transcricional e pós-transcricional é útil na compreensão do estado diferencial de ativação final desses macrófagos (GAUTIER *et al.*, 2012; SCHULZ *et al.*, 2012). Dentro do nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro a investigar em CEB a relação entre macrófagos alternativamente ativados e a expressão tumoral de miRNAs comprovadamente relacionados.

Identificamos em nossa amostra que todos os miRNAs investigados (miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c) apresentaram certo grau de desregulação, com destaque para o miR-511-5p que esteve superexpresso em 72,73% das amostras. Além disso, exceto o miR-143-3p que se correlacionou apenas com o miR-511-5p, todos os outros miRNAs estiveram correlacionados positivamente entre si, sugerindo assim o envolvimento desses miRNAs na patogênese do CEB atuando em vias de regulação comuns. Ademais, a expressão dos miRNAs investigados não influenciou na graduação histopatológica do CEB.

Zhang *et al.* (2013) investigaram o papel de miRNAs em macrófagos e identificaram através de estudos *ex vivo* que a superexpressão do miR-143-3p está envolvida com a ativação do fenótipo anti-inflamatório de macrófagos, apresentando expressão fortemente elevada em macrófagos M2. No nosso estudo, observamos que em 40% das amostras de CEB o miR-143-3p apresentou-se com expressão normal, além disso, o mesmo número de casos também exibiu expressão elevada desse miRNA, demonstrando que a alteração nos níveis do miR-143-3p pode ser um achado molecular no desenvolvimento do CEB. Além disso, embora tenhamos

encontrado infiltração maciça de macrófagos M2 no tumor, não observamos correlação entre esta população celular e os níveis de expressão do miR-143-3p, demonstrando que a regulação de outros genes não relacionados a macrófagos podem estar participando desse processo.

Por outro lado, He *et al.* (2016) identificaram recentemente em carcinoma escamocelular de esôfago o papel do miR-143-3p como supressor tumoral, ao conduzir a modulação do transdutor de sinal QKI5, tendo associado a baixa expressão desse miRNA a um pior prognóstico. Da mesma forma, diferentes trabalhos investigando neoplasias de outras naturezas observaram uma subexpressão do miR-143-3p (CHEN *et al.*, 2015; LUDWIG *et al.*, 2015; SCHEE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). No nosso estudo, é possível que a subexpressão do miR-143-3p encontrada em 20% das amostras esteja relacionada com os estágios mais avançados da doença, como visto em outras neoplasias.

Em relação ao let-7c, observamos também que 40% das amostras apresentaram subregulação do let-7c. Em consonância com os nossos achados, a regulação negativa desse miRNA tem sido descrita em outras neoplasias humanas (ALI *et al.*, 2012; KOWALEWSKA *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2014), em algumas situações associando a subexpressão ao pior prognóstico (CHEN *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; KNYAZEV *et al.*, 2016), corroborando para o seu papel na supressão tumoral (LI *et al.*, 2015; NADIMINTY *et al.*, 2012; DOU *et al.*, 2015). Portanto, possivelmente a alteração dos níveis desse miRNA no tumor tenha forte relação ao seu papel antitumoral, influenciando na expressão de oncogenes relacionados ao ciclo celular (NADIMINTY *et al.*, 2012), e processos de diferenciação (LI *et al.*, 2015; NADIMINTY *et al.*, 2012; DOU *et al.*, 2015).

Existem evidências que este miRNA seja capaz de promover a polarização de macrófagos para o perfil M2, enquanto suprime a ativação dessas células para o perfil M1 (BANERJEE *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2015) sugerem que o papel do let-7c na promoção do fenótipo M2 ocorre através da modulação da quinase 1 ativada por p21 (PAK1), uma quinase de serina/treonina que é regulada positivamente em macrófagos M1. Ademais, o aumento dos níveis de let-7c em macrófagos M1 conduz a mudança na expressão de genes voltados para o fenótipo inflamatório,

enquanto que o contrário também é observado (BANERJEE *et al.*, 2013). Conseqüentemente, macrófagos M2 apresentam maior expressão do let-7c (BANERJEE *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2016). Na nossa amostra notamos infiltração maciça de macrófagos M2 no tecido, no entanto, a expressão do let-7c esteve elevada em apenas 20% dos casos e, assim, não apresentou evidências de estar influenciando na polarização de TAM. Por outro lado, é possível que os níveis desse miRNA tenham sido influenciados pela agressividade do tumor, tendo em vista que já foi identificada a influência do prognóstico do paciente sobre o padrão de expressão desse miRNA (CHEN *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; KNYAZEVA *et al.*, 2016).

Recentemente Hilly *et al.* (2016) identificaram a expressão tecidual elevada do let-7c em pacientes jovens com carcinoma escamocelular de língua e sugeriram que os tumores mais agressivos apresentavam níveis mais elevados. Considerando que no carcinoma escamocelular de língua o predomínio de macrófagos M2 está associado aos casos mais agressivos da doença (PIRILÄ *et al.*, 2015), acreditamos que mais estudos devem investigar a correlação entre let-7c e TAM em diferentes estágios do CEB, em sítios anatômicos específicos e em pacientes com faixa etária bem estabelecida.

O miR-511-5p também tem sido identificado como específico de macrófagos M2 (KARO-ATAR *et al.*, 2015; MELTON *et al.*, 2016). Tserel *et al.* (2011) identificaram a influência do miR-511-5p na regulação positiva do TLR-4 em macrófagos, molécula que ao ser expressa de forma exacerbada favorece um estado supressor tumoral (PRADERE *et al.*, 2014). Em linhagem celular de CEB humano bem diferenciado Sun *et al.* (2012) encontraram elevada expressão do TLR4. Sabendo que os macrófagos correspondem a uma das principais células que expressam TLRs (COLE *et al.*, 2010) e que estão abundantemente presentes no microambiente tumoral (KOMOHARA *et al.*, 2015), acreditamos que a superexpressão do miR-511-5p (72,73%) em nossa amostra pode estar envolvida com papéis antitumorais via regulação positiva do *TLR4* em macrófagos. Adicionalmente, a estimulação do TLR4 promove o fenótipo M1 nos macrófagos (MOSSER e EDWARDS, 2008), provavelmente por influenciar negativamente os níveis de let-7c nos macrófagos M2 (BANERJEE *et al.*, 2013).

Apesar da elevada expressão do miR-511-5p (72,73%) em nossas amostras e baixa subexpressão (9,09%) da molécula, não observamos correlações com os marcadores de macrófagos investigados. E, em contraste aos nossos achados, a expressão do miR-511-5p tem sido descrita predominantemente diminuída em outros tipos de malignidades (TÖMBÖL *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; CAO *et al.*, 2015; FANG *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2017), apesar de alguns estudos também evidenciarem a superexpressão da molécula (AUGELLO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015). Possivelmente, em virtude da especificidade que os miRNAs apresentam para cada tipo de tecido (BARAD *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004) é provável que no CEB o miRNA-511-5p esteja mais suscetível à superexpressão.

Squadrito *et al.* (2012) identificaram através de ensaios *in vitro* e *in vivo* que a síntese de ambas as cadeias do miR-511 (-5p e -3p) em TAM MRC1+ ocorre em conjunto com a transcrição do gene *Mrc1* na via de ativação alternativa de macrófagos. Contudo, sugerem que apenas o miR-511-3p corresponde a cadeia ativa desse miRNA e que seu papel antitumoral ocorre pela atenuação das funções pró-tumorais nessas células em um mecanismo de retroalimentação negativa. Atualmente é sabido que a regulação negativa de genes envolvidos com a ativação de macrófagos M2 pelo miR-511-3p contribui para a supressão do crescimento tumoral (SQUADRITO *et al.*, 2013).

