

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 31/03/2018.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**MARCELL COSTA DE MEDEIROS**

**Modulação da imunidade adaptativa por produtos solúveis de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC): um papel da galanina derivada do tumor?**

**Araraquara**

**2016**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**MARCELL COSTA DE MEDEIROS**

**Modulação da imunidade adaptativa por produtos solúveis de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC): um papel da galanina derivada do tumor?**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

**Araraquara**

**2016**

Medeiros, Marcell Costa de

Modulação da imunidade adaptativa por produtos solúveis de células de HNSCC: um papel da galanina derivada do tumor? / Marcell Costa de Medeiros.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

139 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr Carlos Rossa Junior

1. Neoplasias 2. Galanina 3. Alergia e imunologia I. Título

MARCELL COSTA DE MEDEIROS

MODULAÇÃO DA IMUNIDADE ADAPTATIVA POR PRODUTOS SOLÚVEIS DE  
CÉLULAS DE CARCINOMA ESPINOCEULAR DE CABEÇA E PESCOÇO  
(HNSCC): UM PAPEL DA GALANINA DERIVADA DO TUMOR?

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Carlos Rossa Junior  
2º examinador: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros  
3º examinador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio  
4º examinador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta  
5º examinador: Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas

Araraquara, 31 de março de 2016.

## DADOS CURRICULARES

MARCELL COSTA DE MEDEIROS

NASCIMENTO	28 de março de 1987 – Natal – Rio Grande do Norte
FILIAÇÃO	Arnaldo Costa de Medeiros Maria de Lourdes Costa de Medeiros
2005 – 2009	Graduação em Odontologia Universidade Federal do Rio Grande do Norte
2010 – 2012	Pós-Graduação em Odontologia – Nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP
2011 – 2013	Especialização em Periodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP
2012 – 2016	Pós-Graduação em Odontologia – Nível de Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista – UNESP
2014 – 2015	Pós-Graduação – <i>Research Scholar</i> <i>Dental School</i> <i>Michigan University</i>

## DEDICATÓRIA

A Deus por estar sempre presente nos momentos de dificuldades e me proporcionar momentos de alegrias. Me dando a força necessária diante das adversidades para que eu pudesse seguir sempre em frente.

À mulher da minha vida Giovana pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos fora da zona de conforto. Quando eu mais precisei de você sempre pude contar com a sua prontidão, ombro amigo e amor inigualável. Sem você não teria conseguido. Amor para vida inteira. Muito obrigado.

Aos meus pais Arnaldo e Maria de Lourdes pelos ensinamentos passados ao longo da minha criação, sem os quais não teria despertado para buscar a maior riqueza que o ser humano pode possuir: o conhecimento.

Ao meu irmão Arnaldo Júnior pelo exemplo de companheirismo e integridade. Vivenciamos grande momentos juntos, e ao saber da distância que nos separaria não deixou de me dar o suporte necessário.

À minha Família que me forneceu a base para os valores que agreguei ao longo do tempo e levo comigo aonde quer que eu vá.

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, pela paciência que me transmite seus ensinamentos. Sem dúvida uma das pessoas mais inteligentes e humildes que já convivi. Minha admiração e gratidão serão eternas.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha primeira orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Miryam, pelo incentivo e estímulo a odontologia e pesquisa, sem os quais não poderia estar trilhando esse caminho. Exemplo de honestidade e dedicação, foi com a senhora que aprendi meus primeiros valores no meio acadêmico.

À minha grande orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lélia Batista por ter confiado no meu trabalho e me ter passado tantos ensinamentos na iniciação científica que levo até hoje. O seu conhecimento me estimulou a buscar sempre o melhor.

À minha dedicada orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Delane Rego por ter mostrado a verdadeira e encantadora face da periodontia, se mostrando sempre solícita aos meus anseios e desejos. Nunca vou me esquecer o que a senhora fez por mim.

Aos demais professores, como a Prof<sup>a</sup> Auliadora Nesi, que me incentivou no início da minha carreira acadêmica enquanto na graduação ainda. E demais amigos e funcionários do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como Gustavo, Denise e Fernanda Amorim, que de alguma forma contribuíram nesse período que estive aqui.

