CAMILA MORAIS MELO

**Envolvimento das galectinas na angiogênese
tumoral em modelo de melanoma murino e associação
com o microambiente tumoral via receptores toll-like**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Roger
Chammas

**São Paulo
2015**

CAMILA MORAIS MELO

**Envolvimento das galectinas na angiogênese
tumoral em modelo de melanoma murino e associação
com o microambiente tumoral via receptores toll-like**

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Roger
Chammas

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Camila Morais

Envolvimento das galectinas na angiogênese tumoral em modelo de melanoma murino e associação com o microambiente tumoral via receptores toll-like / Camila Morais Melo. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Microambiente tumoral 2.Galectinas 3.Macrófagos 4.Receptores toll-like 5.Neovascularização patológica 6.Melanoma

USP/FM/DBD-273/15

*A todos os pacientes oncológicos
que lutam bravamente na esperança
de obter a cura da sua doença*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Roger Chammas, por ter aberto as portas do seu laboratório tão gentilmente para a realização desse trabalho. Por todos os ensinamentos científicos e conselhos em todas as nossas conversas. Pela paciência constante em solucionar todos os meus “problemas”. Por ser uma das pessoas mais inteligentes que eu conheço e um exemplo de pesquisador para todos nós.

À Dra. Camila Machado, por ter sido a minha “mãe” no início do doutorado, me ensinando tudo de experimentação animal com muita paciência e dedicação. E por todas as discussões científicas que desenvolvemos no decorrer desses 5 anos.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação em Oncologia, por todo auxílio prestado.

À direção do ICESP, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

A todos os funcionários do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP (CTO) e do LIM24, pelo apoio logístico para a realização dos experimentos.

A todos os membros do laboratório GACC, por me receberem tão amigavelmente, pelos ensinamentos, pela ajuda constante nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração. E por tornarem minha vida no laboratório mais divertida!

Aos antigos membros do laboratório que não fazem mais parte do grupo, Luiza e Rafael. A amizade de vocês foi e ainda é muito importante mim.

À Silvina, Renata e Carolina Rosal pela companhia, amizade, ensinamentos científicos, conversas de incentivo. Por terem me ajudado e me ensinado muito sobre todos os experimentos, interrompendo pacientemente o que estavam fazendo para me ajudar.

À Tatiane pela amizade, por toda a ajuda com a PCR quantitativa em tempo real e pelas ajudas nos meus problemas pessoais durante esse tempo que convivemos juntas.

À Karina, pela amizade, conversas científicas e ajuda em todos os experimentos de histologia e Elisa.

Ao Adalberto, meu irmão de bancada, por todas as discussões científicas, companhia durante os experimentos demorados e detalhados, pelo incentivo nos momentos de desespero e pela amizade.

Ao Matheus, pelos ensinamentos científicos, ajuda nos experimentos com os macrófagos derivados da medula e pela ajuda com a revisão da tese.

A Angélica, Silvia, Mayara, Mariana, Lizete, Iara e Cíntia pela amizade, almoços descontraídos e ajuda nos momentos difíceis e decisivos desses anos vividos juntos.

À Cida, pela amizade, conversas de incentivo e toda a ajuda no cuidado e manutenção dos camundongos no biotério de experimentação animal.

A todos os funcionários do Biotério Central da FMUSP, pelo cuidado e manutenção dos camundongos.

À minha família, por sempre acreditar em mim, por nunca deixar que eu desistisse dos meus sonhos.

Ao meu pai, Toninho, que nos momentos que eu ligava chorando, dizendo que queria desistir, usava a frase encorajadora “Não se preocupe, minha filha,

você sempre pode voltar e será ótimo ter sua ajuda no mercado”. Pelo seu exemplo de honestidade, companheirismo, amor, dedicação, amizade, respeito. Por sempre acreditar que eu posso ser uma pessoa melhor.

À minha mãe, Célia, pelo apoio infinito, pelas conversas de incentivo, pela fé inabalável, pelas orações que tanto me ajudam, pela confiança. Pelo seu exemplo de honestidade, abnegação, amor, amizade, dedicação, respeito. Por sempre acreditar em mim.

À minha irmã preferida, Paula, pela amizade, companheirismo e carinho. Pelas conversas, emails e torpedos de apoio. Pela fé também inabalável, pelas orações. Por acreditar que eu posso ser uma ótima cientista.

Ao Henrique, amor da minha vida, pelo apoio, companhia, amor e dedicação. Por ter estado presente em todos os momentos difíceis e por todos os momentos felizes, desde todos os anos de vestibular, faculdade, mestrado e doutorado. Por tornar a minha adaptação em São Paulo muito mais fácil, agradável e divertida. Por ser meu porto seguro e ter tanta paciência comigo durante esse momento de dedicação do doutorado, e pela super ajuda na formatação da tese.

À Marilu, pela amizade, carinho e apoio durante todos esses anos.

Aos meus amigos caninos, Elvis e Bob, pela amizade incondicional. Por ficarem alegres em me ver, pelos rabinhos abanando quando eu chegava e por terem tornado minha vida mais alegre.

Aos amigos espirituais, que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio, sustentação e me ajudando em todos os momentos em que precisei.

*“Es inmoral pretender que una cosa deseada se realice mágicamente,
simplemente porque la deseamos. Sólo es moral el deseo al que acompaña la
severa voluntad de aprontar los medios de su ejecución.”*

La rebelión de las masas (1930)

José Ortega y Gasset, filósofo español (1883-1955)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MELANOMA.....	1
1.2 QUIMIORRESISTÊNCIA	3
1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL	4
1.4 GALECTINAS	7
1.5 GALECTINA-1, -3 E ANGIOGÊNESE.....	10
1.6 RECEPTORES TOLL-LIKE E PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88	18
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 LINHAGENS CELULARES	23
4.2 INIBIDORES FUNCIONAIS DE GALECTINAS.....	23
4.3 IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS E TRATAMENTO DOS ANIMAIS	24
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL	25
4.5 EXTRAÇÃO PROTEICA	26
4.6 MULTIPLEX DE CITOCINAS.....	26
4.7 ELISA PARA VEGF	27

4.8 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.....	29
4.9 MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS E POLARIZAÇÃO PARA M1 E M2	31
4.10 EXTRAÇÃO DE RNA.....	32
4.11 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	33
4.12 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	33
4.13 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	35
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO TM1M:	37
5.1.1 ANIMAIS <i>WILD-TYPE</i> (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)	37
5.1.2 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™).....	42
5.1.3 ANIMAIS <i>WILD-TYPE</i> (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02).....	45
5.1.4 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02).....	47
5.2 CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10:.....	49
5.2.1 ANIMAIS <i>WILD-TYPE</i> (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)	49

5.2.2 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™).....	51
5.2.3 ANIMAIS WILD-TYPE (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02).....	53
5.2.4 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02).....	55
5.2.5 CAMUNDONGOS BALB/C NUDE TRATADOS DIARIAMENTE COM OS INIBIDORES DE GALECTINAS (DAVANAT™ E GR-MD-02).....	57
5.3 CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO TM1M:	60
5.3.1 ANIMAIS <i>WILD-TYPE</i> (WT) E KNOCKOUT PARA GALECTINAS-1 (GAL-1KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™).....	60
5.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS <i>WILD-TYPE</i> (WT), KNOCKOUT PARA GALECTINAS-3 (GAL3-KO) E KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO):	62
5.4.1 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS <i>WILD-TYPE</i> (WT):	66
5.4.2 MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA	71
5.4.3 ELISA PARA VEGF	75
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

APÊNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BMDM	macrófagos derivados da medulla óssea
CD	Cluster of differentiation
CE	Células endoteliais
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
gal-1	Galectina-1
gal1KO	Camundongo knockout para galectinas-1
gal-3	Galectina-3
gal3KO	Camundongo knockout para galectinas-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Nitric oxide synthase

JNK	c-Jun N terminal kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMPs	Matriz Metaloproteinases
LGALS3BP	lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein
LPS	Lipopolissacarídeo
MRC1	receptor de manose
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
MyD88KO	camundongo knockout para MyD88
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
siRNA	small interfering RNA
TGF β 1	Transforming Growth Factor beta 1
TLRs	receptores toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B light
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
WT	Wild-type

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da estrutura dos diferentes membros da família das galectinas.....	7
Figura 2. Os papéis das galectinas.....	8
Figura 3. Via de sinalização dos receptores toll-like.....	20
Figura 4. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino TM1M.	40
Figura 5. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino TM1M.....	42
Figura 6. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino TM1M.....	44
Figura 7. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino TM1M.....	46
Figura 8. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino TM1M.....	48
Figura 9. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino B16F10.....	50

Figura 10. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino B16F10..	52
Figura 11. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino B16F10..	54
Figura 12. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino B16F10..	56
Figura 13. Análise do crescimento tumoral em camundongos fêmeas Balb/c nude frente ao tratamento diário com PBS e Davanat™.....	58
Figura 14. Análise do crescimento tumoral em camundongos fêmeas Balb/c nude frente ao tratamento metronômico com PBS e os inibidores de gal-3 extracelular Davanat™e GR-MD-02.....	59
Figura 15. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos WT e gal1 KO, inoculados com células de melanoma murino TM1M.....	61
Figura 16. Gráfico de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos extraídos da medula óssea de camundongos <i>wild-type</i> , análise por citometria de fluxo.....	63
Figura 17. Gráfico de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos extraídos da medula óssea de camundongos gal-3KO, análise por citometria de fluxo.....	64