Em nossa investigação, apenas 18,75% e 28,13% dos casos de CEB apresentaram expressão normal e elevada do miR-511-3p, respectivamente. Recentemente, Heinsbroek *et al.* (2016) sugeriram que macrófagos deficientes em MRC1 apresentam subregulação de miR-511-3p. Levando em consideração os achados desses autores, juntamente com as descobertas recentes do nosso grupo (VILAS-BÔAS *et al.* em preparação) que identificou a expressão elevada de um conjunto de genes relacionados com a ativação alternativa de macrófagos no CEB, exceto os níveis do MRC1, sugerimos que provavelmente a subexpressão (12,5%) ou ausência de detecção (40,62%) do miR-511-3p em nossa investigação seja influência pela baixa expressão do MRC1 nessas células.

Adicionalmente, com base no que foi sugerido por Squadrito *et al.* (2012), os TAM CD11c+ também produzem o miR-511-3p, apesar de ser em uma proporção ínfima ao comparar com os TAM MRC1+, justificando a expressão normal (18,75%) e superexpressão (28,13%) desse miRNA em nossa amostra. Além disso, devido à ausência de correlações entre os níveis elevados de miR-511-5p e TAM, acreditamos que outras células também estão expressando esse miRNA no tumor, necessitando o desenvolvimento de mais estudos. Inclusive, a indução da expressão do miR-511-5p em células tumorais de outros tipos de cânceres tem demonstrado papéis antitumorais, tais como na inibição na capacidade de formação de colônias, na proliferação (FANG *et al.*, 2017), migração e invasão das células neoplásicas (CAO *et al.*, 2015).

Os miRNAs investigados atuam na regulação de inúmeros genes alvos do organismo humano e apresentam diversos alvos em comuns entre eles (Figura 9). No entanto, a ausência de correlação entre a expressão desses miRNAs, compreendidos como influenciadores da polarização de macrófagos M2, com a distribuição tecidual de TAM em nossa amostra de CEB pode ser explicada pelo fato desses miRNAs também regularem genes envolvidos com outras funções tumorais que não ativação de macrófagos pró-tumorais, incluindo a regulação de genes supressores tumorais e oncogenes. Ademais, pode ser que os miRNAs investigados também estejam sendo expressos em outros tipos celulares. Sendo assim, estudos *in vitro* são necessários para confirmar o papel desses miRNAs reguladores de macrófagos no CEB.

Em relação a desregulação na expressão dos miRNAs, particularmente o miR-511-5p mostrou-se superexpresso em mais de 70% dos casos. Além disso, foi o único miRNA que apresentou correlação com todos os outros miRNAs estudados, sugerindo seu envolvimento na patogênese do CEB atuando em vias de regulação comuns aos demais miRNAs. Sendo assim, acreditamos que entre os miRNAs analisados o miR-511-5p tenha se destacado como um biomarcador potencial do CEB e mais estudos devem ser realizados levando em consideração a expressão desse miRNA e os aspectos clínico-patológicos dos pacientes.

O conhecimento até então trazido pela literatura de que a positividade ao CD204+ e ao CD163+ é indicativo da presença de macrófagos alternativamente ativados (SHIGEOKA *et al.*, 2013; URAKAWA *et al.*, 2015; ESSA *et al.*, 2016; NISHIO *et al.*, 2016), somado aos nossos resultados, fornece subsídios para afirmarmos que no CEB o infiltrado maciço de macrófagos é predominantemente formado por células que atuam a favor do tumor. Embora alguns estudos já tenham demonstrado a alteração de miRNAs no CEB (DU *et al.*, 2015; HILLY *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016), nenhum trabalho até o momento avaliou a expressão de miRNAs relacionados aos macrófagos M2 nesta doença, sendo este o primeiro estudo a investigar especificamente a expressão do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c em amostras de CEB de diferentes localizações intrabucais. Novas investigações deverão ser realizadas na tentativa de explicar os mecanismos regulatórios que conduzem à infiltração maciça de macrófagos alternativamente ativados para o microambiente tumoral do CEB.

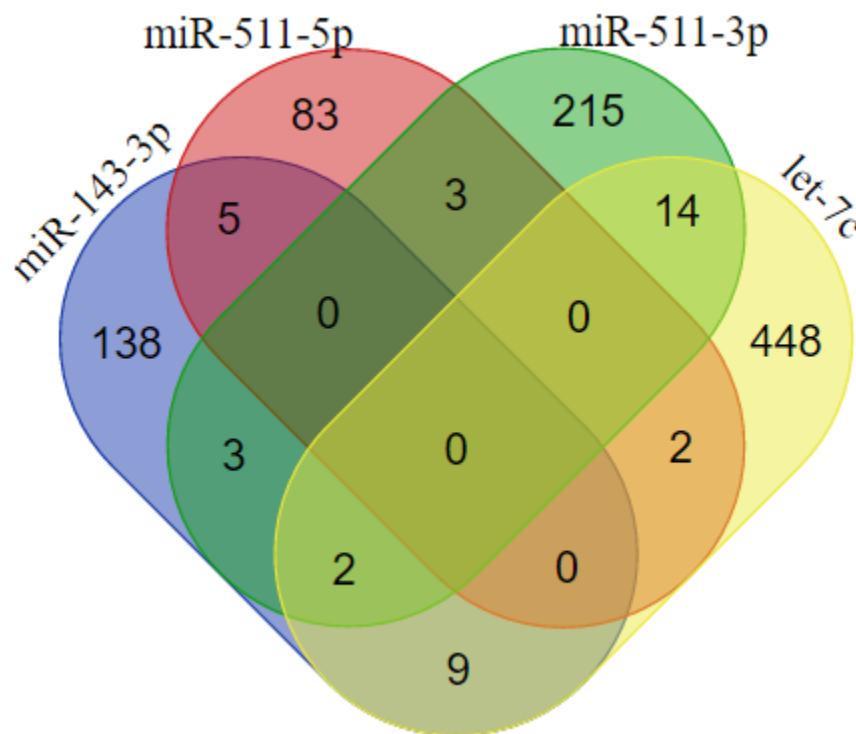


Figura 9. Número de alvos do miR-511-5p, miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c-5p experimentalmente comprovados e mencionados no miRTarBase (PAPADOPOULOS *et al.*, 2009). As cores não sobrepostas exibem o número de alvos de cada miRNA específico, miR-511-5p (rosa), miR-511-3p (verde), miR-143-3p (azul) e let-7c-5p (amarelo). As cores sobrepostas exibem intersecções entre o número de alvos que são regulados por mais de um miRNA.

5. CONCLUSÃO GERAL

- Nossos resultados sugerem que a superexpressão do miRNA-511-5p apresenta envolvimento na tumorigênese do CEB e, possivelmente, esse miRNA atua em vias de regulação comuns aos miR-511-3p, miR-143-3p e let-7c.
- Além disso, reforçam a importância dos macrófagos na patogênese do CEB e corroboram com as evidências dos TAM como macrófagos predominantemente polarizados para M2;
- A expressão dos miRNAs investigados e a distribuição de macrófagos M2 parecem não influenciar a graduação histopatológica do CEB.

REFERÊNCIAS

AKILA, P. *et al.* Cd163 and its expanding functional repertoire. **Clinica chimica acta**, 2012. v. 413, n. 7–8, p. 669–674.

ALI, S. *et al.* MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. **Br j cancer**, 2012. v. 107, n. 8, p. 1354–1360.

ALLAVENA, P. *et al.* The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. **Critical reviews in oncology/hematology**, 2008. v. 66, n. 1, p. 1–9.

Anantharaman D. *et al.* Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. **Int J Cancer**, 2017. Jan 20.

AUGELLO, C. *et al.* MicroRNA as potential biomarker in hcv-associated diffuse large b-cell lymphoma. **Journal of clinical pathology**, 2014. v. 67, n. 8, p. 697–701.

BAAY, M. *et al.* Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clinical and developmental immunology**, 2011. v. 2011.

BABIARZ J. E. *et al.* Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. **Genes & development**, 2008. v. 22, n. 20, p. 2773-2785.

BÄCHLI, E. B. *et al.* Functional expression of the cd163 scavenger receptor on acute myeloid leukemia cells of monocytic lineage. **Journal of leukocyte biology**, 2006. v. 79, n. 2, p. 312–318.

