



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



Laura Andrea González Maldonado

Eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por macrófagos: influência da galanina, dos produtos solúveis secretados por células tumorais e do fenótipo dos macrófagos

Araraquara
2018



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



Laura Andrea González Maldonado

Eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por macrófagos: influência da galanina, dos produtos solúveis secretados por células tumorais e do fenótipo dos macrófagos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Jr
Coorientadora: Profa. Dra. Morgana Rodrigues
Guimarães Stabili

Araraquara
2018

González Maldonado, Laura Andrea

Eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por macrófagos: influência da galanina, dos produtos solúveis secretados por células tumorais e do fenótipo dos macrófagos / Laura Andrea González Maldonado. –

Araraquara: [s.n.], 2018

58 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Jr

Coorientadora: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães
Stabili

1. Neoplasias bucais 2. Macrófagos 3. Fagocitose
4. Galanina I. Título

Laura Andrea González Maldonado

Eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por macrófagos: influência da galanina, dos produtos solúveis secretados por células tumorais e do fenótipo dos macrófagos

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Jr

2º Examinador: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

3º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Araraquara, 28 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Laura Andrea González Maldonado

NASCIMENTO: 13.02.1990 – Armenia – Quindío – Colômbia

FILIAÇÃO: Elsa Clara Maldonado Rodríguez
Jorge Iván González Vargas

2008 – 2014: Curso de Graduação
Facultad de Odontologia – Universidad Nacional de Colombia

2016 – 2018: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia
Nível: Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicado a mi abuelita Mari Vargas Motta de González

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização do Mestrado.

González-Maldonado LA. Eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por macrófagos: influência da galanina, dos produtos solúveis secretados por células tumorais e do fenótipo dos macrófagos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Os macrófagos representam uma das principais pontes entre imunidade inata e adaptativa e estão presentes em grande número tanto no estroma circundando tumores sólidos quanto no interior da massa tumoral (TAMs, *tumor-associated macrophages*), onde podem representar até 50% da massa da lesão. Nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (HNSCC), TAMs apresentam predominantemente o perfil M2 (pró-tumoral), e a quantidade de TAMs é inversamente relacionada ao prognóstico. A efetividade do tratamento não-cirúrgico (quimio/radioterapia ou imunoterapia) dos tumores sólidos é diretamente relacionada à indução de morte das células neoplásicas. No processo de reparo, as células apoptóticas são removidas por fagocitose por outros tipos celulares, num processo denominado eferocitose. Embora seja um processo importante para o reparo e homeostasia tecidual, a eferocitose pode afetar o fenótipo dos macrófagos, favorecendo a polarização para o perfil M2, associado à progressão de HNSCC. A galanina é um peptídeo de 29 aminoácidos amplamente distribuída no organismo e com amplo espectro de efeitos biológicos. A expressão constitutiva de galanina por células de OSCC está associada à maior agressividade do tumor e tem sido estudado como marcador prognóstico de agressividade do tumor e também como um possível alvo terapêutico de HNSCC. O objetivo do presente trabalho é determinar a influência dos produtos secretados pelas células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, bem como da galanina isoladamente, no fenótipo de macrófagos e atividade de eferocitose. Para determinar a influência dos produtos secretados no perfil fenotípico dos macrófagos por células tumorais (independentemente do contato direto célula:célula) e da galanina, as células foram tratadas com meio condicionado (CM) contendo os produtos secretados das linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B. Adicionalmente, para avaliar efeito do contato célula:célula e dos produtos secretados sobre a expressão gênica e na eferocitose dos macrófagos 'pré-polarizados' em M1 ou M2, foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais apoptóticas UM-SCC-1 e UM-SCC-22B. O perfil fenotípico (M1/M2) foi determinado por RT-qPCR e a modulação na eferocitose dos macrófagos pela citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Os produtos secretados pelas células tumorais, assim como o contato direto célula:célula influenciam a expressão de TNF e IL10 em macrófagos, com aumento significativo da expressão global de TNF e IL10 em co-culturas de macrófagos com as linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B ($P < 0.05$). Por outro lado, o pré-condicionamento dos macrófagos com produtos solúveis das células tumorais antes da co-cultura (contato célula:célula) levou à uma diminuição da expressão de TNF e IL10 (sem diferença significativa com os macrófagos M0). Na eferocitose, os macrófagos polarizados para o perfil M2 apresentaram uma maior atividade da eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço do que macrófagos polarizados para o perfil M1 (31,38% de macrófagos M2 eferocitóticos versus 15,90% para macrófagos M1 em co-cultura com células UM-SCC-1, $P < 0.05$). Adicionalmente, verificou-se que a eferocitose de células tumorais influencia o fenótipo dos macrófagos.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Macrófagos. Fagocitose. Galanina.

González-Maldonado LA. Efferocytosis of squamous cell carcinoma cells by macrophages: influence of galanin, tumor cell-secreted soluble products and phenotype [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Macrophages are a major link between innate and adaptive immunity and are present both in the surrounding stroma and within various solid tumors (when they are denominated *tumor-associated macrophages*, TAMs), where these cells may represent up to 50% of the tumor mass. In head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), TAMs are predominantly of the M2 phenotype and the prognosis is inversely correlated with their abundance. The effectiveness of non-surgical treatment of solid tumors (chemotherapy/radiotherapy) is directly related to the induction of neoplastic cell death. In the repair process, apoptotic/dead cells must be removed by phagocytosis by other cell types (particularly macrophages), in a process called efferocytosis. Although this is a critical step in the repair and reestablishment of tissue homeostasis, efferocytosis itself may affect the phenotype of macrophages, skewing the cells towards an M2 phenotype, which is deemed as a 'pro-tumoral' phenotype. Galanin is a 29 aminoacid peptide of 29 produced by various cell types and with a broad spectrum of biological effects. The constitutive expression of galanin by head and neck cancer cells is associated with the increased of tumor aggressiveness and has been proposed as a biomarker of tumor aggressiveness and also as a possible therapeutic target in HNSCC. Thus, the goal of the present study was to determine the role of secreted products from head and neck cancer cells, and of galanin independently, on macrophage phenotype and efferocytosis. In order to determine the influence of secreted products from tumor cells and of galanin in the phenotypic profile of the macrophages (independent of cell-to-cell contact), the cells were treated with conditioned medium (CM) prepared from tumor cell lines UM-SCC- 1 and UM-SCC-22B. Furthermore, to evaluate the effect of cell-to-cell contact and secreted products on the gene expression and efferocytosis of 'pre-polarized' M1 or M2 macrophages, co-cultures with tumor cell lines UM-SCC-1 and UM-SCC-22B with UV-induced apoptosis were performed. The phenotypic profile (M1 / M2) was determined by RT-qPCR and efferocytosis was assessed by flow cytometry and fluorescence microscopy. Products secreted by tumor cells, as well as direct cell:cell contact influence the expression of TNF and IL10 in macrophages. Our results shows an increased expression of TNF and IL10 when macrophages were co-cultured with UM-SCC-1 and UM-SCC-22B tumor cells ($P < 0.05$). However, when macrophages were pre-conditioned with soluble products of these tumor cell lines, there was a decrease in gene expression of TNF and IL10 (without significant difference versus M0 macrophages). M2 macrophages (31.38%) were more effective in the efferocytosis of head and neck squamous cell carcinoma cells than M1 macrophages (31.38% of efferocytotic M2 macrophages versus 15,90% of M1 macrophages for the UM-SCC-1 cell line, $P < 0.05$). In addition, it was observed that the efferocytosis of tumor cells influences the phenotype of the macrophages.

Keywords: Mouth neoplasms. Macrophages. Phagocytosis. Galanin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD: 7-aminoactinomycin D

APC: antigen-presenting cells (células apresentadoras de antígeno)

ARG1: Arginase 1

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico complementar)

DNA: deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

FBS: fetal bovine serum (soro fetal bovino)

HNC: head and neck cancer (câncer de cabeça e pescoço)

HNSCC: head and neck squamous cell carcinomas (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço)

IGF-I: insulin-like growth factor-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)

IL10: interleukin-10 (interleucina-10)

IL12: interleukin-12 (interleucina-12)

IL1ra: interleukin-1 receptor antagonist (receptor antagonista da interleucina-1)

IL23: interleukin-23 (interleucina-23)

CM: conditioned medium (Meio condicionado)

MHC: major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade)

OSCC: oral squamous cell carcinomas (carcinomas espinocelulares de orofaringe)

P/S: Penicillin - Streptomycin (Penicilina - Estreptomicina)

PCR: polymerase chain reaction (reação de polimerase em cadeia)

PDGF: platelet derived growth factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate

RNA: messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)

RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)

TAM: tumor-associated macrophages (macrófagos associados a tumores)

TGF-beta: transforming growth factor beta (fator de transformação do crescimento beta)

TNF: tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

UV: ultraviolet (ultravioleta)

VEGF: vascular endothelial growth factor (fator de crescimento do endotélio vascular)

Δ Ct: delta threshold cycle (comparativo Ct)

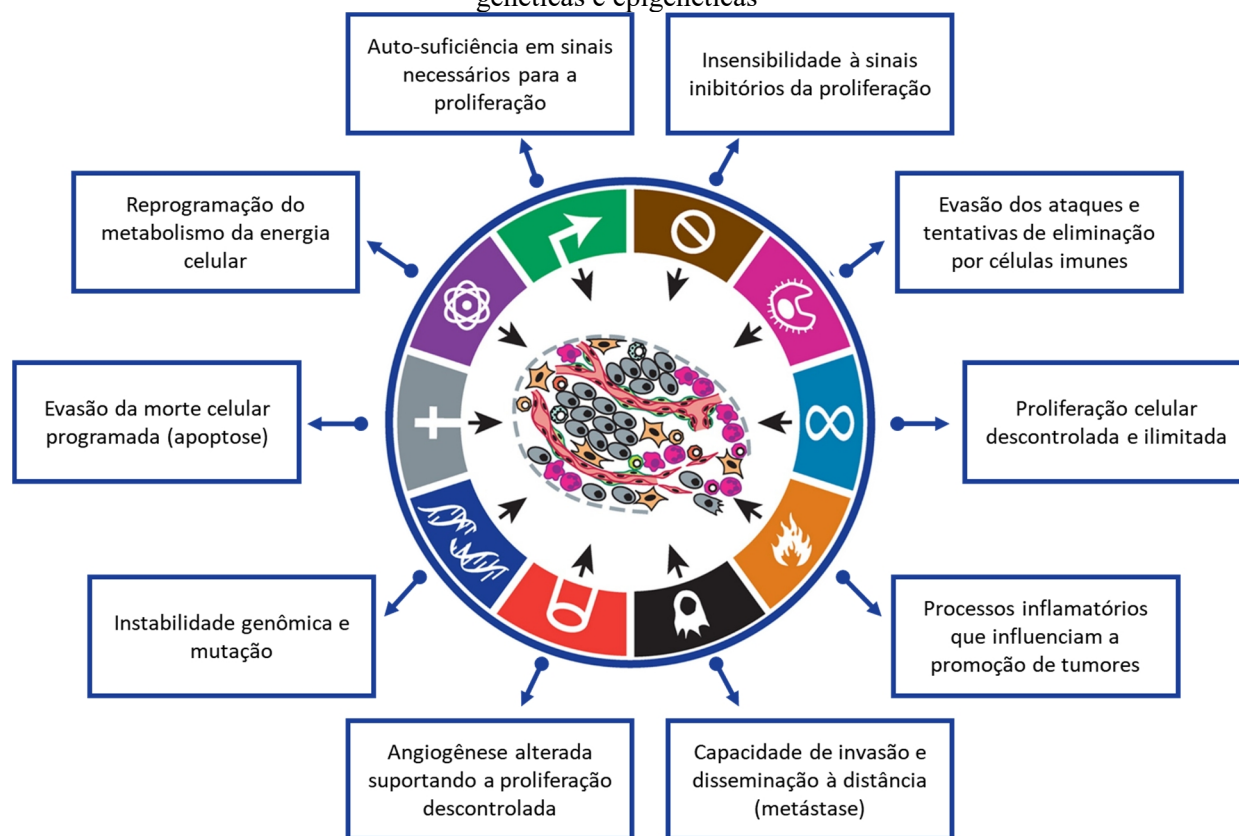
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODO	19
3.1 Linhagens Celulares	19
3.2 Diferenciação de Monócitos em Macrófagos	19
3.3 Meio Condicionado das Linhagens Celulares Neoplásicas	20
3.4 Polarização Fenotípica dos Macrófagos e Estímulo com Meio Condicionado (CM) e Galanina	20
3.5 Indução de Apoptose nas Linhagens Celulares Tumorais e Co-cultura Macrófagos:Células Neoplásicas	21
3.6 Extração de RNA Total e RT-qPCR	22
3.7 Eferocitose	25
3.8 Análise dos Dados	28
4 RESULTADO	29
4.1 Expressão Gênica das Linhagens Tumorais Após Indução de Apoptose Com Luz UV	29
4.2 Macrófagos Diferenciados a Partir de Monócitos (U937) Aumentam a Expressão de <i>TNF</i> e <i>IL10</i> Quando estão em Co-cultura com Células Apoptóticas das Linhagens Neoplásicas UM-SCC-1 e UM-SCC-22B	30
4.3 Produtos Secretados por Células de Câncer de Cabeça e Pescoço e Galanina Afetam a Expressão Gênica de <i>TNF</i> e <i>IL10</i>	31
4.4 Influência da Co-Cultura com Linhagens Tumorais Apoptóticas na Resposta de Macrófagos M0, M1 e M2	33
4.5 Influência da Exposição aos Produtos Secretados Pelas Células Tumorais e à Galanina na Co-cultura De Macrófagos com Células Neoplásicas Apoptóticas	35
4.6 Eferocitose de Células UM-SCC-1 e UM-SCC-22B Pelos Macrófagos	36
4.7 O Fenótipo dos Macrófagos Influencia a Eferocitose de Células Tumorais de Cabeça e Pescoço	38
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A – RESULTADOS PRELIMINARES	56

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa uma das principais causas de mortalidade no mundo, com estimativa de 1.685.210 novos casos diagnosticados apenas nos EUA em 2016, sendo que destes estima-se que 595.690 morreriam por causa da doença¹. Câncer é a denominação coletiva para uma multitude de doenças que apresentam como características centrais comuns: **i.** proliferação celular descontrolada e ilimitada; **ii.** auto-suficiência em sinais necessários para a proliferação; **iii.** insensibilidade aos sinais inibitórios da proliferação; **iv.** evasão da morte celular programada (apoptose); **v.** angiogênese alterada suportando a proliferação descontrolada; **vi.** capacidade de invasão e disseminação à distância (metástase); **vii.** instabilidade genômica e mutação; **viii.** modulação de processos inflamatórios que influenciam a promoção de tumores; **ix.** reprogramação do metabolismo da energia celular; e **x.** evasão dos ataques e tentativas de eliminação por células imunes^{2,3} (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática das características centrais do câncer, envolvendo alterações genéticas e epigenéticas



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg^{2,p.668}.

O câncer de cabeça e pescoço (*Head and neck cancer*, HNC) é a denominação comum para um conjunto de condições neoplásicas afetando os tecidos e estruturas da cabeça e

pescoço. HNC está entre os 8 tipos mais comuns de câncer e, fundamentalmente, é associado com elevados custos econômicos e sociais uma vez que o tratamento não apresentou avanços significativos nas últimas 5 décadas. Mesmo quando bem-sucedido, o tratamento de escolha (ressecção cirúrgica, associada ou não à quimio e radioterapia) causa elevada morbidade em casos mais avançados ou com lesões extensas. Embora no período entre 2005-2011 as estatísticas indiquem que praticamente todos os tipos de câncer tenham apresentado melhora nas taxas de sobrevida em 5 anos, o prognóstico de HNC continua sendo tão ruim ou pior do que o prognóstico de câncer de mama, próstata ou cólo de útero^{1,4}. A maior parte (>90%) dos HNC são carcinomas de células espinoelulares (*head and neck squamous cell carcinomas*, HNSCC), os quais tem como característica uma alta agressividade relacionada à invasão loco-regional nos tecidos circundantes e metástases em órgãos distantes, as quais podem ocorrer mesmo em estágios iniciais, além de uma alta recorrência após tratamento^{5,6}.

O microambiente tumoral inclui diferentes tipos celulares além das células neoplásicas, como células da resposta imune (linfócitos, macrófagos) e fibroblastos que vão interagir entre si e com a matriz extracelular. A heterogeneidade celular no microambiente tumoral vai dar a cada neoplasia características únicas que podem influenciar a progressão de cada neoplasia⁷. Com a progressão do tumor, o microambiente tumoral também se altera para um estado ‘ativo’ por meio de interações tumor-estroma⁵. A galanina é um peptídeo de 29 aminoácidos originalmente identificada como um neuropeptídeo. Existem três receptores distintos reconhecidos em ratos e humanos (GalR1, GalR2, GalR3) com diferentes afinidades pela galanina como ligante resultando na regulação de efeitos biológicos mediante diversas vias de sinalização⁸. A expressão de galanina se encontra amplamente distribuído no sistema nervoso central e periférico, assim como em diferentes órgãos do sistema digestivo, pele e células cancerígenas⁸. Como resultado dos diferentes alvos pela ampla distribuição da galanina, se vem estudando possíveis efeitos terapêuticos em tratamento em patologias como Alzheimer, dor neuropática, diabetes⁹ e diagnóstico e tratamento de câncer como câncer de colón¹⁰, melanoma¹¹, câncer de cabeça e pescoço¹². A expressão constitutiva de galanina por células de câncer de cavidade oral está associada à maior agressividade do tumor, o que é suportado por estudos em modelo murino de câncer de células escamosas da cavidade oral, em que a expressão de galanina pelas células tumorais se correlaciona positivamente com o crescimento tumoral¹³. Estes dados indicam que a expressão de galanina pode ser um marcador prognóstico de agressividade do tumor e também um possível alvo terapêutico em HNSCC.