À minha madrinha Ana Almira por todo o incentivo, carinho e amor incondicional dado ao longo de toda minha vida, me apoiando nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos do Colégio Marista de Natal: Renato, Marcus, Arthur, Aderson, Leonardo Siqueira e Luana, Leonardo Medeiros, Samua, Suzanna, Rafael Galego, Stefano, Luiz Paulo, Samuel e demais que aqui não foram citados, por todo o apoio dado nos momentos mais difíceis e pela amizade constante. Levarei vocês por toda minha vida.

Aos meus amigos e colegas da Pós-Graduação da Foar-UNESP: Sabrina Aquino, João Antonio, Pedro, João Paulo, Fausto, Rafael Molon e Erica, Luiz Guilherme e Lívia, Guilherme, Fabiana, Giovana, Lívia Finoti, Vinícius Ibiapina, Elton, Rafael Nepomuceno, Suzane, Nicolau, Andressa, Rubinho e Tete, Kahena, Jonleno, Luis



Carlos, Fernando, Mauricio, Mayara, Romerito, Bruno, Sâmara, Sâmia, Fernanda Florian, Vinícius Paiva, Cassio, Lélis e todos os demais, pelos momentos compartilhados, ensinamentos e companheirismo. Tenham certeza que vocês contribuíram de alguma forma para meu crescimento.

Aos companheiros de Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Periodontia Morgana, Sabrina Aquino, Sabrina Frasnelli, Dayane, Mei, Adriana, Laura e demais que convivi ao longo desses anos.

Aos queridos amigos de Araraquara e região Mario e Luana, Júlio e Andressa, Edgard e Diana, Lucas e Ana (e a princesinha Alcía) pela verdadeira amizade, companheirismo e momentos especiais.

Aos meus Avós, Dinorá e Agostinho (*in memoriam*), Arnaldo, Juraci e Ceição pelos ensinamentos e valores passados.

Aos meus Tios Wilton e Graça, Wellington e Gilvanda, Telma e Evertinho, Tânia e Marcos (*in memoriam*), Welton e Lili, Carminha, Ceição, Welson e Maskisa, Márcia e Erivaldo, Teika (*in memoriam*), Welter e Nevinha, pelo apoio e ajuda nos momentos que precisei.

Aos meus primos-irmãos Márnica e Clayton, Marcos e Maria, Mayara, Vinícius, Amanda (*in memoriam*), Welton Filho e todos os demais pelo suporte, atenção e carinho dado principalmente ao longo desses seis anos.

Aos amigos potiguares de Araraquara Sergei e Marília, Alexandre e Beatriz, Norberto, Raphael, Cibele e Diogo (quase potiguar) pela alegre convivência e ajuda que sempre estiveram dispostos a me dar.

À minha nova família Allan e Margarete Anovazzi que sempre me trataram como um filho me ajudando no que fosse preciso. Muito obrigado pelo carinho, amor e atenção. Obrigado ao Allan Filho e Taynara pelos momentos alegres, e a Cris e o Rafael pela confiança em nós pelo batizado do Lorenzo, esse ser de luz que veio

para iluminar cada vez mais nossas vidas. O meu muito obrigado também aos demais familiares da família Anovazzi e Maretti pelo constante carinho e apoio.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nisha J. D'Silva que gentilmente me aceitou no seu laboratório na Universidade de Michigan e sempre me atendeu de maneira solícita e inteligente. Uma verdadeira mente brilhante com humildade de caráter. E aos meus companheiros de laboratório: Rajat, Min, Ronald e Songlin pela ajuda, atenção e paciência para me atender nos momentos que precisei.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, na pessoa da sua Diretora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Affonso Barretto Montandon e sua Vice-Diretora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Maria Sgavioli Massucato, pelas condições para realização desta pesquisa.

Aos Funcionários e Funcionárias da Foar-UNESP que sempre me ajudaram no necessário: Maria José, Maria do Rosário, Regina Lúcia, Leandro, Cláudia, Isabela, Lene, Esther, Mara, Alexandre e todos os outros.

Ao Coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior. E aos demais docentes do programa e em especial a Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga pela confiança, paciência e humildade em saber transmitir seus conhecimentos.

Aos docentes da disciplina de Periodontia: Adriana Marcantonio, Carlos Rossa Júnior, Élcio Marcantonio Júnior, Joni Augusto Cirelli, José Eduardo Cezar Sampaio, Silvana Regina Perez Orrico e Daniela Leal Zandim-Barcelos pelos ensinamentos passados ao longo desses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pela concessão da bolsa de estudos no país (2014/06472-4) e no exterior (2014/16436-5) pela concessão da Bolsa de Estudos e Pesquisa no Exterior auxílio de pesquisa (2012/24196-9).