BAGUL, N. *et al.* Quantitative assessment of tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma using cd68 marker: an immunohistochemical study. **Journal of clinical and diagnostic research**, 2016. v. 10, n. 4, p. ZC81-ZC84.

BALKWILL, Fran; MANTOVANI, Alberto. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **The lancet**, 2001. v. 357, n. 9255, p. 539-545.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Seminars in cancer biology**, 2012. v. 22, n. 1, p. 33–40.

BANERJEE, Sami *et al.* MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. **The Journal of Immunology**, 2013. v. 190, n. 12, p. 6542-6549.

BARAD, O. *et al.* MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays : system establishment and expression profiling in human tissues. **Methods**, 2004.

v.14, p. 2486–2494.

BAROIS, N. *et al.* Mhc class ii compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. **Traffic**, 2002. v. 3, n. 12, p. 894–905.

BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. v. 116, n. 2, p. 281-297.

BARTEL, D. P. MicroRNA target recognition and regulatory functions. **Cell**, 2009. v. 136, n. 2, p. 215–233.

BEREZIKOV, Eugene *et al.* Mammalian mirtron genes. **Molecular cell**, v. 2007. 28, n. 2, p. 328-336.

BHARGAVA, A.; SAIGAL, S.; CHALISHAZAR, M. Systems in oral squamous cell carcinoma : a review. **Journal internacional oral health**, 2010. v. 2, n. 4, p. 1–10.

BINDEA, G. *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Current opinion in immunology**, 2010. v. 22, n. 2, p. 215–222.

BINGLE, L. *et al.* The role of tumor-associated macrophages in tumor progression : implications for new anticancer therapies [j] the role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. 2002. v. 8, n. MARCH, p. 254–265.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Seminars in immunopathology**, 2013. v. 35, n. 5, p. 585–600.

BOYERINAS, Benjamin *et al.* The role of let-7 in cell differentiation and cancer. **Endocrine-related cancer**, 2010. v. 17, n. 1, p. F19-F36.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

BRENNECKE, J. *et al.* Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. **Cell**, 2003. v. 113, n. 1, p. 25–36.

- BROWN, Henry. Ilya Mechnikov and his studies on comparative inflammation. **Experimental Biology and Medicine**, 1995. v. 209, n. 2, p. 99-101.
- BUFALINO, A. *et al.* Low mir-143/mir-145 cluster levels induce activin a overexpression in oral squamous cell carcinomas, which contributes to poor prognosis. **Plos one**, 2015. v. 10, n. 8, p. 1–22.
- CALIN, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- rna genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 2002. v. 99, n. 24, p. 15524–9.
- CALIN, G. A. *et al.* A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. **New eng j med**, 2005. v. 353, n. 17, p. 1793–801.
- CAO, G. *et al.* Mir-511 inhibits growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting pik3r3. **Tumour biology : the journal of the international society for oncodevelopmental biology and medicine**, 2015. v. 36, n. 6, p. 4453–4459.
- CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **The scientific world journal**, 2011. v. 11, p. 2391–2402.
- CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. **International journal of molecular sciences**, 2016. v. 17, n. 10.
- CHEN, X. *et al.* Role of mir-143 targeting kras in colorectal tumorigenesis. **Oncogene**, 2009. v. 28474, p. 1385–1392.
- CHEN, Z. H. *et al.* A panel of five circulating micrnas as potential biomarkers for prostate cancer. **Prostate**, 2012. v. 72, n. 13, p. 1443–1452.
- CHEN, Z. *et al.* Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, 2012. v. 48, n. 8, p. 686-691.
- CHEN, X. *et al.* Clinical value of integrated-signature mirnas in colorectal cancer: mirna expression profiling analysis and experimental validation. **Oncotarget**, 2015. v. 6, n. 35, p. 37544–56.
- CHENDRIMADA, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, 2005. v. 436, n. 7051, p. 740-744.
- CHIOSEA, S. *et al.* Up-regulation of dicer, a component of the microRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. **The american journal of pathology**, 2006. v. 169, n. 5, p. 1812–20.
- CHIOSEA, S. *et al.* Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. **Cancer research**, 2007. v. 67, n. 5, p. 2345-2350.
- CHISTIAKOV, D. A. *et al.* Cd68/macrosialin: not just a histochemical marker.

Laboratory investigation, 2016. v. 0, n. October, p. 1–10.

CHIU, S. C. *et al.* Therapeutic potential of microRNA let-7: tumor suppression or impeding normal stemness. **Cell transplantation**, 2014. v. 23, n. 4–5, p. 459–469.

CIFUENTES, D. *et al.* A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. **Science**, 2010. v. 328, n. 5986, p. 1694-1698.

COFFELT, S. B.; HUGHES, R.; LEWIS, C. E. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. **Biochimica et biophysica acta**, 2009. v. 1796, n. 1, p. 11–18.

COLE, J. E.; GEORGIU, E.; MONACO, C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. **Mediators of inflammation**, 2010. v. 2010.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, 2006. v. 124, n. 2, p. 263–266.

COSTA, N. L. *et al.* Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, 2013. v. 49, n. 3, p. 216-223.

COSTEA, D. E. *et al.* Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. **Cancer research**, 2013. v. 73, n. 13, p. 3888–3901.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 2002. v. 420, n. 6917, p. 860–867.

CROCE, Carlo M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature reviews genetics**, 2009. v. 10, n. 10, p. 704-714.

DAVIS, B. H.; ZAREV, P. V. Human monocyte cd163 expression inversely correlates with soluble cd163 plasma levels. **Cytometry part b - clinical cytometry**, 2005. v. 63, n. 1, p. 16–22.

DAYAN, D. *et al.* Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. **Cancer medicine**, 2012. v. 1, n. 2, p. 128–40.

DE MARVAL, P. L. M. *et al.* Enhanced malignant tumorigenesis in Cdk4 transgenic mice. **Oncogene**, 2004. v. 23, n. 10, p. 1863-1873.

DE MORAIS, E. F. *et al.* Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma in young patients: a systematic review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2016.

DE PALMA, M.; LEWIS, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer cell**, 2013. v. 23, n. 3, p. 277-286.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between

lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. **Cancer and metastasis reviews**, 2010. v. 29, n. 2, p. 309–316.

DENLI, A. M. *et al.* Processing of primary miRNAs by the microprocessor complex. **Nature**, 2004. v. 432, n. 7014, p. 231–5.

DHOLAM, K. P.; CHOUKSEY, G. C. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in patients aged 18-45 years: a case-control study to evaluate the risk factors with emphasis on stress, diet, oral hygiene, and family history. **Indian journal of cancer**, 2016. v. 53, n. 2, p. 244–251.

DI LEVA, G.; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, 2006. v. 78, n. 2, p. 180-189.

DIEDERICHS, S.; HABER, D. A. Dual role for argonautes in miRNA processing and posttranscriptional regulation of miRNA expression. **Cell**, 2007. v. 131, n. 6, p. 1097–1108.

DOU, H. *et al.* Decreased plasma let-7c and mir-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer. **International journal of clinical and experimental medicine**, 2015. v. 8, n. 6, p. 9291–8.

DU, Y. *et al.* miR-98 suppresses tumor cell growth and metastasis by targeting IGF1R in oral squamous cell carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, 2015. v. 8, n. 10, p. 12252.

EGEBLAD, M. *et al.* Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current opinion in cell biology**, 2010. v. 22, n. 5, p. 697-706.

EHRENREICH, I. M.; PURUGGANAN, M. MicroRNAs in plants: possible contributions to phenotypic diversity. **Plant signaling & behavior**, 2008. v. 3, n. 10, p. 829–30.

EL-ROUBY, D. H. Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas. **Journal of oral pathology and medicine**, 2010. v. 39, n. 7, p. 559–564.

EMMRICH, S. *et al.* miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF β and Wnt signaling. **Genes & development**, 2014. v. 28, n. 8, p. 858-874.

