

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/03/2020.



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 Odontología – 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 (químio/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- β : 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)

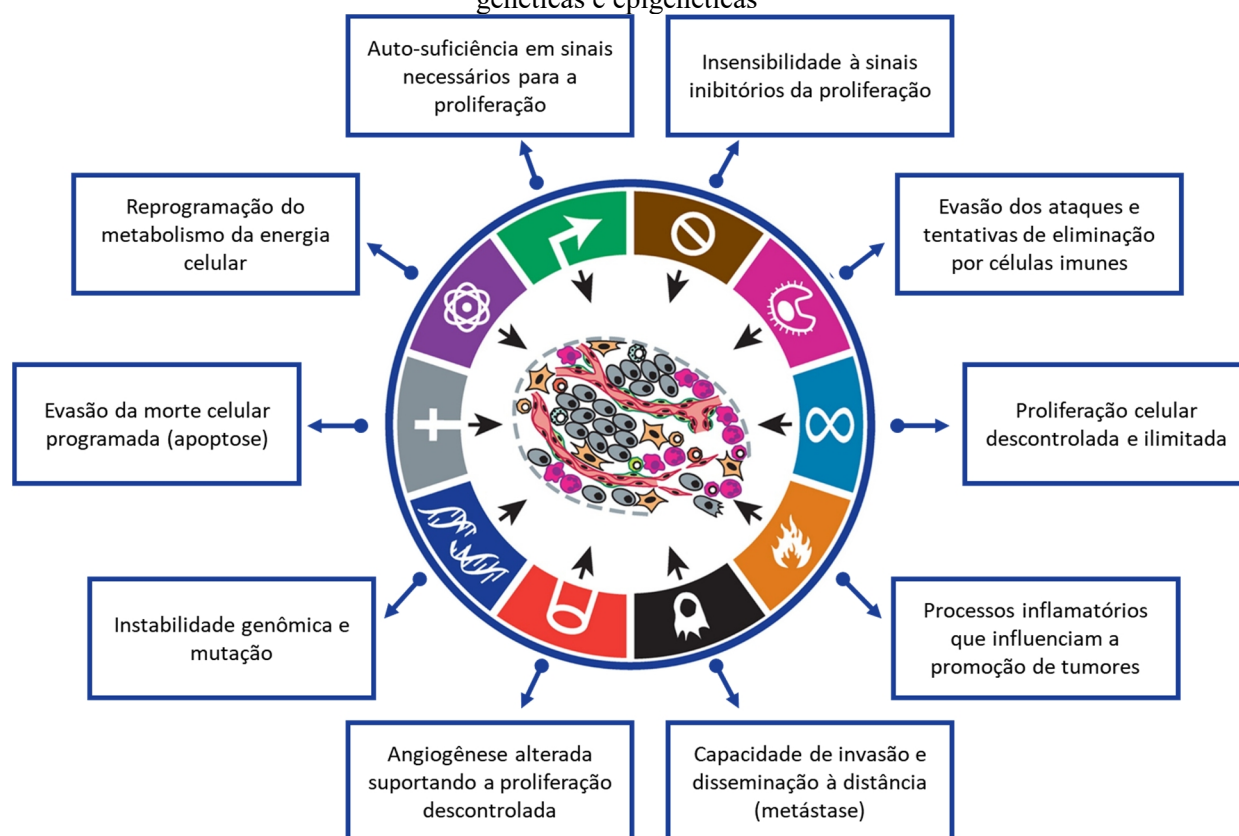
SUMÁRIO

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 neuropático, 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.