E a todos que contribuíram direta e indiretamente com a realização desse trabalho,  
muito obrigado!

*“A menos que modifiquemos a nossa  
maneira de pensar, não seremos capazes de  
resolver os problemas causados pela forma como  
nos acostumamos a ver o mundo”.*

(Albert Einstein)

Medeiros MC. Modulação da imunidade adaptativa por produtos solúveis de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC): um papel da galanina derivada do tumor? [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## **RESUMO**

Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC, squamous cell carcinoma of the head and neck) é uma neoplasia caracterizada mais comumente por invasão local/regional de prognóstico sombrio quando diagnosticada em estágios avançados e uma característica imunossupressão local ou sistêmica associada. A taxa de sobrevivência em casos avançados é inferior à de câncer de mama ou próstata, e seu tratamento usualmente causa morbidade severa. A resposta ao tratamento é altamente variável mesmo entre pacientes em estágios iniciais da doença e apesar do tratamento implementado seguir o padrão de cuidados vigente. Assim, há grande necessidade de identificar biomarcadores que indiquem um fenótipo agressivo e possa proporcionar informações de utilidade no desenvolvimento de novas terapias específicas. Nossa hipótese foi de que produtos secretados por células de HNSCC ou o contato direto das mesmas com células imunológicas podem induzir uma modulação no sentido de causar a evasão do tumor da resposta imune. Observamos que a literatura mostra diversos trabalhos onde células tumorais exercem efeito imunossupressor em diversos tipos celulares da resposta imune. O estímulo de PBMC com meio condicionado (CM) de células de HNSCC induziu uma diminuição na proliferação, bem como modulou a polarização para fenótipos anti-inflamatórios e em co-cultura de HNSCC e PBMC, o tratamento prévio com CM das PBMC conferiu vantagem às células tumorais. Por último avaliamos um possível biomarcador, a galanina, na modulação da resposta imune. A ausência de galanina induziu melhores níveis de proliferação bem como mais polarização para fenótipos pro-inflamatórios. O aumento da expressão de galanina se mostrou um importante mecanismo de fuga das células tumorais da vigilância das células imunes, aumentando a proliferação, sobrevivência e migração das células HNSCC. Concluiu-se que de fato o microambiente tumoral lança mão de mecanismos que causam imunossupressão, facilitando o crescimento e progressão do câncer.

**Palavra-chaves:** Neoplasias, Galanina, Alergia e Imunologia

Medeiros MC. Modulation of adaptive immunity by soluble products of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells: a role for tumor-derived galanin? [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

## **ABSTRACT**

Squamous cell carcinoma of head and neck (HNSCC) is a cancer characterized commonly by local/regional invasion of poor prognosis when diagnosed in advanced stages and are associated with local or systemic immunosuppression. The survival rate for advanced cases is below the breast or prostate cancer, and treatment usually causes severe morbidity. The response to the treatment is highly variable among patients even in the early stages of the disease, despite the treatment implemented following the current standard care. Thus, there is great need to identify biomarkers that indicate an aggressive phenotype and can provide useful information on the development of new target therapies. Our hypothesis was that secreted products by HNSCC cells or direct contact with immune cells can induce a modulation in order to cause tumor evasion of the immune response. We note that the literature shows several studies where tumor cells exert immunosuppressive effect in different cell types of the immune response. The stimulation of PBMC with conditioned medium (CM) of HNSCC cells induced a decrease in proliferation, and modulates a polarization toward anti-inflammatory phenotypes and in co-culture of HNSCC and PBMC pre-treated with CM caused advantage to tumor cells. Finally we evaluate a possible biomarker, galanin, in modulating the immune response. The absence of galanin induced higher levels of proliferation as well a more bias towards pro-inflammatory phenotypes. Increase of galanin expression showed a significant escape mechanism of tumor cells from the surveillance of the immune cells, enhancing the proliferation, migration and survival of HNSCC cells. In fact, the tumor microenvironment uses mechanisms that cause immunosuppression, facilitating the growth and progression of cancer.

