

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 10/03/2024.



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



Laura Andrea González Maldonado

**TGF-beta derivado de células neoplásicas como mediador da modulação do
fenótipo de macrófagos e da invasão em câncer de cabeça e pescoço (HNC):
intersecção com expressão e atividade de GALR2 em células neoplásicas**

Araraquara

2022



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



Laura Andrea González Maldonado

TGF-beta derivado de células neoplásicas como mediador da modulação do fenótipo de macrófagos e da invasão em câncer de cabeça e pescoço (HNC): intersecção com expressão e atividade de GALR2 em células neoplásicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia - Área de concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Carlos Rossa Junior

Araraquara
2022

M244t	Maldonado, Laura Andrea González TGF-beta derivado de células neoplásicas como mediador da modulação do fenótipo de macrófagos e da invasão em câncer de cabeça e pescoço (HNC): intersecção com expressão e atividade de GALR2 em células neoplásicas / Laura Andrea González Maldonado. -- Araraquara, 2022 91 p.: il.; tab. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Carlos Rossa Junior 1. Neoplasias bucais. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Macrófagos. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Laura Andrea González Maldonado

TGF-beta derivado de células neoplásicas como mediador da modulação do fenótipo de macrófagos e da invasão em câncer de cabeça e pescoço (HNC): intersecção com expressão e atividade de GALR2 em células neoplásicas

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutor em odontologia

Presidente e orientador: Carlos Rossa Junior

2º Examinador: Profa. Dra. Andreia Bufalino

3º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

4º Examinador: Prof. Dr. Marcell Costa de Medeiros

Araraquara, 10 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Laura Andrea González Maldonado

NASCIMENTO:	13.02.1990 Armenia – Quindio – Colômbia
FILIAÇÃO:	Elsa Clara Maldonado Rodríguez Jorge Iván González Vargas
2008 – 2014:	Curso de Graduação Faculdade 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

A mis papás y mi hermano, gracias por siempre apoyar mis decisiones y a pesar de la distancia siempre estar presente apoyándome y queriéndome. Este logro es para ustedes y por ustedes. Los amo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr Carlos Rossa Jr., muito obrigada por ser o melhor orientador sempre. Por sempre me ensinar com paciência e responder as minhas - muitas- dúvidas. Aprender da ciência ao seu lado é uma honra, a sua inteligência e capacidade de raciocínio é admirável. Sempre vou ser grata pelos ensinamentos científicos e como pessoa. Obrigada pela paciência e pelo carinho!

A Prof. Dr. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, por aceitar me orientar no primeiro ano do doutorado. Obrigada pelos ensinamentos e sempre estar disponível para me apoiar.

Aos professores de pós-graduação Prof. Dr. Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Prof. Dr. Daniela Leal Zandim-Barcellos, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior e o Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli. Foi um prazer aprender de vocês. Obrigada!

Aos amigos/companheiros do laboratório, Marcell, Mei, Adriana Cabrera, Cindy Perez, Mariana Cominotte, Flavia Gomes Matos, Camila Barbeiro. As meninas de iniciação científica Flavia Gullo, Ana Lidia e Brenda, obrigada pela parceria e ensinamentos.

A Natalie Rodrigues Fernandes e Camyla Rodrigues Nascimento, obrigada pela ajuda e companhia sempre. Eu tive uma sorte gigante de ter vocês como companheiras de pesquisa e amigas. Vocês duas têm um coração gigante, tenho certeza que todos seus sonhos vão se cumprir.

A Uxua, obrigada por estar sempre do meu lado. Uma amizade que cresceu na pandemia e virou minha irmã/mãe/amiga. Você é uma das pessoas mais importantes que Araraquara me deu. Obrigada por me acompanhar, escutar e compartilhar muitas caminhadas e muitos vinhos.

Ao Pako, das primeiras pessoas que conheci em Araraquara e sempre foi um apoio e parceiro. Eu não encontro as palavras para te agradecer pela amizade. Obrigada por tudo!

Ao Victor, obrigada pela amizade e apoio. Tem uma amiga sempre aqui.