Figura 18. Gráfico de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos extraídos da medula óssea de camundongos MyD88KO, análise por citometria de fluxo.....	65
Figura 19. Gráfico de expressão gênica relativa do gene MRC1 (receptor de manose) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT).....	66
Figura 20. Gráfico de expressão gênica relativa do gene PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT).....	67
Figura 21. Gráfico de expressão gênica relativa do gene iNOS (nitric oxide synthase) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT).....	68
Figura 22. Gráfico de expressão gênica relativa do gene IL1 β (interleukin-1 beta) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT).	69
Figura 23. Gráfico de expressão gênica relativa do gene Gal-3 (galectina-3) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT)	71
Figura 24. Morfologia dos macrófagos sem estímulo de polarização (M0) após diferentes concentrações de tratamento com Davanat.....	72
Figura 25. Morfologia dos macrófagos com estímulo de polarização M1 após diferentes concentrações de tratamento com Davanat.....	73
Figura 26. Morfologia dos macrófagos com estímulo de polarização M2 após diferentes concentrações de tratamento com Davanat.....	74

Figura 27. Quantificação de VEGF por Elisa do sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos wild-type (WT), knockout para gal-3 (gal3KO) e knockout para MyD88 (MyD88KO) sem estímulo de polarização (M0). 75

Figura 28. Quantificação de VEGF por Elisa do sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos wild-type (WT), knockout para gal-3 (gal3KO) e knockout para MyD88 (MyD88KO) polarizados para M1 77

Figura 29. Quantificação de VEGF por Elisa do sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos wild-type (WT), knockout para gal-3 (gal3KO) e knockout para MyD88 (MyD88KO) polarizados para M2 79

RESUMO

Melo CM. Envolvimento das galectinas na angiogênese tumoral em modelo de melanoma murino e associação com o microambiente tumoral via receptores toll-like [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O melanoma é a forma mais letal entre os cânceres de pele. Essa neoplasia freqüentemente apresenta-se resistente a abordagens terapêuticas. A angiogênese associada ao tumor representa um crítico passo da tumorigênese, resultado da ação de diferentes citocinas e fatores de crescimento como VEGF produzidos no microambiente tumoral. As galectinas extracelulares participam de múltiplos processos biológicos incluindo angiogênese tumoral e metástases, sua interação com as células presentes no microambiente tumoral pode ocorrer via receptores toll-like sugerindo seu envolvimento nos processos pro-inflamatórios e na secreção de citocinas. Recentemente mostramos que a ausência de gal-3 no estroma e parênquima tumoral diminui a angiogênese por interferir na resposta de macrófagos via VEGF e/ou TGF β 1. Entretanto, o envolvimento de galectinas extracelulares na angiogênese e na modulação do sistema imune no microambiente tumoral ainda não está esclarecido. Assim, este estudo visa buscar respostas ao envolvimento das galectinas no crescimento tumoral e angiogênese contribuindo ao combate do melanoma maligno. Nossos resultados mostram a participação das galectinas 1 e 3 no crescimento tumoral e seu envolvimento com macrófagos via receptores toll-like, além de coordenarem a modulação do perfil de polarização de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type. Dessa forma, podemos inferir que essas galectinas agem como coordenadoras de mudança de perfil dos macrófagos, uma vez que inibidas extracelularmente promovem uma diminuição do crescimento tumoral em camundongos wild-type, inoculados com células de melanoma murino e uma manutenção do perfil de macrófagos M1 *in vitro*. Assim, concluímos que as galectinas 1 e 3 extracelulares são importantes para o crescimento tumoral de melanomas murinos pois promovem o crescimento tumoral e são coordenadoras da mudança do perfil de macrófagos.

Descritores: microambiente tumoral; galectinas; macrófagos; receptores toll-like; neovascularização patológica; melanoma.

ABSTRACT

Melo CM. Involvement of galectins in tumor angiogenesis in a murine melanoma model and association with tumor microenvironment through toll-like receptors [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer. This tumor often presents itself resistant to therapeutic approaches. The tumor-associated angiogenesis is a critical step in tumorigenesis and the result of the action of several cytokines and growth factors such as VEGF produced in the tumor microenvironment. The extracellular galectins participate in multiple biological processes including tumor angiogenesis and metastasis, their interaction with cells present in the tumor microenvironment may occur via toll-like receptors suggesting their involvement in pro-inflammatory processes and the secretion of cytokines. We have recently shown that the absence of Gal-3 the stroma and tumor parenchyma decreases angiogenesis by interfering with the macrophage response by VEGF and / or TGF β 1. However, the involvement of extracellular galectins on angiogenesis modulation of the immune system in the tumor microenvironment is not yet clear. This study aims is to find answers to the involvement of galectins on tumor growth and angiogenesis contributing to the study of the malignant melanoma. Our results demonstrate the involvement of galectin 1 and 3 on tumor growth and its involvement in macrophage by toll-like receptors pathway, and coordinating the modulation of the polarization profile in wild-type mice bone marrow derived macrophages. Therefore, we show these galectins act as coordinators of macrophages profile change, since inhibited extracellularly promote a reduction in tumor growth in wild-type mice inoculated with murine melanoma cells and macrophages M1 maintenance of profile in vitro. Thus, we conclude that galectins 1 and 3 extracellular are important for tumor growth of murine melanomas because they promote tumor growth and are coordinators of change macrophages profile.

Descriptors: tumor microenvironment; galectins; macrophages; toll-like receptors; neovascularization, pathologic; melanoma.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e origina-se da transformação maligna de melanócitos, processo resultante de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais. A exposição aos raios ultravioleta, tipo A (UVA, 320-400nm) ou tipo B (UVB, 290-320nm), é o fator de risco mais importante para o surgimento do melanoma esporádico (HERLYN *et al.* 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que anualmente ocorram cerca de 130 mil casos novos dessa neoplasia no mundo, representando cerca de 2% de prevalência (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009). Apesar de relativamente baixa quando comparada com outros tumores, a incidência de melanoma nos países desenvolvidos tem aumentado mais rapidamente do que a de qualquer outro tipo de câncer (JEMAL *et al.* 2010). Além disso, a mortalidade atribuída ao melanoma é bastante alta. A média mundial de sobrevida em cinco anos é 69% incluindo todos os estágios da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009). Entretanto, apenas 3% a 14% dos pacientes com estágios mais avançados ao diagnóstico estão vivos após cinco anos (BROWN e ATTARDI 2005).

O surgimento das neoplasias está diretamente relacionado ao acúmulo de alterações moleculares sofridas por células normais. Uma vez alteradas,

essas células são denominadas transformadas. Hanahan e Weinberg (2011) sugeriram seis capacidades adquiridas pelas células transformadas, que são importantes para o estabelecimento e sobrevivência do tumor: capacidade celular de evasão a apoptose, auto-suficiência em sinalização para crescimento celular, insensibilidade a sinalização da parada de ciclo celular, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese e capacidade para invasão de outros tecidos (metástase). A aquisição dessas capacidades está condicionada à disfunção de moléculas ligadas ao controle do ciclo celular (proliferação, crescimento e morte celular), reparo de DNA e comunicação célula-célula e célula-matriz. Os melanócitos apresentam diferentes alterações moleculares que permitem sua transformação em células malignas e conseqüente sucesso no estabelecimento do melanoma. Essas capacidades adquiridas pelos melanócitos contribuem para que a célula tumoral sobreviva inclusive em condições desfavoráveis, como no tratamento quimioterápico. A interação das células neoplásicas com as células do estroma, com a matriz extracelular e com o sistema imune são fundamentais para o surgimento do tumor e sua sobrevivência (PIETRAS e ÖSTMAN 2010).

O tratamento do melanoma in situ é a ressecção cirúrgica com margens ampliadas, com alta taxa de cura (VERONESI *et al.* 1991). Entretanto, uma vez disseminada a outros locais distantes do sítio primário, a doença é raramente curável (LEE *et al.* 2000). A recidiva ou a doença metastática não passível de ressecção cirúrgica usualmente é tratada com quimioterapia convencional e/ou imunoterapia, embora o melanoma seja resistente à maioria dos tratamentos sistêmicos disponíveis atualmente. A compreensão dos mecanismos que levam

à refratariedade dos melanomas aos tratamentos disponíveis é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias ou de terapias adjuvantes às atuais, tornando-as mais eficazes.

1.2 QUIMIORRESISTÊNCIA

Diversos tipos de câncer compartilham a característica de quimiorresistência, por meio de diferentes processos. Entretanto, o melanoma é considerado um dos tipos de câncer com extraordinária resistência aos quimioterápicos, sendo uma das formas mais invasivas e mais mortais de câncer de pele.

A rescisão cirúrgica pode curar cerca de 50% de pacientes com melanoma, porém apenas quando a doença é descoberta nos estágios iniciais. A metástase de melanoma pode atingir vários órgãos como cérebro, pulmões, fígado, ossos, linfonodos, pele e pâncreas (SUN e SCHUCHTER 2001; LEV *et al.* 2004).