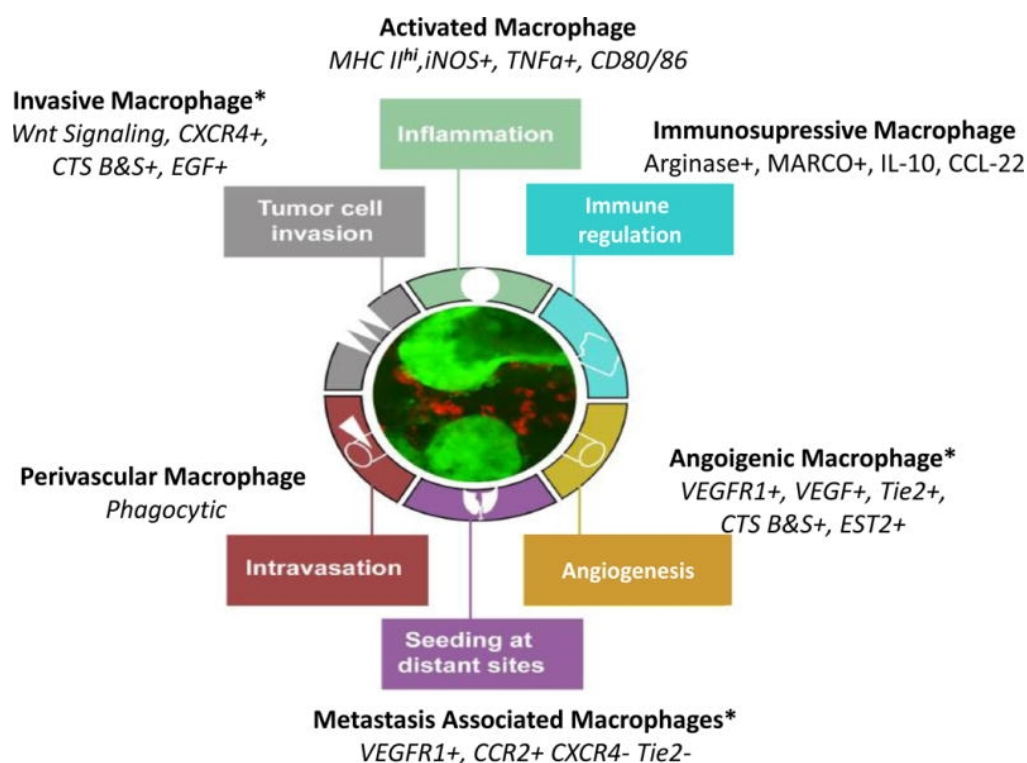
Macrófagos são derivados de um precursor mielóide comum que também dá origem a células dendríticas. Juntamente com as células dendríticas, os macrófagos são o protótipo das células apresentadoras de antígeno (APCs, *antigen-presenting cells*), realizando a “ponte” entre resposta imune inata e adaptativa. 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.