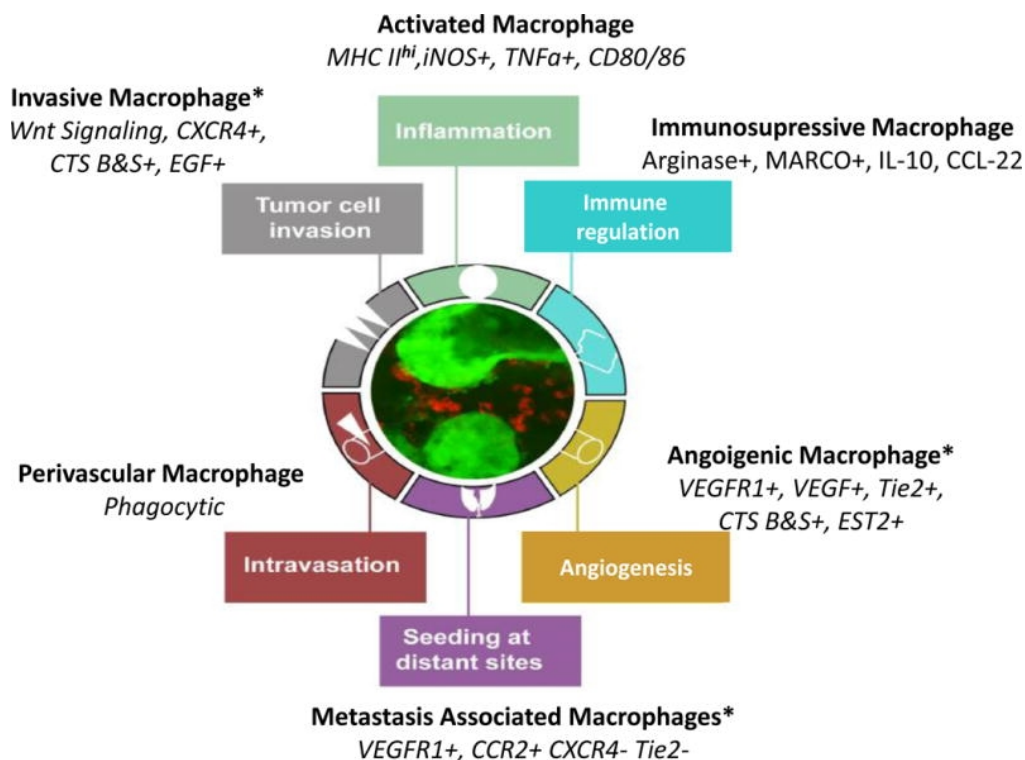
Macrófagos são derivados de um precursor mielóide comum que também dá origem a células dendríticas. Juntamente com as células dendríticas, os macrófagos são o protótipo das células apresentadoras de antígeno (APCs, *antigen-presenting cells*), realizando a "ponte" entre resposta imune inata e adaptativa. Suas principais funções como APC são: 1) fagocitar e matar microrganismos invasores, e 2) ativar as células T por meio da apresentação de antígenos via complexo de histocompatibilidade (MHC) II e também pela secreção de citocinas imunomodulatórias e outras moléculas bioativas. No entanto, os macrófagos exercem outras funções de grande relevância na homeostase dos tecidos, por meio de seu papel nas fases de reparo após injúria de natureza estéril ou infecciosa. Este processo de reparo frequentemente envolve a fagocitose de células mortas, debris celulares, produtos de degradação tecidual e também pela estimulação da angiogênese e fibrose com a secreção de moléculas bioativas, como TGF-beta (fator de transformação do crescimento beta), PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina tipo) ou VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular)^{14, 15} (Figura 2).

Os macrófagos são extensamente estudados no contexto do câncer, em parte pela abundância relativa na resposta imune associada às neoplasias, já que podem representar até 50% da massa tumoral¹⁶. Quando presentes no interior da massa tumoral de tumores sólidos, são denominados macrófagos infiltrantes no tumor (TAMs, *tumor-infiltrating macrophages*). Existe evidência indicando que os TAMs têm, primariamente, um papel pró-tumoral ou de favorecimento da progressão do tumor, incluindo a redução da apoptose e promoção da proliferação de células tumorais, aumento da invasão e metástase^{7, 17, 18}. De fato, existe uma correlação inversa entre a intensidade do infiltrado de macrófagos na massa tumoral e o prognóstico de diversos tipos de câncer, incluindo mama, colo-retal, estômago, próstata, pulmão, tireoide, vesícula, trato urinário e melanoma¹⁹⁻²³. É preciso considerar também a possibilidade de diferentes fenótipos de macrófagos estarem associados à localização anatômica destas células: no interior da massa tumoral (TAMs) ou no estroma circundando a lesão^{24 25}. A notável diferença nos microambientes do interior da massa tumoral e do estroma circundante suportam a possibilidade de variações fenotípicas nos macrófagos (Figura 2). A hipóxia, um fator ambiental de grande relevância no fenótipo de macrófagos, é muito acentuada no interior da massa tumoral em comparação ao estroma circundante. Macrófagos localizados no estroma circundante podem facilitar a invasão loco-regional dos tumores, degradando a matriz extracelular na "borda infiltrante" do tumor; enquanto outros macrófagos presentes no interior da massa tumoral (TAMs) podem estimular a angiogênese e

favorecer a penetração de células neoplásicas nos vasos sanguíneos, estimulando a metástase^{26, 27}.

Uma meta-análise indica que o aumento da infiltração de macrófagos está associado com estágios mais avançados e reduzida sobrevida dos pacientes com tumores sólidos, incluindo carcinomas de cabeça e pescoço²⁸. Um maior infiltrado de macrófagos é observado em casos de carcinoma de células escamosas de orofaringe metastáticos em comparação a casos sem metástase, e também está correlacionado diretamente com envolvimento nodal e reduzida sobrevida dos pacientes^{29, 30}, dados que suportam o papel pró-metastático de macrófagos presentes no interior da massa tumoral (TAMs).

Figura 2 - Representação esquemática de seis possíveis ações biológicas de macrófagos de relevância para a progressão de neoplasias



Embora cada uma destas ações possa ser atribuída a uma subpopulação de macrófagos específica, a maior parte das ações pró-tumorais podem ser associadas ao fenótipo M2 ou de ativação alternativa.

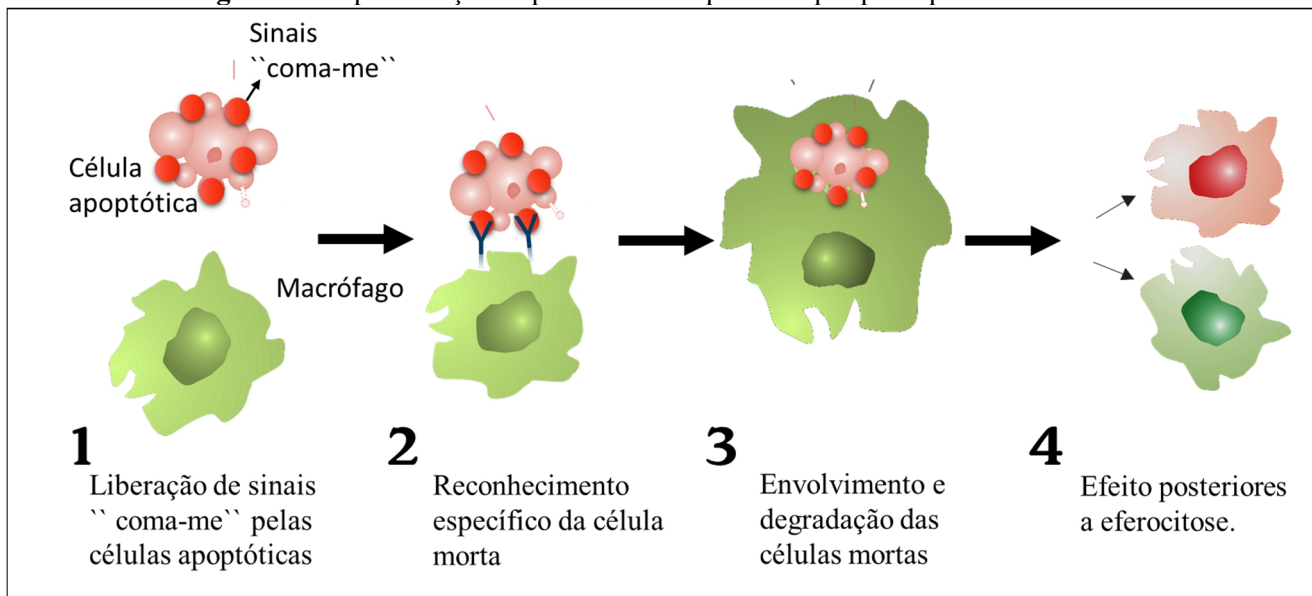
Fonte: Qian e Pollard^{31,p.25}

Heterogeneidade e plasticidade são características fundamentais dos macrófagos, os quais se apresentam basicamente em dois tipos fundamentais: "M1" ou clássicos/pró-inflamatórios (expressão de *IL23* e de elevados níveis de *IL12*); e 'M2' ou alternativos/anti-inflamatórios (elevada expressão de *IL10*, *IL1RA* e baixa expressão de *IL12*). A polarização

para estes fenótipos é induzida por características e estímulos do microambiente. Produtos secretados por linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de orofaringe aumentam a migração/quimiotaxia de macrófagos, indicando que o microambiente nestes tumores recruta, ativamente, macrófagos¹⁶.

A efetividade do tratamento quimio/radioterápico e também da resposta imune anti-tumoral está diretamente relacionada ao aumento da morte celular de células neoplásicas. O microambiente tumoral após o tratamento anti-tumoral apresenta abundância de sinais de células em apoptose³². A remoção das células mortas ocorre por um processo denominado eferocitose, segundo o qual as células apoptóticas são fagocitadas por diversos tipos celulares, especialmente por macrófagos e células dendríticas^{33, 34}. Este processo é regulado por sinais moleculares denominados "me coma" (*eat me*), como a calreticulina³⁵ e a fosfatidilserina^{36, 37} e "não me coma" (*don't eat me*), como *CD47*³⁸. A remoção das células apoptóticas é um processo fisiológico necessário (por ex., a desregulação/inibição deste processo está associada ao desenvolvimento de doenças auto-imunes como o lúpus eritematoso sistêmico e a doença pulmonar obstrutiva crônica), a eferocitose está associada ao processo de reparo e, portanto, a um microambiente "menos inflamatório" ou de imunotolerância e, especificamente, a um perfil de ativação alternativo (M2) em macrófagos^{32, 39-41}.

O processo de eferocitose pode ser didaticamente dividido em quatro etapas principais⁴²: I. liberação de sinais "me coma" pelas células apoptóticas, II. reconhecimento específico da célula morta, III. envolvimento e degradação das células mortas; IV. efeitos posteriores à eferocitose (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática das quatro etapas principais na eferocitose

Fonte: Adaptado de Tabas I⁴².

A ativação da eferocitose é um possível mecanismo para a promoção do crescimento tumoral pela manutenção de um microambiente anti-inflamatório e com inibição da resposta imune. Assim, embora seja um processo necessário, a inibição da eferocitose em câncer (ao menos de forma controlada e por tempo limitado) pode ser uma estratégia de promoção da imunidade anti-tumoral, pró-inflamatória e associada ao perfil de ativação clássico/M1 em macrófagos^{43, 44}, ou uma alteração de um microambiente imunossupressor (M2) para um ambiente "imuno-ativo" (M1)³². De fato, evidências recentes indicam que a eferocitose de células de câncer de próstata apoptóticas induz a polarização de macrófagos para o perfil M2⁴⁵; também que a inibição da eferocitose por macrófagos reduziu a metástase em modelo pré-clínico de câncer de cólon⁴⁶. A literatura é escassa em informações sobre o papel da eferocitose na progressão de carcinoma espinocelular de orofaringe. Um dos poucos estudos sugerem que macrófagos M1 ou M2 podem fagocitar células apoptóticas de carcinoma espinocelular de língua⁴⁷. Além disso, a metodologia de avaliação da eferocitose não é definitiva (marcação de lipídeos de membrana com fluoróforos) e pode representar apenas contato direto ou fusão entre macrófagos e células tumorais.

Considerando **i)** a relevância dos macrófagos para a progressão de tumores sólidos; **ii)** a influência de mediadores biológicos secretados por células tumorais sobre o fenótipo de macrófagos; **iii)** a influência do fenótipo de macrófagos presentes no microambiente tumoral na produção de substâncias biologicamente ativas com efeitos anti- ou pró-tumorais; **iv)** a relevância da eferocitose no processo de reparo tecidual pós-tratamento de tumores sólidos; e

v) a relativa escassez de informações relacionadas especificamente à eferocitose em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, propomos avaliar a influência de produtos secretados por células tumorais, da galanina especificamente, e do contato direto célula-célula sobre o perfil fenotípico e a atividade de eferocitose de macrófagos.

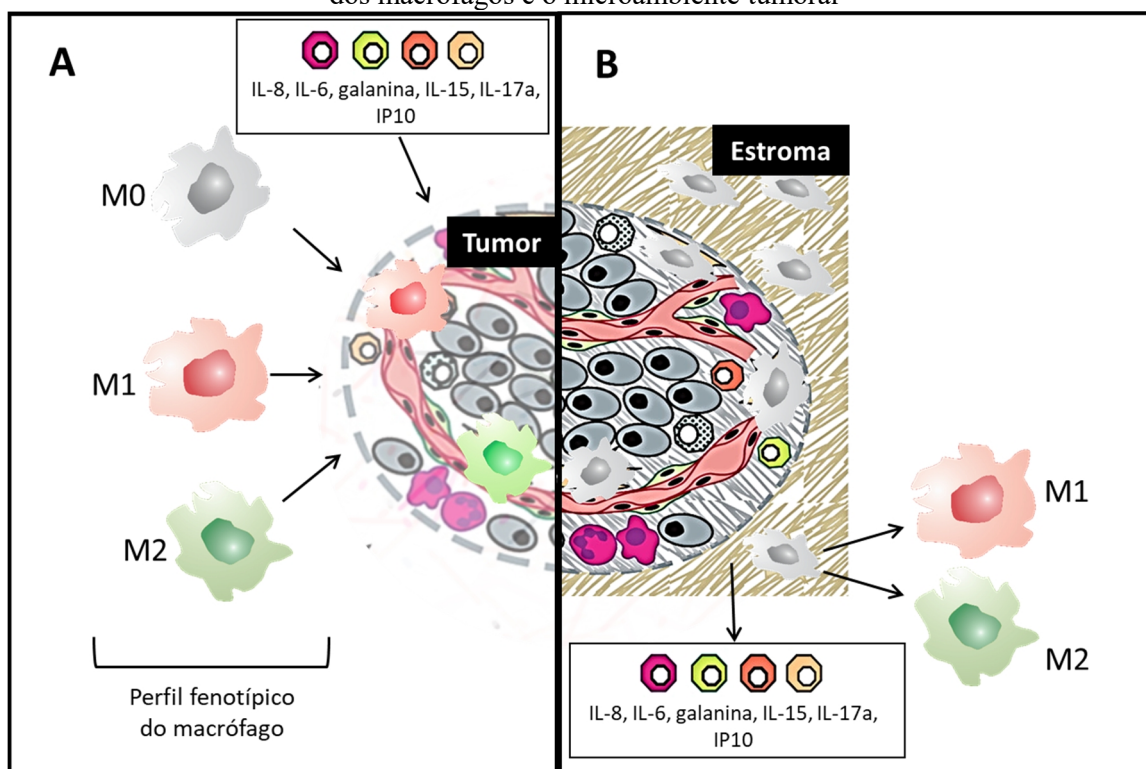
2 PROPOSIÇÃO

A hipótese geral deste estudo é que os produtos secretados pelas células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, em especial a galanina, influenciam o fenótipo de macrófagos e a atividade de eferocitose.

Para testar esta hipótese, propomos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar a influência dos produtos secretados por células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e do contato direto com células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço sobre o perfil fenotípico de macrófagos (Figura 4A)
2. Determinar a influência do fenótipo de macrófagos (M1, M2) na resposta aos produtos secretados por células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Figura 4B)
3. Verificar a influência da exposição aos produtos secretados por células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço sobre a atividade de eferocitose (Figura 5).

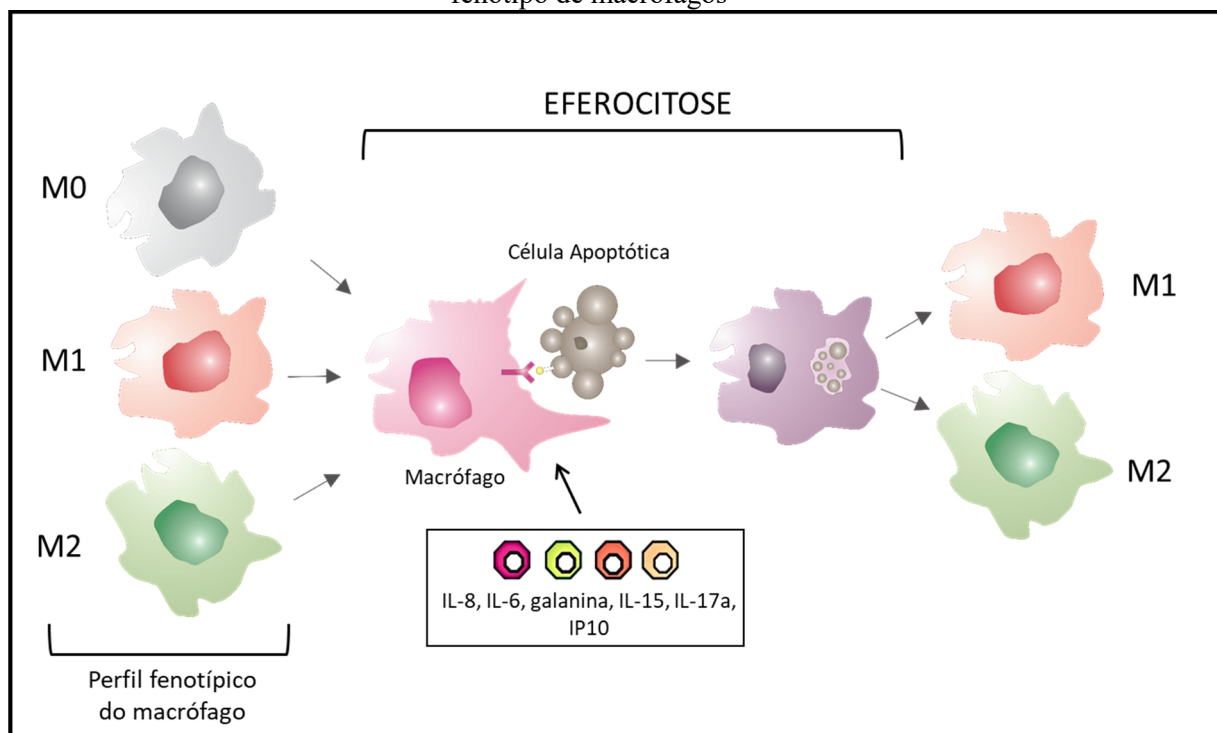
Figura 4 – Representação esquemática das possibilidades de influência recíproca entre o fenótipo dos macrófagos e o microambiente tumoral



Produtos secretados e/ou contato direto célula:célula com células tumorais. A: Interior da lesão. B: Estroma.

Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg^{2,p.662}.

Figura 5 – Representação esquemática da influência do perfil fenotípico do macrófago (M0, M1, M2), na eferocitose de células tumorais, bem como da eferocitose destas células tumorais sobre o fenótipo de macrófagos



Fonte: Elaboração própria

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Linhagens Celulares

Foram usadas linhagens celulares monocíticas humanas (U937 – ATCC 1593.2), mantidas em meio de cultura RPMI1640 (cat# 11875119, Gibco, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) e também linhagem de macrófagos murinos (RAW264.7 – ATCC TIB71), mantidas em DMEM (cat# 11965118, Gibco, ThermoFisher Scientific). As células foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (FBS) inativado por calor (cat# 16000044, Gibco, ThermoFisher Scientific) e penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente, cat# 15140122, Gibco, ThermoFisher Scientific).

As linhagens celulares UM-SCC-1 (cavidade oral, paciente do sexo masculino, T2N0M0)⁴⁸ e UM-SCC-22B (linfonodo metastático de tumor primário localizado na hipofaringe de paciente do sexo feminino, T2N1M0)^{48, 49}, originadas de tumores primários de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foram obtidas por meio de acordo de transferência de material (MTA, Material Transfer Agreement, firmado com o Dr. Thomas E. Carey, Dept. Otolaryngology - University of Michigan, Ann Arbor, MI). Estas linhagens foram mantidas em DMEM (cat# 11965118, Gibco, ThermoFisher Scientific) suplementado com 10% (v:v) de FBS inativado por calor (cat# 16000044, Gibco, ThermoFisher Scientific) e penicilina /estreptomicina (100 U/mL e 100 ug/mL, respectivamente, cat# 15140122, Gibco, ThermoFisher Scientific). Como controle foi usada a linhagem de células epiteliais normais (não neoplásicas) de mucosa oral humana imortalizadas espontaneamente (NOKsi - CVCL_BW57). Todas as culturas foram mantidas em incubadora com atmosfera de ar suplementado com 5% de CO₂, à 98% de umidade e temperatura de 37°C. Todos os produtos plásticos descartáveis utilizados nas culturas celulares foram obtidos de fornecedores locais das marcas Corning/Costar e BD Biosciences.