A quimioterapia e a radioterapia ainda são as principais terapias adjuvantes contra o câncer. No caso do melanoma maligno estes tratamentos apresentam poucos efeitos e desta forma, o desenvolvimento de outras terapias, inclusive utilizando combinações a estas clássicas, torna-se crucial.

1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

Os tumores são microambientes constituídos pelas células malignas e por células estromais (células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, adipócitos, células imunes e inflamatórias) que interagem entre si, delineando o comportamento biológico da célula tumoral e, portanto, constituindo elementos determinantes do processo de progressão tumoral (HANAHAHAN e WEINBERG 2011).

As células do sistema imune modulam a sobrevivência das células, sendo essa proliferação ou morte, e regulam a matriz extracelular devido a sua ampla plasticidade e capacidade de produzir grande variedade de citocinas, quimiocinas, metaloproteinases, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores bioativos. Dessa forma, vários processos fisiológicos que são necessários para o desenvolvimento e sobrevivência tumoral, como aumento da sobrevivência celular, remodelação tecidual, angiogênese e supressão de respostas imunes adaptativas antitumorais são regulados por leucócitos infiltrados no microambiente tumoral (de VISSER *et al.* 2006).

Outras células de interesse no contexto do microambiente tumoral são os macrófagos com polarização M1 são potentes efetores na eliminação de microrganismos e de células tumorais, produzindo citocinas pró-inflamatórias, portanto, promovem rejeição tumoral. Já os macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e IL-13, ajustam e amenizam a resposta inflamatória e a resposta imune Th1, eliminam debris, promovem angiogênese

e remodelação tecidual (MANTOVANI *et al.* 2003; VAN GINDERACHTER *et al.* 2006), portanto, promovem estimulação da regeneração e progressão tumoral.

Os macrófagos associados ao tumor, além de ajudar na imunossupressão, produzem citocinas e fatores de crescimento que contribuem para o desenvolvimento tumoral e ajudam sua recuperação pós-quimioterapia (CROWTHER *et al.* 2001). A presença de macrófagos determinaria que uma resposta imune inata contra o tumor seja desencadeada, entretanto, muitas vezes essa resposta é fraca e incapaz de gerar rejeição tumoral completa (BRIGATI *et al.* 2002). Os macrófagos associados ao tumor apresentam polarização M2 e seriam recrutados pelo microambiente tumoral para dar suporte à progressão tumoral (MANTOVANI *et al.* 2003; POLLARD 2004; VAN GINDERACHTER *et al.* 2006). Esse fenômeno foi observado em vários estudos clínicos em pacientes com tumores de mama, próstata, ovário e colo uterino onde relacionam a abundância de macrófagos M2 com um prognóstico desfavorável (POLLARD 2004; VAN GINDERACHTER *et al.* 2006).

Interessantemente, MacKinnon e colaboradores (2008) demonstraram que a galectina-3, uma lectina ligante de β -galactosídeo altamente expressa em macrófagos, promove ativação de PI3K na presença de IL-4. Essa ativação ocorre via CD98 e parece ser essencial para a polarização M2.

A resposta tumoral frente à ação do tratamento quimioterápico pode ser influenciada pelos macrófagos associados ao tumor. No microambiente tumoral exposto a quimioterapia, assim como numa ferida em cicatrização, ocorre proliferação e sobrevivência de células e migração celular em resposta a

fatores de crescimento e citocinas, além de uma resposta inflamatória e angiogênica (GROSE 2004).

Após a fase inicial onde as células transformadas ocorrem e a resposta imune inata é desencadeada, a persistência de células tumorais viáveis pode gerar uma resposta imune adaptativa onde a estimulação constante do sistema imune induza o aumento da produção de mediadores e células que favoreçam a angiogênese, como os mediadores inflamatórios. Ainda, a resposta imune pode gerar fenótipos tumorais mais adaptados ao meio ambiente. Em adição, a utilização de drogas anti-neoplásicas, como a cisplatina, que provoquem necrose e apoptose de células tumorais exercem também uma pressão seletiva, além de aumentar a antigenicidade tumoral ao sistema imune, e consequentemente o aumento da produção de citocinas inflamatórias. Dessa forma, é importante buscar moléculas presentes no microambiente que desempenhem papéis multifuncionais e sejam importantes ao sucesso do estabelecimento tumoral, que tenham a capacidade de modular resposta inflamatória inata e adaptativa.

A galectina-3 (gal-3), uma proteína pleiotrópica é portadora de tais qualidades sendo capaz de contribuir ao sucesso adaptativo tumoral em condições de estresse oxidativo do micro-ambiente, na diferenciação de células endoteliais na angiogênese, como moduladora nos processos imunes fisiológicos e patológicos (NEWLACZYL e YU 2011).

1.4 GALECTINAS

Diferentes processos biológicos dependem da interação fisiológica entre lectinas e carboidratos, tais como o reconhecimento de patógenos por células do sistema imune inato, as interações célula-célula e célula-matriz extracelular e os processos de migração e proliferação celular (GABIUS e WU 2006).

As galectinas (Figura 1) são proteínas da família das lectinas e apresentam afinidade primária a β -galactosídeos. Os membros dessa família possuem um domínio de ligação a carboidratos (*carbohydrat recognition domain*, CRD) (DUMIC *et al.* 2006). Dentre as galectinas mais estudadas destacam-se as galectinas-1 e -3.

Figura 1- Esquema representativo da estrutura dos diferentes membros da família das galectinas. As galectinas podem ser subdivididas em três grupos: as galectinas protótipos (contêm um domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) e podem formar homodímeros), galectinas tipo repetição em série (contêm dois CRDs distintos conectados por um ligante de até 70 aminoácidos e são altamente bivalentes) e o único tipo quimérico (consiste em repetição em série incomum com trechos curtos de prolina e rica em glicina fundidos no CRD, sofrem alterações conformacionais que permitem a sua oligomerização em pentâmeros). Adaptada de Rabinovich e Toscano (Nat Rev Immunol. 2009;9(5):338-52)

Evidências experimentais mostraram a participação dessas lectinas em importantes processos biológicos tais como adesão celular, proliferação, morte,

embriogênese, inflamação, transformação maligna e subsequentes etapas do processo de progressão tumoral (Figura 2) (DUMIC *et al.* 2006).

Figura 2. Os papéis das galectinas. As galectinas podem ter papéis importantes nos diferentes passos do processo tumorigênico, incluindo transformação da célula tumoral, regulação do ciclo celular e apoptose. **a.** Galectina-1 e -3 podem mediar a transformação neoplásica por interagir com oncogenes, como Ras (HRAS e KRAS). **b.** Galectinas também podem controlar a progressão tumoral por modular a progressão do ciclo celular. Galectina-3 regula os níveis de reguladores do ciclo celular como ciclina A, E e D, assim como de inibidores do ciclo celular como p21 e p27. **c.** Galectinas regulam a apoptose. Galectina-1 e -9 podem induzir a apoptose da célula tumoral quando adicionada exogenamente à celular. Gal-7 e -12 promovem apoptose por mecanismos intracelulares. Gal-3 possui funções anti-apoptóticas e é translocada para a membrana perinuclear e para a mitocôndria nas células expostas a estímulos apoptóticos. Os efeitos da gal-3 na regulação da apoptose dependem da sua localização subcelular (gal-3 citoplasmática é anti-apoptótica e nuclear é pró-apoptótica). Figura adaptada de Liu FT e Rabinovich GA. (Nat Rev Cancer. 2005).

Em melanomas, a gal-3 pode estar envolvida no crescimento e na progressão desse tipo tumoral, uma vez que modula a expressão do fator de transcrição NFAT1 e regula a expressão de autotaxina. Dessa forma, autotaxina estimula angiogênese, crescimento tumoral e metástase, uma vez que o silenciamento de gal-3 resultou em diminuição de NFAT1, expressão de autotaxina e crescimento tumoral (BRAEUER *et al.* 2012). Já a expressão de gal-1 pelas células tumorais e endoteliais parece estar envolvida na resistência de células de melanoma à radioterapia e quimioterapia por modular diretamente a angiogênese, assim como as células imunossupressoras no microambiente do tumor (LEFRANC *et al.* 2011; MATHIEU *et al.* 2012).

A gal-3 pode atuar como uma molécula anti- ou pró-apoptótica, o que depende da sua localização celular (DUMIC *et al.* 2006, LARSEN *et al.* ,2011). Radosavljevic e colaboradores (2012) sugeriram seu envolvimento nos processos pro-inflamatórios, como promotor de ativação de células mononucleares, linfócitos T, células natural killer e células dendríticas e na secreção de citocinas. A expressão dessa proteína pode facilitar a metástase de melanomas por afetar a adesão celular e modular a resposta imune antitumoral, em particular a imunidade inata (RADOSAVLJEVIC *et al.* 2012). Pietro e colaboradores (2006) mostraram que nos melanócitos há acúmulo de gal-3 ao longo da progressão tumoral.