**Keywords:** Neoplasias, Galanin, immunology and Allergy.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Publicação 1: <i>Tumor immunology: general overview and specific head and neck cancer context.....</i></b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Publicação 2: <i>HNSCC products causes an immunosuppressive modulation in PBMC that confers a advantage to tumor scape in vitro.....</i></b>	<b>86</b>
<b>2.3</b>	<b>Publicação 3: <i>Galanin role in immunomodulation of peripheral mononuclear blood cells and conference of tumor progression.....</i></b>	<b>114</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>136</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### ***Modulação da imunidade adaptativa pelo carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC): um mecanismo de evasão das células neoplásicas da resposta imune e também promover o crescimento tumoral?***

A oncogênese é um processo complexo com múltiplas causas possíveis associadas, incluindo fatores exógenos (radiação, substâncias químicas, radiação UV, vírus, toxinas do tabaco e álcool) e agentes endógenos (mutações no DNA genômico, alterações epigenéticas, hormonais e citocinas inflamatórias), as quais podem estar presentes simultaneamente em diversas combinações. A transformação oncogênica é acompanhada da alteração de vários aspectos da biologia celular, incluindo proliferação, sobrevivência, migração e invasão. É função do sistema imune detectar estes desvios da homeostase e eliminar as células alteradas; contudo as células neoplásicas de diversos tipos de câncer podem modular a resposta do hospedeiro não apenas para escapar desta vigilância imunológica, mas também para facilitar e promover o crescimento e invasão tumorais. Em modelos de câncer induzido quimicamente em camundongos, o uso de animais deficientes em linfócitos T reduziu o período de latência para o desenvolvimento dos tumores e também esteve associado a um maior número de lesões (Ku, Crowe<sup>17</sup>, 2009). Por outro lado, há evidência da associação entre a ativação prolongada da resposta imune com a incidência e progressão de alguns tipos de câncer, como o carcinoma hepatocelular e câncer gástrico e de cólon (Grivennikov et al.<sup>12</sup>, 2010).

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) é considerado uma das neoplasias mais imunossupressoras (Bose et al.<sup>6</sup>, 2008; Bose et al.<sup>7</sup>, 2006; Chen et al.<sup>8</sup>, 1999). Foi identificado um perfil de expressão gênica característico em lesões primárias e secundárias de HNSCC (Liu et al.<sup>22</sup>, 2008), indicando que fenótipos tumorais distintos podem conferir uma vantagem para a invasão e progressão. O aumento da expressão de genes que atenuam a resposta imune, como IL-4, foi detectado em análises de alta capacidade por meio de arrays de amostras de HNSCC (Leethanakul et al.<sup>20</sup>, 2003). Esta mediação da imunidade mediada pelo tumor é suportada pelos achados de redução do número total de células CD4+ associado à uma polarização para um padrão de resposta Th2 (aumento da expressão de IL-4 e redução da expressão de IL-2) em pacientes com HNSCC (Manchanda et al.<sup>23</sup>, 2006). Existem evidências de que mediadores biológicos



capazes de modular a resposta imune adaptativa, como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , estão presentes no câncer oral (Jimi et al.<sup>14</sup>, 2011; Woods et al.<sup>35</sup>, 1998) e no microambiente de outros tumores (Li et al.<sup>21</sup>, 2012; Taylor et al.<sup>29</sup>, 2011), causando uma disfunção na resposta imune que possibilita a evasão das células tumorais da vigilância imunológica e facilita o crescimento tumoral (Kim et al.<sup>15</sup>, 2006).

### ***Alterações na diferenciação e polarização das células T se correlacionam com a progressão de HNSCC***

A lesão primária do HNSCC é o sítio de interação direta entre as células tumorais e células da resposta imune. Há dois possíveis mecanismos associados à evasão da resposta imune adaptativa pelos tumores: 1) depleção de células T, inibindo a detecção de células tumorais; e 2) indução de imunotolerância. Em suporte ao primeiro mecanismo, o aumento da produção de Fas ligand por células tumorais [22] pode induzir apoptose de células da resposta imune e, de fato, linfócitos T expostos a lesões de HNSCC metastáticas são mais susceptíveis à apoptose (Ku, Crowe<sup>17</sup>, 2009). Contudo, a falta de eficiência de abordagens terapêuticas de HNSCC em modelos pré-clínicos utilizando a estimulação da resposta imune por citocinas e da transferência (transplante) de células T citotóxicas (Whiteside et al.<sup>33</sup>, 1996; Whiteside et al.<sup>34</sup>, 1993) juntamente com as evidências que demonstram que as células T presentes no microambiente tumoral se tornam suprimidas ou inativadas sugerem a possibilidade do segundo mecanismo (imunotolerância) também estar envolvido.