3.2 Diferenciação de Monócitos em Macrófagos

A linhagem monocítica humana U937 foi diferenciada em macrófagos previamente aos experimentos por meio de tratamento com forbol-miristil-acetato (PMA, cat# P1585, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA). Os monócitos foram tratados com PMA na concentração de 10 ng/mL por 48 horas, seguido de remoção do meio, lavagem das células com tampão fosfato (PBS, pH 7.2, cat# 20012-027, Gibco, ThermoFisher Scientific) para remoção de células mortas e não aderidas. Em seguida foi acrescentado RPMI1640

suplementado com FBS inativado por calor e antibióticos. Após 24 h, as células aderidas foram utilizadas para os experimentos como macrófagos "M0"^{50, 51}. A diferenciação celular foi avaliada pelas alterações nas características fenotípicas de aderência ao substrato e morfologia celular.

3.3 Meio Condicionado das Linhagens Celulares Neoplásicas

O meio condicionado contendo os produtos secretados de forma constitutiva pelas linhagens celulares neoplásicas foi preparado pelo plaqueamento 1×10^6 células (UM-SCC-1 ou UM-SCC-22B) em placas de 100 mm. As células foram plaqueadas em meio RPMI1640 (para manter a homogeneidade do meio de cultura nos experimentos utilizando macrófagos humanos) ou DMEM (para manter a homogeneidade do meio de cultura nos experimentos utilizando macrófagos murinos) suplementado com 10% (v:v) de FBS e antibióticos por aproximadamente 48 h, até atingirem aproximadamente 60-70% de confluência. O meio de cultura completo foi removido, as células lavadas com tampão fosfato para remoção de células mortas e não aderidas e foi acrescentado meio de cultura não suplementado (sem FBS e antibióticos, 10 mL/placa). Este meio de cultura não suplementado foi substituído a cada 2 h por 8 h (4 substituições ou "lavagen"), para eliminação dos produtos secretados sob influência residual do período de cultura em meio suplementado com FBS e antibióticos. Após as 8 h de trocas sucessivas do meio de cultura, foram acrescentados 4 mL de meio de cultura não suplementado, o qual foi coletado após 24 h ("meio condicionado", CM), sendo imediatamente aliquotado e mantido em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização (menos de 30 dias de armazenamento). Depois da coleta do meio condicionado, as células foram tripsinizadas (0,25% trypsin/EDTA, cat# 25200056, Gibco, ThermoFisher Scientific) e foi feita a contagem do número de células em hemocítmetro para registro da homogeneidade do meio condicionado preparado em diferentes momentos. Como controle para o meio condicionado das células neoplásicas, foi feito meio condicionado das células normais de mucosa oral (NOKsi), seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

3.4 Polarização Fenotípica dos Macrófagos e Estímulo com Meio Condicionado (CM) e Galanina

A polarização fenotípica para o perfil M1 foi induzida por tratamento dos macrófagos (4×10^5 céls/poço em placas de 12 poços) com interferon-gama (25 ng/mL, cat# 300-02, Peprotech Inc), LPS (100 ng/mL, cat# L6529, Sigma-Aldrich Co.) e anticorpos neutralizadores de IL-4 (50 ng/mL, cat#, 500-P24, Peprotech, Inc). A polarização para o perfil

M2 foi realizada pelo tratamento dos macrófagos com IL-4 (20 ng/mL, cat# 200-04, Peprotech Inc) e anticorpos neutralizadores de IL-12 (20 ng/mL, cat# 500-P154G, Peprotech, Inc)⁵¹. Estes tratamentos foram mantidos por 72 h em meio de cultura suplementado com 10% (vol:vol) de FBS inativado por calor e antibióticos. As células coletadas ao final deste período foram utilizadas como macrófagos "M1" ou "M2". Macrófagos não polarizados (perfil fenotípico "M0") foram preparados em paralelo, com o plaqueamento do mesmo número de células em placas de 12 poços e manutenção destas células em cultura com meio suplementado apenas com FBS e antibióticos por 72 h.

O tratamento das células com meio condicionado (CM) contendo produtos secretados pelas linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B foi feito na proporção (vol:vol) de 2:1 CM:meio não suplementado por 72 h. Similarmente, o tratamento com galanina (cat# G0278, Sigma-Aldrich Co.) foi feito utilizando a concentração de 10 nM por 72 h.

3.5 Indução de Apoptose nas Linhagens Celulares Tumorais e Co-cultura

Macrófagos:Células Neoplásicas

Previamente à indução de apoptose, as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B foram resuspendidas numa concentração de 1×10^6 céls/mL em tampão fosfato contendo *carboxyfluorescein succinimidyl ester* / CFSE (cat# C34554, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) na concentração de 10 μ M por 15 minutos. As células foram lavadas em PBS contendo 2% (vol:vol) de FBS e, então, plaqueadas para posterior indução de apoptose. A apoptose das linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B foi induzida por exposição à luz UV (302 nm de comprimento de onda) por 20 min^{45, 52}, 18 h após a marcação com CFSE. Brevemente, 1×10^6 células tumorais previamente marcadas com CFSE foram plaqueadas em placas de 100 mm em meio suplementado e, após 18 h, as placas foram colocadas diretamente sobre uma fonte de luz UV dentro da incubadora de CO₂. Após a exposição à luz UV, o meio de cultura foi coletado, as células aderentes foram tripsinizadas e acrescentadas ao meio de cultura coletado. Após centrifugação (1.200 RPM, 5 min, temp. ambiente), as células foram resuspendidas em tampão fosfato e uma alíquota desta suspensão foi contada em hemocitômetro.

As co-culturas foram realizadas acrescentando células das linhagens tumorais com apoptose induzida diretamente sobre as culturas dos macrófagos (com tratamento iniciado 48 h antes para o perfil fenotípico M1 ou M2, CM ou galanina, e como controle os macrófagos M0 foram mantidos em meio suplementado com 10% de FBS e antibióticos) na proporção 3:1

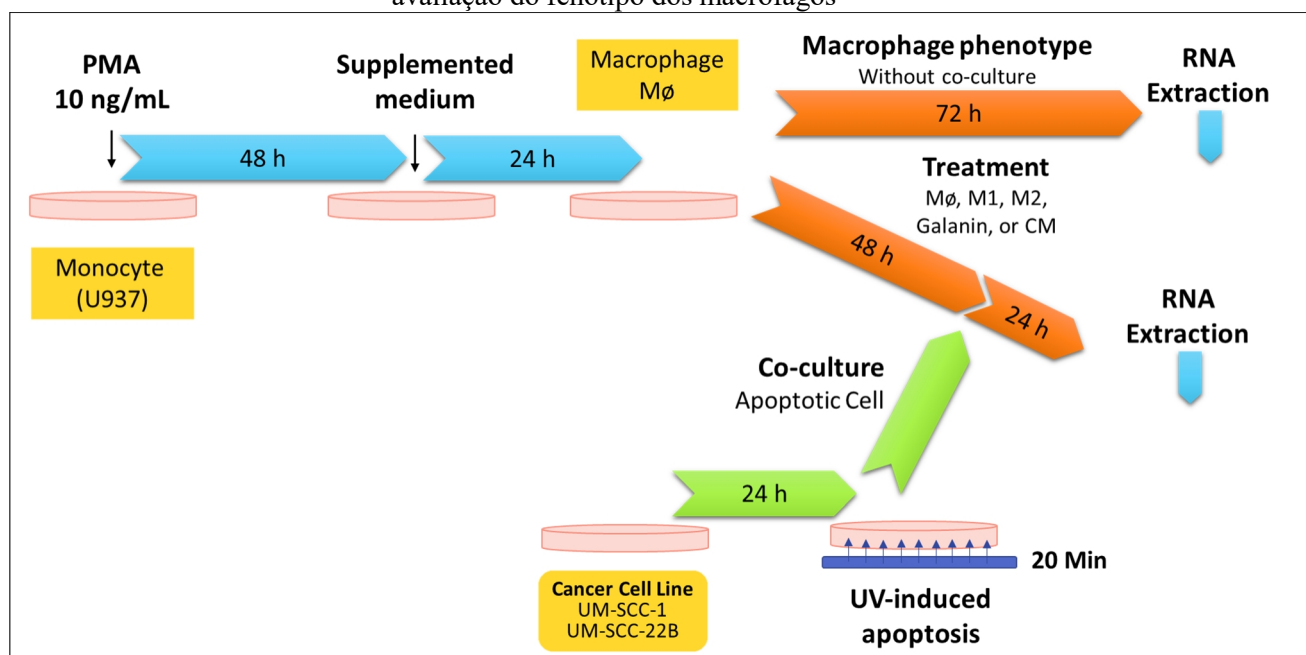
(células apoptóticas:macrófagos). As co-culturas foram mantidas por 24 h, para posterior avaliação da alteração fenotípica dos macrófagos mediante expressão genica e da eferocitose por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

Para avaliar o efeito da indução de apoptose com luz UV na expressão gênica de genes relacionados ao processo de eferocitose, células das linhagens celulares tumorais, 2×10^5 células das linhagens UM-SCC-1 e UM-SCC-22B foram plaqueadas em placas de 60mm de diâmetro em meio suplementado, e após 18 h, as placas foram colocadas diretamente sobre uma fonte de luz UV dentro da incubadora de CO₂ como descrito anteriormente. Imediatamente após a exposição à luz UV, foi feita a extração de RNA para avaliação de expressao gênica de genes ``não me coma`` e ``me coma``

3.6 Extração de RNA Total e RT-qPCR

O RNA total foi purificado de lisados celulares preparados ao final do período de cada experimento utilizando sistema de colunas de afinidade incluindo tratamento com DNase (RNAqueous-4-PCR, Ambion, ThermoFisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA total isolado de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro de microvolumes (NanoVue Plus, GE Healthcare), por meio da avaliação da absorvância em 260 nm. A pureza da suspensão de RNA foi avaliada pela relação entre as absorvâncias obtidas em 260 e 280 nm, a qual deveria estar entre 1,8 a 2,0. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita utilizando 500 ng de RNA total, utilizando *random hexamers* como *primers* e enzima de transcriptase reversa segundo as instruções do fornecedor dos reagentes (High capacity cDNA reverse transcription kit, cat# 4368814, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific).

Figura 6 - Representação esquemática do desenho experimental utilizado nos experimentos de avaliação do fenótipo dos macrófagos



Avaliação mediante expressão gênica após tratamento para M1, M2, CM, galanina ou controle (Mø), assim como a resposta fenotípica após co-cultura com as linhagens celulares tumorais.

Fonte: Elaboração própria.

A detecção dos genes-alvo de interesse utilizando o sistema SYBR Green foi feita utilizando as sequências de oligonucleotídeos apresentados na Tabela 1, obtidas do banco de *primers* online da Universidade de Harvard (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Após otimização, os primers foram utilizados na concentração final de 600 nM, e as reações de amplificação realizadas em volume final de 20 μ L (2 μ L de cDNA) utilizando master mix do sistema SYBR Green (Power Up SYBR Green, cat# A25779, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), segundo as orientações do fornecedor do reagente. As reações foram realizadas em termocicladora de qPCR (StepOne Plus, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) nas seguintes condições: 2 minutos a 50 $^{\circ}$ C, 2 minutos a 95 $^{\circ}$ C, 40 ciclos com 2 estágios de 3 segundos a 95 $^{\circ}$ C e 30 segundos a 60 $^{\circ}$ C por ciclo, e finalizando com a curva de dissociação (*melting curve*). A expressão dos genes-alvo de interesse foi normalizada usando o gene constitutivo (não alterado pelas condições experimentais) GAPDH, e os dados apresentados como quantificação relativa, $\Delta(\Delta CT)$, calculados utilizando o software da termocicladora.

Tabela 1 - Sequência ('S'-sense; 'AS'-Anti-sense) dos *primers*

Nome do Gene	Sequência (5' – 3')
hGAPDH-S	ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG G
hGAPDH-AS	GCC ATC ACG CCA CAG TTT C
hTNF-S	GAC GCC AAG CCC TGG TAT G
hTNF-AS	CGG GCC GAT TGA TCT CAG C
hIL10-S	GAC TTT AAG GGT TAC CTG GGT TG
hIL10-AS	TCA CAT GCG CCT TGA TGT CTG
mIl-12p40-S	GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA
mIl-12p40-AS	AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG
mArg1-S	CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA
mArg1-AS	AGG AGC TGT CAT TAG GGA CAT C
hIL-1b-S	TCA GCC AAT CTT CAT TGC TCA A
hIL-1b-AS	TGG CGA GCT CAG GTA CTT CTG
hTGF-S	CGC GTG CTA ATG GTG GAA A
hTGF-AS	GCT GTG TGT ACT CTG CTT GAA CTT GT
hCD31-S	CAC AGA TGA GAA CCA CGC CT
hCD31-AS	GGC CCC TCA GAA GAC AAC AT
hPAII-S	ATC GAG GTG AAC GAG AGT GG
hPAII-AS	AAG GAC TGT TCC TGT GGG GT
hCD47-S	GTA CAG CGA TTG CAT TAA CCT CC
hCD47-AS	ACC ACA GCG AGG ATA TAG GCT
hCALR-S	CCT GCC GTC TAC TTC AAG GAG
hCALR-AS	GAA CTT GCC GGA ACT GAG AAC

Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR com o sistema SYBR Green. As sequências foram obtidas do banco de *primers* online da Universidade de Harvard.

Fonte: Elaboração própria

Também foram utilizados pares de primers e sondas pré-desenhadas e otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) para a detecção dos genes-alvo de interesse (*IL-10* e *TNF*, *Galanin*, *Galanin receptor 1*, *Galanin receptor 2* e *Galanin receptor 3*) apresentados na Tabela 2 com o master mix do sistema TaqMan (TaqMan Fast Advanced, cat# 4444557, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). As condições de ciclagem utilizadas na termocicladora de qPCR (StepOne Plus,

Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) foram as previamente otimizadas pelo fornecedor dos reagentes: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 1 segundo e 60 °C por 20 segundos. A expressão de 18S RNA foi utilizada para normalização dos resultados nestes experimentos, que também foram analisados pelo método $\Delta(\Delta CT)$ utilizando o software da termocicladora.

Tabela 2 – Referências dos ensaios de expressão gênica (*primers* e sondas pré-desenhados) do sistema TaqMan utilizados

Nome do Gene	TaqMan Gene Expression Assays
<i>18sRNA</i>	Hs99999901-s1
<i>IL10</i>	Hs00961622-m1
<i>TNF</i>	Hs00174128-m1
<i>GAL</i>	Hs00544355_m1
<i>GALR1</i>	Hs00175668_m1
<i>GALR2</i>	Hs00605839_m1
<i>GALR3</i>	Hs00358572_m1

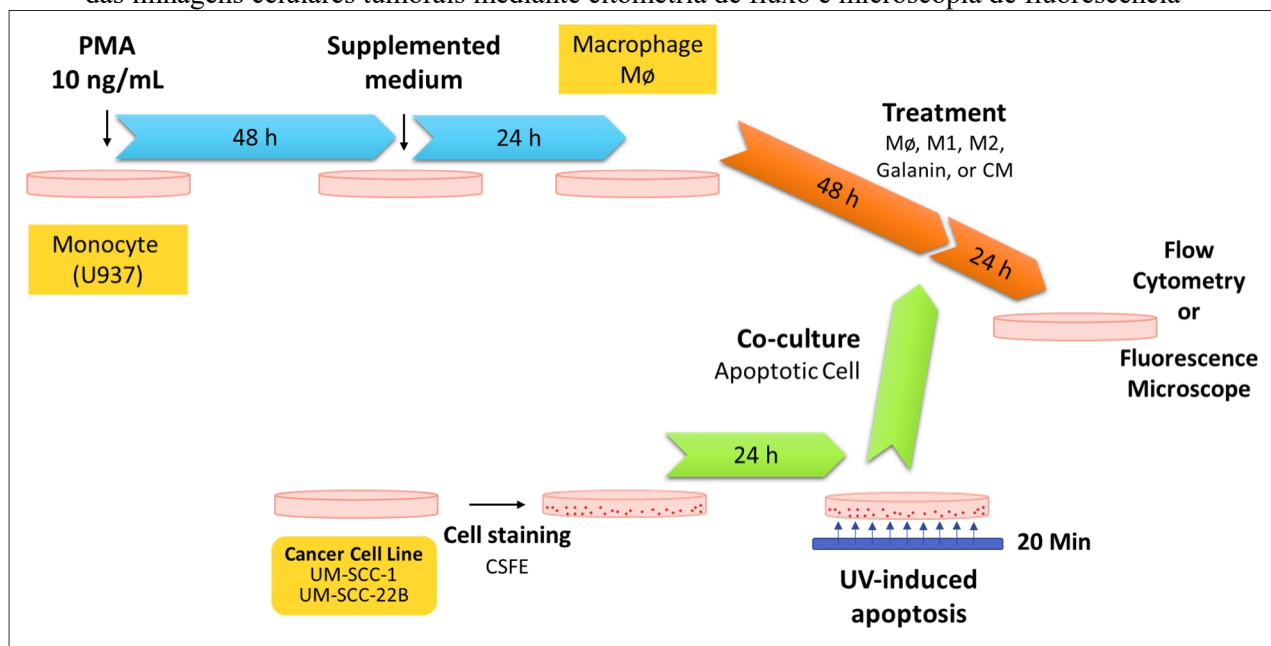
Fonte: Elaboração própria.