A gal-3 intracelular pode induzir a expressão de genes associados à progressão tumoral. No meio extracelular pode aumentar o fenótipo migratório por ligar a integrinas na superfície celular e a proteínas da matriz extracelular como elastinas. Além disso, pode reduzir a atividade dos linfócitos associados

ao tumor por inibir a dimerização do receptor de células T com CD4 ou CD8, o que reduz a secreção de IL-2, IFN γ e TNF no microambiente tumoral. As galectinas se ligam a CD45 e induzem apoptose de células T contribuindo ao escape do sistema imune. A gal-3 também pode aumentar a metástase ao ligar no endotélio vascular e promover o extravasamento das células tumorais a órgãos distantes assim como inibindo a ativação das células T anti-tumorais (BRAEUER *et al.*2006).

1.5 GALECTINA-1, -3 E ANGIOGÊNESE

A angiogênese representa um passo fundamental na tumorigênese porque fornece ao tumor oxigênio e nutrientes necessários para o seu rápido crescimento. A angiogênese associada ao tumor é resultado da ação de diferentes citocinas e fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), produzido por vários tipos celulares presentes no microambiente do tumor (WATNICK, 2012).

A estrutura vascular complexa permite o transporte de moléculas e células dentro do organismo. Essa infraestrutura é composta pelas células endoteliais (CE), que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos. Estas células atuam como uma barreira semipermeável e controlam a transferência de moléculas e células da circulação para o tecido adjacente e vice-versa. Além disso, o endotélio contribui para diferentes processos fisiológicos, como coagulação,

inflamação e angiogênese (GRIFFIOEN e MOLEMA 2000). Para iniciar o crescimento de novos vasos sanguíneos, as CEs são ativadas, desencadeando uma cascata de atividades celulares rigidamente regulada, incluindo degradação da matriz extracelular, proliferação, migração, e formação do tubo. Uma vez que novos vasos foram formados o processo de angiogênese termina com a deposição de uma nova matriz extracelular, atração de pericitos (células indiferenciadas, de origem mesenquimal), para estabilização dos vasos e um retorno para o fenótipo de CE quiescente (POTENTE *et al.* 2011).

A angiogênese tumoral é considerada uma etapa essencial para o desenvolvimento do câncer e, com isso, um alvo para a sua terapia (GRIFFIOEN e MOLEMA 2000, HANAHAN e WEINBERG 2011, CARMELIET e JAIN 2011). Para induzir a angiogênese no tumor, as células tumorais que estão sob estresse metabólico passam por um switch angiogênico que resulta no aumento da expressão e liberação de fatores estimulatórios e de crescimento (GRIFFIOEN e MOLEMA 2000, CARMELIET e JAIN 2011). Recentemente, tornou-se evidente que as galectinas podem contribuir para a ativação das CEs, bem como para outras etapas da cascata angiogênica. Dessa forma, as galectinas se tornaram um potencial alvo nas terapias angiogênicas tumorais (THIJISSEN *et al.* 2013).

As CEs expressam principalmente galectinas-1, -3, -8 e -9 (THIJISSEN *et al.* 2008). Essas galectinas podem ser encontradas na superfície celular, no citoplasma e até mesmo no núcleo da CE (THIJISSEN *et al.* 2008, DELGADO *et al.* 2011). A expressão e a localização das galectinas dependem do status de ativação da CE, bem como do contexto do microambiente onde essas células

residem (THIJISSEN *et al.* 2008). Portanto, a expressão das galectinas nos vasos tumorais é muitas vezes diferente em comparação com os vasos de tecidos normais. Como exemplo, já foi descrito aumento da expressão endotelial de gal-1 em câncer de próstata (CLAUSSE *et al.* 1999, LADERACH *et al.* 2013), pulmão (LOTAN *et al.* 1994), boca (HSIEH *et al.* 2008) e cólon (THIJISSEN *et al.* 2006, 2008). Expressão endotelial aberrante de gal-3 também foi encontrada em diferentes tumores incluindo mama (MOISA *et al.* 2007), cabeça e pescoço (LOTAN *et al.* 1994), pulmão (LOTAN *et al.* 1994) e cólon (THIJISSEN *et al.* 2008).

O primeiro passo na cascata angiogênica é a ativação da CE quiescente, mediada por diferentes fatores como VEGF, EGF e bFGF, que se ligam à superfície da célula disparando suas vias de sinalização. Galectinas foram mostradas como facilitadoras dessa sinalização tanto extracelular como intracelularmente (COMPAGNO *et al.* 2014). Na superfície celular, as galectinas podem melhorar ou prolongar a sinalização por mediação de interações entre receptores ou dificultando a absorção de receptores (HSIEH *et al.* 2008, D'HAENE *et al.* 2013, MARKOWSKA *et al.* 2010, 2011).

Um recente estudo mostrou que galectina-1 estimula a sinalização de VEGFR2 mesmo na ausência do seu ligante (CROCI *et al.* 2014) confirmando conclusões anteriores de que gal-1 podem agir por si só como um fator pro-angiogênico (THIJISSEN *et al.* 2010). Curiosamente, as funções extracelulares escritas acima são, em sua maioria, dependentes de glicanos enquanto intracelularmente as galectinas pode se envolver em interações diretas proteína-proteína para facilitar as etapas da sua sinalização (BELANIS *et al.*

2008). Por exemplo, gal-1 aumenta a sinalização através de interações com H-Ras enquanto gal-3 direciona sinalizando a jusante de K-Ras (ELAD-SFADIA *et al.* 2002, 2004).

A ativação da CE por fatores de crescimento resulta em aumento da proliferação celular. Por induzir ou manter esse perfil a ativação de galectinas contribuem diretamente para a regulação da proliferação da CE. Pesquisas mostraram que gal-1 e gal-3 podem induzir proliferação de CE (THIJISSEN *et al.* 2010, D'HAENE *et al.* 2013) e quando há interferência na expressão ou na função de gal-1 pode resultar em menores taxas de proliferação celular (THIJISSEN *et al.* 2006, CROCI *et al.* 2012). Por outro lado, os efeitos na proliferação parecem ser dependentes da concentração e do tipo de célula porque nem todas CEs respondem igualmente a gal-1 ou gal-3 (D'HAENE *et al.* 2013), enquanto que a alta concentração de galectinas exógenas podem inibir o crescimento das CEs (THIJISSEN *et al.* 2010).

Uma vez ativada, a CE tem que migrar para a região onde ocorreu o estímulo angiogênico. Isto requer interação contínua com as células do microambiente. As galectinas estão envolvidas nessas interações modulando a migração das CEs. Pesquisas mostram que gal-1 exógena promove a migração enquanto que o bloqueio de gal-1 reduz a capacidade migratória (THIJISSEN *et al.* 2006, 2010, CROCI *et al.* 2012, HSIEH *et al.* 2008). Também mostraram que gal-1 modula a adesão da CE aos componentes da matriz como laminina e fibronectina (HSIEH *et al.* 2008). Além disso, gal-3 modula a migração, servindo como um quimiotático exógeno (MARKOWSKA *et al.* 2010, NANGIA-MAKKER *et al.* 2002, 2010). A atividade de gal-3 parece

principalmente envolver a estimulação de sinalizações pro-migratórias através de complexos com integrina $\alpha\beta3$, estimular integrina com atividade da quinase, ou manter a sinalização do receptor de VEGF (D'HAENE *et al.* 2013, MARKOWSKA *et al.* 2010, WESLEY *et al.* 2013).

A gal-3 extracelular se liga aos ligantes de glicol na superfície celular ou na matriz extracelular e participa de vários processos biológicos, incluindo angiogênese e metástase (Liu 2005, Makker Nangia 2000). A angiogênese mediada por gal-3 ocorre por sua interação com as integrinas e os glicanos expressos por moléculas de superfície celular (Fukushi, 2004). Isto leva a modulação angiogênica via fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Markowska, 2010). A interação de gal-3 com as células endoteliais pode regular a vascularização endotelial em estágios iniciais de angiogênese (Yang *et al.*, 2007).

Migração e proliferação celular são características importantes durante a angiogênese. No entanto, funções mais específicas das CEs envolvem a capacidade de formar estruturas tubulares em matrizes 2D e 3D. Há ampla evidência de que as galectinas estão envolvidas na regulação de ambos processos. Por exemplo, CE isolada de camundongos knockouts para gal-1 mostraram dificuldade na formação de tubos em matrigel (MATHIEU *et al.* 2012). Enquanto esses resultados sugerem que as CEs precisam de gal-1 para a formação do tubo, Le Mercier e colaboradores (2008) não relataram nenhuma diferença na formação de tubos entre HUVEC normal e HUVEC transfectadas com siRNA anti-gal-1 (LE MERCIER *et al.* 2008). Provavelmente, esta discrepância está relacionada com o grau de silenciamento da expressão de

gal-1. Além disso, Croci e colaboradores (2012) mostraram que gal-1 secretada pelas células de sarcoma de Kaposi pode regular a formação de tubo na linhagem celular HUVEC (CROCI *et al.* 2012). A formação de tubo mediada por gal-1 pode ser neutralizada pela lactose, bem como por um anticorpo anti-gal-1 (CROCI *et al.* 2012). D'haene e colaboradores (2013) também observaram aumento na formação de tubos na presença de gal-3 (D'HAENE *et al.* 2013), confirmando achados anteriores de Markowska e colaboradores (MARKOWSKA *et al.* 2010, 2011) e Nangia-Makker e colaboradores (2008) que também encontraram aumento da atividade formadora de tubo de CEs em resposta a gal-3 (NANGIA-MAKKER *et al.* 2002, 2008, 2010).