ESSA, A. A. M. *et al.* Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: reciprocal roles of neutrophils and macrophages. **Journal of oral pathology and medicine**, 2014. v. 43, n. 10, p. 778–784.

ESSA, A. A. M. *et al.* Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. **Pathology**, 2016. v. 48, n. 3, p. 219–227.

ESSANDOH, K. *et al.* MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response. **Shock**, 2016. v. 46, n. 2, p. 122-131.

FABRIEK, B. O.; DIJKSTRA, C. D.; BERG, T. K. VAN DEN. The macrophage scavenger receptor cd163. **Immunobiology**, 2005. v. 210, n. 2–4, p. 153–160.

FACTORY, C. Act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. 2016. v. 12, n. 17, p. 1484–1495.

FANG, Z. *et al.* Regulation of trim24 by mir-511 modulates cell proliferation in gastric cancer. **Journal of experimental & clinical cancer research**, 2017. v. 36, n. 1, p. 17.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Journal of cancer therapy**, 2012. v. 3, n. 4, p. 263–268.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, 2015. v. 136, n. 5, p. E359–E386.

FRASER, I.; HUGHES, D.; GORDON, S. Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. 1993. p. 343–346.

FLEISCHMANN, K. K. *et al.* The leukemogenic fusion gene *MLL-AF9* alters microRNA expression pattern and inhibits monoblastic differentiation via mir-511 repression. **Journal of experimental & clinical cancer research : cr**, 2016. v. 35, p. 9.

FUJITA, Y. *et al.* Prognostic significance of interleukin-8 and cd163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. **Plos one**, 2014. v. 9, n. 12, p. 1–17.

FUNG, M.; MAK, N.; LEUNG, K. Involvement of interleukin-1 in the differentiation-inducing activity of tumor necrosis factor- α on a murine myeloid leukemia (*Wehi-3b*). 1997. v. 1, p. 821–826.

GAUTIER, E. L. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nature immunology**, 2012. v. 13, n. 11, p. 1118–1128.

GEISSMANN, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, 2010. v. 327, n. 5966, p. 656–661.

GHOLIZADEH, P. *et al.* Role of oral microbiome on oral cancers, a review. **Biomedicine and pharmacotherapy**, 2016. v. 84, p. 552–558.

GONG, Y. *et al.* Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. **Journal of clinical investigation**, 2008. v. 118, n. 9, p. 3012–3024.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, 2003. v. 3, n. 1, p. 23–35.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, 2002. v. 111, n. 7, p. 927–930.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, 2010. v. 32, n. 5, p. 593-604.

GORP, H. VAN; DELPUTTE, P. L.; NAUWYNCK, H. J. Scavenger receptor cd163, a jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. **Molecular immunology**, 2010. v. 47, n. 7–8, p. 1650–1660.

GOTTFRIED, E. *et al.* Expression of cd68 in non-myeloid cell types. **Scandinavian journal of immunology**, 2008. v. 67, n. 5, p. 453–463.

GRAVERSEN, J. H.; MADSEN, M.; MOESTRUP, S. K. Cd163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. **International journal of biochemistry and cell biology**, 2002. v. 34, n. 4, p. 309–314.

GREAVES, D. R.; GORDON, S. Macrophage-specific gene expression: current paradigms and future challenges. **International journal of hematology**, 2002. v. 76, n. 1, p. 6–15.

GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA registry. **Nucleic acids research**, 2004. v. 32, n. Database issue, p. D109-11.

GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic acids research**, 2006. v. 34, n. suppl 1, p. D140-D144.

GRIMSON, A. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Molecular cell**, 2007. v. 27, n. 1, p. 91-105.

GUETTA, J. *et al.* Haptoglobin genotype modulates the balance of th1/th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. **Atherosclerosis**, 2007. v. 191, n. 1, p. 48–53.

HAGEMANN, T. *et al.* “re-educating” tumor-associated macrophages by targeting nf-kappab. **The journal of experimental medicine**, 2008. v. 205, n. 6, p. 1261–1268.

HAMMOND, S. M. *et al.* Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of rna. **Science**, 2001. v. 293, n. 5532, p. 1146–1150.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced drug delivery reviews**, 2015. v. 87, p. 3-14.

HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, 2012. v. 21, n. 3, p. 309–322.

- HE, K. F. *et al.* CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. **Biomed Res Int**, 2014:838632.
- HE, Q. *et al.* MicroRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. **Oral oncology**, 2016. v. 57, p. 15–20.
- HE, Z. *et al.* MiR-143-3p functions as a tumor suppressor by regulating cell proliferation, invasion and epithelial–mesenchymal transition by targeting QKI-5 in esophageal squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, 2016. v. 15, n. 1, p. 51.
- HE, Q. *et al.* microRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. **Oral oncology**, 2016. v. 57, p. 15-20.
- HEBERT, C. *et al.* High mobility group a2 is a target for mirna-98 in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular cancer**, 2007. v. 6, p. 5.
- HEINSBROEK, S. E. M. *et al.* Mir-511-3p, embedded in the macrophage mannose receptor gene, contributes to intestinal inflammation. **Mucosal immunology**, 2016. v. 9, n. 4, p. 960–73.
- HENDRIX, M. J. C. *et al.* Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. **Nature reviews. cancer**, 2007. v. 7, n. 4, p. 246–255.
- HEO, I. *et al.* Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group ii let-7 microRNAs. **Cell**, 2012. v. 151, n. 3, p. 521–532.
- HERTEL, J. *et al.* Evolution of the let-7 microRNA family. **RNA biology**, 2012. v. 9, n. 3, p. 231-241.
- HEUSINKVELD, M.; BURG, S. H. VAN DER. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of translational medicine**, 2011. v. 9, n. 1, p. 216.
- HILLY, O. *et al.* Distinctive pattern of let-7 family microRNAs in aggressive carcinoma of the oral tongue in young patients. **Oncology letters**, 2016. v. 12, n. 3, p. 1729–1736.
- HIRAYAMA, S. *et al.* Prognostic impact of CD204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma: possible contribution of Cd204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment. **Journal of thoracic oncology**, 2012. v. 7, n. 12, p. 1790-1797.
- HÖGGER, P. *et al.* Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). **The Journal of Immunology**, 1998. v. 161, n. 4, p. 1883-1890.
- HOLNESS, B. C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of cd68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. 2016.

HU, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **Journal of experimental & clinical cancer research : cr**, 2016. v. 35, n. 1, p. 12.

HUANG, D. W.; LEMPICKI, R. A; SHERMAN, B. T. Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. **Nature protocols**, 2009. v. 4, n. 1, p. 44–57.

HUME, D. Plenary perspective: the complexity of constitutive and inducible gene expression in mononuclear phagocytes. **Journal of leukocyte biology**, 2012. v. 92, n. 3, p. 433–44.

HUME, D. A. Macrophages as apc and the dendritic cell myth. **Journal of immunology (baltimore, md. : 1950)**, 2008. v. 181, p. 5829–5835.

IIO, A. *et al.* Identification of non-coding rnas embracing microrna-143/145 cluster. **Molecular cancer**, 2010. v. 9, p. 136.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. Microrna dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. a comprehensive review. **Embo molecular medicine**, 2012. v. 4, n. 3, p. 143–159.

JAIN, M. Assesment of correlation of herpes simplex virus-1 with oral cancer and precancer- a comparative study. **Journal of clinical and diagnostic research**, 2016. v. 10, n. 8, p. ZC014-ZC17.

JAKYMIW, A. *et al.* Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2010. v. 49, n. 6, p. 549-559.

JENKINS, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of th2 inflammation. **Science (new york, n.y.)**, 2011. v. 332, n. 6035, p. 1284–8.

KAKU, Y. *et al.* Overexpression of cd163, cd204 and cd206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. **Plos one**, 2014. v. 9, n. 1, p. 1–8.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews. cancer**, 2006. v. 6, n. 5, p. 392–401.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. Nf-kappab: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature reviews. immunology**, 2005. v. 5, n. 10, p. 749–59.