Uma maior prevalência de células T infiltradas na lesão tumoral é positivamente correlacionada com um melhor prognóstico e resposta ao tratamento em vários tipos de neoplasias, incluindo câncer de cólon e ovário (Galon et al.<sup>9</sup>, 2006; Sato et al.<sup>27</sup>, 2005). A maior prevalência de células T auxiliares ativadas (CD4+CD69+) e células T regulatórias (CD4+FoxP3+) são associadas com melhores prognósticos em HNSCC, mais especificamente: melhor prognóstico (células CD4+ ativadas) e melhor controle loco-regional do crescimento e expansão (células CD4+ regulatórias) da doença (Badoual et al.<sup>1</sup>, 2006). Este achado aparentemente contraditório de uma 'faca de dois gumes imunológica' é interpretado conceitualmente com base no papel central das células T CD4+ na resposta anti-tumoral (Mantovani<sup>25</sup>, 1998; Toes et al.<sup>30</sup>, 1999), uma vez que estas células são

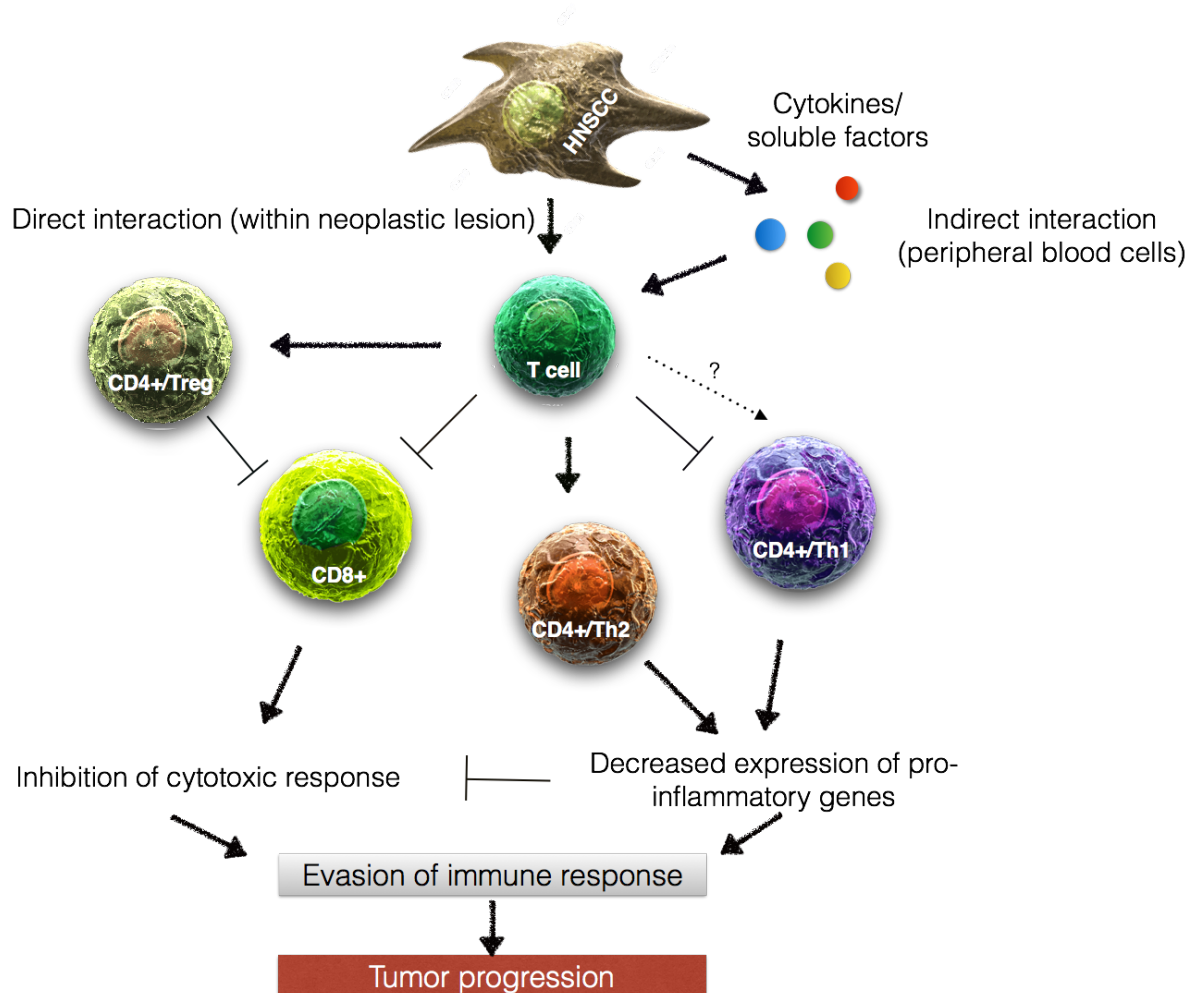
necessárias para a função adequada, memória e proliferação das células T citotóxicas (Bevan et al.<sup>5</sup>, 2004; Kurts et al.<sup>18</sup>, 1997). Linfócitos T CD4+ também podem exercer funções anti-tumorais independentes de linfócitos citotóxicos, por meio do recrutamento de outras células efetoras, como macrófagos e eosinófilos, ou pela lise direta de células T positivas para MHC