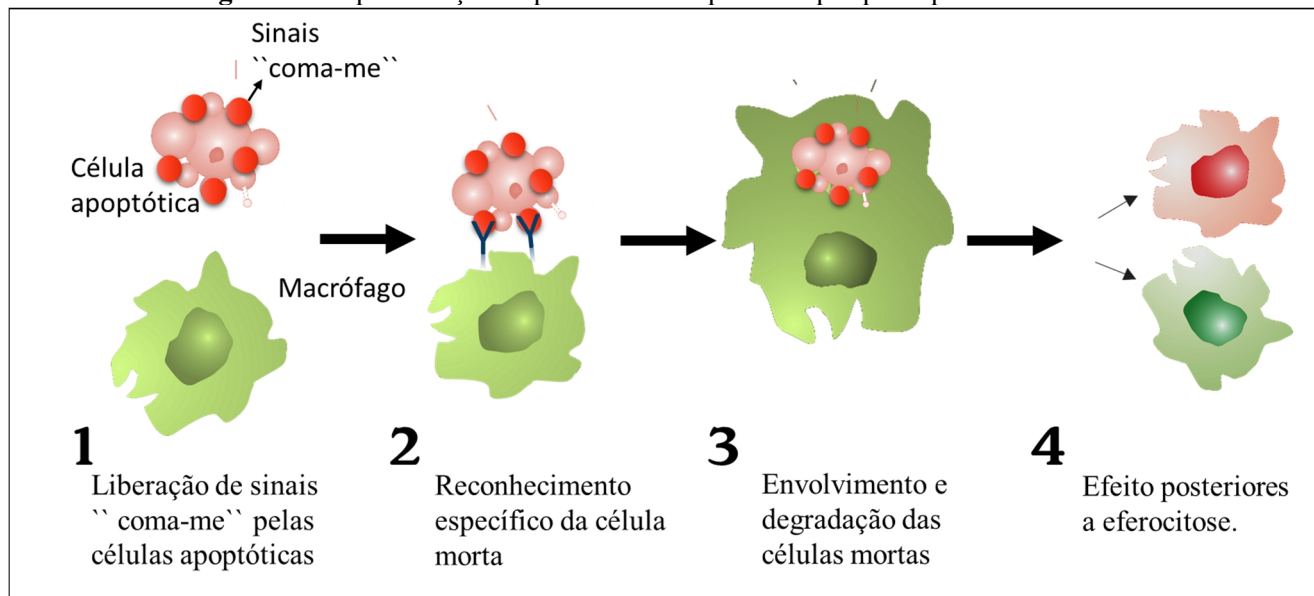
Fonte: Qian e Pollard^{31,p.25}

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

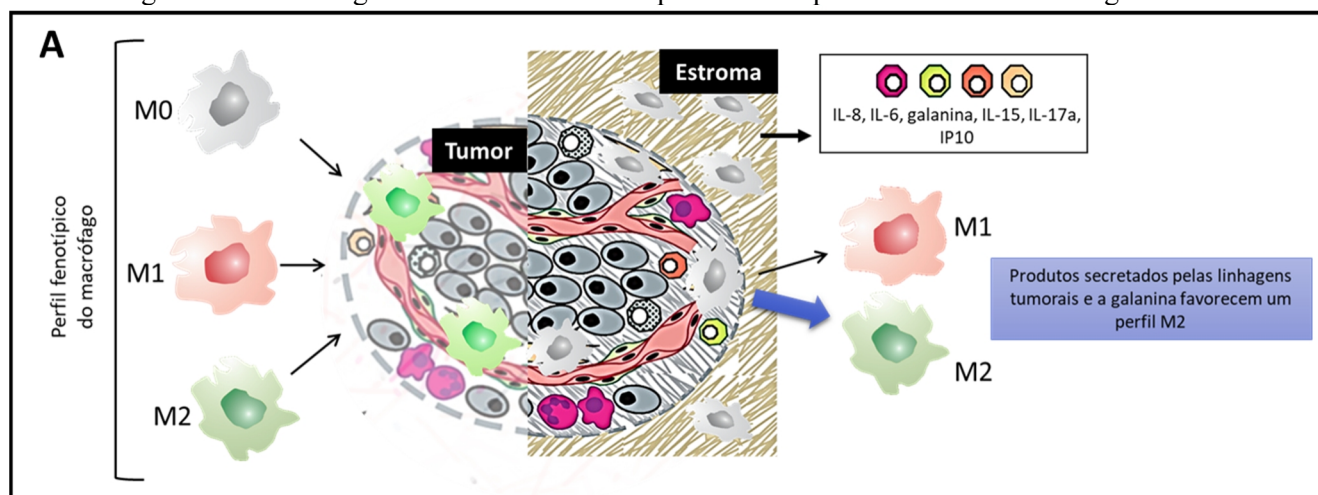
v) a relativa escassez de informações relacionadas especificamente à eferocitose em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, propomos avaliar a influência de produtos secretados por células tumorais, da galanina especificamente, e do contato direto célula-célula sobre o perfil fenotípico e a atividade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

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 genica 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), porem o microambiente contendo os produtos secretados pelas linhagens tumorais apresentou uma diminuição na atividade da eferocitose (Figura 18B).

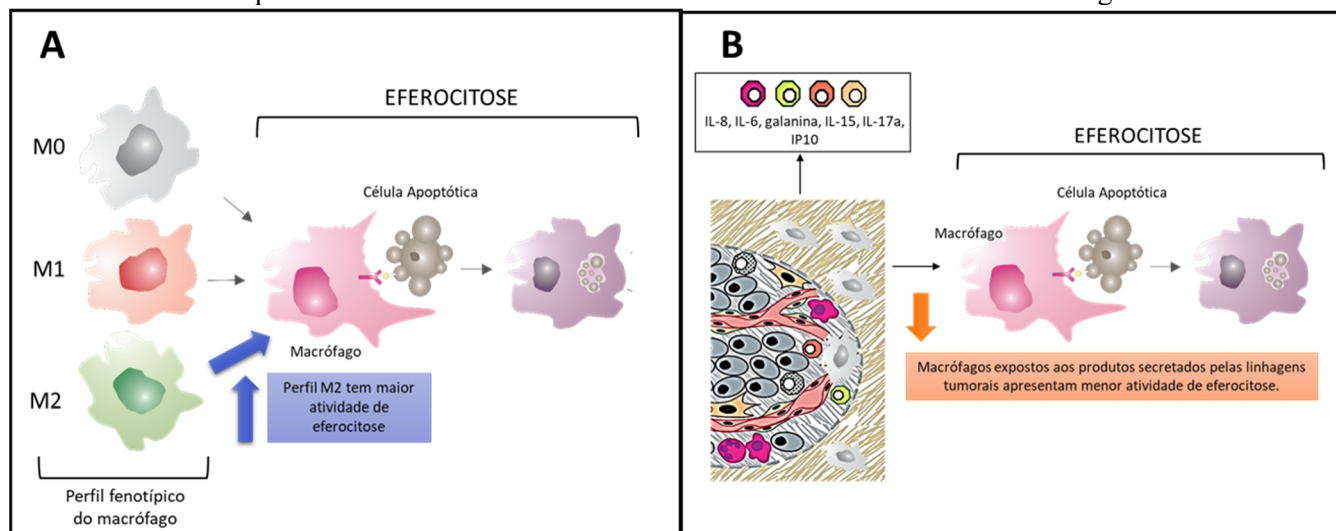
A literatura relata a relevância dos macrófagos para a progressão de tumores sólidos, conhecidos como TAM, e importante ressaltar nossos resultados na modulação no fenótipo dos macrófagos em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, tanto pelos produtos secretados pelas células tumorais, quanto do 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-sifiliograficas.* 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, Panoskaltsis-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 neovascrogenesis, 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, Batth 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. Gaip 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 (SIRPα) 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.