KARO-ATAR, D. *et al.* Microrna profiling reveals opposing expression patterns for mir-511 in alternatively and classically activated macrophages. **The journal of asthma : official journal of the association for the care of asthma**, 2015. v. 52, n. 6, p. 545–553.

KASINSKI, A. L.; SLACK, F. J. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. **Nature reviews Cancer**, 2011. v. 11, n. 12, p. 849-864.

KAWAMURA, K. *et al.* Detection of m2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. **Pathology international**, 2009. v. 59, n. 5, p. 300–305.

KEESHAN, K. *et al.* Tribbles homolog 2 (Trib2) and HoxA9 cooperate to accelerate acute myelogenous leukemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 2008. v. 40, n. 1, p. 119-121.

KELLEY, J. L. *et al.* Scavenger receptor-a (cd204): a two-edged sword in health and disease. **Critical reviews in immunology**, 2014. v. 34, n. 3, p. 241–61.

KENT, O. A *et al.* Repression of the mir-143 / 145 cluster by oncogenic ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway service repression of the mir-143 / 145 cluster by oncogenic ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. **Genes & development**, 2010. n. 410, p. 2754–2759.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, 2010. v. 141, n. 1, p. 52-67.

KHOT, K. P.; DESHMANE, S.; CHOUDHARI, S. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma - the enigma unravelled. **The chinese journal of dental research : the official journal of the scientific section of the chinese stomatological association (csa)**, 2016. v. 19, n. 1, p. 17–23.

KIM, T. H. *et al.* Deregulation of mir-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. **Histopathology**, 2010. v. 57, n. 5, p. 734–743.

KNYAZEY, E. N. *et al.* Plasma levels of hsa-mir-619-5p and hsa-mir-1184 differ in prostatic benign hyperplasia and cancer. **Bulletin of experimental biology and medicine**, 2016. v. 161, n. 1, p. 108–111.

KOK, K. H. *et al.* Human trbp and pact directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering rna. **Journal of biological chemistry**, 2007. v. 282, n. 24, p. 17649–17657.

KOMOHARA, Y. *et al.* Am-3k, an anti-macrophage antibody, recognizes cd163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, 2006. v. 54, n. 7, p. 763–771.

KOMOHARA, Y. *et al.* Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **The Journal of pathology**, 2008. v. 216, n. 1, p. 15-24.

KOMOHARA, Y. *et al.* M2 macrophage/microglial cells induce activation of Stat3 in

primary central nervous system lymphoma. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**, 2011. v. 51, n. 2, p. 93-99.

KOMOHARA, Yoshihiro; JINUSHI, Masahisa; TAKEYA, Motohiro. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer science**, 2014. v. 105, n. 1, p. 1-8.

KOMOHARA, Yoshihiro et al. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies. **Pathology international**, 2015. v. 65, n. 4, p. 170-176.

KONG, L. Q. *et al.* The clinical significance of the cd163+ and cd68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. **Plos one**, 2013. v. 8, n. 3.

KOWALEWSKA, M. *et al.* Micrnas in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. **Tumor biology**, 2013. v. 34, n. 4, p. 2153–2160.

KOZAKI, K. I. *et al.* Exploration of tumor-suppressive micrnas silenced by dna hypermethylation in oral cancer. **Cancer research**, 2008. v. 68, n. 7, p. 2094–2105.

KRAUSGRUBER, T. *et al.* Irf5 promotes inflammatory macrophage polarization and th1-th17 responses. **Nature immunology**, 2011. v. 12, n. 3, p. 231–238.

KRIEGER, M.; STERN, D. M.; EDITORS, S. Multiligand receptors multiligand receptors and human disease. 2001. v. 108, n. 5, p. 645–647.

KRISTIANSEN, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, 2001. v. 409, n. 6817, p. 198–201.

KRYCZEK, I. *et al.* B7-h4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. **Journal of experimental medicine**, 2006. v. 203, n. 4, p. 871–881.

KUANG, D.-M. *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through pd-l1. **Journal of experimental medicine**, 2009. v. 206, n. 6, p. 1327–1337.

KUJAN, O. *et al.* Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. **Oral oncology**, 2007. v. 43, n. 3, p. 224–231.

KUMAR, M. S. *et al.* Impaired micrna processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nature genetics**, 2007. v. 39, n. 5, p. 673–677.

LAGO, N. *et al.* Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. 2013. v. 49, p. 216–223.

LAGOS-QUINTANA, M. *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, 2001. v. 294, n. 5543, p. 853-858.

- LAGOS-QUINTANA, M. et al. New microRNAs from mouse and human. **Rna**, 2003. v. 9, n. 2, p. 175-179.
- LANE, David P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, 1992. v. 358, p. 15-16.
- LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 2001. v. 294, n. 5543, p. 858-862.
- LAVIN, Y.; MERAD, M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. **Cancer immunology research**, 2013. v. 1, n. 4, p. 201-209.
- LEANNE PEISER, SUBHANKAR MUKHOPADHYAY, S. G. Scavenger receptors in innate immunity leanne peiser , subhankar mukhopadhyay and siamon gordon. **Curr opin immunol**, 2002. v. 14, p. 123–128.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, 1993. v. 75, n. 5, p. 843-854.
- LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small rnas in *caenorhabditis elegans*. **Science (new york, n.y.)**, 2001. v. 294, n. 5543, p. 862–4.
- LEE, H. et al. Biogenesis and regulation of the *let-7* mirnas and their functional implications. **Protein and cell**, 2016. v. 7, n. 2, p. 100–113.
- LEGDEUR, M. C. J. C.; SCHUURHUIS, G. J.; OSSENKOPPELE, G. J. Monocyte-chemoattractant-protein-1-mediated migration of human monocytes towards blasts from patients with acute myeloid leukemia. 2001. p. 16–22.
- LEVENTAL, K. R. et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. **Cell**, 2009. v. 139, n. 5, p. 891-906.
- LEVER, E.; SHEER, D. The role of nuclear organization in cancer. **The journal of pathology**, 2010. v. 220, n. September, p. 114–125.
- LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, 2005. v. 120, n. 1, p. 15–20.
- LI, C. et al. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. **Oncol rep**, 2002. v. 9, n. 6, p. 1219–1223.
- LI, Y. et al. Up-regulation of miR-200 and *let-7* by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. **Cancer research**, 2009. v. 69, n. 16, p. 6704-6712.
- LI, X.-X. et al. Reduced expression levels of *let-7c* in human breast cancer patients. **Oncology letters**, 2015. v. 9, n. 3, p. 1207–1212.

LIN, E. Y. *et al.* Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer research**, 2006. v. 66, n. 23, p. 11238–11246.

LIN, E. Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. **Molecular oncology**, 2007. v. 1, n. 3, p. 288-302.

LINDSAY, M. A. microRNAs and the immune response. **Trends in immunology**, 2008. v. 29, n. 7, p. 343-351.

LIU, C.-G. *et al.* An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 2004. v. 101, n. 26, p. 9740–4.

LIU, S. Y. *et al.* Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, 2008. v. 44, n. 3, p. 277–285.

LIU, S. *et al.* Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, 2008. v. 44, n. 3, p. 277-285.

LIU, Z. *et al.* Knocking down cdk4 mediates the elevation of let-7c suppressing cell growth in nasopharyngeal carcinoma. **Bmc cancer**, 2014. v. 14, n. 1, p. 274.

LU, L. *et al.* Time series mirna-mrna integrated analysis reveals critical mirnas and targets in macrophage polarization. **Scientific reports**, 2016. v. 6, n. October, p. 37446.

LU, M. *et al.* A novel microRNAs expression signature for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. **Oncotarget**, 2017. v. 8, n. 5, p. 8775–8784.

LÚCIO, P. S. C. *et al.* Tumor-associated macrophages (tams): clinical-pathological parameters in squamous cell carcinomas of the lower lip. **Brazilian oral research**, 2016. v. 30, n. 1, p. 1–9.