classe II (Greenberg<sup>11</sup>, 1991). O outro lado da 'faca de dois gumes imunológica' é representado pelo fato de que além do efeito protetor associado à maior ativação da imunidade inata, uma maior prevalência de células T infiltrando o tumor com fenótipo regulatório (imunossupressivo, CD4+CD25+FoxP3+) também está associada a melhor prognóstico de HNSCC. A interpretação, neste caso, é que as células Tregs atenuam a resposta imune, reduzindo a inflamação e, conseqüentemente, minimizando a degradação da matriz extracelular necessária para o crescimento e invasão tumoral (Balkwill, Coussens<sup>2</sup>, 2004; Mantovani<sup>24</sup>, 2005). É importante destacar que células T auxiliares ativadas (CD4+CD69+) podem incluir tanto células polarizadas para um fenótipo Th1 ('inflamatório' / anti-tumoral) quanto Th2 (menos inflamatório / resposta humoral), e que a relevância do estímulo ou atenuação da resposta imune pode variar com o tipo de câncer e com o estágio de desenvolvimento tumoral (Badoual et al.<sup>1</sup>, 2006). Coletivamente, estas evidências indicam que os números relativos de células T de diferentes fenótipos infiltrando a lesão tumoral ou circulando na corrente sanguínea tem valor prognóstico em HNSCC (Badoual et al.<sup>1</sup>, 2006; Reichert et al.<sup>26</sup>, 2002; Wansom et al.<sup>32</sup>, 2010).