Meus amigos gringos, Hernan, Elkin, Patty, Nati, Jeffersson, Francesco, Julio, Wilo, Gabi, Carmelia, Kasandra, Esteban, Caterin e Ranulfo, pela amizade sempre.

Às funcionárias da FOAr-UNESP, em especial a Isa, Suleima, Claudinha e Lene, as quais sou muito grata pela convivência e por toda ajuda para o desenvolvimento de meu trabalho no dia a dia.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), todos os seus professores, funcionários e alunos que permitiram minha formação profissional e pessoal neste período de Pós-Graduação.

Ao CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, em reconhecimento ao auxílio financeiro que possibilitou a realização das etapas de minha pesquisa.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 18/24240-4) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado.

González Maldonado LA. TGF-beta derivado de células neoplásicas como mediador da modulação do fenótipo de macrófagos e da invasão em câncer de cabeça e pescoço (HNC): intersecção com expressão e atividade de GALR2 em células neoplásicas [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Macrófagos são as células imunes mais abundantes em carcinomas espinocelulares de cavidade bucal, podendo representar cerca de 50% da massa do tumor. A quantidade de macrófagos infiltrando a lesão tumoral é inversamente relacionada ao prognóstico e sobrevida dos pacientes. Os macrófagos presentes no microambiente tumoral (TME) são denominados macrófagos associados ao tumor (TAM) e tem seu fenótipo influenciado por moléculas presentes no TME, incluindo os produtos secretados pelas células neoplásicas. No processo de vigilância imune, os macrófagos têm a função de detectar células tumorais e ativar a imunidade adaptativa para eliminação destas, além de participar no processo de reparo tecidual / restabelecimento da homeostasia. O Fator de Transformação de Crescimento (TGF)- β e o Fator Estimulador da Formação de Colônia (CSF)-1 afetam diretamente o fenótipo de macrófagos, e sua expressão em tumores epiteliais está associada à maior agressividade / progressão. Estas proteínas favorecem a polarização de macrófagos para um fenótipo semelhante ao M2, que é associado à tumores mais agressivos. O receptor 2 de galanina (GALR2) é considerado um oncogene em HNC, favorecendo a proliferação e sobrevivência celular e também a invasão; no entanto as influências da expressão de GALR2 pelas células tumorais na modulação macrófagos e na expressão de TGF- β e CSF-1 são desconhecidas. O objetivo geral do projeto foi determinar o efeito do TGF- β secretado pelas células tumorais na biologia de macrófagos, assim como determinar o efeito da expressão/atividade de GALR2 por células tumorais no fenótipo de macrófagos e sua possível interação com a expressão de TGF- β e CSF-1 pelas células tumorais. O desenvolvimento do projeto foi baseado em três objetivos específicos e os resultados foram divididos em 3 artigos. O primeiro objetivo foi determinar a influência dos produtos secretados pelas células de linhagens neoplásicas com alta (H314, carcinoma de células escamosas de assoalho de boca) e baixa (SCC-9, carcinoma de células escamosas de língua) expressão constitutiva de TGF- β no fenótipo de macrófagos; assim como na migração, quimiotaxia e invasão de células tumorais em co-cultura com macrófagos *in vitro*. O fenótipo de macrófagos foi determinado pelo RT-qPCR e análise multiplex e indicou um perfil pró-tumoral/reparo (M2) de macrófagos estimulados com o secretoma de H314 e um perfil com tendência ao perfil pró-tumoral/inflamatório (M1) em macrófagos estimulados com o secretoma das células SCC-9. Produtos secretados por macrófagos aumentaram a quimiotaxia de ambas as linhagens neoplásicas, porém apenas o secretoma de H314 foi quimiotático para macrófagos. Macrófagos condicionados com o secretoma das células tumorais favoreceram a invasão da linhagem menos invasiva (H314) e inibirão a invasão da linhagem mais invasiva (SCC9). O segundo objetivo foi avaliar a influência específica do TGF- β secretado pelas linhagens SCC-9 e H314 no fenótipo de macrófagos pelo RT-qPCR e ELISA, assim como na quimiotaxia e invasão (*in vitro* e *in vivo*, em modelo de membrana corio-alantóica do ovo de galinha) das células neoplásicas em co-cultura com macrófagos. A inibição do efeito do TGF-