3.7 Eferocitose

Ao final do período 24 h de co-cultura, o meio de cultura contendo células em suspensão foi removido por aspiração e as células aderidas foram lavadas com PBS para remoção das células fracamente aderidas (incluindo células mortas não fagocitadas e células viáveis não aderidas). As células aderidas foram removidas da placa de cultura com reagente apropriado para posterior detecção de antígenos/marcadores de membrana celular (Accutase cell detachment solution, cat# 561527, BD Biosciences), contadas em hemocitômetro e resuspendidas em tampão de marcação de citometria (PBS + 2% FBS) na concentração de 1×10^6 céls/mL. Inicialmente, as células foram tratadas com reagente para bloquear receptores $Fc\gamma$, prevenindo interações não-específicas do anticorpo primário com as células por meio da porção Fc (Human BD Fc Block, cat# 564220, BD Biosciences), segundo as instruções do fornecedor. A suspensão de células foi marcada com anticorpos primários para CD11b (antígeno característico de macrófagos e ausente em células tumorais de origem epitelial) conjugado com o fluoróforo PE-Cy7 (cat# 552850, BD Biosciences). A faixa de emissão de PE-Cy7 após excitação em 488 nm não se sobrepõe à faixa de emissão do composto CFSE, com o qual as células tumorais foram marcadas. Esta marcação foi realizada utilizando 1 μ L

da suspensão de anticorpos para cada 100 μL de suspensão de células na concentração de 1×10^6 céls/mL, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS por duas vezes para remoção dos anticorpos "livres" antes de proceder à aquisição dos dados em citômetro de fluxo (BD FACSVersé, BD Biosciences). A estratégia para aquisição dos dados foi feita a partir do *dot-plot* FSCxSSC, no qual foi estabelecido um *gate* selecionando as células viáveis, excluindo debris celulares (população "P1"). Nesta população "P1" foi estabelecido um novo *gate* de quadrantes em *dot-plot* PE-Cy7/FL4 (canal de detecção de PE-Cy7) X FITC/FL2 (canal de detecção de CFSE) para avaliar o percentual de células positivas *apenas* para CD11b-PE-Cy7 (macrófagos), o percentual de células positivas *apenas* para FITC/CFSE (células tumorais apoptóticas), e o percentual de células *duplo-positivas* CFSE/FITC e PE-Cy7, consideradas como macrófagos que fagocitaram células tumorais, ou percentual de células eferocitóticas. Os dados foram analisados e os gráficos obtidos com o software do equipamento (BD FACSuite, BD Biosciences). Como controle, alíquotas contendo a mesma quantidade de células da co-cultura foram incubadas com a mesma concentração de anticorpo isotipo-controle, também conjugados à PE-Cy7. Estes experimentos foram repetidos de forma independente três vezes, com aquisição de 10.000 eventos em cada amostra. Na análise dos dados, consideramos o percentual de macrófagos eferocitóticos (eventos duplo-positivos para PE-Cy7 e CFSE) do *total de macrófagos* (todos os eventos positivos para PE-Cy7, incluindo os simples- e duplo-positivos).

Figura 7- Representação esquemática do desenho experimental utilizado para avaliação da eferocitose das linhagens celulares tumorais mediante citometria de fluxo e microscopia de fluorescência



Fonte: Elaboração própria.

A eferocitose também foi avaliada por microscopia de fluorescência. As condições experimentais, incluindo período de co-cultura de macrófagos e células tumorais apoptóticas e a proporção célula:célula foram as mesmas descritas anteriormente (item 3.6) e utilizados para a avaliação da eferocitose por citometria. As células tumorais foram marcadas antes da indução de apoptose por exposição à luz UV (como descrito anteriormente), porém utilizando composto fluorescente que emite no espectro da cor vermelha (Cell Proliferation Staining Reagent, Cytopainter cat#ab176737, Abcam), segundo as instruções do fornecedor. Brevemente, 1 μL da suspensão do composto fluorescente foi acrescentado à 500 μL (1X) de uma suspensão de células tumorais ajustada para uma concentração de 1×10^6 céls/mL em tampão HBSS (Hank's Balanced Salt Solution + 20 mM HEPES). A marcação das células foi realizada por 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As células tumorais foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro e após 18 h foi induzida a apoptose por exposição à luz UV, da forma descrita anteriormente. Imediatamente após a exposição à luz UV, o meio de cultura contendo células não aderidas foi coletado, as células aderentes ao substrato plástico foram tripsinizadas e acrescentadas ao meio de cultura coletado. Após centrifugação (1.200 RPM, 5 min, temp. ambiente), as células foram resuspendidas em tampão fosfato e uma alíquota desta suspensão foi contada em hemocitômetro. As co-culturas foram realizadas acrescentando células das linhagens tumorais com apoptose induzida diretamente sobre as culturas dos macrófagos (com tratamento iniciado 48 h antes, para o perfil fenotípico M1 ou M2, CM ou galanina, e como controle os macrófagos M0 foram

mantidos em meio suplementado com 10% de FBS e antibióticos) na proporção 3:1 (células apoptóticas:macrófagos)^{53, 54}.

Ao final do período de co-cultura de 24 h, o meio de cultura contendo células em suspensão foi removido por aspiração, e foram realizadas três lavagens com tampão fosfato para remoção das células mortas residuais e células viáveis fracamente aderidas. As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 2% por 10 min (Cytotfix, cat# 554655, BD Biosciences) e permeabilizadas com tampão contendo saponina (Perm/Wash, cat# 554723, BD Biosciences) por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram coradas com Faloidina conjugada à AlexaFluor 488 (cat#A12379, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) por 20 minutos e subsequentemente com DAPI numa concentração de 0,5 µg/mL, durante 5 min à temp. ambiente (cat# D9542, Sigma-Aldrich), possibilitando a marcação da actina/citoplasma e núcleo celular, respectivamente. Após nova lavagem das células com tampão fosfato, estas foram visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Evos fl, AMG Micro). Nas imagens em *overlay* dos canais Verde/Vermelho/Azul obtidas em aumento de 200X e em condições padronizadas de tempo de exposição e brilho foi feita a contagem, em 5 campos aleatórios/ para cada poço, do número de macrófagos marcados em verde pela Faloidina conjugada à AlexaFluor 488 apresentando fluorescência vermelha em seu interior (indicando a eferocitose de células tumorais), em relação ao total de macrófagos (marcados só em verde) presentes, para o cálculo do índice fagocítico. Um operador treinado e sem conhecimento das condições experimentais de cada imagem realizou as contagens.

3.8 Análise dos Dados

Os dados obtidos nos experimentos avaliando expressão gênica e percentual de células eferocitóticas foram tabulados e a natureza da distribuição (aproximadamente normal ou não) foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Subsequentemente, os dados foram analisados por testes paramétricos (ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparações pareadas e teste t de Student) ou não-paramétricos (Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney) apropriados, segundo o número de condições comparadas e a natureza dos dados e de sua distribuição. As análises foram feitas considerando um nível de significância (para proteção contra erros do tipo I) de 95% ($p < 0.05$). A menos que explicitamente indicado, todos os experimentos foram realizados de forma independente três vezes e analisados em duplicata.

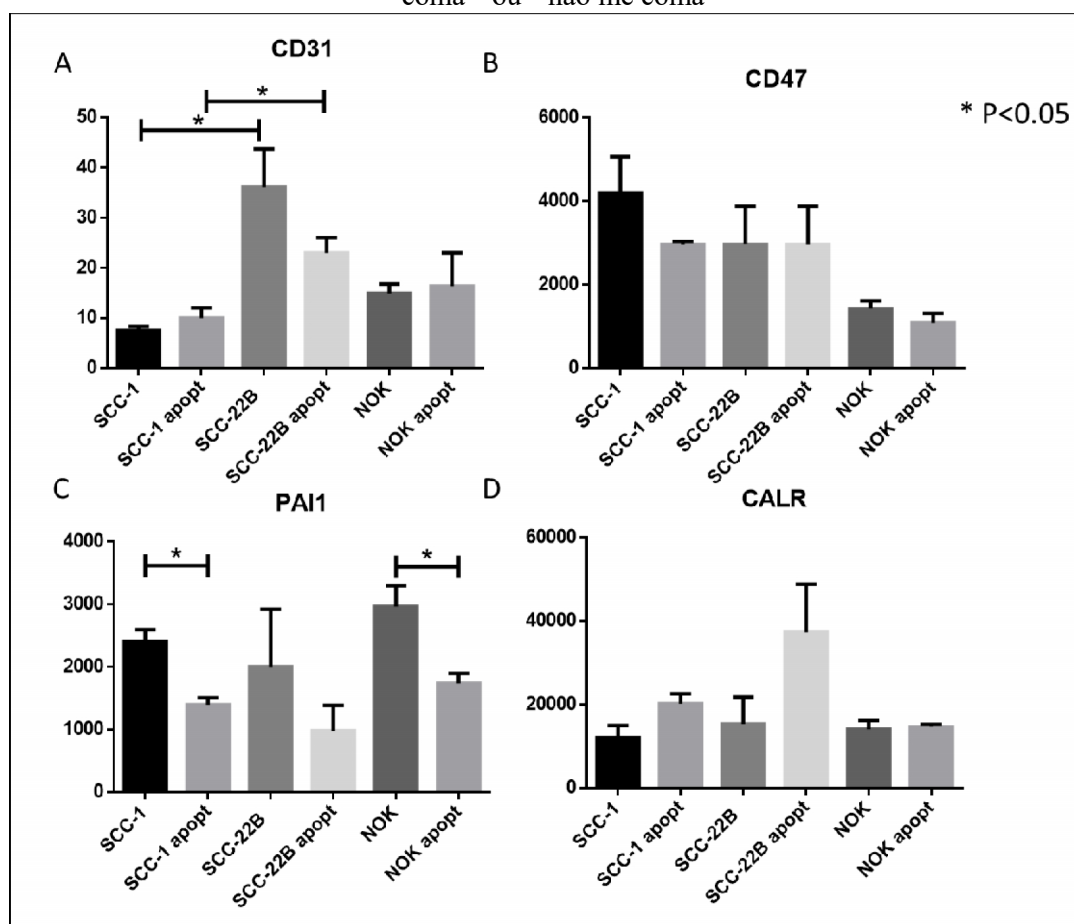
4 RESULTADOS

4.1 Expressão Gênica das Linhagens Tumorais Após Indução de Apoptose Com Luz UV

As linhagens celulares UM-SCC-1 e UM-SCC-22B foram expostas à luz UV durante 20 minutos e, posteriormente, foi feita avaliação de expressão gênica de *CD31*, *CD47*, *CALR*, e *PAIL*. Como controle, utilizamos células da mesma linhagem que não foram expostas à luz UV. Nestes experimentos, procuramos avaliar como a indução de apoptose nas linhagens celulares tumorais utilizadas afetou a expressão de genes importantes para a regulação do processo de eferocitose.

A indução de apoptose na linhagem celular UM-SCC-22B resultou em redução da expressão de genes inibidores de eferocitose ("não me coma") *CD31* e *PAIL* (não estatisticamente significativa), mas não de *CD47*, além de notável (embora não significativo estatisticamente) aumento da expressão de gene indutor de eferocitose ("me coma") *CALR* (figura 8). Na linhagem celular UM-SCC-1, a indução de apoptose resultou em redução significativa da expressão de *PAIL*, enquanto a expressão de *CD47* e não de *CD31* também foi diminuída, mas sem significância estatística (figura 8A-C). O aumento da expressão de *CALR* (indutor de eferocitose, ou "me coma") na linhagem UM-SCC-1 foi proporcionalmente inferior ao observado para a linhagem UM-SCC-22B (figura 8D). Interessantemente, a indução de apoptose na linhagem controle não neoplásica NOKsi resultou em redução significativa da expressão apenas de *PAIL* (inibidor de eferocitose ou "não me coma"). Estes resultados indicam uma resposta heterogênea das linhagens celulares tumorais utilizadas em relação à influência do processo de indução de apoptose sobre a regulação da expressão destes genes-alvos.

Figura 8 - Gráficos representativos da expressão de genes relacionados ao processo de eferocitose 'me coma' ou 'não me coma'



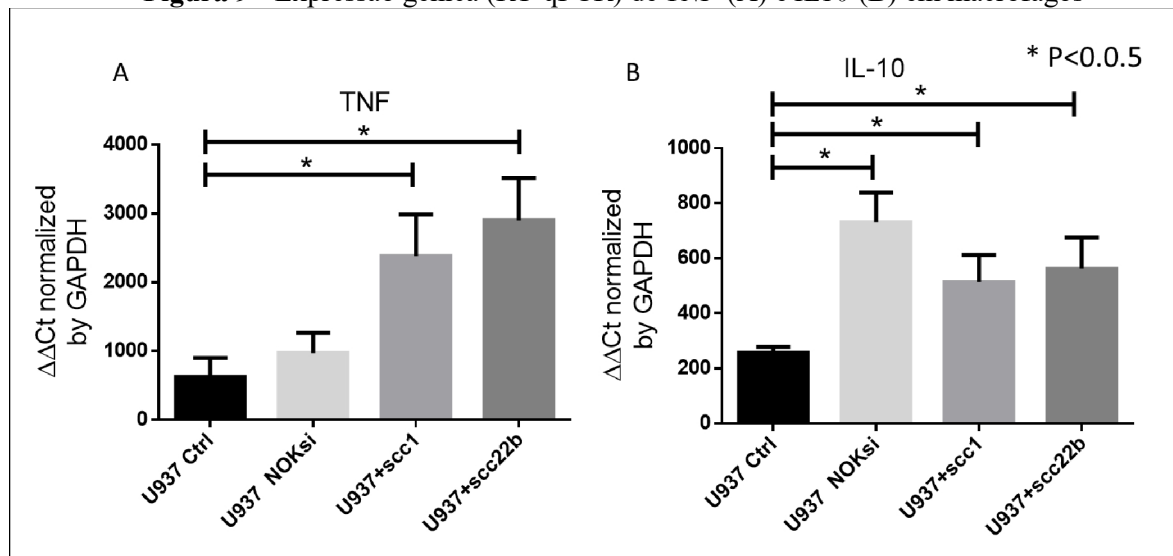
Genes inibidores ou "não me coma": *CD31*, *CD47*, *PAI1* e indutores ou "me coma": *CALR* pelas linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B e pela linhagem de células epiteliais não neoplásicas NOKsi avaliados por RT-qPCR. As linhagens celulares indicadas foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 cels/mL e a apoptose foi induzida por exposição direta à luz UV por 20 min. As células controle foram colocadas sobre o aparato de luz UV pelo mesmo período, sem acionar a lâmpada. Completado o tempo de 10 min o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, dados normalizados pela a expressão de GAPDH. Dados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.

4.2 Macrófagos Diferenciados a Partir de Monócitos (U937) Aumentam a Expressão de *TNF* e *IL10* Quando estão em Co-cultura com Células Apoptóticas das Linhagens Neoplásicas UM-SCC-1 e UM-SCC-22B

As linhagens celulares monocíticas humanas (U937) foram diferenciadas em macrófagos, realizado a co-cultura com as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B em apoptose induzida na proporção de 3:1 (células tumorais:macrófagos). Como controle, foi feita a co-cultura com células apoptóticas NOKsi, na mesma proporção. A co-cultura com as linhagens celulares tumorais resultou em aumento da expressão tanto de *TNF* quanto de *IL10* (figura 9A e B) em relação aos macrófagos isolados (sem co-cultura com as linhagens celulares tumorais). Por outro lado, a co-cultura com a linhagem celular não

neoplásica aumentou significativamente a expressão de *IL10*, mas não de *TNF*. Estes dados sugerem que o perfil fenotípico dos macrófagos é influenciado pelo contato direto com linhagens celulares tumorais apoptóticas. No entanto, neste experimento não é possível distinguir a expressão dos genes-alvo pelos macrófagos e pelas células tumorais, uma vez que todas as células são de origem humana e considerando que nem todas as células tumorais estão em estágio final de apoptose.

Figura 9 - Expressão gênica (RT-qPCR) de *TNF* (A) e *IL10* (B) em macrófagos



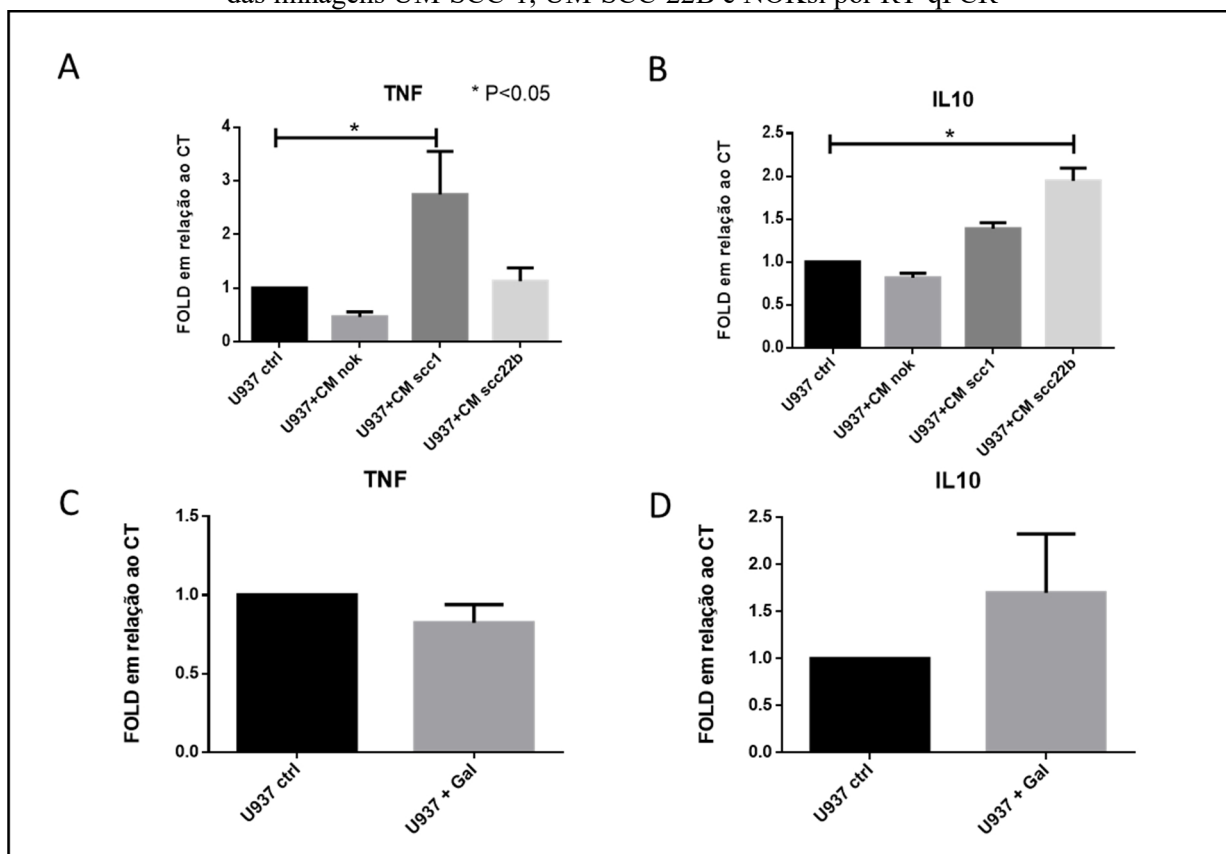
Macrófagos M0 diferenciados a partir de células de linhagens monocíticas humanas (U937) em co-cultura com as linhagens celulares NOKsi, UM-SCC-1 e UM-SCC-22B. Monócitos humanos (U937) plaqueados 4×10^5 céls/poço em placas de 12 poços foram diferenciadas em macrófagos (M0) com PMA 10ng/mL durante 48 h. Depois de 72 h sem tratamento foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B em apoptose induzida na proporção de 3:1. Como controle, foi feita a co-cultura com células apoptóticas NOKsi. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h. Posteriormente o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, normalizada para a expressão de GAPDH. Dados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.