Além disso, o knockdown de expressão de gal-3 resultou em redução de capacidade de formação de tubo (MARKOWSKA *et al.* 2010), dificultando a produção de novos vasos (MARKOWSKA *et al.* 2011). Semelhante a gal-1, a função estimulatória de gal-3 parece ser diretamente relacionada com a sinalização de VEGF (D'HAENE *et al.* 2013, MARKOWSKA *et al.* 2010, 2011).

Markowska e colaboradores (2010) mostraram que gal-3 atua como o mediador da resposta angiogênica via VEGF e bFGF. Através do silenciamento da gal-3 por siRNA foi observada redução da resposta angiogênica via VEGF e bFGF *in vitro* e *in vivo* em camundongos knockout para gal-3. Eles também mostraram que a interação entre gal-3 e os complexos N-glicanos das integrinas desempenha um papel na angiogênese mediada por gal-3. Com efeito, estes pesquisadores observaram em um ensaio de micropocket de córnea em camundongos que a angiogênese mediada por VEGF e bFGF foi reduzida nos camundongos KO. Além disso, a formação de clusters

VEGFR2+ gerados por gal-3 devem potencializar os efeitos da sinalização em células endoteliais (Markowska, 2011).

O aumento de gal-3 no soro de pacientes com câncer está envolvido com aumento da adesão de células metastáticas em células endoteliais (Zhao 2009). Gal-3 interage diretamente com os lipídios de membrana celular e penetra espontaneamente na bicamada lipídica de lipossomas em ambas as direções (Lepur 2012). Gao e colaboradores (2012), investigaram sobre a interação de gal-3 com as células endoteliais vasculares, mostrando que gal-3 era endocitada por células da linhagem celular HUVECs.

Além disso, gal-3 é capaz de estimular diretamente a tubulogênese dependente de VEGF nas linhagens celulares HUVECs. Gal-3 secretado pelas células de câncer de mama atua como um fator pro-angiogênico pela indução de VEGF e tubulogênese tumoral. LGALS3BP (lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein) induz a expressão de VEGF em células de câncer de mama humano pela ativação da via PI3K/AKT. Gal-3 recombinante atua diretamente em células endoteliais, promove angiogênese *in vitro* e *in vivo* de uma forma independente de VEGF e dependente de gal-3 (Piccolo 2013).

Um estudo recente no nosso grupo mostrou que a ausência de gal-3 no estroma e parênquima diminui a vasculogênese, interferindo na resposta dos macrófagos por sinalização interdependente das vias de VEGF e TGF β 1. O microambiente tumoral ausente de gal-3 apresenta diminuição de áreas vasculares funcionais, acompanhado de aumento de áreas de necrose. Corroborando nossos resultados histopatológicos, a secreção de VEGF foi reduzida na ausência de gal-3. Nesse cenário, o desenvolvimento de um tumor

menor tem uma baixa expressão de VEGF e VEGFR2 e de sua forma fosforilada. Também observamos aumento da expressão de TGFb1 em tumores inoculados com células de melanoma que não expressam gal-3 em camundongos tanto WT quanto knockouts para gal-3. *In vitro*, células de melanoma, expressando gal-3 secretam mais VEGF do que as células que não expressam gal-3. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos WT secretam mais VEGF do que as mesmas células derivadas de camundongos gal-3 KO. Além disso, os macrófagos derivados de camundongos WT respondem a TGFb1 com aumento de VEGF e secreção de gal-3 e células que não expressam gal-3 são menos responsivas ao estímulo TGFb1 com aumento modesto de VEGF (Machado, 2014).

A secreção de VEGF pelas células do tumor ou por monócitos/macrófagos pode ser a chave para a mediação da angiogênese, favorecendo o crescimento do tumor. Nós hipotetizamos que a gal-3 do parênquima do tumor ou do estroma poderia melhorar a sinalização de VEGF por aumentar a migração de macrófagos e angiogênese. Fato que leva ao aumento da sinalização de TGFb1 e aumenta a produção de VEGF. Assim, gal-3 poderia aumentar a secreção de citocinas pelos macrófagos no microambiente do tumor devido à presença de TGFb1 e em troca, haveria maior produção de VEGF (Machado, 2014)

Todas essas descobertas mostram que gal-1 e gal-3 estão envolvidas na indução e manutenção da angiogênese tumoral durante o crescimento tumoral. No entanto, o papel dessas galectinas como reguladores vasculogênicos *in vivo* ainda não foi inteiramente estudado. Desvendar esses mecanismos

envolvidos entre as galectinas e o crescimento tumoral são desafios para desvendar possíveis alvos no tratamento do câncer.

1.6 RECEPTORES TOLL-LIKE E PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88

Um dos mecanismos envolvendo as galectinas e o crescimento tumoral se relaciona aos receptores toll-like e sua sinalização no microambiente tumoral. As galectinas podem funcionar como DAMPs (damage-associated molecular patterns), sendo reconhecidas pelos receptores toll-like presentes em macrófagos no microambiente tumoral (SATO *et al.* 2009).

Os receptores toll-like (TLRs) pertencem a uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões moleculares conservados de origem microbiana conhecidos por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) (SRIKRISHNA e FREEZE, 2009, GALLI *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2011). Os TLRs possuem um papel fundamental na reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (AKIRA e TAKEDA, 2004, GALLI *et al.*, 2010). Neste contexto, os ligantes de TLRs podem ser derivados microbianos ou hospedeiros endógenos (TAKEDA *et al.*, 2003, GALLI *et al.*, 2010).

A sinalização dos TLRs induz a ativação dos genes de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas

adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador. A transdução de sinais dos TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, as quais desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs), proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular (ERKs) e os fatores regulatórios de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7). Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do NF- κ B e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF- α e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (AKIRA e TAKEDA 2004; GALLI *et al.* 2010).

O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs estimula o recrutamento de proteínas adaptadoras que possuem domínios TIR (domínio toll/IL1R) em sua estrutura para interagir com o domínio TIR intracelular dos TLRs (Figura 3). A proteína MyD88 é utilizada por todos os TLRs, a exceção do TLR3, e ativa NF- κ B e as vias das MAPKs para induzir a produção de citocinas inflamatórias. Assim, a sinalização dos TLRs pode ser classificada de duas formas: via dependente de MyD88 (via canônica) para a produção de citocinas inflamatórias e via dependente de TRIF (via não-canônica) para a produção de interferon (AKIRA e TAKEDA, 2004).

Os TLRs foram, inicialmente, identificados somente em células imunes e epiteliais, contudo estudos recentes demonstraram que estes receptores também são expressos em algumas células tumorais, sendo que essa

expressão está relacionada à carcinogênese (RAKOFF-NAHOUM e MEDZHITOV, 2009; GALLI *et al.*, 2010).

Nature Reviews | Immunology

Figura 3. Via de sinalização dos receptores toll-like. A sinalização via proteína adaptadora MyD88 é usada por TLR1, -2, -4, -5, -6, -7 e -9 e libera NF-κB ao núcleo e induz a expressão de citocinas inflamatórias. Uma segunda proteína adaptadora TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) está envolvida na via de sinalização dependente de MyD88 através de TLR2 e -4. Um terceiro adaptador é TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFNβ) é essencial para a via independente de MyD88. Figura adaptada de Akira e Takeda (Nat Rev Immunol 2004)

2 JUSTIFICATIVA

Como o melanoma apresenta-se resistente a abordagens terapêuticas, a compreensão dos mecanismos envolvidos na quimiorresistência e a identificação de moléculas que atuem conferindo resistência à quimioterapia são fundamentais para inovações que visem a melhoria do tratamento. Em nosso grupo foram demonstradas evidências do papel da gal-3 na adaptação tumoral frente ao tratamento quimioterápico. Entretanto, o papel exato da gal-3 no microambiente tumoral enquanto atenuadora da resposta ao tratamento ainda não está estabelecido. Assim, o presente estudo visa entender os mecanismos envolvidos no crescimento tumoral via envolvimento das galectinas e os receptores toll-like. Buscando, dessa forma, alternativas aditivas à terapêutica contribuindo ao combate do melanoma maligno.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os mecanismos da resposta tumoral diferencial frente à inibição de galectinas em camundongos *wild-type* e camundongos *knockout* para o gene MyD88, inoculados com células de melanoma murino, TM1M e B16F10, em relação à angiogênese e resposta imune.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da inibição funcional das galectinas no crescimento de melanomas murinos, bem como o envolvimento da proteína adaptadora MyD88 na ação das galectinas no microambiente tumoral.
- Determinar a fração de vasos sanguíneos no microambiente tumoral na vigência do tratamento com os inibidores funcionais de galectinas;
- Avaliar a população de macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos WT, MyD88KO e gal-3KO frente à polarização fenotípica M1 e M2 e tratamento com os inibidores funcionais de galectinas.
- Investigar o crescimento tumoral em camundongos Balb/c nude frente ao tratamento diário com os inibidores funcionais de galectinas, inoculados com células de melanoma murino TM1M e B16F10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

Linhagens de melanoma murino, TM1M e B16F10 foram utilizadas para a indução do melanoma nos modelos animais. Essas linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 da Sigma Aldrich®, pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), para B16F10 e 5% de SFB para TM1M (Cultilab®), 25mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e Bicarbonato de Sódio 25mM. As culturas celulares foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida de ar e 5% de CO₂. O deslocamento das células para posterior contagem e subcultivo foi feito por curta exposição a PBS-EDTA e Tripsina (Gibco®).