β como componente do secretoma das linhagens neoplásicas foi realizada com o tratamento dos macrófagos com inibidor bioquímico da quinase associada ao receptor de TGF- β tipo I (TGF-bRIk) previamente ao estímulo com o secretoma das linhagens neoplásicas. O bloqueio da atividade biológica de TGF- β atenuou a expressão de IL-10 (marcador M2) avaliada por RT-qPCR e ELISA. A inibição de TGF- β em macrófagos também reduziu a invasão de células H314 in vivo e in vitro e reduziu a quimiotaxia de macrófagos para esta linhagem. Por outro lado, a inibição de TGF-bRIk aumentou a quimiotaxia recíproca entre macrófagos e a linhagem SCC-9. O terceiro objetivo foi determinar a influência da expressão/atividade de GALR2 nas linhagens neoplásicas sobre o fenótipo de macrófagos e a possível interação de GALR2 com a expressão de TGF- β e CSF-1 como mediadores importantes para macrófagos. Utilizamos quatro linhagens celulares transgênicas derivadas das mesmas linhagens neoplásicas parentais (SCC-9 e H314), incluindo duas linhagens com alta expressão de GALR2 e as respectivas linhagens-controle (transfectadas com o mesmo vetor plasmidial de expressão - pcDNA3.1 - 'vazio'). A expressão constitutiva de TGF- β e CSF-1 e a meia-vida dos mRNAs foram determinados por ELISA e RT-qPCR, respectivamente. O perfil fenotípico de macrófagos foi determinado usando RT-qPCR e análise multiplex; e a invasão de células tumorais em co-cultura com macrófagos foi avaliada in vitro. A superexpressão de GALR2 reduziu a produção de TGF- β e CSF-1, bem como a meia-vida do RNAm tanto na linhagem H314 quanto SCC-9. A maior expressão de GALR2 nas células neoplásicas influenciou o perfil fenotípico dos macrófagos regulando a expressão de genes-alvo de forma dependente da linhagem celular neoplásica. Em geral, a maior expressão de GALR2 nas linhagens neoplásicas H314 e SCC-9 tendeu a acentuar o perfil pró-tumoral dos macrófagos. A invasão de H314 com alta expressão de GALR2 na presença de macrófagos foi discretamente acentuada, enquanto a expressão de GALR2 reduziu a invasão da linhagem SCC-9 na presença e ausência de macrófagos. Como conclusão geral do trabalho, os dados suportam que o secretoma de células de carcinoma oral de células escamosas (OSCC) influencia o fenótipo de macrófagos. A modulação do fenótipo de macrófagos pode afetar positiva ou negativamente diversos processos da biologia tumoral, como quimiotaxia e invasão, de maneira dependente da linhagem celular neoplásica específica. A inibição de TGF- β como um componente do secretoma das linhagens H314 e SCC-9 tem efeito atenuador no fenótipo M2 de macrófagos e pode favorecer ou inibir a quimiotaxia e invasão de diferentes linhagens celulares tumorais. A expressão de GALR2 em células OSCC influencia a expressão gênica e a produção de proteínas pelos macrófagos de uma maneira específica da linhagem celular. O aumento de GALR2 diminui a invasão de células tumorais.

Palavras chave: Neoplasias bucais. Carcinoma de células escamosas. Macrófagos.