4.3 Produtos Secretados por Células de Câncer de Cabeça e Pescoço e Galanina Afetam a Expressão Gênica de *TNF* e *IL10*

Para determinar a influência dos produtos secretados por células tumorais (independentemente do contato direto célula:célula) e da galanina, especificamente, no perfil fenotípico dos macrófagos, as células (macrófagos M0 derivados da linhagem monocítica U937) foram tratadas com meio condicionado (CM) preparado das linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B na proporção (vol:vol) de 2:1 (meio condicionado:meio RPMI suplementado com FBS 10% e P/S) ou galanina (10 nM) durante 3 dias. Como controles, utilizamos macrófagos cultivados pelo mesmo período nas mesmas condições com CM da linhagem celular não neoplásica NOKsi na mesma proporção (vol:vol) 2:1 de CM:meio RPMI

suplementado (10% FBS e P/S) e também macrófagos cultivados na mesma proporção (2:1 vol:vol) em mistura de RPMI não suplementado: RPMI suplementado (10% FBS e P/S). Houve aumento na expressão de *TNF* por macrófagos expostos ao CM de células neoplásicas UM-SCC-1, mas não quando expostos ao CM da linhagem UM-SCC-22B (figura 10A). Resultados opostos foram obtidos para a expressão gênica de *IL10*, que aumentou com a exposição dos macrófagos ao CM da linhagem UM-SCC-22B, mas não com exposição ao CM da linhagem UM-SCC-1 (figura 10B). Além disso, não se observou influência significativa na expressão de *TNF* e *IL10* em macrófagos expostos ao CM de células NOKsi em comparação ao controle negativo (figura 10A e B), sugerindo que os compostos secretados pelas células neoplásicas podem influenciar o fenótipo de macrófagos, enquanto os produtos secretados constitutivamente por células epiteliais não neoplásicas não tem efeito sobre o fenótipo dos macrófagos. O tratamento dos macrófagos com galanina não causou alteração notável na expressão gênica de *TNF*, porém foi associado a um aumento discreto (embora não significativo estatisticamente) na expressão de *IL10* em comparação às células não estimuladas (controle) (figura 10C e D), sugerindo que a galanina pode promover um desvio fenotípico anti-inflamatório, ou para um perfil "M2" nos macrófagos.

Figura 10 - Expressão gênica de *TNF* e *IL10* em macrófagos tratados com meio condicionado (CM) das linhagens UM-SCC-1, UM-SCC-22B e NOKsi por RT-qPCR



(A) e (B) apresentam os resultados após exposição ao CM por 72 h. (C) e (D) apresentam os resultados após estímulo com galanina (10 nM) também por 72 h. Células U937 foram diferenciadas em Macrófagos (M0) com PMA 10ng/mL durante 48 h. Depois de 24 h sem tratamento, as células foram tratadas com meio condicionado (CM) preparado das linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B na proporção (vol:vol) de 2:1 ou galanina (10 nM) durante 3 dias. Como controle, as células foram tratadas com CM da linhagem celular não neoplásica NOKsi na mesma proporção. Completado o tempo de tratamento, o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, normalizada para a expressão de GAPDH. Dados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.

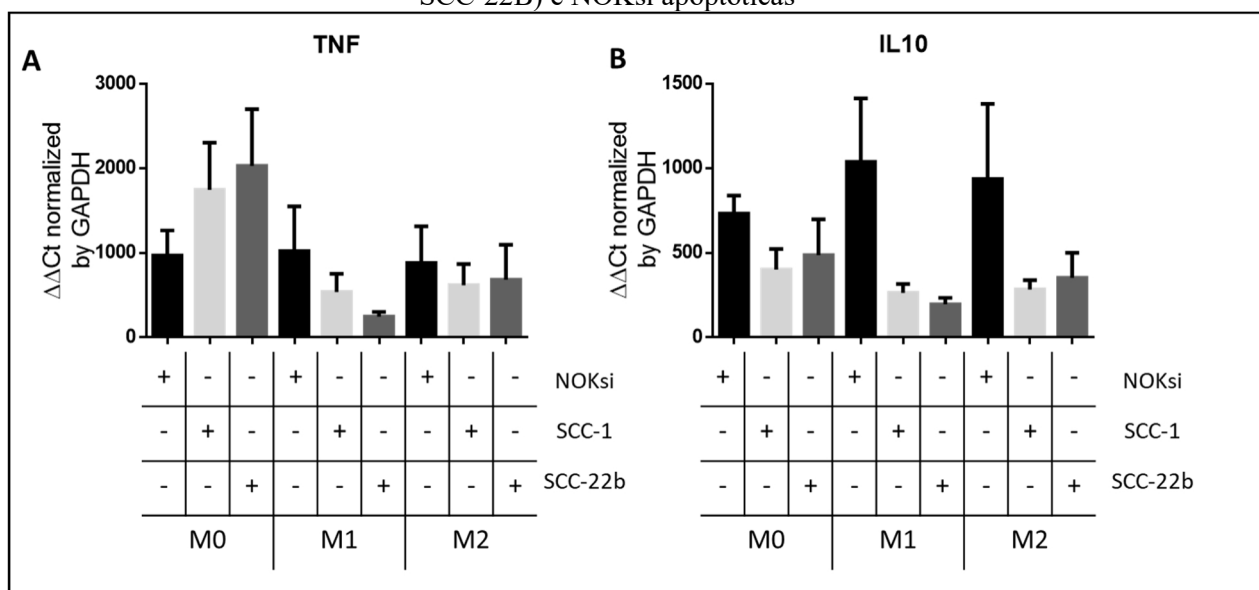
4.4 Influência da Co-cultura com Linhagens Tumorais Apoptóticas na Resposta de Macrófagos M0, M1 e M2

Considerando que os macrófagos que migram para a região da lesão neoplásica e invadem o parênquima tumoral podem apresentar uma polarização "basal" nos perfis M1 ou M2, avaliamos também o efeito do contato célula:célula e dos produtos secretados sobre a expressão gênica destes macrófagos "pré-polarizados". Nestes experimentos, inicialmente, os macrófagos foram polarizados para os perfis fenotípicos M1 e M2 (macrófagos não estimulados foram utilizados como macrófagos "M0"). Posteriormente, foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais apoptóticas UM-SCC-1 e UM-SCC-22B e, para efeito de comparação, com a células NOKsi apoptóticas. Em macrófagos M0, o contato com

as linhagens celulares tumorais causou um aumento na expressão de *TNF*, enquanto macrófagos M1 apresentaram redução da expressão de *TNF* (figura 11A). Em macrófagos M2, a expressão de *TNF* não foi marcadamente afetada pela co-cultura com as linhagens celulares tumorais. Por outro lado, a expressão de *IL10* foi sempre reduzida após a co-cultura com as linhagens tumorais em comparação à co-cultura com a linhagem controle não neoplásica, no entanto esta redução foi mais marcante para os macrófagos pré-polarizados nos perfis M1 e M2 (figura 11B).

Interessante observar que, como não houve diferença marcante na expressão de *TNF* ou *IL10* pelas linhagens UM-SCC-1 e UM-SCC-22B após a indução da apoptose (figura 9A e B), estes resultados sugerem que esta discreta redução da expressão gênica efetivamente reflete um efeito supressor nos macrófagos pelo contato direto célula:célula.

Figura 11 - Gráficos representativos da expressão de genes-alvo de interesse característicos de cada perfil fenotípico de macrófagos por RT-qPCR, segundo o perfil fenotípico (M0, M1 e M2) dos macrófagos no momento do início da co-cultura com linhagens celulares tumorais (UM-SCC-1 e UM-SCC-22B) e NOKsi apoptóticas



(A) e (C) correspondem aos macrófagos diferenciados de monócitos humanos (U937). Macrófagos (M0) diferenciados de monócitos U937 foram tratados durante 72 h para perfil M1 e M2. Para o perfil M1 foi realizado pelo tratamento com interferon-gama (25 ng/mL), LPS (100 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-4 (50 ng/mL). Para o perfil M2 com IL-4 (20 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-12 (20 ng/mL). Como controle os macrófagos M0 não receberam tratamento. Após 48 de tratamento para polarização, foram acrescentadas as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B em apoptose induzida na proporção de 3:1. Como controle, foi feita a co-cultura com células apoptóticas NOKsi. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h. Posteriormente o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, normalizada para a expressão de GAPDH. Dados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.

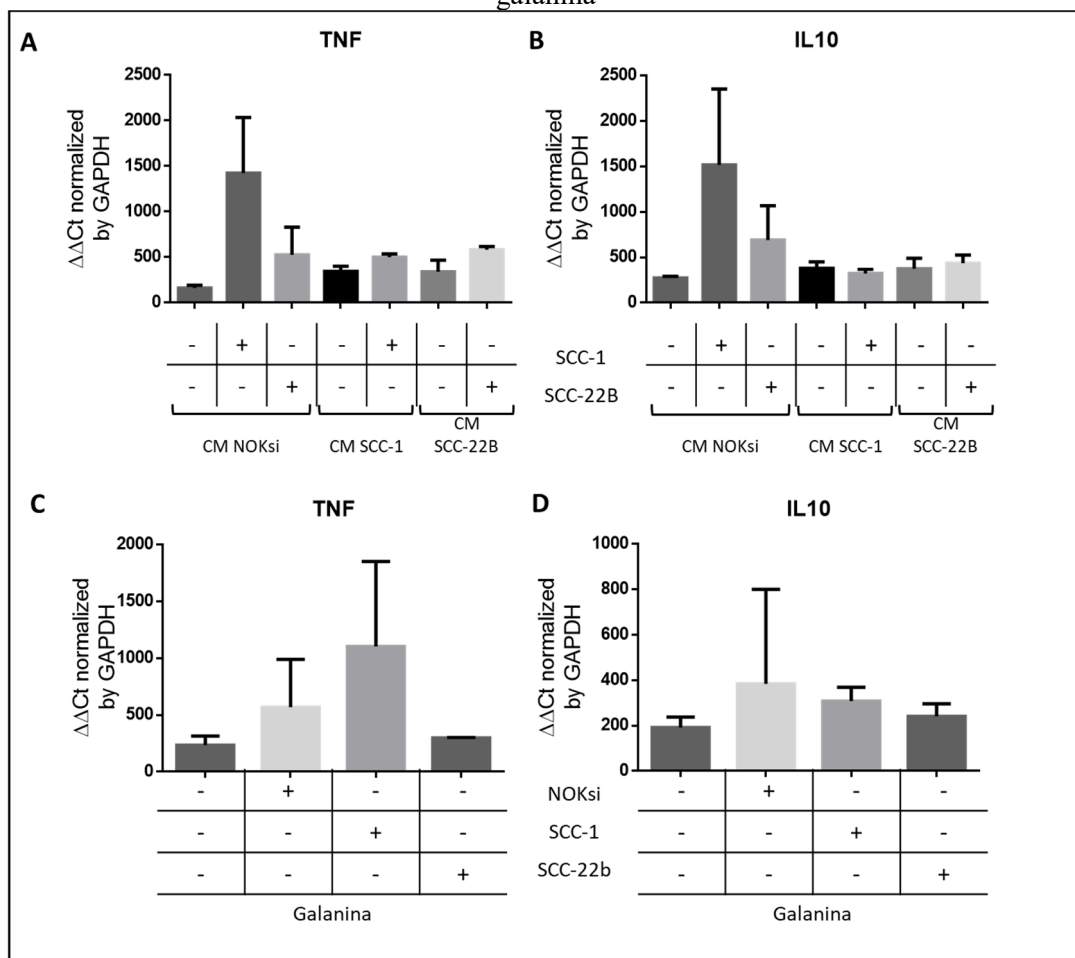
4.5 Influência da Exposição aos Produtos Secretados Pelas Células Tumorais e à Galanina na Co-cultura de Macrófagos com Células Neoplásicas Apoptóticas

Considerando que os macrófagos infiltrantes (presentes no parênquima tumoral) podem migrar do estroma para o interior da lesão, avaliamos se a exposição inicial aos produtos secretados pelas células tumorais (o microambiente do estroma tumoral) poderia afetar a resposta dos macrófagos ao contato direto (célula:célula) com as células neoplásicas. Neste experimento, inicialmente utilizamos o meio condicionado (CM) das linhagens tumorais para simular o microambiente tumoral e seus efeitos sobre os macrófagos migrando para o interior da lesão.

Para simular o microambiente tumoral, os macrófagos foram expostos (proporção 2:1, vol:vol) ao CM das linhagens celulares tumorais por 48 h antes das co-culturas. Como controle, os macrófagos foram também estimulados com CM da linhagem celular epitelial não neoplásica NOKsi. As co-culturas de macrófagos condicionados com CM das linhagens celulares tumorais foram realizadas com as células tumorais apoptóticas correspondentes ao CM utilizado (CM de UM-SCC-1/co-cultura com UM-SCC-1 ou CM de UM-SCC-22B/co-cultura com UM-SCC-22B) por 48 h. No caso dos macrófagos expostos ao CM da linhagem não neoplásica NOKsi, as co-culturas foram subsequentemente realizadas com as duas linhagens tumorais avaliadas.

Quando os macrófagos foram condicionados com CM da linhagem NOKsi, a co-cultura com as linhagens tumorais aumentou a expressão gênica de *TNF* e *IL10*, sendo este efeito mais pronunciado para as co-culturas com a linhagem UM-SCC-1. Por outro lado, não houve alteração na expressão gênica de *TNF* ou *IL10* nos macrófagos expostos ao CM das linhagens tumorais previamente à co-cultura. Este resultado foi observado para as duas linhagens tumorais avaliadas e indica o efeito supressor dos produtos secretados pelas linhagens tumorais (figura 12A e B). Quando os macrófagos foram pré-condicionados apenas com galanina, a co-cultura com as células tumorais apoptóticas resultou em aumento discreto da expressão de *TNF* em co-cultura com a linhagem celular UM-SCC-1, enquanto a expressão de *IL10* não foi alterada (figura 12C e D).

Figura 12 - Gráficos representativos da influência do contato direto macrófagos:células tumorais apoptóticas em macrófagos previamente condicionados com produtos solúveis (meio condicionado, CM) das linhagens celulares tumorais, e da linhagem celular epitelial não neoplásica (NOKsi) ou com galanina



(A) e (B) apresentam os dados utilizando macrófagos previamente condicionados com CM das linhagens celulares tumorais e da linhagem não neoplásica. (C) e (D) apresentam os dados dos macrófagos condicionados com galanina (10 nM). Macrófagos (M0) diferenciados de monócitos U937 foram tratados durante 72 h com meio condicionado (CM) preparado das linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B na proporção (vol:vol) de 2:1 ou galanina (10 nM) durante 3 dias. Como controle, as células foram tratadas com CM da linhagem celular não neoplásica NOKsi na mesma proporção. 24 h antes de terminado o tratamento, foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B em apoptose induzida na proporção de 3:1. Como controle, foi feita a co-cultura com células apoptóticas NOKsi. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h. Posteriormente o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, normalizada para a expressão de GAPDH. Dados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.

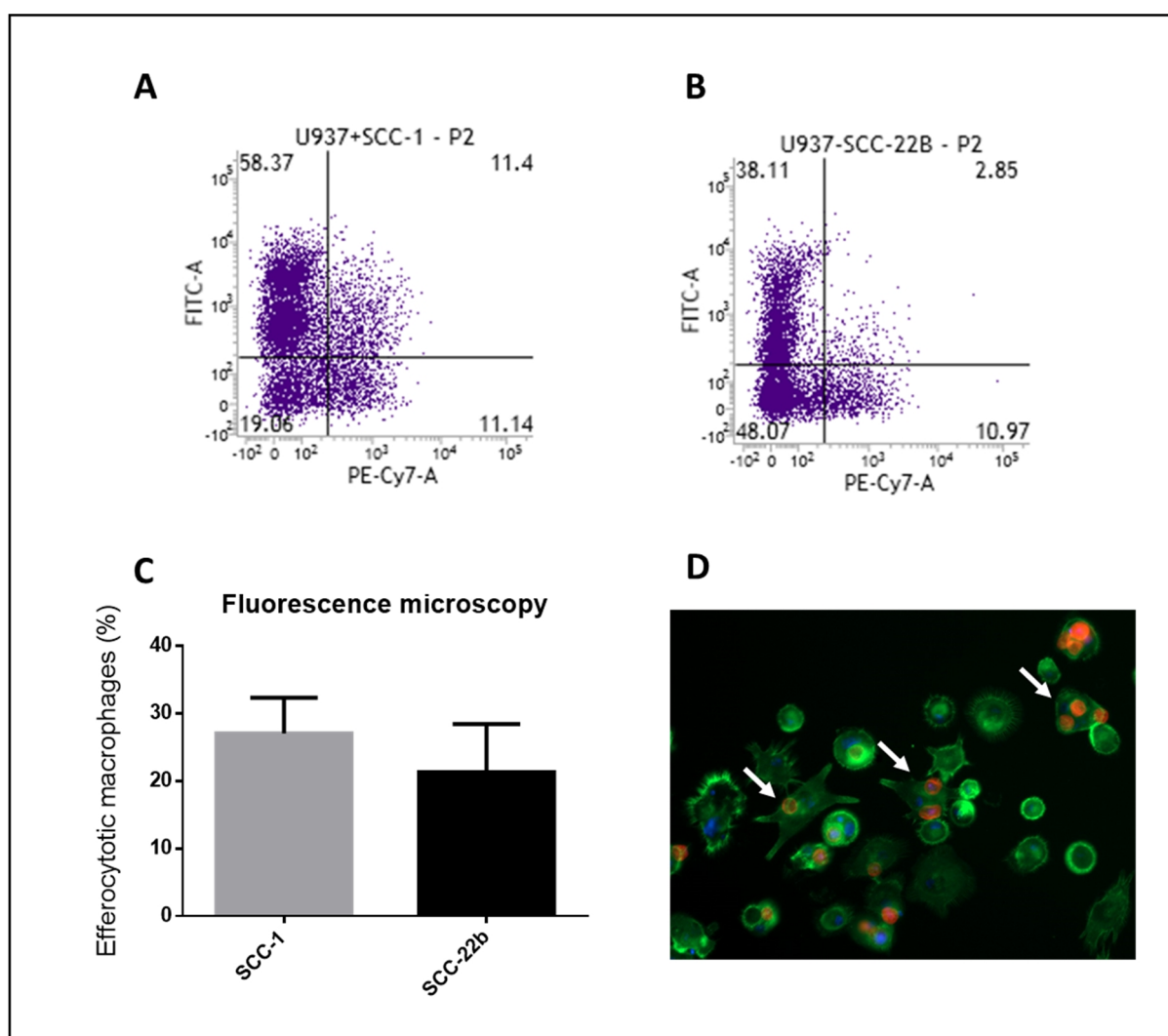
4.6 Eferocitose de Células UM-SCC-1 e UM-SCC-22B pelos Macrófagos

A eferocitose por macrófagos foi avaliada após co-cultura por 24 horas (período determinado em experimentos-piloto, dados não apresentados) com as linhagens celulares tumorais apoptóticas. O percentual de macrófagos que fagocitaram células tumorais variou segundo a linhagem celular tumoral: 11.4% (ou aproximadamente 50% do total de

macrófagos CD11b+) para a linhagem UM-SCC-1 e 2.85% (ou aproximadamente 20.6% do total de macrófagos CD11b+) para a linhagem UM-SCC-22B (figura 13A e B).

A eferocitose também foi avaliada por microscopia de fluorescência, com a contagem e determinação do percentual relativo de macrófagos eferocitóticos em relação ao total de macrófagos presentes. Nesta abordagem experimental, os resultados indicaram um percentual médio de 21,33% de macrófagos eferocitóticos para a linhagem UM-SCC-1, e um percentual médio de 27,08% de macrófagos eferocitóticos para a linhagem UM-SCC-22B (figura 13C).