LUDWIG, N. *et al.* Circulating serum mirnas as potential biomarkers for nephroblastoma. 2015. n. March, p. 1360–1367.

MA, Q. *et al.* MicroRNA-143 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer and its relative mechanism. **International journal of biological sciences**, 2013. v. 9, n. 7, p. 680–692.

MACRAE, I. J. *et al.* In vitro reconstitution of the human risc-loading complex. **Proceedings of the national academy of sciences**, 2008. v. 105, n. 2, p. 512–517.

MANIECKI, M. B. *et al.* Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor cd163 in malignant cells. **International journal of cancer**, 2012. v. 131, n. 10, p. 2320–2331.

- MANIKANDAN, M. *et al.* Down regulation of mir-34a and mir-143 may indirectly inhibit p53 in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. **Asian pacific journal of cancer prevention**, 2015. v. 16, n. 17, p. 7619–7625.
- MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current opinion in immunology**, 2010. v. 22, n. 2, p. 231-237.
- MANTOVANI A *et al.* The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol today** , 1992. v. 13, p. 265–270.
- MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized m 2 mononuclear phagocytes. **Trends immunol.**, 2002. v. 23, n. 11, p. 549–555.
- MANTOVANI, A. *et al.* Cancer-related inflammation. **Nature**, 2008. v. 454, n. 7203, p. 436–444.
- MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of pathology**, 2013. v. 229, n. 2, p. 176-185.
- MARAGKAKIS, M. *et al.* Diana-microt web server: elucidating microrna functions through target prediction. **Nucleic acids research**, 2009. v. 37, n. SUPPL. 2, p. 273–276.
- MARAGKAKIS, M. *et al.* Accurate microrna target prediction correlates with protein repression levels. **Bmc bioinformatics**, 2009. v. 10, n. 1, p. 295.
- MARCUS, B. *et al.* Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Cancer**, 2004. v. 101, n. 12, p. 2779–2787.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual review of immunology**, 2009. v. 27, n. 1, p. 451–483.
- MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor. **Journal of leukocyte biology**, 2012. v. 92, n. 6, p. 1177–86.
- MAZZIERI, R. *et al.* Targeting the ang2/tie2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. **Cancer cell**, 2011. v. 19, n. 4, p. 512–526.
- MASON, S. D.; JOYCE, J. A. Proteolytic networks in cancer. **Trends in cell biology**, 2011. v. 21, n. 4, p. 228-237.
- MAZZIERI, R. *et al.* Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. **Cancer cell**, 2011. v. 19, n. 4, p. 512-526.

MELTON, D. W. *et al.* Dynamic macrophage polarization-specific mirna patterns reveal increased soluble vegf receptor 1 by mir-125a-5p inhibition. **Physiol genomics**, 2016. n. 210, p. physiolgenomics 00098 2015.

MITRA, A. K. *et al.* MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. **Cancer discovery**, 2012. v. 2, n. 12, p. 1100-1108.

MOESTRUP, S. K.; MØLLER, H. J. Cd163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. **Annals of medicine**, 2004. v. 36, n. 5, p. 347–354.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 2006. v. 26, n. 8, p. 1702–1711.

MOORE, T. O. *et al.* Human papillomavirus, smoking, and cancer. **Journal of cutaneous medicine and surgery**, 2001. v. 5, n. 4, p. 323–328.

MORENO-LOPEZ, L. A. *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in madrid, spain. **Oral oncology**, 2000. v. 36, n. 2, p. 170–174.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Nih public access. **Genetics**, 2009. v. 8, n. 12, p. 958–969.

MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. **Immunobiology**, 2004. v. 209, n. 1–2, p. 39–49.

MÜLLER-RICHTER, U. D. A. *et al.* Analysis of expression profiles of mage-a antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Head & face medicine**, 2009. v. 5, p. 10.

MURDOCH, C. *et al.* The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, 2008. v. 8, n. 8, p. 618-631.

MURPHY, J. E. *et al.* Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. **Atherosclerosis**, 2005. v. 182, n. 1, p. 1–15.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, 2011. v. 11, n. 11, p. 723–737.

NINOMIYA, M. *et al.* Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers. **PloS one**, 2013. v. 8, n. 6, p. e66086.

NADIMINTY, N. *et al.* Microrna let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. **Plos one**, 2012. v. 7, n. 3, p. 1–10.

NEYEN, C. *et al.* Europe pmc funders group macrophage scavenger receptor a promotes tumour progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer.

2013. v. 190, n. 7, p. 3798–3805.

NI, Y.-H. *et al.* Microlocalization of cd68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. **Tumour biology : the journal of the international society for oncodevelopmental biology and medicine**, 2015. v. 36, n. 7, p. 5291–8.

NISHIO, M. *et al.* Software-assisted morphometric and phenotype analyses of human peripheral blood monocyte-derived macrophages induced by a microenvironment model of human esophageal squamous cell carcinoma. **Pathology international**, 2016. v. 66, n. 2, p. 83–93.

O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. MicroRNA regulation of inflammatory responses. **Annual review of immunology**, 2012. v. 30, p. 295–312.

OCHSENBEIN, A. F. Immunological ignorance of solid tumors. **Springer seminars in immunopathology**, 2005. v. 27, n. 1, p. 19–35.

OHRI, C. M. *et al.* Macrophages within nsccl tumour islets are predominantly of a cytotoxic m1 phenotype associated with extended survival. **European respiratory journal**, 2009. v. 33, n. 1, p. 118–126.

OHTAKI, Y. *et al.* Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 2010. v. 5, n. 10, p.1507-15.

OJALVO, L. S. *et al.* High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. **Am. j. pathol.**, 2009. v. 174, n. 3, p. 1048–1064.

OJALVO, L. S. *et al.* Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors. **J Immunol.** 2010 Jan 15;184(2):702-12.

OKAMURA, K. *et al.* The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. **Cell**, 2007. v. 130, n. 1, p. 89-100.

OLSEN, P. H.; AMBROS, V. The lin-4 regulatory rna controls developmental timing in *caenorhabditis elegans* by blocking lin-14 protein synthesis after the initiation of translation. **Dev. biol.**, 1999. v. 216, p. 671–680.

ONOFRE, G. *et al.* Scavenger receptor cd163 and its biological functions molecular characterization. **Acta medica**, 2009. v. 52, n. 26, p. 57–61.

PAPADOPOULOS, G. L. *et al.* The database of experimentally supported targets: a functional update of tarbase. **Nucleic acids research**, 2009. v. 37, n. SUPPL. 1, p. 155–158.

PARK, W. *et al.* CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, 2002. v. 12,

n. 17, p. 1484-1495.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2005. v. 55, n. 2, p. 74-108.

PASQUINELLI, A E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory rna. **Nature**, 2000. v. 408, n. 6808, p. 86–89.

PATEL, S. G.; SHAH, J. P. Tnm staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. **Ca: a cancer journal for clinicians**, 2005. v. 55, n. 4, p. 242-258-262, 264.

PEARSON, A. M. Scavenger receptors in innate immunity. **Current opinion in immunology**, 1996. v. 8, n. 1, p. 20-28.

PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr opin immunol.**, 2002. v. 14, p. 123–128.

PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. I. Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. **Cell**, 2002. v. 109, n. 3, p. 321-334.

PENBERTHY, K. K.; RAVICHANDRAN, K. S. Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. **Immunological reviews**, 2016. v. 269, n. 1, p. 44-59.

PERRON, M. P.; PROVOST, P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, 2008. v. 13, p. 2537.

PIAST, M. *et al.* Molecular evolution of enolase. **Acta biochimica polonica**, 2005. v. 52, n. 2, p. 507–513.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial paracoccidioides brasiliensis infection. **Journal of leukocyte biology**, 2008. v. 83, n. 5, p. 1088–99.

PIRILÄ, E. *et al.* Macrophages modulate migration and invasion of human tongue squamous cell carcinoma. **Plos one**, 2015. v. 10, n. 3.