4.2 INIBIDORES FUNCIONAIS DE GALECTINAS

Os inibidores funcionais de galectinas foram cedidos pelo laboratório Galectin Therapeutics®. O inibidor Davanat™ (GM-CT-01) é um polímero de polissacarídeos linear derivado de galactomananas, composto por manose e galactose. Estudos estruturais mostraram que Davanat™ se liga a múltiplos sítios nas moléculas de gal-1 e gal-3 incluindo os domínios de reconhecimento

a carboidratos e de dimerização, no entanto, apresenta maior afinidade por gal-1 (Miller et. al. 2009). Devido ao seu alto peso molecular, Davanat™ se liga primariamente às galectinas extracelulares. O inibidor GR-MD-02 é um polímero de polissacarídeos *galactoarabino-rhamnogalacturonan* composto predominantemente de ácido galacturônico, galactose, arabinose, rhamnose e alguns açúcares. Estudos estruturais mostraram que GR-MD-02 também se liga a gal-1 (Miller et. al. 2009) e gal-3 (dados não publicados), apresentando alta afinidade por gal-3 (gal-3 > gal-1). Assim como o Davanat™, GR-MD-02 se liga às galectinas extracelulares (Miller et. al. 2009).

4.3 IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

As células de melanoma murino, TM1M e B16F10, foram inoculadas subcutaneamente (2×10^5 células/animal) em camundongos C57/Bl6 machos. Após aparecimento do tumor, o volume foi determinado através da aproximação do formato tumoral à figura de uma elipse (volume tumoral = $0,52 \times D \times d^2$, onde D é o diâmetro maior e d o diâmetro menor da massa tumoral). O crescimento dos tumores foi acompanhado diariamente e após o período de tratamento os animais foram sacrificados e os tumores removidos cirurgicamente. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina-USP sob número 237/11 em 22/06/2011.

Os animais foram divididos em três grupos. No primeiro, grupo controle, receberam diariamente PBS i.p. No segundo, grupo inibidor, os animais receberam tratamento diário com Davanat™ i.p., 30mg/kg. No terceiro, grupo inibidor, os animais receberam tratamento diário com GR-MD-02 i.p., 30mg/kg. O tratamento foi iniciado quando o tumor foi detectável e terminou quando o tumor atingiu aproximadamente 1,5cm³ de volume.

Os tumores retirados cirurgicamente dos camundongos foram encaminhados para análise histológica e proteica.

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL

Os fragmentos tumorais removidos cirurgicamente ao final dos tratamentos descritos anteriormente foram fixados em parafina. Os cortes dos tecidos em parafina foram feitos no micrótomo e foram armazenados para posterior análise por imunohistoquímica. A análise do microambiente tumoral feita com a coloração por hematoxilina e eosina permitiu a visualização e quantificação das áreas necróticas e das áreas vasculares presentes nas áreas viáveis dos tecidos analisados.

4.5 EXTRAÇÃO PROTEICA

Os fragmentos tumorais removidos cirurgicamente foram armazenados em freezer -80°C em tampão de extração proteica NP40 (Life Technologies®). Em seguida foi realizada a extração proteica. Os fragmentos tumorais em tampão de extração proteica foram sonicados em sonicador (Sonic Dismembrator Model 100, Fisher Scientific®) e mantidos em gelo por 30 minutos. Após esse tempo foram centrifugados a 13000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante corresponde ao extrato proteico total. Em seguida foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método do BCA.

4.6 MULTIPLEX DE CITOCINAS

Para determinar o perfil de citocinas no microambiente tumoral utilizamos o equipamento Luminex™ e o kit Mouse cytokine 10-plex panel (Invitrogen cat. LMC0001). O procedimento experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo original pode ser obtido pelo site: www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/LMC0001. Com esse kit podemos avaliar 10 citocinas diferentes (IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-12, GM-CSF, IL-5, IFN γ , TNF α , IL-2 e IL-4) em uma pequena quantidade de amostra.

Os reagentes e as amostras devem ser mantidos à temperatura ambiente antes do uso. As proteínas da curva padrão foram reconstituídas com uma hora de antecedência do experimento em 1mL de 50%Assay buffer / 50%RPML+10%SFB. Após centrifugação de 10 minutos a 1500rpm, as amostras a serem analisadas foram pipetadas em uma placa com filtro de 96 poços (fornecida pelo kit) previamente preparada com o mix de beads dos anticorpos para cada citocina e foram mantidas sob incubação de duas horas. Após esse período foi adicionado o mix de anticorpos biotinilados seguido de uma segunda incubação de uma hora. Posteriormente foi adicionado a streptavidina conjugada a peroxidase e terceira incubação por 30 minutos. Antes de todas as incubações foram feitas lavagens com a solução de lavagem e as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação. Após a incubação com a streptavidina e três lavagens a placa pôde ser lida na plataforma do Luminex™ de acordo com as especificações do fabricante.

4.7 ELISA PARA VEGF

Foi utilizado o kit Mouse VEGF Elisa development kit (PeProtech 900-K99, lot#0608099), seguindo o protocolo do fabricante.

Para preparar a placa, diluímos o anticorpo de captura em PBS 1X para concentração de 1,0µg/mL e imediatamente pipetamos 100µL em cada poço da placa, posteriormente selamos a placa e incubamos overnight à temperatura

ambiente. No dia seguinte, aspiramos os poços para remover todo o líquido e lavamos 4 vezes usando 300µL de Wash buffer por poço. Após lavar, removemos o resíduo de tampão invertendo a placa e apoiando em papel absorvente. Em seguida, adicionamos 300µL de Block buffer em cada poço e incubamos por 1 hora à temperatura ambiente. A curva padrão de VEGF contém as concentrações de 1,5ng/mL, 0,75ng/mL, 0,375ng/mL, 0,1875ng/mL, 0,09375ng/mL, 0,046875ng/mL e zero. Assim, adicionamos imediatamente 100µL de cada padrão ou da amostra em cada poço em triplicata e incubamos por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, aspiramos e lavamos 4 vezes usando 300µL de Wash buffer por poço. O anticorpo de detecção foi diluído no diluente para concentração de 0,5µg/mL. Adicionamos 100µL por poço e incubamos por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, aspiramos e lavamos 4 vezes usando 300µL de Wash buffer por poço. Diluímos 5,5µL de avidin-HRP conjugate no diluente para um total de 11µL e adicionamos 100µL por poço e incubamos por 30 minutos à temperatura ambiente. Aspiramos e lavamos 4 vezes usando 300µL de Wash buffer por poço. Para a revelar, adicionamos 50µL por poço da solução OPD (0,003g de OPD em 1mL citrato fosfato + 1µL H₂O₂) e deixamos por 5 minutos (até corar os poços). Para parar a reação acrescentamos 50µL de ácido sulfúrico 2M e lemos a placa no espectrofotômetro com o filtro de 490nm.

4.8 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS

Os macrófagos derivados da medula óssea são macrófagos primários (BMDM), derivados de células da medula óssea cultivadas in vitro na presença de fatores de crescimento. O fator estimulante de macrófagos (M-CSF) é uma linhagem específica de fatores de crescimento que são responsáveis pela proliferação e diferenciação de progenitores mielóides em linhagens celulares de macrófagos/monócitos.

Nesse protocolo, células da medula óssea foram cultivadas em placas de cultura na presença de M-CSF, que é secretado pela célula L929 e é usado na forma de meio condicionado da L929. Sob essas condições, os monócitos/macrófagos progenitores proliferaram e diferenciam em populações homólogas de BMDMs maduros. A eficiência da diferenciação é determinada pela análise por citometria de fluxo pela expressão de F4/80 e CD11b. Uma vez diferenciados, os BMDMs podem ser utilizados para diversos procedimentos experimentais, incluindo morfologia, expressão gênica e estudos fisiológicos. Todo o procedimento é realizado dentro de uma cabine de fluxo laminar. O primeiro passo é selecionar o número de animais necessários (1 animal = 2 fêmures; 1 fêmur = 2 placas; 1 placa = 10^7 macrófagos). Em seguida os animais são eutanasiados e lavados com álcool 70%. Deve-se divulsionar a pele da pata do animal para expor totalmente o músculo das patas e retirar as duas patas traseiras do animal com cuidado para não

danificar os ossos. Os ossos devem ser limpos, retirando todos os músculos e tendões com o auxílio da pinça, tesoura ou bisturi. Em seguida, passar os ossos em álcool 70% e colocá-los em PBS. Com muito cuidado pegar o osso com a pinça e cortar as epífises e injetar o meio RPMI no interior do osso até a medula sair e o osso ficar translúcido. Colocar em tubo falcon de 50mL e manter no gelo. Para cada animal (2 fêmeas) plaquear o lavado da medula em 4 placas de 100mm (em R15/30 – RPMI 15%SFB 30%sobrenadante da linhagem celular L929). Dois dias após o plaqueamento, no fluxo laminar, colocar mais 10mL de meio R15/30 nas placas (não remover o meio anterior, somente acrescentar). No sexto dia após a extração da medula óssea, aspirar o meio das placas e lavá-las com 10mL de PBS estéril e gelado aquecido, aspirar e lavar novamente com 10mL de PBS aquecido. Adicionar 10mL de PBS gelado em cada placa e colocá-las no gelo por 10 minutos. Com isso, as células se soltam da placa, caso necessário, pipete repetidamente o PBS para soltar as células que ainda estiverem aderidas, adicione mais 10mL de PBS gelado e lave a placa. Retirar as células das placas, colocá-las em tubo de fundo cônico de 50mL. Contar as células em câmara de Neubauer. Centrifugá-las a 1200rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em meio RPMI no volume necessário para plaquear.