Figura 13 – *Dot-plots* representativos dos experimentos de avaliação da eferocitose de células de UM-SCC-1 e UM-SCC-22B por macrófagos M0 derivados da linhagem monocítica humana U937 utilizando citometria de fluxo e microscopia de fluorescência



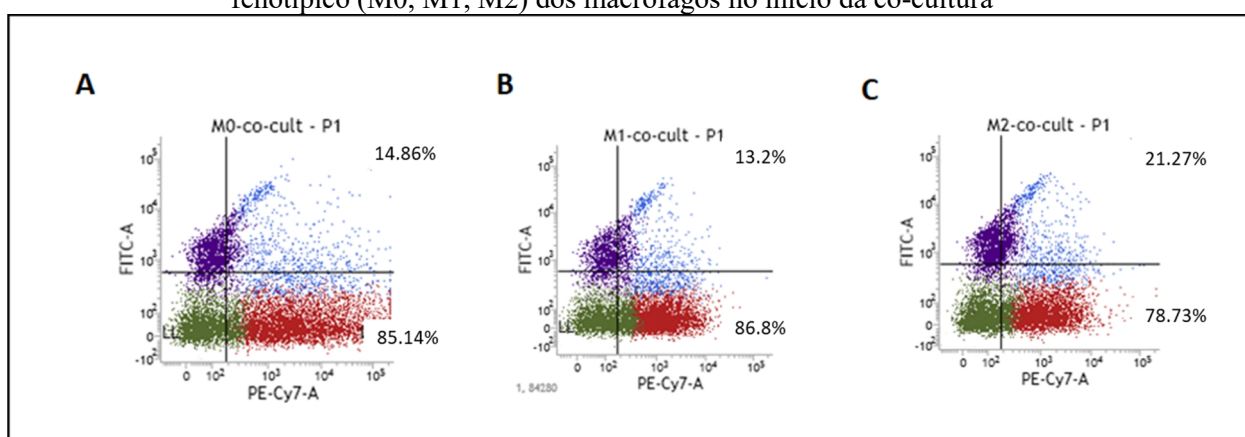
(A e B) Monócitos humanos (U937) foram diferenciadas em macrófagos (M0) com PMA 10ng/mL durante 48 h. Depois de 72 h sem tratamento foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B em apoptose induzida na proporção de 3:1. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h. As células tumorais foram marcadas com CFSE (detectado no canal FL2/FITC) previamente à indução da apoptose, e os macrófagos identificados pela expressão do marcador de membrana CD11b (detectado no canal FL4/PE-Cy7). São considerados macrófagos eferocitóticos as células duplo-positivas (FITC+/PE-Cy7+) no quadrante superior direito dos gráficos.

Dados de um experimento com aquisição de 10.000 eventos. (C) Gráfico da porcentagem de macrófagos eferocitóticos segundo a linhagem celular tumoral, após avaliação por microscopia de fluorescência. (D) Imagem representativa da avaliação de eferocitose de células tumorais da linhagem UM-SCC-1. Na microscopia de fluorescência, as condições experimentais, incluindo período de co-cultura de macrófagos e células tumorais apoptóticas e a proporção célula:célula foram as mesmas descritas anteriormente para citometria de fluxo. A marcação das células tumorais foi com corante que emite no espectro da cor vermelha e os macrófagos foram marcados com Faloidina conjugada à AlexaFluor 488 na cor verde após fixação e permeabilização. O DNA genômico foi marcado com DAPI (que emite na cor azul). Resultados de três experimentos independentes, avaliados em duplicata.

4.7 O fenótipo Dos Macrófagos Influencia a Eferocitose De Células Tumorais de Cabeça e Pescoço

Neste experimento, avaliamos se o perfil fenotípico basal dos macrófagos influencia a eferocitose de células tumorais de câncer de cabeça e pescoço. Considerando que os macrófagos que migram para o microambiente tumoral e realizam a eferocitose de células tumorais podem já apresentar uma pré-polarização fenotípica, consideramos válida esta avaliação. Estes experimentos foram realizados apenas com a linhagem UM-SCC-1. Após a polarização fenotípica dos macrófagos para os perfis fenotípicos M1 e M2 (com descrito em "material métodos", item 3.4), foi iniciada a co-cultura (24 h) com células tumorais UM-SCC-1 apoptóticas previamente marcadas com CFSE. A porcentagem de macrófagos eferocitóticos dentre o total de macrófagos CD11b+ dos perfis M0 (14.8%) e M1 (13.2%) foi similar, enquanto macrófagos do perfil M2 apresentaram maior eficácia de eferocitose desta linhagem celular (21.27% do total de células CD11b+) (figura 14).

Figura 14 – *Dot-plots* representativos da eferocitose de células tumorais UM-SCC-1, segundo o perfil fenotípico (M0, M1, M2) dos macrófagos no início da co-cultura

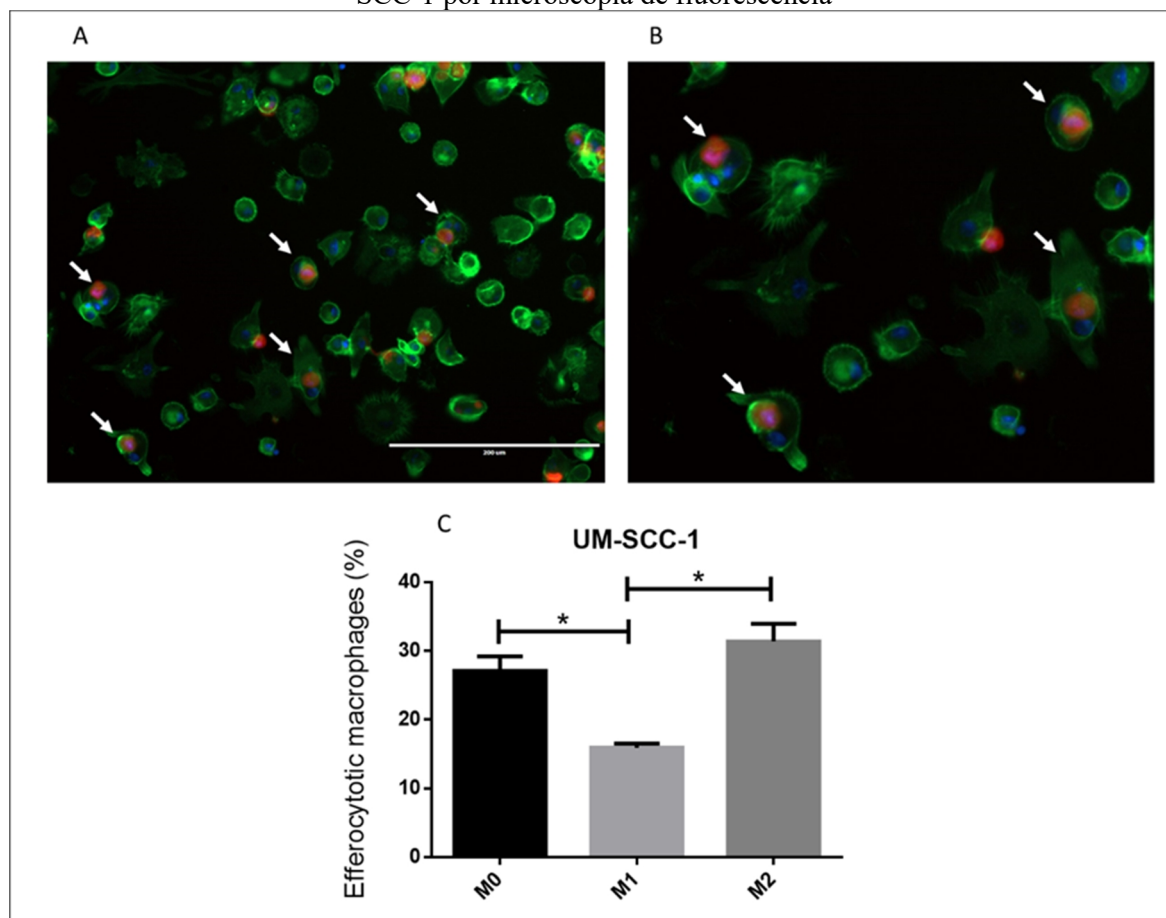


As células tumorais foram marcadas com CFSE (detectado no canal FL2/FITC) previamente à indução da apoptose, e os macrófagos identificados pela expressão do marcador de membrana CD11b (detectado no canal FL4/PE-Cy7). São considerados macrófagos eferocitóticos as células duplo-positivas (FITC+/PE-Cy7+) no quadrante superior direito dos *dot-plots*. Macrófagos (M0) diferenciados de monócitos U937 foram tratados durante 72 h para perfil M1 e M2. Para o perfil M1 foi realizado pelo tratamento dos macrófagos com interferon-gama (25 ng/mL), LPS (100 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-4 (50 ng/mL). Para o perfil M2 com IL-4 (20 ng/mL) e anticorpo

neutralizador de IL-12 (20 ng/mL). Como controle os macrófagos M0 não receberam tratamento. 24 h antes de completado o tempo de polarização, foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 em apoptose induzida na proporção de 3:1. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h. ao final do período foi realizada a leitura pela citometria de fluxo. Dados de um experimento com aquisição de 10.000 eventos, avaliado em duplicata.

Para confirmar a influência do fenótipo basal dos macrófagos na eferocitose de células tumorais, realizamos o experimento utilizando a abordagem de avaliação por microscopia de fluorescência. Neste experimento, também utilizamos apenas a linhagem UM-SCC-1 e o índice fagocítico foi calculado determinando a porcentagem relativa de macrófagos (marcados em verde) eferocitóticos (apresentando células tumorais marcadas com vermelho em seu interior - seta branca na figura 15A e B) a partir do número total em um total de macrófagos presentes no campo da imagem obtida na magnificação de 200X. Foram avaliadas 5 imagens de cada poço, utilizando áreas diferentes e padronizadas. A contagem das células foi feita por examinador treinado e sem conhecimento das condições experimentais.

Figura 15 – Imagens representativas da avaliação de eferocitose de células tumorais da linhagem UM-SCC-1 por microscopia de fluorescência

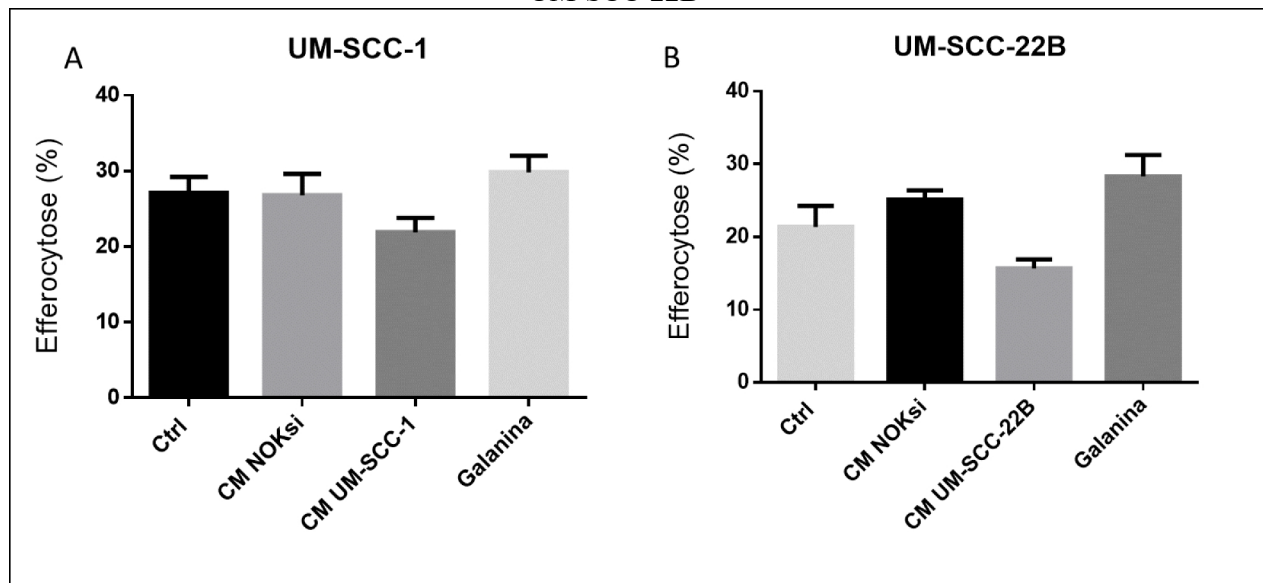


Macrófagos (M0) diferenciados de monócitos U937 foram tratados durante 72 h para perfil M1 e M2. Para o perfil M1 foi realizado pelo tratamento dos macrófagos com interferon-gama (25 ng/mL), LPS (100 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-4 (50 ng/mL). Para o perfil M2 com IL-4 (20 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-12 (20 ng/mL). Como controle os macrófagos M0 não

receberam tratamento. 24 h antes de completado o tempo de polarização, foi realizada a co-cultura com as linhagens celulares tumorais UM-SCC-1 em apoptose induzida na proporção de 3:1. As células foram mantidas em co-cultura por 24 h. As células tumorais foram marcadas com corante fluorescente que emite no espectro da cor vermelha previamente à indução de apoptose, e os macrófagos foram marcados com faloidina conjugada à AlexaFluor 488 (que emite no espectro da cor verde) ao final do período experimental de 24 h em co-cultura, após fixação e permeabilização. O DNA genômico foi marcado com DAPI (que emite na cor azul). Imagem em aumento de 200X (A) e (B) zoom digital (2X) da mesma imagem em (A) para observação de detalhe. (C) Gráfico dos índices fagocíticos para a linhagem UM-SCC-1 determinados por microscopia de fluorescência, segundo o perfil fenotípico dos macrófagos no início do experimento.

O percentual de macrófagos eferocitóticos foi maior para o perfil M2, tanto na avaliação por citometria de fluxo quanto na avaliação por microscopia de fluorescência. Uma vez que há influência do fenótipo basal dos macrófagos na eferocitose de células tumorais, avaliamos também se o condicionamento/exposição de macrófagos M0 aos produtos secretados pelas linhagens tumorais (também capaz de influenciar o fenótipo dos macrófagos) ou à galanina afetaria a eferocitose. Nestes experimentos, tenta-se emular a situação dos macrófagos presentes no estroma tumoral, influenciados por mediadores biológicos presentes no microambiente tumoral e que posteriormente entram em contato e realizam eferocitose de células tumorais. Se evidencia uma diminuição no índice fagocítico de macrófagos quando foram expostos aos produtos secretados pelas linhagens células (CM) previa co-cultura. Assim como um aumento discreto de macrófagos tratados previamente com galanina na eferocitose de células apoptóticas (Figura 16A e B).

Figura 16 – Avaliação da influência dos produtos secretados pelas linhagens tumorais (CM) e pela linhagem de células epiteliais não neoplásicas (NOKsi) sobre a eferocitose das linhagens UM-SCC-1 e UM-SCC-22B



Células U937 foram diferenciadas em Macrófagos (M0) com PMA 10ng/mL durante 48 h. Depois de 24 h sem tratamento, as células foram tratadas com meio condicionado (CM) preparado das linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B na proporção (vol:vol) de 2:1 ou galanina (10 nM) durante 3 dias. Como controle, as células foram tratadas com CM da linhagem celular não neoplásica NOKsi na mesma proporção. 24 horas antes de terminado o tratamento, foi realizada a co-cultura dos macrófagos com as linhagens UM-SCC-1 (A) e UM-SCC-22B (B). Os resultados foram avaliados pela contagem do percentual relativo de macrófagos eferocitóticos (identificados pela fluorescência em verde apresentando fluorescência emitida na com vermelha em seu interior) dentre o total de macrófagos (marcados apenas em verde ou 'não eferocitóticos' e duplamente marcados em verde e vermelho ou 'eferocitóticos'). Dados de três experimentos independentes avaliados em duplicata.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, observamos que os produtos secretados pelas células tumorais e galanina, assim como o contato direto célula:célula influenciam a expressão de *TNF* e *IL10* em macrófagos. Estes dados sugerem que o microambiente tumoral pode afetar o fenótipo dos macrófagos, o que pode influenciar a eferocitose neste microambiente. Por outro lado, a eferocitose de células tumorais também pode influenciar o fenótipo dos macrófagos. Macrófagos polarizados M2 tem uma maior atividade de eferocitose do que macrófagos M1.

Os macrófagos são o protótipo de célula imune fagocítica e, portanto, primariamente relacionadas ao processo de eferocitose⁵⁵. Os macrófagos podem assumir dois fenótipos principais, segundo sinais do microambiente: M1 ou classicamente ativados ou pró-inflamatórios; e M2 ou alternativamente ativados ou anti-inflamatórios⁵⁶. No câncer, os macrófagos presentes no microambiente tumoral, conhecidos como macrófagos associados a tumores (*tumor-associated macrophages* - TAM), podem estar associados à prognósticos/desfechos favoráveis ou desfavoráveis, dependendo do tipo específico de câncer considerado.

Em tumores do estômago ou do trato urogenital, um maior infiltrado de macrófagos está associado a prognóstico desfavorável, enquanto em tumores do cólon a quantidade de TAMs está associada a prognóstico favorável²⁸. Em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, a maior prevalência do fenótipo M2 de macrófagos está associada à pior prognóstico e maior invasão do tumor^{47, 57}. Adicionalmente, estudos demonstraram um maior infiltrado em de macrófagos M2 em carcinoma espinocelular agressivo, com envolvimento nodal^{58, 59}

Eferocitose é o processo pelo qual células do sistema imune, especialmente macrófagos e células dendríticas, fagocitam células apoptóticas. É um processo fisiológico, comum em diversos tecidos e órgãos; como intestino, pulmão e medula óssea que apresentam uma alta taxa de renovação celular; processo que é necessário para manter o equilíbrio na homeostasia do organismo³⁴. Em processos inflamatórios ou neoplásicos a alteração no microambiente tecidual associada à ativação de mecanismos de defesa pode resultar em aumento da quantidade de células mortas e, como consequência, maior ativação do processo de eferocitose^{55, 60}. Em câncer, o tratamento com quimioterapia ou radioterapia tem por objetivo primário induzir a morte de células tumorais (com elevadas taxas de proliferação e metabolismo), e consequentemente uma maior atividade de eferocitose⁶¹. O aumento da

prevalência de células apoptóticas pode, por sua vez, levar a alteração no microambiente tumoral pela expressão de citocinas e outros mediadores biologicamente ativos associados ao processo de apoptose, bem como pelo aumento de outros compostos biologicamente ativos (incluindo os padrões moleculares associados ao dano – *damage-associated molecular patterns* ou DAMPs) que podem ativar receptores e processos imunológicos, amplificando a resposta das células imunes⁶². Estudo *in vitro* utilizando células de linfoma de Burkitt, um tipo de linfoma não-Hodgkin associado a uma alta taxa de apoptose de células tumorais e alto infiltrado de macrófagos, demonstrou uma maior atividade de eferocitose de macrófagos na presença de IL10, simulando o microambiente tumoral⁶³.

A eferocitose ocorre por meio de mecanismos de comunicação entre a célula apoptótica e a célula fagocitante, mediados por sinais moleculares específicos regulados no processo de apoptose. Os sinais *ativadores de eferocitose*, são denominados “me coma”: fosfatidilserina e calreticulina (*CALR*); e os sinais *inibidores da eferocitose* são denominados “não me coma”: *CD31*, *CD47* e *PAII*⁵⁵. Alteração nos sinais envolvidos no processo de eferocitose pode levar ao desenvolvimento de diferentes patologias como doenças autoimunes como artrite reumatóide ou lúpus⁶⁴, Alzheimer⁶⁵ ou aterosclerose⁶⁶.