González Maldonado LA. Tumor-cell derived TGF-beta as a mediator macrophage phenotype and Head and Neck Cancer (HNC) tumor cell invasion: intersection with increased expression and activity of GALR2 in neoplastic cells [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Macrophages are the most abundant immune cell type in the tumor microenvironment (TME) of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), representing up to 50% of the tumor mass. The intensity of macrophage infiltration is inversely proportional to prognosis and disease survival. In the TME, macrophages are called tumor-associated macrophages (TAM) and their phenotype is determined by molecules in this microenvironment, including neoplastic cell-secreted products. As innate immune antigen-presenting cells, macrophages have an important role in immune surveillance, detecting neoplastic cells and activating the adaptive immune response for their elimination, besides participating in the repair process after treatment. Transforming growth factor (TGF)-beta has marked effects on both macrophage and neoplastic cell phenotype and it can be produced by cancer cells. Increased expression of TGF- β is associated with worse prognosis of epithelial cancers and drive an M2-like phenotype in macrophages, which is associated with more aggressive tumors. Galanin receptor 2 (GALR2) is an oncogene in HNC, as it is associated with increased cancer cell proliferation, survival and invasion; however, the influences of increased GALR2 expression by cancer cells on macrophages and on the expression of TGF- β are unknown. The main objective of the project was to determine the relative influence of TGF- β as a component of neoplastic cell secretome on macrophage biology. As a secondary objective, the possible intersection between expression and activity of GALR2 in tumor cells and the influence on macrophage phenotype through regulation of TGF- β expression and production. This proposal was structured in three specific objectives, and the data organized, presented and arranged in three manuscripts. The first specific objective was to determine the influence of the secretome from neoplastic cell lines with low (SCC-9, squamous cell carcinoma, tongue) and high (H314, squamous cell carcinoma, floor of mouth) constitutive production of TGF- β on macrophage phenotype and macrophage-modulated tumor cell migration, chemotaxis and invasion. Macrophage phenotype was determined by RT-qPCR and multiplex analysis. Secretome of H314 cells enhanced the pro-tumoral profile (M2-like) of macrophages, whereas the secretome of SCC-9 cells skewed macrophages to a pro-inflammatory (M1-like) phenotype. Macrophage-secreted products were chemotactic for both neoplastic cell lines, but only H314 secretome was chemotactic for macrophages. Invasion of the less invasive H314 cells was increased in the presence of macrophages, whereas inhibited invasion of SCC9 cells. The second specific objective was to determine the specific relative influence TGF- β secreted by SCC-9 and H314 cell lines on macrophage phenotype. To block the biological influence of TGF- β as a component of the secretome of neoplastic cell lines, macrophages were treated with a TGF- β Type I Receptor Kinase (TGF- β RIK) biochemical inhibitor before stimulation with the secretome (conditioned medium - CM) from neoplastic cell lines. Macrophage phenotype was determined by RT-qPCR and ELISA. Influence of tumor cell-derived TGF- β on macrophage-modulated chemotaxis and invasion (in vitro and in vivo) was investigated. Blocking the influence of neoplastic cell-derived TGF- β in macrophages reduced IL-10 (M2 marker) by RT-qPCR and ELISA. In addition,

inhibition of TGF- β in macrophages attenuates the invasion capacity of H314 cells in vivo and in vitro and also reduced macrophage chemotaxis to the secretome of H314 cells. In contrast, blocking the effects of TGF- β enhanced reciprocal chemotaxis between macrophages and SCC-9 cells. The third objective was to determine the influence of GALR2 expression in neoplastic cells on macrophage phenotype and the possible crosstalk with expression of TGF- β and CSF-1, as important macrophage-related mediators, by neoplastic cells. We used four transgenic cell lines derived from the parental neoplastic lines (SCC-9 and H314), including two cell lines with high expression of GALR2 and their respective control cell lines (transfected with the same 'empty' plasmid expression vector - pcDNA3.1). Influence of GALR2 expression on constitutive production of TGF- β and CSF-1 and on the half-life of their mRNAs were determined by ELISA and RT-qPCR, respectively. Macrophage phenotype was determined using RT-qPCR and multiplex assay; and the invasion of tumor cells in co-culture with macrophages was determined in vitro and in vivo. Increased expression of GALR2 by neoplastic cells tended to enhance the pro-tumoral phenotype of macrophages. In H314 cells, increased GALR2 discretely increased invasion in the presence of macrophages, whereas in SCC9 cells increased GALR2 reduced invasion both in the presence and absence of macrophages. In conclusion, the secretome of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells influence macrophage phenotype. Changes in macrophage phenotype can either increase or decrease chemotaxis and invasion as outcomes of tumor biology, depending on the specific neoplastic cell line and the modulation on macrophage phenotype can affect several processes of tumor biology, such as chemotaxis and invasion in a neoplastic cell lineage-dependent manner. Inhibition of the biological effect of TGF- β as a component of the secretome of the H314 and SCC-9 cells attenuates the M2 / pro-tumoral phenotype of macrophages. GALR2 expression in OSCC cells influences gene expression and protein production by macrophages in a neoplastic cell lineage-specific manner. The increase in GALR2 decreases invasion of neoplastic cells.