***Níveis aumentados de produção de galanina e ativação de Rap1 promovem o crescimento tumoral em HNSCC: também são mecanismos de modulação da resposta imune adaptativa pelo tumor?***

HNSCC são notoriamente heterogêneos em sua apresentação, prognóstico e resposta ao tratamento. Este fato ilustra a relevância da identificação de marcadores de prognóstico. Uma melhor compreensão do papel de diferentes marcadores prognósticos na oncogênese e progressão do tumor pode levar à novas abordagens terapêuticas. Galanina é um peptídeo de 29 resíduos de aminoácidos amplamente distribuída e com amplo espectro de efeitos biológicos (Bartfai<sup>4</sup>, 1993). Existem três receptores distintos já identificados em ratos e humanos (GalR1, GalR2, GalR3), os quais são amplamente conservados nestas espécies, porém com graus de

homologia entre os subtipos variados e, em geral, baixos, indicando uma importante variabilidade entre estes receptores e, possivelmente, em suas funções biológicas. Em humanos, GalR3 tem 36% de homologia na sequência de resíduos de aminoácidos com o hGalR1 e 58% de homologia com hGalR2 (Kolakowski et al.<sup>16</sup>, 1998). Estes receptores também apresentam diferentes afinidades pelo ligante e sinalizam por meio de vias distintas (fosfolipase C/PKC para GalR2, enquanto GalR1 e GalR3 sinalizam por meio da inibição de adenilil-ciclase)(Kolakowski et al.<sup>16</sup>, 1998; Kuteeva et al.<sup>19</sup>, 2008). Como diferentes GalR apresentam afinidades variadas pela galanina e ativam vias de sinalização distintas, esta é outra indicação que os receptores medeiam efeitos biológicos diferentes em resposta ao ligante comum. Em células de HNSCC, GalR2 é o receptor mais expresso e leva à maior ativação de Rap1 e das vias downstream a esta proteína, incluindo MEK/ERK, PI3kinase/Akt e  $\beta$ -catenin (Banerjee et al.<sup>3</sup>, 2011; Goto et al.<sup>10</sup>, 2010). Em modelo experimental ortotópico de HNSCC utilizando camundongos *nude*, o aumento da sinalização de GalR2 promove o crescimento tumoral, o que suporta um papel da expressão deste receptor como marcador prognóstico e como um mecanismo de tumorigênese (Banerjee et al.<sup>3</sup>, 2011; Goto et al.<sup>10</sup>, 2010; Henson et al.<sup>13</sup>, 2005), contudo não existem informações sobre como a expressão aumentada de galanina por HNSCC afeta a resposta imune. Por outro lado, também não existem informações sobre a expressão de receptores de galanina por células T ou outras células imunes maduras, e os efeitos biológicos da galanina nestas células bem como as vias de sinalização envolvidas são desconhecidas. Ainda que a expressão de receptores de galanina não tenha sido relatada especificamente em linfócitos T humanos, o RNA mensageiro de GalR3 foi detectado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e do baço, mas não o RNAm de hGalR2 e hGalR1 (Kolakowski et al.<sup>16</sup>, 1998; Sullivan et al.<sup>28</sup>, 1997). Apenas GalR1 e GalR3 foram detectados em timócitos imaturos de ratos, e o tratamento destas células com galanina inibiu a proliferação e estimulou a apoptose, indicando que a galanina pode exercer um papel na regulação autócrina/parácrina do sistema imune (Trejter et al.<sup>31</sup>, 2002). Estas informações sugerem que a produção de galanina por HNSCC pode representar um mecanismo de evasão da resposta imune.

**Figura 1** - Representação esquemática das possíveis influências diretas e indiretas do HNSCC na imunidade adaptativa. A hipótese principal é que produtos solúveis de HNSCC inibem a imunidade adaptativa por meio da modulação da polarização e atividade de células T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+), de forma a conferir uma vantagem ao crescimento tumoral. A hipótese secundária é que a produção aumentada de galanina/maior atividade de sinalização via GalR2 em algumas linhagens de células de HNSCC (diferente perfil fenotípico tumoral) representa uma vantagem adicional para o crescimento tumoral acentuando este mecanismo de evasão da resposta imune.



Fonte: Elaboração própria.

O objetivo primário deste trabalho de tese foi o de avaliar se fatores solúveis derivados de células de HNSCC modulam a imunidade adaptativa e também se esta

modulação representa um mecanismo de evasão da vigilância imune que confere uma vantagem para a progressão do tumor (Figura 1):

1) Fatores solúveis de HNSCC e sua influência geral em células da resposta imune. E o contato direto com células de HNSCC modulam a resposta imune adaptativa afetando diretamente as células imunológicas, reduzindo a capacidade citotóxica destas células de forma direta (contato células imune/células de HNSCC) e indireta (produtos solúveis de PBMCs);

2) O aumento da atividade de GalR2 e conseqüentemente uma maior produção de galanina em células de HNSCC estão associadas à um fenótipo tumoral que resulta em um efeito modulatório da resposta imune característico de tumores mais agressivos.

### **3 Conclusão**

Nossos dados em conjunto sugerem uma imunomodulação pelos produtos secretados de células tumorais de cabeça e pescoço na proliferação, diferenciação, ativação de células T e conferem uma vantagem para o tumor escapar da resposta imunológica quando os PBMC foram pre-tratados com CM de HNSCC antes da cocultura. Bem como elucidada a participação de uma via Galanina/GaIR2, nunca antes explorada, na imunomodulação de células da resposta imune.

No entanto, novos estudos precisam ser realizados para avaliar o mecanismo pelo qual essa imunossupressão ocorre e quais vias de sinalização poderiam ser alvos para novos tratamentos experimentais.