Utilizamos duas linhagens celulares de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, e considerando os sinais inibitórios (“não me coma”) e ativadores (“me coma”) da eferocitose, a heterogeneidade na resposta destas linhagens na expressão destes sinais pode influenciar diretamente o processo de eferocitose. Neste estudo a expressão destes sinais reguladores de eferocitose foi avaliada exclusivamente por RT-qPCR. Apesar das limitações da análise restrita à expressão de mRNA, observamos diferenças na expressão do sinal “inibitório” preponderante: a expressão de *CD31* foi maior na linhagem UM-SCC-22B, enquanto a expressão de *CD47* foi maior nas células UM-SCC-1, tanto nas células viáveis (antes da indução de apoptose) quanto depois da indução de apoptose. No entanto, em ambas as linhagens, a indução de apoptose reduziu a expressão tanto de *CD31* quanto de *CD47*. O gene *PAII*, outro sinal inibitório da eferocitose (“não me coma”), teve expressão similar nas duas linhagens celulares tumorais e a indução de apoptose reduziu a expressão também em ambas as linhagens. De forma interessante, na linhagem NOKsi de células epiteliais não neoplásicas mas imortalizadas espontaneamente, o único gene dentre os sinais inibitórios de eferocitose que teve sua expressão reduzida com a indução de apoptose foi também *PAII*. É tentador especular que *PAII* seja um gene de maior relevância na inibição da eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, no entanto esta especulação é

limitada pelo uso de apenas duas linhagens celulares e pela avaliação da expressão de *PAIL* apenas por meio da quantificação relativa de mRNA. Já o gene *CALR* associado à ativação da eferocitose (''me coma''), teve sua expressão notadamente aumentada após a indução de apoptose apenas na linhagem UM-SCC-22B. Estes dados reforçam a heterogeneidade de resposta das diferentes linhagens celulares utilizadas ao estímulo apoptótico, que pode resultar em influências distintas na atividade de eferocitose. De fato, quando avaliada por citometria de fluxo, a eferocitose da linhagem UM-SCC-22B foi menos eficiente em comparação à linhagem UM-SCC-1 (Figura 13A e B).

Existem evidências de que a expressão de *CD47* por células de tumorais está diretamente associada à menor atividade de eferocitose, especialmente por macrófagos previamente polarizados para M1⁶⁷. De fato, a maior expressão de *CD47* foi relacionada a um pior prognóstico em pacientes com leucemia, câncer de ovário e de mama⁶⁸. Notadamente, os resultados do presente estudo demonstram uma maior expressão constitutiva de *CD47* pelas duas linhagens celulares tumorais em comparação à linhagem não neoplásica NOKsi. O estímulo apoptótico não reduziu a expressão de *CD47* pela linhagem UM-SCC-22B, mais resistente à eferocitose na análise por citometria de fluxo.

Células UM-SCC-1 foram isoladas do carcinoma espinocelular localizado no assoalho de boca num paciente de sexo masculino (T2N0M0). As células de linhagem UM-SCC-22B foram isoladas de paciente do sexo feminino com o carcinoma espinocelular localizado primariamente na hipofaringe, sendo estas células isoladas de linfonodos regionais invadidos pelo tumor (T2N1M0)^{48, 49}. Tumores com infiltrado nodal, como no caso de linhagem UM-SCC-22B, apresentam maior agressividade e menor tempo de sobrevida^{58, 69}. Recentemente, tem se observado uma melhora na sobrevida e na efetividade do tratamento em câncer de cavidade oral em comparação ao câncer localizado em hipofaringe⁷⁰. Existe evidência de um maior infiltrado de macrófagos M2 em carcinoma espinocelular primário com envolvimento nodal²⁹, características similares à linhagem de células UM-SCC-22B utilizada neste estudo.

O processo de eferocitose influencia o fenótipo dos macrófagos. A inibição do processo de eferocitose de células neoplásicas reduziu a proporção de macrófagos polarizados para o fenótipo M2 e também diminuiu a metástase em câncer de cólon⁴⁶. Estes dados sugerem que a eferocitose de células tumorais modula o fenótipo dos macrófagos presentes no microambiente tumoral, favorecendo o crescimento e invasão tumoral. Neste estudo, embora o contato direto célula:célula tenha aumentado a expressão tanto de *IL10* (representativa do fenótipo M2) quanto de *TNF* (representativa do fenótipo M1), quando os macrófagos foram

previamente polarizados para o fenótipo M1, a co-cultura com as células tumorais resultou em redução da expressão destes mesmos genes, sugerindo um efeito inibitório ou anérgico do contato direto célula:célula nos macrófagos (Figura 11A e B). Outros estudos avaliando a eferocitose^{54, 71} utilizaram menores períodos de co-cultura macrófagos: células apoptóticas (30 min até 4 horas), considerando que a apoptose é um processo rápido, levando entre 2-3 horas⁷². No experimento-piloto feito com células RAW264.7 realizado pelo nosso grupo de pesquisa e posteriormente testado com macrófagos humanos derivados da linhagem monocítica U937, a co-cultura durante 24 horas possibilitou a observação da eferocitose de forma clara, no entanto é preciso considerar que os resultados deste estudo podem ser influenciados por diferenças no período de co-cultura utilizado.

TAMs em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço comumente apresentam fenótipo M2 ou pró-tumoral, com maior expressão de citocinas como *IL-10*, *IL-1 β* , *CCL5*, *CCL22*, *MMP7*, *MMP9*, *CD206*⁷³. Nossos resultados in vitro de aumento tanto da expressão tanto de *IL10* quanto de *TNF* podem ter diferentes significados. Enquanto *IL10* é uma citocina associada ao perfil M2 (pró-tumoral) e o aumento de sua expressão está de acordo com os dados da literatura⁷³, *TNF* é uma citocina pró-inflamatória associada ao perfil M1, considerado anti-tumoral. No entanto, a inflamação tem sido descrita como um ambiente favorável ao desenvolvimento do câncer, como ilustrado pela relação entre gastrite associada à infecção por *H. pylori* e câncer gástrico⁷⁴. Outras evidências indicam que *TNF* tem relação com aumento da agressividade tumoral e metástase, já que pode aumentar a expressão de várias moléculas de adesão em células endoteliais que promovem a adesão e migração de células tumorais, facilitando sua disseminação hematogênica^{16, 75, 76}. Em osteossarcoma, a eferocitose de células tumorais induz uma resposta inflamatória persistente com produção local de *CXCL5* e outras citocinas pró-inflamatórias e está associada à maior agressividade e progressão do tumor⁷⁷. Em condições inflamatórias, *TNF* inibe a eferocitose de neutrófilos por macrófagos derivados de monócitos⁷⁸. *TNF* pode promover sinais de ativação, diferenciação, sobrevivência ou morte celular. Existe evidência in vitro e in vivo de efeito inibitório de *TNF* sobre a eferocitose por macrófagos⁷⁹.

Na última etapa da eferocitose, depois que o macrófago reconhece e envolve a célula apoptótica, ela é processada por degradação lisossômica. O processo de eferocitose estimula no macrófago a expressão de *IL10*, *IL13*, *IL4* e *TGF β 1*, mediadores também associados a um microambiente tumoral associado a pior prognóstico, com maior agressividade do tumor⁸⁰. Assim, além do microambiente tumoral modular a polarização fenotípica dos macrófagos, a

eferocitose também pode ter este efeito modulatório, num *loop* de ativação de macrófagos com características fenotípicas que favorecem o crescimento e invasão tumoral⁸¹.

Neste estudo, o tratamento de macrófagos com meio condicionado de células UM-SCC-1 aumentou significativamente a expressão de *TNF* (Figura 10A). Quando os macrófagos foram tratados com meio condicionado da linhagem UM-SCC-22B observou-se um aumento significativo na expressão de *IL10* (Figura 10B), demonstrando resultados variáveis segundo as diferentes linhagens celulares tumorais utilizadas. Células THP-1 (monócitos humanos) diferenciadas em macrófagos com PMA, similarmente ao realizado no presente estudo, apresentaram polarização com um fenótipo variável entre M1/M2 após tratamento com meio condicionado de diferentes linhagens celulares de câncer colorretal. Além disso, o meio condicionado de diferentes linhagens celulares de câncer de colón tem efeito distinto sobre a atividade fagocítica e quimiotática dos macrófagos^{82, 83}. Resultados similares são relatados em estudo *in vitro* utilizando células de câncer de ovário, que relata aumento de *IL10* (M2) e de *TNF* (M1)⁸⁴. Outro estudo relata que o tratamento com meio contendo os produtos solúveis secretados por células tumorais causa uma alteração na expressão de citocinas por macrófagos, porém com um fenótipo que não se relaciona especificamente com M1 ou M2, sugerindo uma população mista de macrófagos⁸⁵.

Quando os macrófagos foram expostos ao contato direto célula:célula com células apoptóticas, observou-se um aumento na expressão de *TNF* tanto na co-cultura com ambas linhagens celulares, UM-SCC-1 e UM-SCC-22B, (Figura 9A); assim como aumento significativo na expressão de *IL10* (Figura 9B). Por outro lado, quando os macrófagos foram expostos *inicialmente* aos produtos solúveis das células tumorais e posteriormente colocados em co-cultura (contato direto célula:célula), houve redução na expressão de *TNF* e *IL10* (Figura 12A e 12B), sugerindo que a exposição prévia dos macrófagos ao microambiente do estroma tumoral pode influenciar a resposta e fenótipo dos macrófagos infiltrantes no parênquima do tumor e que efetivamente entram em contato direto com as células neoplásicas. Estes dados também sugerem que diferentes microambientes podem ter efeitos distintos sobre o fenótipo e atividade de macrófagos, de acordo com a evolução do tumor e da resposta imune associada⁸⁵.

A polarização de macrófagos para o perfil M2, especialmente aqueles tratados para M2c (tratados com M-CSF e IL10) está associada à maior atividade de eferocitose de neutrófilos⁸⁶. Neste estudo, macrófagos M2 foram mais ativos na eferocitose das linhagens

celulares de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço do que macrófagos M0 ou M1. In vivo, existem evidências de que o microambiente tumoral induz a polarização de TAMs para o fenótipo M2, como forma de subversão da resposta imune para facilitar o crescimento e invasão do tumor⁸¹. A linhagem UM-SCC-22B é proveniente de lesão secundária (invasão nodal) e, portanto, pode apresentar variações fenotípicas que dificultam sua detecção e remoção pelos macrófagos, o que estaria relacionado à menor eficiência da eferocitose desta linhagem pelos macrófagos (Figura 13). As diferenças encontradas na avaliação de eferocitose pela microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, podem estar relacionadas às limitações na marcação total de macrófagos presentes com CD11b, bem como das células tumorais com CFSE. Por outro lado, na avaliação por microscopia de fluorescência não podemos afastar a possibilidade de falso-positivos de eferocitose pela superposição, sem efetiva fagocitose, de células tumorais e macrófagos. De qualquer forma, os resultados indicam uma atenuação no processo de eferocitose com o pré-condicionamento dos macrófagos com meio condicionado das linhagens celulares tumorais e posterior co-cultura, em comparação aos macrófagos que não foram expostos previamente ao meio condicionado (Figura 16A e B).

A alta expressão de galanina está associada a pior prognóstico em câncer de colón⁸⁷. Em câncer de cabeça e pescoço, existem evidências de que galanina pode ser inibidor da proliferação do câncer ativando o receptor GALR1⁸⁸; enquanto a maior expressão de GALR2 promove a proliferação e crescimento tumoral¹³. Com base nestas informações, antecipa-se que o tratamento com galanina resulte em um microambiente mais pró-tumoral ou M2; que está de acordo com os resultados deste estudo que demonstraram aumento na expressão de *IL10* e diminuição na expressão de *TNF* por macrófagos tratados com galanina (Figura 10C e D). Na eferocitose, a galanina aumentou o índice fagocítico em relação ao controle, num resultado similar ao encontrado com macrófagos previamente polarizados para o perfil M2 e então colocados em co-cultura com as linhagens tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B (Figura 15).

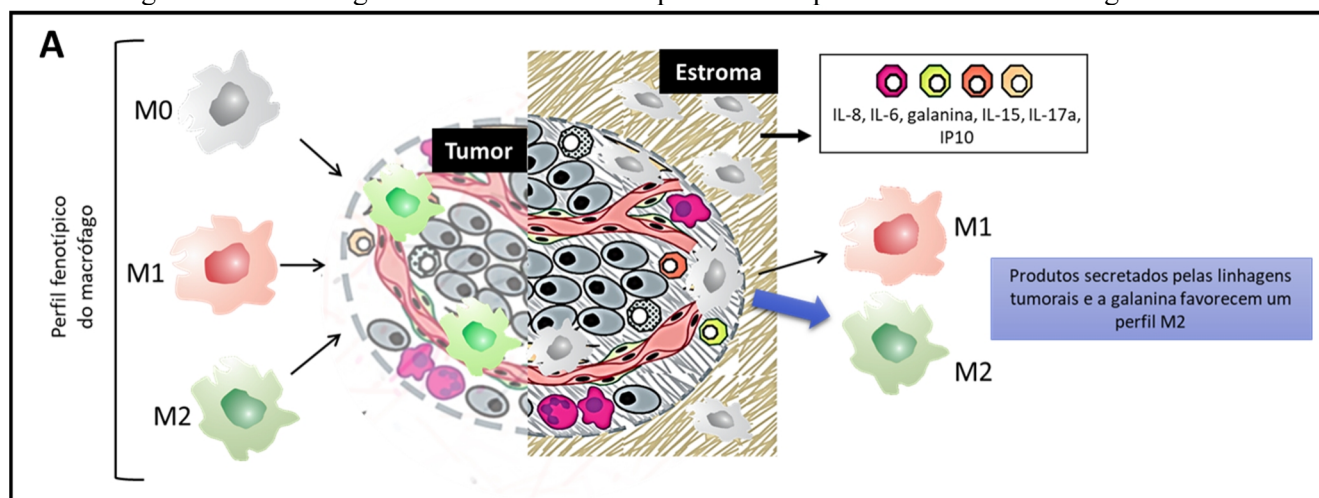
Um melhor entendimento da regulação da eferocitose no câncer de cabeça e pescoço pode contribuir para o desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas deste tipo de tumor. Os resultados deste estudo in vitro sugerem que o microambiente tumoral influencia o fenótipo dos macrófagos, o que pode influenciar a atividade de eferocitose no microambiente tumoral.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que os produtos secretados por células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e o contato direto dos macrófagos com as células tumorais (célula-célula) pode influenciar a expressão genética de *TNF* e *IL10* em macrófagos (Figura 17). Os resultados também indicam que a eferocitose de células tumorais influencia o fenótipo dos macrófagos. Macrófagos polarizados para o perfil M2 tem uma maior atividade de eferocitose de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço do que macrófagos M0 ou macrófagos polarizados para o perfil M1 (Figura 18A), porém o microambiente contendo os produtos secretados pelas linhagens tumorais apresentou uma diminuição na atividade da eferocitose (Figura 18B).

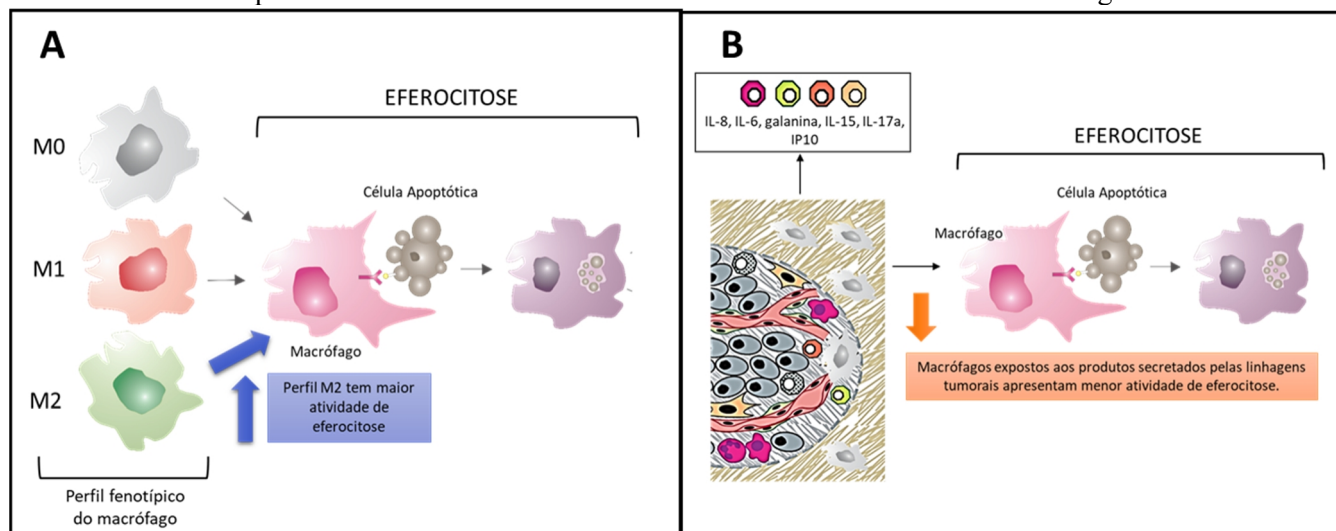
A literatura relata a relevância dos macrófagos para a progressão de tumores sólidos, conhecidos como TAM, e importante ressaltar nossos resultados na modulação no fenótipo dos macrófagos em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, tanto pelos produtos secretados pelas células tumorais, quanto do contato célula:célula. Assim como o mecanismo na comunicação do macrófago para o reconhecimento da célula tumoral apoptóticas em diferentes tipos de câncer de cabeça e pescoço. A relevância da eferocitose e do fenótipo dos macrófagos no processo de reparo tecidual pós-tratamento de tumores sólidos e na progressão do tumor e de grande importância para o planejamento do tratamento, assim como o reconhecimento de possíveis alvos para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de cabeça e pescoço.

Figura 17 - Representação esquemática da influência nos macrófagos dos produtos secretados pelas linhagens tumorais e a galanina favorecendo um perfil M2 ou pro-tumoral dos macrófagos



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg^{2,p.662}.