Keywords: Mouth neoplasms. Carcinoma, squamous cell. Macrophages.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Hipótese	13
2.2 Objetivos	13
3 PUBLICAÇÕES	15
3.1 Publicação 1	15
3.2 Publicação 2	38
3.3 Publicação 3	62
4 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A.....	84

1 INTRODUÇÃO

Câncer de cabeça e pescoço (HNC) é a 6ª neoplasia mais prevalente no mundo¹, e o carcinoma espinocelular ou de células escamosas é o tipo mais prevalente, representando cerca de 90% dos casos de HNC^{2,3}. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) é uma neoplasia agressiva, caracterizada por invasão loco-regional e disseminação metastática (especialmente para o sistema linfático) e elevadas taxas de recidiva pós-tratamento⁴. Atualmente, mesmo com a implementação dos tratamentos padrão recomendados, a expectativa de sobrevivência em 5 anos para casos avançados de HNSCC é de cerca de 50%, a qual é inferior à sobrevida de casos de câncer de mama (~ 70%) e melanoma (~80%)⁵.

Nos últimos anos, tem havido grande interesse no estudo da interação entre resposta imune e tumores sólidos, incluindo HNSCC, devido ao papel importante da resposta do hospedeiro no desenvolvimento (tumorigênese), progressão (invasão) e resposta ao tratamento^{6,7}. A interação entre células neoplásicas e da resposta imune ocorre no microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*), o qual inclui células imunes, endoteliais, fibroblastos, células mesenquimais e componentes da matriz extracelular. O TME é, atualmente, considerado como parte do tumor^{8,9} e tem sido intensamente estudado como potencial alvo terapêutico de diversos tipos de câncer, incluindo HNSCC^{9,10}. Macrófagos são as células imunes mais prevalentes no TME de HNSCC¹¹ e representam um importante alvo terapêutico devido à sua participação na oncogênese, progressão/invasão e recidiva pós-tratamento¹². O número de macrófagos infiltrantes é diretamente relacionado à pior prognóstico em HNSCC¹³⁻¹⁵, e pode estar relacionado à diversos mecanismos biológicos, como: (i) produção aumentada de mediadores capazes de ativar STAT3 nas células tumorais e promover sua sobrevivência e proliferação; (ii) produção de mediadores angiogênicos, como fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF); (iii) produção de mediadores capazes de degradar a matriz extracelular e facilitar a invasão, como metaloproteases de matriz (MMPs); e (iv) produção de mediadores biológicos imunomoduladores da resposta anti-tumoral, como IL-6, TNF e IL-10¹⁶⁻²⁰.

Uma característica fundamental dos macrófagos é sua responsividade e adaptação aos sinais do microambiente, denominada plasticidade fenotípica. Dois