**REFERÊNCIAS\*:**

1. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(2): 465-72.
2. Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature.* 2004; 431(7007): 405-6.
3. Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. Rap1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cell Signal.* 2011; 23(7): 1110-8.
4. Bartfai T, Hokfelt T, Langel U. Galanin--a neuroendocrine peptide. *Crit Rev Neurobiol.* 1993; 7(3-4): 229-74.
5. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(8): 595-602.
6. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun.* 2008; 8: 10.
7. Bose A, Ghosh D, Pal S, Mukherjee KK, Biswas J, Baral R. Interferon alpha2b augments suppressed immune functions in tobacco-related head and neck squamous cell carcinoma patients by modulating cytokine signaling. *Oral Oncol.* 2006; 42(2): 161-71.
8. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(6): 1369-79.
9. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313(5795): 1960-4.
10. Goto M, Mitra RS, Liu M, Lee J, Henson BS, Carey T, et al. Rap1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(1): 65-76.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>

11. Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol.* 1991; 49: 281-355.
12. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140(6): 883-99.
13. Henson BS, Neubig RR, Jang I, Ogawa T, Zhang Z, Carey TE, et al. Galanin receptor 1 has anti-proliferative effects in oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem.* 2005; 280(24): 22564-71.
14. Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2011; 17(5): 462-8.
15. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* 2006; 66(11): 5527-36.
16. Kolakowski LF, Jr., O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, et al. Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem.* 1998; 71(6): 2239-51.
17. Ku TK, Crowe DL. Impaired T lymphocyte function increases tumorigenicity and decreases tumor latency in a mouse model of head and neck cancer. *Int J Oncol.* 2009; 35(5): 1211-21.
18. Kurts C, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR, et al. CD4<sup>+</sup> T cell help impairs CD8<sup>+</sup> T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med.* 1997; 186(12): 2057-62.
19. Kuteeva E, Hokfelt T, Wardi T, Ogren SO. Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(12): 1854-63.
20. Leethanakul C, Knezevic V, Patel V, Amornphimoltham P, Gillespie J, Shillitoe EJ, et al. Gene discovery in oral squamous cell carcinoma through the Head and Neck Cancer Genome Anatomy Project: confirmation by microarray analysis. *Oral Oncol.* 2003; 39(3): 248-58.
21. Li X, Sterling JA, Fan KH, Vessella RL, Shyr Y, Hayward SW, et al. Loss of TGF- $\beta$  responsiveness in prostate stromal cells alters chemokine levels and facilitates the development of mixed osteoblastic/osteolytic bone lesions. *Mol Cancer Res.* 2012; 10(4): 494-503.
22. Liu CJ, Liu TY, Kuo LT, Cheng HW, Chu TH, Chang KW, et al. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2008; 214(4): 489-97.



23. Manchanda P, Sharma SC, Das SN. Differential regulation of IL-2 and IL-4 in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2006; 12(5): 455-62.
24. Mantovani A. Cancer: inflammation by remote control. *Nature.* 2005; 435(7043): 752-3.
25. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10(5): 588-94.
26. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(10): 3137-45.
27. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(51): 18538-43.
28. Sullivan KA, Shiao LL, Cascieri MA. Pharmacological characterization and tissue distribution of the human and rat GALR1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 233(3): 823-8.
29. Taylor MA, Lee YH, Schiemann WP. Role of TGF-beta and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. *Gene Expr.* 2011; 15(3): 117-32.
30. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med.* 1999; 189(5): 753-6.
31. Trejter M, Brelinska R, Warchol JB, Butowska W, Neri G, Rebuffat P, et al. Effects of galanin on proliferation and apoptosis of immature rat thymocytes. *Int J Mol Med.* 2002; 10(2): 183-6.
32. Wansom D, Light E, Worden F, Prince M, Urba S, Chepeha DB, et al. Correlation of cellular immunity with human papillomavirus 16 status and outcome in patients with advanced oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 136(12): 1267-73.
33. Whiteside TL, Chikamatsu K, Nagashima S, Okada K. Antitumor effects of cytolytic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16(4C): 2357-64.

34. Whiteside TL, Letessier E, Hirabayashi H, Vitolo D, Bryant J, Barnes L, et al. Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1993; 53(23): 5654-62.
35. Woods KV, El-Naggar A, Clayman GL, Grimm EA. Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer Res.* 1998; 58(14): 3132-41.

**Não autorizo a publicação deste trabalho até 31/03/2018.**

**(Diretos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 31 março de 2016.**

**MARCELL COSTA DE MEDEIROS**