Figura 18: Representação esquemática da influência do perfil fenotípico do macrófago (M0, M1, M2), na eferocitose de células tumorais com marcado aumento na atividade do perfil M2 (Figura 18A). Sem embargo, se evidencia e diminuição da eferocitose quando os macrófagos foram expostos ao meio contendo os produtos solúveis das células tumorais UM-SCC-1 e UM-SCC-22B e a galanina



Fonte: Elaboração própria

REFERÊNCIAS*

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016. Epub 2016/01/09. doi: 10.3322/caac.21332. PubMed PMID: 26742998.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
5. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer.* 2013;4(1):66-83.
6. Safdari Y, Khalili M, Farajnia S, Asgharzadeh M, Yazdani Y, Sadeghi M. Recent advances in head and neck squamous cell carcinoma--a review. *Clin Biochem.* 2014;47(13-14):1195-202.
7. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer.* 2004;4(1):71-8.
8. Lang R, Gundlach AL, Kofler B. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol Ther.* 2007;115(2):177-207.
9. Fang P, Yu M, Wan D, Zhang L, Han L, Shen Z, et al. Regulatory effects of galanin system on development of several age-related chronic diseases. *Experimental gerontology.* 2017;95:88-97.
10. Kim KY, Kee MK, Chong SA, Nam MJ. Galanin is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2007;16(11):2373-8.
11. Gilaberte Y, Vera J, Coscojuela C, Roca MJ, Parrado C, Gonzalez S. [Expression of galanin in melanocytic tumors]. *Actas dermo-sifiliográficas.* 2007;98(1):24-34.
12. Kanazawa T, Misawa K, Misawa Y, Uehara T, Fukushima H, Kusaka G, et al. G-Protein-Coupled Receptors: Next Generation Therapeutic Targets in Head and Neck Cancer? *Toxins.* 2015;7(8):2959-84.
13. 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.
14. Gentek R, Molawi K, Sieweke MH. Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol Rev.* 2014;262(1):56-73.
15. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016;44(3):450-62.
16. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology.* 2009;86(5):1065-73.
17. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006;124(2):263-6.
18. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer metastasis reviews.* 2007;26(3-4):373-400.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

19. Jung KY, Cho SW, Kim YA, Kim D, Oh BC, Park do J, et al. Cancers with Higher Density of Tumor-Associated Macrophages Were Associated with Poor Survival Rates. *Journal of pathology and translational medicine*. 2015;49(4):318-24.
20. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Monkkonen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast cancer research : BCR*. 2015;17(1):101.
21. Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, et al. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2015.
22. Hu W, Qian Y, Yu F, Liu W, Wu Y, Fang X, et al. Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncology letters*. 2015;10(3):1390-6.
23. Bostrom MM, Irjala H, Mirtti T, Taimen P, Kauko T, Algars A, et al. Tumor-Associated Macrophages Provide Significant Prognostic Information in Urothelial Bladder Cancer. *PloS one*. 2015;10(7):e0133552.
24. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006;66(2):605-12.
25. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res*. 2012;4(4):376-89.
26. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.
27. Goswami KK, Ghosh T, Ghosh S, Sarkar M, Bose A, Baral R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell Immunol*. 2017;316:1-10.
28. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one*. 2012;7(12):e50946.
29. Weber M, Buttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Distel L, Ries J, et al. Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages--an immunohistochemical analysis. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2014;42(7):1087-94.
30. Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, et al. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2004;101(12):2779-87.
31. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
32. Munoz LE, Berens C, Lauber K, Gaipf US, Herrmann M. Apoptotic cell clearance and its role in the origin and resolution of chronic inflammation. *Front Immunol*. 2015;6:139.
33. deCathelineau AM, Henson PM. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem*. 2003;39:105-17.
34. Elliott MR, Ravichandran KS. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev Cell*. 2016;38(2):147-60.
35. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005;123(2):321-34.

36. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 2001;155(4):649-59.
37. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1071-7.
38. Blazar BR, Lindberg FP, Ingulli E, Panoskaltis-Mortari A, Oldenborg PA, Iizuka K, et al. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med.* 2001;194(4):541-9.
39. Cohen HB, Mosser DM. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology.* 2013;94(5):913-9.
40. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997;390(6658):350-1.
41. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell.* 2010;140(5):619-30.
42. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med.* 2010;207(9):1807-17.
43. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nature reviews Cancer.* 2014;14(12):769-85.
44. Nguyen KQ, Tsou WI, Kotenko S, Birge RB. TAM receptors in apoptotic cell clearance, autoimmunity, and cancer. *Autoimmunity.* 2013;46(5):294-7.
45. Soki FN, Koh AJ, Jones JD, Kim YW, Dai J, Keller ET, et al. Polarization of prostate cancer-associated macrophages is induced by milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)-mediated efferocytosis. *J Biol Chem.* 2014;289(35):24560-72.
46. Yang M, Liu J, Piao C, Shao J, Du J. ICAM-1 suppresses tumor metastasis by inhibiting macrophage M2 polarization through blockade of efferocytosis. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1780.
47. Pirila E, Vayrynen O, Sundquist E, Pakkila K, Nyberg P, Nurmenniemi S, et al. Macrophages modulate migration and invasion of human tongue squamous cell carcinoma. *PloS one.* 2015;10(3):e0120895.
48. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck.* 2007;29(2):163-88.
49. Brenner JC, Graham MP, Kumar B, Saunders LM, Kupfer R, Lyons RH, et al. Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck.* 2010;32(4):417-26.
50. Nogueira MNM. Caracterização da ação modulatória de citocinas inflamatórias pelo óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes (terpinen-4ol e alfa-terpineol) em macrófagos humanos ativados lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* [Tese (doutorado)]: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia de Araraquara; 2013.
51. Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Alvarez A, Hinojosa J, et al. M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis. *PloS one.* 2013;8(10):e78128.
52. Salucci S, Burattini S, Buontempo F, Martelli AM, Falcieri E, Battistelli M. Protective effect of different antioxidant agents in UVB-irradiated keratinocytes. *Eur J Histochem.* 2017;61(3):2784.

53. Gaforio JJ, Serrano MJ, Algarra I, Ortega E, Alvarez de Cienfuegos G. Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D. *Cytometry*. 2002;49(1):8-11.
54. Santulli-Marotto S, Gervais A, Fisher J, Strake B, Ogden CA, Riveley C, et al. Discovering Molecules That Regulate Efferocytosis Using Primary Human Macrophages and High Content Imaging. *PloS one*. 2015;10(12):e0145078.
55. Gordon S, Pluddemann A. Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front Immunol*. 2018;9:127.
56. Moghaddam AS, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2018. doi: 10.1002/jcp.26429. PubMed PMID: 29319160.
57. Okubo M, Kioi M, Nakashima H, Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, et al. M2-polarized macrophages contribute to neovasclogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. *Scientific reports*. 2016;6:27548.
58. Wehrhan F, Buttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Preidl R, Distel L, et al. Increased malignancy of oral squamous cell carcinomas (oscc) is associated with macrophage polarization in regional lymph nodes - an immunohistochemical study. *BMC cancer*. 2014;14:522.
59. Weber M, Iliopoulos C, Moebius P, Buttner-Herold M, Amann K, Ries J, et al. Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 2016;52:75-84.
60. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature immunology*. 2015;16(9):907-17.
61. Sarode GS, Sarode SC, Maniyar N, Sharma NK, Patil S. Carcinogenesis-relevant biological events in the pathophysiology of the efferocytosis phenomenon. *Oncology reviews*. 2017;11(2):343.
62. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(12):860-75.
63. Ogden CA, Pound JD, Bath BK, Owens S, Johannessen I, Wood K, et al. Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *Journal of immunology*. 2005;174(5):3015-23.
64. Gaipl US, Franz S, Voll RE, Sheriff A, Kalden JR, Herrmann M. Defects in the disposal of dying cells lead to autoimmunity. *Current rheumatology reports*. 2004;6(6):401-7.
65. Taupin P. Adult neurogenesis, neural stem cells and Alzheimer's disease: developments, limitations, problems and promises. *Current Alzheimer research*. 2009;6(6):461-70.
66. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(11):2255-64.
67. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Murata T, Ohnishi H, et al. Relationship between tumor-associated macrophage subsets and CD47 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck in the tumor microenvironment. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2016;96(9):994-1003.
68. Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for

- human solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(17):6662-7.
69. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(4):242-58; quiz 61-2, 64. PubMed PMID: 16020425.
 70. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *The oncologist*. 2010;15(9):994-1001.
 71. Jehle AW, Gardai SJ, Li S, Linsel-Nitschke P, Morimoto K, Janssen WJ, et al. ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *J Cell Biol*. 2006;174(4):547-56.
 72. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
 73. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
 74. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
 75. Stoelcker B, Hafner M, Orosz P, Nieswandt B, Mannel DN. Role of adhesion molecules and platelets in TNF-induced adhesion of tumor cells to endothelial cells: implications for experimental metastasis. *Journal of inflammation*. 1995;46(3):155-67.
 76. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):239-52.
 77. Roca H, Jones JD, Purica MC, Weidner S, Koh AJ, Kuo R, et al. Apoptosis-induced CXCL5 accelerates inflammation and growth of prostate tumor metastases in bone. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(1):248-66.
 78. Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(3):844-54.
 79. McPhillips K, Janssen WJ, Ghosh M, Byrne A, Gardai S, Remigio L, et al. TNF-alpha inhibits macrophage clearance of apoptotic cells via cytosolic phospholipase A2 and oxidant-dependent mechanisms. *Journal of immunology*. 2007;178(12):8117-26.
 80. Sarode GS. Efferocytosis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2016;20(2):170-2.
 81. Weber M, Moebius P, Buttner-Herold M, Amann K, Preidl R, Neukam FW, 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;113(3):510-9.
 82. Wu TH, Li YY, Wu TL, Chang JW, Chou WC, Hsieh LL, et al. Culture supernatants of different colon cancer cell lines induce specific phenotype switching and functional alteration of THP-1 cells. *Cell Immunol*. 2014;290(1):107-15.
 83. Caras I, Tucureanu C, Lerescu L, Pitica R, Melinceanu L, Neagu S, et al. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori*. 2011;97(5):647-54.
 84. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Pluddemann A, et al. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *Journal of immunology*. 2006;176(8):5023-32.

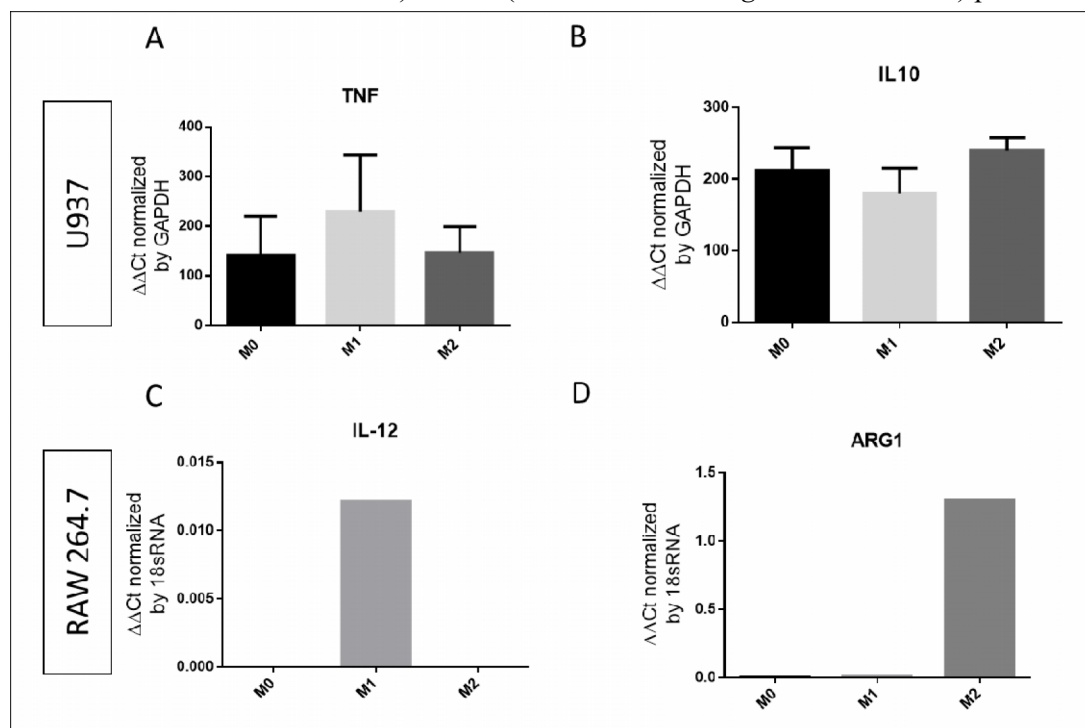
85. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *Journal of immunology*. 2008;180(4):2011-7.
86. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *Journal of immunology*. 2012;189(7):3508-20.
87. Nagayoshi K, Ueki T, Tashiro K, Mizuuchi Y, Manabe T, Araki H, et al. Galanin plays an important role in cancer invasiveness and is associated with poor prognosis in stage II colorectal cancer. *Oncology reports*. 2015;33(2):539-46.
88. Scanlon CS, Banerjee R, Inglehart RC, Liu M, Russo N, Hariharan A, et al. Galanin modulates the neural niche to favour perineural invasion in head and neck cancer. *Nature communications*. 2015;6:6885.

APÊNDICE A – RESULTADOS PRELIMINARES

Macrófagos Derivados da Linhagem Monocítica Humana U937 e Macrófagos Murinos da linhagem RAW264.7 Podem ser Polarizados Para os Perfis Fenotípicos M1 e M2

Para avaliar a resposta fenotípica dos macrófagos derivados de monócitos, em que pesem as evidências da literatura indicando que as células da linhagem monocítica humana U937 e da linhagem murina RAW264.7 poderiam ser diferenciadas em macrófagos (U937) e polarizadas para os perfis fenotípicos M1 e M2 (U937 e RAW264.7), inicialmente avaliamos se as células disponíveis no laboratório efetivamente poderiam ser polarizadas nestes fenótipos utilizando as condições descritas na literatura. As células foram tratadas como foi descrito anteriormente para induzir uma resposta pró-inflamatória (M1) ou pró-tumoral (M2). A resposta dos macrófagos diferenciados a partir da linhagem U937 e tratados com as condições indicadas para o perfil M1 coincide com uma resposta fenotípica pró-inflamatória, com aumento da expressão de *TNF* e diminuição da expressão de *IL10*. Estes mesmos macrófagos tratados com as condições para o perfil M2 apresentaram aumento discretamente a expressão gênica de *IL10*. Estes resultados indicam a efetividade das condições experimentais utilizadas para a indução de resposta nos perfis M1 e M2 de macrófagos derivados da linhagem U937 (Figura 19A e 19B). Macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 foram tratados nas mesmas condições experimentais (com exceção dos anticorpos neutralizadores) e observa-se um aumento da expressão gênica de *Il12* (pró-inflamatória) quando induzidas para o perfil M1. Quando estimuladas com as condições para polarização para o perfil M2, estas células apresentaram aumento da expressão gênica de *Arg1*, característica do perfil M2 (Figura 19C e 19D). Em resumo, estes dados indicam que as condições experimentais utilizadas são adequadas para a polarização fenotípica das células disponíveis no laboratório.

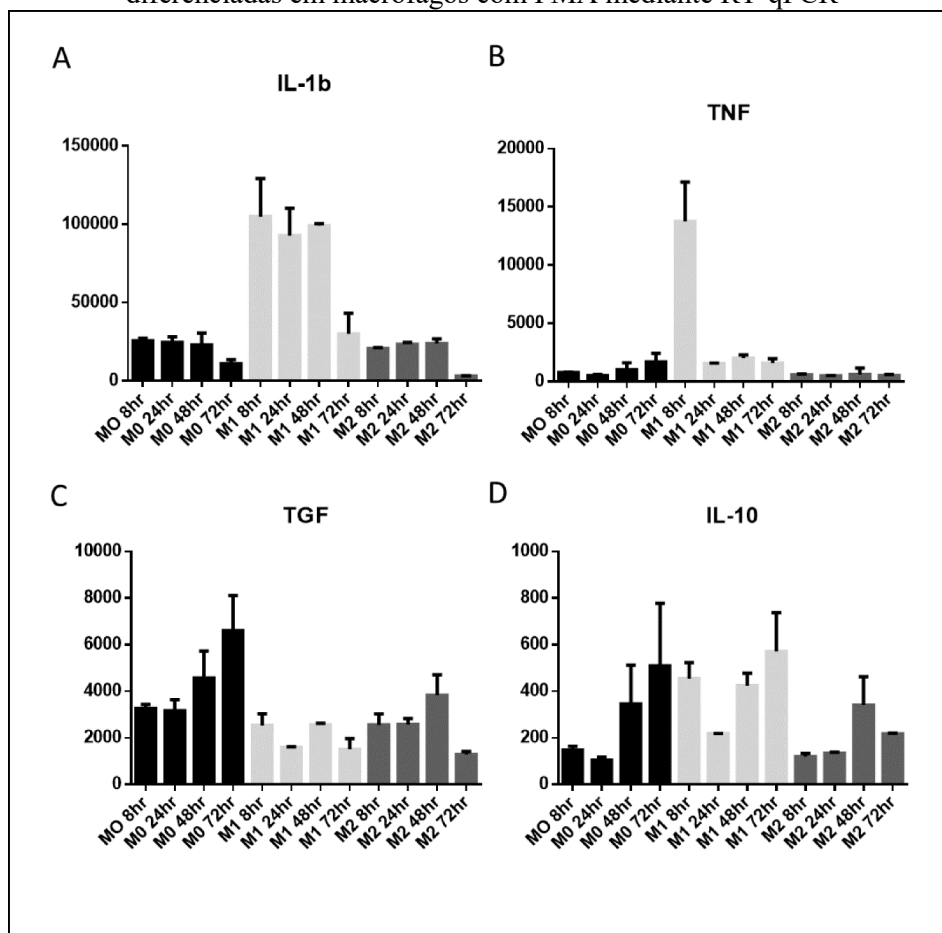
Figura 19 - Gráficos representativos da expressão gênica, por RT-qPCR, de citocinas associadas a M1 (*TNF* em U937 e *Il12* em RAW264.7) e a M2 (*Il10* em U937 e *Arg1* em RAW264.7) pela RT-qPCR



Células de linhagem de macrófagos murinos (RAW264,7) e macrófagos (M0) diferenciados de monócitos (U937) foram polarizadas para o perfil M1 pelo tratamento com interferon-gama (25 ng/mL), LPS (100 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-4 (50 ng/mL). Para o perfil M2 com IL-4 (20 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-12 (20 ng/mL) em períodos de tempo de 8 h, 24 h, 48 h, 72 h. Ao final de cada período, o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, normalizada para a expressão de GAPDH das células humanas e 18sRNA as células murinas. Dados de um experimento independente avaliado em duplicata. Dados de dois experimentos independentes avaliados em duplicata.

Adicionalmente, foi induzida uma resposta M1 ou M2 em diferentes períodos de tempo (8 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas) e posterior extração de RNA para avaliar a expressão gênica de *IL1B*, *TNF*, *TGF* e *IL10*. Nos resultados após o tempo de tratamento, evidenciou-se aumento na expressão de *IL1B* e *TNF* nas células tratadas para o perfil M1. Para o perfil M2 foram estudados os genes *TGF* e *IL10*, nos quais evidencia-se um aumento pronunciado dos genes *IL1B* e *TNF* especialmente nas primeiras horas de tratamento (8horas), com posterior diminuição da expressão destes genes. Para os genes *TGF* e *IL10* o resultado mais alto foi depois de 42 horas posteriores ao tratamento. Os resultados demonstram uma resposta M1 e M2 aos tratamentos que foram sometidas as células para polarização fenotípica (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico representativo da expressão genica em diferentes tempos para confirmar a resposta pro-inflamatória ou M1 (*IL1B* e *TNF*) e pro tumoral ou M2 (*TGF* e *IL10*) em células U937 diferenciadas em macrófagos com PMA mediante RT-qPCR



Células U937 foram plaqueadas em concentracao de 4×10^5 céls/poço em placas de 12 poços, diferenciadas em macrófagos (M0) com PMA 10ng/mL durante 48 h. Após 24 h sem tratamento e mantidas em meio completo as células foram polarizadas para o perfil M1 pelo tratamento com interferon-gama (25 ng/mL), LPS (100 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-4 (50 ng/mL). Para o perfil M2 com IL-4 (20 ng/mL) e anticorpo neutralizador de IL-12 (20 ng/mL) em períodos de tempo de 8 h, 24 h, 48 h, 72 h. Ao final de cada período, o RNA total foi purificado para síntese do cDNA que foi utilizado nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão dos genes-alvo, normalizada para a expressão de GAPDH. Dados de um experimento independente avaliado em duplicata.

Não autorizo a publicação deste trabalho até 28/03/2020

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2018.

Laura Andrea González Maldonado