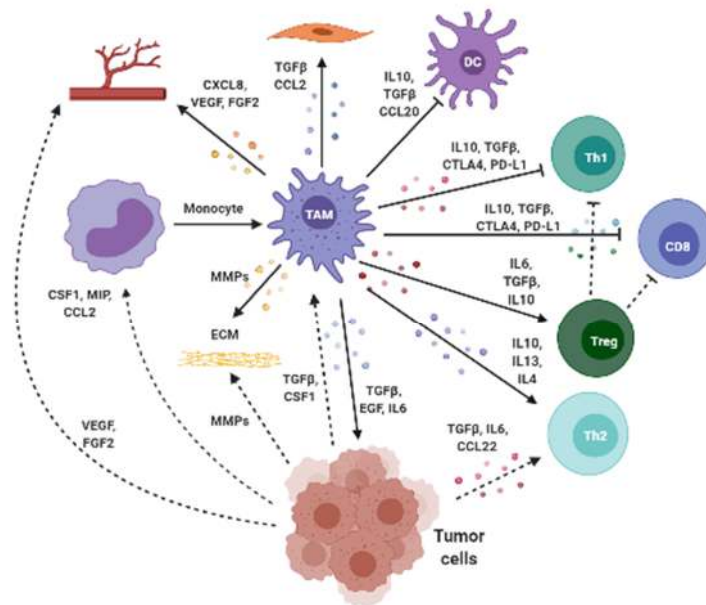
fenótipos extremos contrastantes são tradicionalmente descritos para os macrófagos: M1/clássico ou pró-inflamatório, associado à elevada produção de IL-1, IL-12, TNF e ROS; e M2/alternativo ou pró-reparativo, associado à elevada produção de IL-10, TGF e IL-1ra.

O fenótipo M2 é subclassificado em M2a (induzido por IL4), M2b (induzido por ligantes IgG / TLR) e M2c (induzido por IL10, glucocorticóide, CSF-1)²¹, refletindo a influência de diferentes pistas extracelulares nos macrófagos. Curiosamente, a polarização fenotípica dos macrófagos é transitória e dinâmica, pois pode ser revertida de acordo com os sinais do microambiente²².

Considera-se que o fenótipo dos macrófagos transita em um espectro entre os extremos 'M1' e 'M2', dependendo da natureza e relativa abundância de estímulos externos do microambiente^{21,23}. Além das diferenças entre macrófagos M1 e M2 no perfil de produção de mediadores biológicos secretados, incluindo citocinas, existem proteínas de membrana características de cada perfil, consideradas marcadores fenotípicos, como CD80 (M1) e CD163/CD206 (M2)²⁴.

No TME, os macrófagos assumem um fenótipo típico, sendo denominados 'macrófagos associados ao tumor' (TAM, tumor associated macrophages) o qual é, tradicionalmente, considerado como 'semelhante à M2' (M2-like), de perfil reparador/imunossupressivo. No entanto, em tecidos de casos de HNSCC podem ser encontrados tanto marcadores do perfil M1 quanto do perfil M2²⁵ sugerindo a participação de macrófagos associados aos dois extremos do espectro fenotípico e/ou que TAMs apresentam um fenótipo híbrido e não simplesmente um fenótipo do perfil M2.

Figure 1 – Macrófagos associados a tumor



Created in BioRender.com 

TAMs são macrófagos com fenótipo M2 que respondem a moléculas secretadas pelo tumor (por ex., TGF- β e CSF-1) e secretam mediadores biologicamente ativos que suprimem a resposta imune (CCL22, CCL17, TGF- β , IL-10, IL-4) e promovem o crescimento e invasão do tumor (EGF, VEGF, MMPs).

Fonte: Figura adaptada de Mantovani et al.²³ (2002).

O fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) é um mediador solúvel com efeitos pleiotrópicos no câncer, podendo ter influência pró- ou anti-tumoral. No TME de HNSCC, diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, podem produzir TGF- β . As atividades pró-tumorais do TGF- β incluem a indução da transição epitélio-mesênquima (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*), processo de ‘desdiferenciação’ das células epiteliais que é associado tanto à tumorigênese como à maior agressividade/invasividade dos tumores²⁶⁻²⁸. Além disso, TGF- β pode interferir com o ciclo celular favorecendo a proliferação; pode induzir a produção de outros mediadores angiogênicos e de MMPs; também pode apresentar um efeito supressor na resposta imune, favorecendo a evasão tumoral^{29,30}. Em modelos de câncer oral em camundongos, TGF- β promove maior agressividade (invasão de tumores), embora reduza a ocorrência de metástases^{31,32}. Expressão elevada de TGF- β é observada em lesões primárias avançadas de HNSCC, bem como em lesões metastáticas em linfonodos³³.