Após soltar as células, separar no mínimo 1×10^5 células para realizar a fenotipagem das células aderentes. Após centrifugar, ressuspender o pellet em PBS 1%SFB inativado 0,02% azida sódica para que a cada 100uL pipetado tenhamos 1×10^5 células e pipetar 100uL em cada eppendorf. Adicionar os anticorpos nos eppendorfs diretamente nesses 100uL. Adicionar os anticorpos

e incubar por 45 minutos no gelo (anti-F4/80-PE e seu controle de isotipo (rat-IgG2a-PE) na concentração 0,0025mg/mL em PBS 1%SFB inativado 0,02% azida sódica. E anti-CD11b-FITC e seu controle de isotipo (rat-IgG2b-FITC) na concentração 0,005mg/mL em PBS 1%SFB inativado 0,02% azida sódica). Lavar com 1mL de PBS 1%SFB inativado 0,02% azida sódica e centrifugar a 1200rpm por 5 minutos. Ressuspender em 200uL da solução anterior e analisar no citômetro de fluxo a porcentagem de células duplo positivas (CD11b + F4/80) que deve ser maior que 90%.

4.9 MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS E POLARIZAÇÃO PARA M1 E M2

Após a extração de macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos e sua fenotipagem, os BMDMs foram plaqueados em placa de 6 poços contendo 1×10^6 células por poço em RPMI 1640 da Sigma Aldrich®, pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e Bicarbonato de Sódio 25mM. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida de ar e 5% de CO₂. Após 24h do plaqueamento foram tratados com 1µg/mL de LPS (Sigma Aldrich®) e 50ng/mL de IFNγ (R&D System®) para polarização M1 ou 50ng/mL de IL-4 (R&D System®) para polarização M2.

Os tratamentos com o inibidor funcional de galectinas, Davanat™, foram iniciados após 24h de polarização. O meio de cultura contendo os estímulos de polarização foi trocado e substituído pelo mesmo meio de cultura porém com concentrações diferentes do inibidor Davanat™. Foram utilizadas três concentrações diferentes do inibidor 4µg/mL, 20µg/mL e 100µg/mL. Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -20°C para posterior análise por Elisa e foi extraído RNA das células aderidas por Trizol (Invitrogen®) para posterior análise por PCR quantitativa em tempo real.

4.10 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA total das amostras foi feita com Trizol Reagent (Invitrogen®), segundo o protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em 1,0 mL de Trizol (1,0 mL de Trizol para 5 a 10x10⁶ células) e incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, o RNA total foi extraído adicionando-se 200µL de clorofórmio (Merk®). Após incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos, sendo a fase superior transferida para outro tubo RNase free. O RNA foi precipitado com 500µL de álcool isopropílico (Sigma®) e, decorridos 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas. O pellet de RNA foi lavado com 1,0 mL de etanol 75%, seguido de uma centrifugação a 7.500g por 5 minutos. O

sobrenadante foi desprezado e o RNA foi ressuspendido em água livre de DNase e RNase. O RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e analisado em gel de agarose.

4.11 TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA obtido foi convertido em cDNA por reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies®) sendo cada reação preparada em um volume final de 20 µL. Inicialmente, 2 µg de RNA, 10µL de 2X RT Buffer, 1µL 20X Enzyme Mix. As amostras foram incubadas em termociclador a 37°C por 60 minutos, 95°C por 5 minutos e resfriadas a 4°C.

4.12 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Para análise de expressão gênica em tempo real foi utilizada a metodologia do SYBR® Green. Para a reação foram utilizados 6,25µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Life Technologies®), que já contém os reagentes necessários para a reação, 1µL de cDNA, o volume específico para cada par de *primer* e água ultrapura GIBCO® suficiente para um volume final de 12,5 µL por reação. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo

com as instruções do fabricante (Applied Biosystems 7500). Foram avaliadas as expressões dos genes que diferenciam a polarização fenotípica dos macrófagos M1 [iNOS (Left CAG GAA CCT ACC AGC TCA CTC T e Right ATG TGC TGA AAC ATT TCC TGT G) e IL1 β (Left TGG GAT CCT CTC CAG CCA AGC TT e Right TCA GGA CAG CCC AGG TCA AAG G)] e M2 [PPAR γ (Left TGA TCG CAC TTT GGT ATT CTT G e Right CTT TGA CAT CAA GCC CTT TAC C) e MRC1 (Left TTT GCA AGC TTG TAG GAA GGA e Right CCA ATC CAC AGC TCA TCA TTT)] e a expressão de galectinas-3 (Left GAG AGT GGC AAA CCA TTC AAA e Right ACT GCA GTA GGT GAG CAT CGT)]. As eficiências para cada par de *primer* foram calculadas de acordo com a equação $E = 10^{-1/\text{slope}}$, onde o valor do *slope* foi obtido pelo *software* do equipamento após a análise da curva padrão. Cada amostra foi testada em duplicata e todas as quantificações foram normalizadas em relação a três controles endógenos [HPRT (Left AGG CCA GAC TTT GTT GGA TTT e Right GGC TTT GTA TTT GGC TTT TCC), RPLP13a (Left TCA CTG GTA ACG TCT CCA TCC e Right ACG CTT CTC AAA GCG ATT GTA) e β -actina (Left AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC e Right AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA)]. A expressão relativa foi calculada pelo método de comparação dos valores de CT (limiar de detecção), através do modelo matemático descrito por Pfaffl (2001). Todas as comparações foram feitas com o grupo macrófagos sem polarização e tratados com meio de cultura.DAP

4.13 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para análise da morfologia dos macrófagos derivados da medula óssea foi utilizada a metodologia de imunofluorescência em lâminula circular e marcação com faloidina (Life Technologies®) para visualizar as fibras de actina e DAPI (Sigma Aldrich®) como marcador nuclear. Foram plaqueadas 1×10^4 células em cada lâminula circular e cultivadas com meio RPMI 1640 da Sigma Aldrich®, pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e Bicarbonato de Sódio 25mM. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida de ar e 5% de CO₂. Após 24h do plaqueamento foram tratados com 1µg/mL de LPS (Sigma Aldrich®) e 50ng/mL de IFN γ (R&D System®) para polarização M1 ou 50ng/mL de IL-4 (R&D System®) para polarização M2. Os tratamentos com o inibidor funcional de galectinas, Davanat™, foram iniciados após 24h de polarização. O meio de cultura contendo os estímulos de polarização foi trocado e substituído pelo mesmo meio de cultura, porém com concentrações diferentes do inibidor Davanat™. Foram utilizadas três concentrações diferentes do inibidor 4µg/mL, 20µg/mL e 100µg/mL. Após 24h de tratamento, as lâminulas foram incubadas com faloidina e DAPI por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente montadas em lâminas de vidro com glicerol:PBS e vedadas com esmalte. As lâminulas foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, câmera digital DXM1200F.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 4.0 para o Windows, *GraphPad Software, San Diego California USA*. Os dados foram comparados e analisados com o auxílio de testes paramétricos (One-way ANOVA/Bonferroni e Two-way ANOVA). Foram consideradas como estatisticamente significantes as comparações cujo valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO TM1M:

5.1.1 ANIMAIS *WILD-TYPE* (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)

Para avaliar o papel das galectinas no crescimento tumoral de melanomas murinos utilizamos o inibidor funcional de galectinas Davanat™ (GM-CT-01), um polímero de polissacarídeos linear derivado de galactomananas, composto por manose e galactose. Estudos estruturais mostraram que Davanat™ se liga a múltiplos sítios tanto nas moléculas de gal-1 quanto nas de gal-3, incluindo os domínios de reconhecimento a carboidratos e de dimerização, no entanto, apresenta maior afinidade por gal-1. Devido ao seu alto peso molecular, Davanat™ se liga primariamente às galectinas extracelulares (Miller et. al. 2009).