PLATT, N.; GORDON, S. Is the class a macrophage scavenger receptor (sr-a) multifunctional? — the mouse 's tale. **Journal of clinic investigation**, 2001. v. 108, n. 5, p. 649–654.

PLÜDDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunological reviews**, 2011. v. 240, n. 1, p. 11-24.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, 2004. v. 4, n. 1, p. 71-78.

POOMSAWAT, S. *et al.* Alteration in the expression of cdk4 and cdk6 proteins in oral cancer and premalignant lesions. **Journal of oral pathology and medicine**, 2010. v. 39, n. 10, p. 793–799.

PRABHUDAS, Mercy *et al.* Standardizing scavenger receptor nomenclature. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 1997-2006, 2014.

PRADERE, J. P.; DAPITO, D. H.; SCHWABE, Robert F. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. **Oncogene**, 2014. v. 33, n. 27, p. 3485

PRAMANIK, D. *et al.* Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. **Molecular cancer therapeutics**, 2011. v. 10, n. 8, p. 1470-1480.

PRUIJT, J. F. *et al.* Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase b (mmp-9). **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 1999. v. 96, n. 19, p. 10863–8.

PUCCI, F. *et al.* A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating tie2-expressing monocytes, blood “resident” monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. **Blood**, 2009. v. 114, n. 4, p. 901–914.

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

RANA, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small rnas. **Nat.rev.mol.cell biol.**, 2007. v. 8, n. 1, p. 23–36.

REIKVAM, H. *et al.* Primary human acute myelogenous leukemia cells release matrix metalloproteases and their inhibitors: release profile and pharmacological modulation. **European journal of haematology**, 2010. v. 84, n. 3, p. 239–51.

REINHART, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 rna regulates developmental timing in caenorhabditis elegans. **Nature**, 2000. v. 403, n. 6772, p. 901–906.

REINHART, B. J. *et al.* MicroRNAs in plants. **Genes & development**, 2002. v. 16, n. 13, p. 1616-1626.

REN, Q. *et al.* Epithelial and stromal expression of mirnas during prostate cancer progression. **American journal of translational research**, 2014. v. 6, n. 4, p. 329–339.

RESNICK, D.; PEARSON, A.; KRIEGER, M. The srcr superfamily: a family reminiscent of the ig superfamily. **Trends in biochemical sciences**, 1994. v. 19, n. 1, p. 5–8.

RHOADES, M. W. *et al.* Prediction of plant microrna targets prediction of plant

micrna targets prediction of plant micrna targets. 2002. v. 110, p. 513–520.

RIBEIRO, A. C. P. *et al.* Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in brazilians. **The british journal of oral & maxillofacial surgery**, 2009. v. 47, n. 2, p. 95–98.

RICH, A. M. *et al.* Toll-like receptors and cancer, particularly oral squamous cell carcinoma. **Frontiers in immunology**, 2014. v. 5, n. SEP, p. 1–6.

RITTER, M. *et al.* The scavenger receptor cd163: regulation, promoter structure and genomic organization. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, 1999. v. 67, n. 5–6, p. 257–61.

RODRIGUES, P. C. *et al.* Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma : a retrospective study of 202 cases. **International journal of oral & maxillofacial surgery**, 2014.

RUBY, J. G.; JAN, C. H.; BARTEL, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature**, 2007. v. 448, n. 7149, p. 83-86.

RYAN, B. M.; ROBLES, A. I.; HARRIS, C. C. Genetic variation in micrna networks: the implications for cancer research. **Nature reviews. cancer**, 2011. v. 10, n. 6, p. 389–402.

SAMUEL, M. S. *et al.* Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. **Cancer cell**, 2011. v. 19, n. 6, p. 776-791.

SÁNCHEZ, C. *et al.* The porcine 2a10 antigen is homologous to human cd163 and related to macrophage differentiation. **Journal of immunology (baltimore, md. : 1950)**, 1999. v. 162, n. 9, p. 5230–7.

SCHEE, K. *et al.* Deep sequencing the micrna transcriptome in colorectal cancer. **Plos one**, 2013. v. 8, n. 6.

SCHMALSTIEG, F. C.; GOLDMAN, A. S. Ilya ilich metchnikoff (1845-1915) and paul ehrlich (1854-1915): the centennial of the 1908 nobel prize in physiology or medicine. **Journal of medical biography**, 2008. v. 16, n. 2, p. 96–103.

SCHNOOR, M. *et al.* Production of type vi collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. **Journal of immunology (baltimore, md. : 1950)**, 2008. v. 180, n. 8, p. 5707–5719.

SCHULTZE, J. L. Transcriptional programming of human macrophages: on the way to systems immunology. **Journal of molecular medicine**, 2015. v. 93, n. 6, p. 589–597.

SCHULZ, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. **Science (new york, n.y.)**, 2012. v. 336, n. 6077, p. 86–90.

- SEGGERSON, K.; TANG, L.; MOSS, E. G. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. **Developmental biology**, 2002. v. 243, n. 2, p. 215–225.
- SEMPERE, L. F. *et al.* The expression of the *let-7* small regulatory rna is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. **Developmental biology**, 2002. v. 179, p. 170–179.
- SHENOI, R. *et al.* Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: a retrospective study. **Indian journal of cancer**, 2012. v. 49, n. 1, p. 21–26.
- SHIGEOKA, M. *et al.* Tumor associated macrophage expressing cd204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer science**, 2013. v. 104, n. 8, p. 1112–1119.
- SHOJAEI, F. *et al.* Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+ Gr1+ myeloid cells. **Nature biotechnology**, 2007. v. 25, n. 8, p. 911-920.
- SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.
- SINDRILARU, A. *et al.* An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **The Journal of clinical investigation**, 2011. v. 121, n. 3, p. 985-997.
- SMALHEISER, N. R. Regulation of mammalian microRNA processing and function by cellular signaling and subcellular localization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 2008. v. 1779, n. 11, p. 678-681.
- SOBIN, Leslie H. *et al.* TNM: classificação de tumores malignos. In: **TNM: classificação de tumores malignos**. INCA, 2004. [S.l.]: [s.n.].
- SOEDA, S. *et al.* Tumor-associated macrophages correlate with vascular space invasion and myometrial invasion in endometrial carcinoma. **Gynecologic oncology**, 2008. v. 109, n. 1, p. 122–128.
- SONG, L.; LEE, C.; SCHINDLER, C. Deletion of the murine scavenger receptor *cd68*. **Journal of lipid research**, 2011. v. 52, n. 8, p. 1542–1550.
- SQUADRITO, M. L.; DE PALMA, M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. **Molecular aspects of medicine**, 2011. v. 32, n. 2, p. 123-145.
- SQUADRITO, M. L. *et al.* Mir-511-3p modulates genetic programs of tumor-associated macrophages. **Cell reports**, 2012. v. 1, n. 2, p. 141–154.
- SQUADRITO, M. L. *et al.* MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. **Trends in immunology**, 2013. v. 34, n. 7, p. 350-359.

STEIN, M. *et al.* Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The journal of experimental medicine**, 1992. v. 176, n. 1, p. 287–92.

SUN, Z. *et al.* Role of toll-like receptor 4 on the immune escape of human oral squamous cell carcinoma and resistance of cisplatin-induced apoptosis. **Molecular cancer**, 2012. v. 11, n. 1, p. 33.

SUN, L. *et al.* Association of decreased expression of serum miR-9 with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, 2016. v. 22, p. 289.

SZEBENI, G. J. *et al.* Inflammation and cancer : extra- and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters. 2017. v. 2017.

TABARA, H. *et al.* The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**, 1999. v. 99, n. 2, p. 123-132.

TAKAHASHI, K. Development and differentiation of macrophages and their related cells. **Human cell : official journal of human cell research society**, 1994. v. 7, n. 3, p. 109–115.

TAYLOR, P. R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. **Annual review of immunology**, 2005. v. 23, n. 1, p. 901–944.

TÖMBÖL, Z. *et al.* Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. **Endocrine-related cancer**, 2009. v. 16, n. 3, p. 895–906.