Os efeitos antitumorais do TGF- β incluem a supressão de lesões iniciais, devido a efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos³⁴. Estes efeitos pleiotrópicos do TGF- β podem estar relacionados à variações e interferências na função/atividade/expressão de seus receptores e proteínas intracelulares responsáveis pela transdução do sinal gerado pelo TGF- β extracelular até o núcleo da célula. Estas alterações e variações podem ser relacionadas à mutações/variações genéticas ou à variações epigenéticas, as quais podem afetar a expressão e atividade (funcionalidade) dos receptores e/ou proteínas sinalizadoras³⁵. Embora existam controvérsias sobre o papel de TGF- β favorecendo ou inibindo a progressão de HNSCC, existem evidências indicando que a produção de TGF- β por células tumorais está associada a pior prognóstico.

A galanina é um peptídeo de 29 resíduos de aminoácidos amplamente distribuída e com amplo espectro de efeitos biológicos³⁶. Existem três receptores distintos já identificados em ratos e humanos (GALR1, GALR2, GALR3). Em células de HNSCC, GALR2 é o receptor mais expresso e leva à maior ativação de Rap1 e das vias downstream a esta proteína, incluindo MEK/ERK, PI3kinase/Akt e β -catenin³⁷. Em modelo experimental ortotópico de HNSCC utilizando camundongos nude, o aumento da sinalização de GALR2 promove o crescimento tumoral, o que suporta um papel da expressão deste receptor como marcador prognóstico e como um mecanismo de tumorigênese^{37,38}.

As vias de sinalização associada a Rap1 estão associadas à regulação pós-transcricional (via aumento da estabilidade do mRNA) de várias citocinas e fatores de crescimento³⁹. Não se sabe se o aumento da atividade de GALR2 em células HNC aumenta a expressão de TGF- β e CSF-1, promovendo a estabilidade do mRNA. No TME, TGF- β e CSF-1 são fatores de crescimento associados a polarização no protumoral de macrófagos⁴⁰ e seu efeito pode ser regulado no nível de estabilidade do mRNA⁴¹.

Esta informação indica que a ativação mediada por GALR2 de vias de sinalização em células HNC pode afetar a expressão de vários genes de relevância para o crescimento do tumor, incluindo TGF- β e CSF-1, que estão associados à imunomodulação de macrófagos no TME.

4 CONCLUSÃO

O secretoma de diferentes células de carcinoma oral de células escamosas (OSCC); a influência específica do TGF- β como um componente do secretoma de diferentes células de OSCC e a influência da expressão e atividade de GALR2 em diferentes células de OSCC exercem efeitos distintos sobre macrófagos.

Coletivamente, os diferentes estudos conduzidos indicam que:

O secretoma de células de carcinoma oral de células escamosas influencia o fenótipo de macrófagos;

A modulação do fenótipo de macrófagos pode alterar a capacidade de invasão das células tumorais;

TGF- β , como um componente do secretoma das linhagens H314 e SCC-9 tem efeito supressor de fenótipo pró-inflamatório de macrófagos;

A inibição da influência de TGF- β em macrófagos pode favorecer ou inibir a quimiotaxia e invasão de diferentes linhagens celulares tumorais;

A expressão/atividade aumentada de GALR2 reduz a expressão de CSF-1 e TGF- β pela linhagem H314;

Isoladamente, a expressão aumentada de GALR2 não promove a invasividade das linhagens H314 e SCC-9.

REFERÊNCIAS*

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359-86.
2. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65(5): 401-21.
3. Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H, et al. Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol*. 2008; 13(3): 220-8.
4. He KF, Zhang L, Huang CF, Ma SR, Wang YF, Wang WM, et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 838632.
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71(1): 7-33.
6. 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.
7. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19(11): 1423-37.
8. Runa F, Hamalian S, Meade K, Shisgal P, Gray PC, Kelber JA. Tumor microenvironment heterogeneity: challenges and opportunities. *Curr Mol Biol Rep*. 2017; 3(4): 218-29.
9. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*. 2017; 8(5): 761-73.
10. Belli C, Trapani D, Viale G, D'Amico P, Duso BA, Della Vigna P, et al. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018; 65: 22-32.
11. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(5): 1065-73.

* 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>

12. Jinushi M, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1855(2): 123-30.
13. Sun H, Miao C, Liu W, Qiao X, Yang W, Li L, et al. TGF-beta1/TbetaRII/Smad3 signaling pathway promotes VEGF expression in oral squamous cell carcinoma tumor-associated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 497(2): 583-90.
14. Ni YH, Ding L, Huang XF, Dong YC, Hu QG, Hou YY. Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Tumour Biol*. 2015; 36(7): 5291-8.
15. Alves AM, Diel LF, Lamers ML. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2018; 47(5): 460-7.
16. Salmiheimo A, Mustonen H, Vainionpaa S, Shen Z, Kemppainen E, Puolakkainen P, et al. Tumour-associated macrophages activate migration and STAT3 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells in co-cultures. *Pancreatology*. 2017; 17(4): 635-41.
17. Yin Z, Ma T, Lin Y, Lu X, Zhang C, Chen S, et al. IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem*. 2018; 119(11): 9419-32.
18. She L, Qin Y, Wang J, Liu C, Zhu G, Li G, et al. Tumor-associated macrophages derived CCL18 promotes metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Cell Int*. 2018; 18: 120.
19. 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.
20. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41(1): 49-61.
21. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014; 6: 13.
22. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 2005; 175(1): 342-9.
23. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002; 23(11): 549-55.
24. Vogel DY, Glim JE, Stavenuiter AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014; 219(9): 695-703.

25. 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 Oncol.* 2016; 52: 75-84.
26. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol.* 2002; 156(2): 299-313.
27. Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytomaa M, Schulze A, McMahon M, et al. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* 2000; 14(20): 2610-22.
28. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.* 1996; 10(19): 2462-77.
29. Yang L, Moses HL. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res.* 2008; 68(22): 9107-11.
30. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008; 134(2): 215-30.
31. Davies M, Paterson IC, Stone A, Huntley S, Patel V, Curtis R, et al. Loss of differentiation of 4NQO-induced rat malignant oral keratinocytes correlates with metastatic dissemination and is associated with a reduced cellular response to TGF-beta1 and an altered receptor profile. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28(9): 397-405.
32. Davies M, Prime SS, Stone AM, Heung YL, Huntley SP, Matthews JB, et al. Overexpression of autocrine TGF-beta 1 suppresses the growth of spindle epithelial cells in vitro and in vivo in the rat 4NQO model of oral carcinogenesis. *Int J Cancer.* 1997; 73(1): 68-74.
33. Arantes DA, Costa NL, Mendonca EF, Silva TA, Batista AC. Overexpression of immunosuppressive cytokines is associated with poorer clinical stage of oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol.* 2016; 61: 28-35.
34. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010; 31(6): 220-7.
35. Prime SS, Davies M, Pring M, Paterson IC. The role of TGF-beta in epithelial malignancy and its relevance to the pathogenesis of oral cancer (part II). *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 337-47.
36. Bartfai T, Hokfelt T, Langel U. Galanin--a neuroendocrine peptide. *Crit Rev Neurobiol.* 1993; 7(3-4): 229-74.
37. 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.

38. Goto M, Mitra RS, Liu M, Lee J, Henson BS, Carey T, et al. Rap1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(1): 65-76.
39. Ganguly K, Giddaluru J, August A, Khan N. Post-transcriptional Regulation of Immunological Responses through Riboclustering. *Front Immunol*. 2016; 7: 161.
40. Zheng X, Turkowski K, Mora J, Brune B, Seeger W, Weigert A, et al. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017; 8(29): 48436-52.
41. Suen Y, Lee SM, Schreurs J, Knoppel E, Cairo MS. Decreased macrophage colony-stimulating factor mRNA expression from activated cord versus adult mononuclear cells: altered posttranscriptional stability. *Blood*. 1994; 84(12): 4269-77.