TOMOKIYO, R. Ichiro *et al.* Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class a macrophage scavenger receptors. **Atherosclerosis**, 2002. v. 161, n. 1, p. 123–132.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **Ca: a cancer journal of clinicians.**, 2015. v. 65, n. 2, p. 87–108.

TRAN, N. *et al.* MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. **Biochemical and biophysical research communications**, 2007. v. 358, n. 1, p. 12–17.

TRIPURANI, S. K. *et al.* Bmp- specific smads function as novel repressors of pdgfa and modulate its expression in ovarian granulosa cells and tumors. **Oncogene**, 2013. v. 32, n. 33, p. 3877–3885.

TSEREL, L. *et al.* MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal mir-511 as putative positive regulator of toll-like receptor 4. **Journal of biological chemistry**, 2011. v. 286, n. 30, p. 26487–26495.

- URAKAWA, N. *et al.* Gdf15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via akt and erk pathways. **Laboratory investigation**, 2015. v. 95, n. 10, p. 491–503.
- VALVERDE, L. De F. *et al.* Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. **Tumor biology**, 2016. v. 37, n. 7, p. 9233–9241.
- VAN GORP, H.; DELPUTTE, P. L.; NAUWYNCK, H. J. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. **Molecular immunology**, 2010. v. 47, n. 7, p. 1650-1660.
- VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, 2007. v. 318, n. 5858, p. 1931-1934.
- VILA, J. M. *et al.* The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SCRC-SF): Structure and function of group B members. **Inmunología**, 2000. v. 19, p. 105-10.
- VILAS-BÔAS, D. S. *et al.* Immunohistochemical detection of ki-67 is not associated with tumor-infiltrating macrophages and cyclooxygenase-2 in oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology and medicine**, 2010. v. 39, n. 7, p. 565–570.
- WANG, H. Y. *et al.* Profiling plasma microrna in nasopharyngeal carcinoma with deep sequencing. **Clinical chemistry**, 2014. v. 60, n. 5, p. 773–782.
- WANG, W. *et al.* MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, 2012.v. 33, n. 5, p. 1113-1120.
- WANG, W.; ZHAO, L. J.; TAN, Y. X.; REN, H.; QI, Z. T. Identification of deregulated mirnas and their targets in hepatitis b virus-associated hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, 2012. v. 18, n. 38, p. 5442–5453.
- WANI, S. *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: a 15 year study with respect to clinicodemography and survival analysis. **Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the association of otolaryngologists of india**, 2016. v. 68, n. 4, p. 511–521.
- WEAVER, L. K. *et al.* Up-regulation of human monocyte cd163 upon activation of cell-surface toll-like receptors. **Journal of leukocyte biology**, 2007. v. 81, n. 3, p. 663–671.
- WEBER, M. *et al.* Macrophage polarisation changes within the time between diagnostic biopsy and tumour resection in oral squamous cell carcinomas--an immunohistochemical study. **British journal of cancer**, 2015. v. 113, n. 3, p. 510–9.
- WEBER, M. *et al.* Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. **Oral oncology**, 2016. v. 52, p. 75–84.

WENG, J.-H. *et al.* Mir-494-3p induces cellular senescence and enhances radiosensitivity in human oral squamous carcinoma cells. **International journal of molecular sciences**, 2016. v. 17, n. 7, p. 1092.

WENZEL, I.; ROTH, J. Identification of a novel surface molecule, $\text{rm3} / 1$, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells. **Differences**, 1996. p. 2758–2763.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, 1993. v. 75, p. 855–862.

WILKINSON, K.; KHOURY, J. EL. Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **International journal of Alzheimer's disease**, 2012. v. 2012.

WONG, N.; WANG, X. Mirdb: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic acids research**, 2015. v. 43, n. D1, p. D146–D152.

WONG, T. S. *et al.* Mature mir-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. **Clinical cancer research**, 2008. v. 14, n. 9, p. 2588–2592.

WU, B. *et al.* Mirna-101 inhibits oral squamous-cell carcinoma growth and metastasis by targeting zinc finger e-box binding homeobox 1. 2016. v. 6, n. 6, p. 1396–1407.

WU, B. H. *et al.* MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. **Oral oncology**, 2011. v. 47, n. 5, p. 314–319.

WU, D. *et al.* MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. **Molecular medicine reports**, 2013. v. 8, n. 2, p. 626–630.

WU, X.-L. *et al.* MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting *cox-2*. **World journal of gastroenterology : wjg**, 2013. v. 19, n. 43, p. 7758–65.

WYCKOFF, J. B. *et al.* Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. **Cancer research**, 2007. v. 67, n. 6, p. 2649–2656.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. **Nature**, 2013. v. 496, n. 7446, p. 445–455.

XIONG, H. *et al.* Integrated microRNA and mRNA transcriptome sequencing reveals the potential roles of miRNAs in stage I endometrioid endometrial carcinoma. **Plos one**, 2014. v. 9, n. 10.

XU, P. *et al.* The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required

for normal fat metabolism. **Current Biology**, 2003. v. 13, n. 9, p. 790-795.

XU, B. *et al.* Mir-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of kras. **Molecular and cellular biochemistry**, 2011. v. 350, n. 1–2, p. 207–213.

XU, L. *et al.* Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma. **Annals of surgical oncology**, 2014. n. December 2013, p. 3142–3150.

YANAIHARA, N. *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer cell**, 2006. v. 9, n. 3, p. 189–198.

YANG, J.-S. *et al.* Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. **Rna (new york, n.y.)**, 2011. v. 17, n. 2, p. 312–326.

YANG, J. S.; LAI, E. C. Dicer-independent, ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates. **Cell cycle**, 2010. v. 9, n. 22, p. 4455–4460.

YOKOYAMA, T.; NAKAMURA, T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. **Cancer science**, 2011. v. 102, n. 6, p. 1115-1122.

YOSHIKAWA, K. *et al.* Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. 2012.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells : role of stat3 in the tumour microenvironment. 2007. v. 7, n. January, p. 41–51.

ZAIDI, M. R. *et al.* Interferon- γ links UV to melanocyte activation and promotes melanomagenesis. **Nature**, 2011. v. 469, n. 7331, p. 548.

ZHANG, L. *et al.* Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. **Cell mol immunol**, 2007. v. 4, n. 5, p. 359–367.

ZHANG, H. *et al.* microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. **Oncology reports**, 2010. v. 24, n. 5, p. 1363.

ZHANG, Y. *et al.* MicroRNA-143 targets macc1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. 2012. p. 1–9.

ZHANG, C. *et al.* Mir-511 and mir-1297 inhibit human lung adenocarcinoma cell proliferation by targeting oncogene trib2. 2012. v. 7, n. 10, p. 1–9.

ZHANG, Y. *et al.* Expression profiles of mirnas in polarized macrophages. 2013. p. 797–802.

ZHANG, W. *et al.* Polycomb-mediated loss of microRNA let-7c determines

inflammatory macrophage polarization via pak1-dependent nf- j b pathway. 2015. p. 287–297.

ZHANG, J. *et al.* A seven-microRNA expression signature predicts survival in hepatocellular carcinoma. 2015. p. 1–15.

ZHANG, H.; LI, W. Dysregulation of micro-143-3p and balbp1 contributes to the pathogenesis of the development of ovarian carcinoma. 2016. n. 10, p. 3605–3610.

ZHANG, H. A. O. *et al.* Apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting bcl-2. 2010. p. 1363–1369.

ZHAO, B. *et al.* MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. **Cancer letters**, 2014. v. 342, n. 1, p. 43-51.

ZHAO, B. *et al.* Microrna let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting itgb3 and map4k3. 2014. v. 342, p. 43–51.

ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, H. D. Oral cancer over four decades : epidemiology , trends , histology , and survival by anatomical sites. 2010. p. 299–305.

ZWADLO, G. *et al.* A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. **Pathobiology**, 1987. v. 55, n. 6, p. 295-304.