Nesses experimentos com Davanat™ administrado diariamente foram realizados 3 experimentos independentes sendo o experimento representativo mostrado na Figura 4. Foram utilizados 8 camundongos wild-type (WT) divididos em 2 grupos de tratamento. Grupo controle (n=4), tratados intraperitonealmente (i.p.) com PBS diariamente e grupo Davanat (n=4), tratados i.p. com 30mg/kg de Davanat diariamente.

Nesses ensaios foi possível observar diferenças, estatisticamente significativas, no crescimento tumoral entre os animais estudados. Onde o crescimento tumoral foi maior no grupo PBS em comparação ao grupo inibidor de galectinas (Figura 4a). Os tumores desses animais foram processados para análise histológica e proteica. Dessas análises podemos observar um aumento de IL-6 (Figura 4b) e VEGF (Figura 4e) nos tumores dos animais os quais as galectinas foram inibidas quando comparados com os animais do grupo controle, respectivamente por multiplex de citocinas e Elisa. No entanto, não observamos diferença estatisticamente significativa na comparação de porcentagem de áreas necróticas e porcentagem de áreas vascularizadas (Figura 4c-d).

Crescimento tumoral – TM1M – inibidor galectinas – tratamento diário

a.

Multiplex citocinas

b.

VEGF

c.

Figura 4. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, DavanatTM, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino TM1M. **a.** Curva de crescimento tumoral, **curva azul**, grupo controle (n=4), PBS i.p. todos os dias, **curva verde**, grupo inibidor (n=4), 30mg/kg de DavanatTM i.p. todos os dias. **b.** Gráfico representativo da quantidade de citocinas/proteínas totais dos tumores estudados, por multiplex de citocinas. **c.** Gráfico representativo da quantificação de VEGF nos tumores estudados, por Elisa. **d.** Fotomicrografias representativas dos tumores analisados. **e.** Gráficos representativos da porcentagem de área necrótica e de área vascularizada, por coloração hematoxilina-eosina. Quantificação de 20 campos independentes de cada tumor feita pelo programa Image J. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Esses resultados de aumento de IL-6 e VEGF nos tumores dos camundongos tratados com Davanat podem ser relacionados ao grande volume tumoral no final do experimento (próximo a 3,0 cm³). Dessa forma, refizemos o experimento interrompendo-o quando o tumor atingiu 1,5 cm³ de volume (Figura 5). O comportamento frente ao tratamento com o inibidor de galectinas (DavanatTM) foi o mesmo. Os animais tratados com o inibidor apresentaram menor crescimento tumoral em comparação com o grupo controle, confirmando os dados obtidos anteriormente (Figura 4). Contudo, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre porcentagem de

áreas necróticas, porcentagem de áreas vascularizadas e na quantidade de VEGF tumoral (Figura 5).

Crescimento tumoral – TM1M – inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 5. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino TM1M. **a.** Curva de crescimento tumoral. **Curva preta:** grupo controle (n=6), PBS i.p. todos os dias. **Curva vermelha:** grupo inibidor (n=7), 30mg/kg de Davanat™ i.p. todos os dias. **b.** Fotomicrografias representativas dos tumores analisados. **c.** Gráficos representativos da porcentagem de área necrótica e de área vascularizada, por coloração hematoxilina-eosina. Quantificação de 20 campos independentes de cada tumor feita pelo programa Image J. **d.** Gráfico representativo da quantificação de VEGF nos tumores estudados, por Elisa. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

5.1.2 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)

MyD88 é uma proteína adaptadora que participa da sinalização de todos os receptores toll-like (TLRs), exceto TLR3. Essa proteína desencadeia uma cascata de eventos que resulta em regulação do metabolismo, organização do citoesqueleto, e sobrevivência celular. Alterações nessas sequências de eventos podem gerar respostas imunes inadequadas ou inapropriadas, e modificar o prognóstico de doenças, como o câncer.

Para avaliar o papel destes receptores no crescimento dos melanomas murinos e se as galectinas atuam no crescimento tumoral via TLRs, realizamos ensaios de crescimento tumoral em animais geneticamente deficientes da proteína MyD88. Observamos que os animais tratados com o inibidor de galectinas extracelular apresentam um crescimento tumoral superior ao grupo controle. Os tumores desses animais foram processados para análise histológica e proteica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas, áreas vascularizadas e quantidade de VEGF por Elisa (Figura 6).

Crescimento tumoral – TM1M – inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 6. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, DavanatTM, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino TM1M. **a.** Curva de crescimento tumoral. **Curva verde:** grupo controle (n=6), PBS i.p. todos os dias. **Curva azul:** grupo inibidor (n=8), 30mg/kg de DavanatTM i.p. todos os dias. **b.** Fotomicrografias representativas dos tumores analisados. **c.** Gráficos representativos da porcentagem de área necrótica e de área vascularizada, por coloração hematoxilina-eosina. Quantificação de 20 campos independentes de cada tumor feita pelo programa Image J. **d.** Gráfico representativo da quantificação de VEGF nos tumores estudados, por Elisa. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

5.1.3 ANIMAIS WILD-TYPE (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02)

Utilizamos um segundo inibidor funcional de galectinas, GR-MD-02, um polímero de polissacarídeos *galactoarabino-rhamnogalacturonan* composto predominantemente de ácido galacturônico, galactose, arabinose, rhamnose e alguns açúcares. Estudos estruturais mostraram que GR-MD-02 também se liga a gal-1 e gal-3, apresentando alta afinidade por gal-3. Assim como o Davanat™, GR-MD-02 se liga às galectinas extracelulares (Miller et. al. 2009).

Nesses experimentos com GR-MD-02 administrado diariamente foram realizados 2 experimentos independentes sendo o experimento representativo mostrado na Figura 7. Foram utilizados 10 camundongos wild-type (WT) divididos em 2 grupos de tratamento. Grupo controle (n=5), tratados intraperitonealmente (i.p.) com PBS diariamente e grupo GR-MD-02 (n=5), tratados i.p. com 30mg/kg de GR-MD-02 diariamente.

Ao utilizarmos esse segundo inibidor funcional de galectinas não encontramos diferenças de crescimento tumoral entre os animais estudados. Os tumores desses animais foram processados para análise histológica e não observamos diferença significativa na comparação de áreas necróticas e áreas vascularizadas nos grupos estudados (Figura 7).

Crescimento tumoral - TM1M - GR-MD-02 diariamente - WT

Figura 7. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino TM1M. **a.** Curva de crescimento tumoral. **Curva azul:** grupo controle (n=5), PBS i.p. todos os dias. **Curva verde:** grupo inibidor (n=5), 30mg/kg de GR-MD-02 i.p. todos os dias. **b.** Fotomicrografias representativas dos tumores analisados. **c.** Gráficos representativos da porcentagem de área necrótica e de área vascularizada, por coloração hematoxilina-eosina. Quantificação de 20 campos independentes de cada tumor feita pelo programa Image J. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

5.1.4 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02)

Para avaliar o envolvimento das galectinas no crescimento tumoral via TLRs, realizamos ensaios de crescimento tumoral em animais geneticamente deficientes da proteína MyD88 submetidos ao tratamento com o inibidor funcional de galectinas GR-MD-02. Quando avaliamos o crescimento tumoral nos camundongos MyD88KO tratados com GR-MD-02 não observamos diferenças de crescimento tumoral quando comparados com o grupo controle (Figura 8a). Os tumores desses animais foram processados para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 8b-c).

Crescimento tumoral - TM1M - GR-MD-02 diariamente - MyD88KO

a.

b. **c.** **Figura 8.** Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino TM1M. **a.** Curva de crescimento tumoral. **Curva vermelha:** grupo controle (n=4), PBS i.p. todos os dias. **Curva preta:** grupo inibidor (n=5), 30mg/kg de GR-MD-02 i.p. todos os dias. **b.** Fotomicrografias representativas dos tumores analisados. **c.** Gráficos representativos da porcentagem de área necrótica e de área vascularizada, por coloração hematoxilina-eosina. Quantificação de 20 campos independentes de cada tumor feita pelo programa Image J. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

5.2 CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10:

5.2.1 ANIMAIS *WILD-TYPE* (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)

Com o intuito de mostrar que os resultados encontrados com o tratamento com os inibidores funcionais de galectinas não são exclusivos da linhagem celular inoculada, repetimos os ensaios anteriores inoculando outra linhagem celular de melanoma murino a B16F10 e realizamos o mesmo esquema terapêutico com os inibidores funcionais de galectinas (Figura 9).

Ao analisarmos o gráfico de crescimento tumoral dos camundongos *wild-type* (WT) não observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com o inibidor Davanat™ (Figura 9a). Os tumores desses animais foram processados para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 9b-c).

Crescimento tumoral – B16F10 – inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 9. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino B16F10. Curva de crescimento tumoral. **Curva preta:** grupo controle (n=3), PBS i.p. todos os dias. **Curva laranja:** grupo inibidor (n=3), 30mg/kg de Davanat™ i.p. todos os dias. Representação de 1 experimento independente.

5.2.2 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)

Para avaliar o envolvimento das galectinas no crescimento tumoral via TLRs, realizamos ensaios de crescimento tumoral em animais geneticamente deficientes da proteína MyD88 submetidos ao tratamento com o inibidor funcional de galectinas Davanat™. Quando estudamos o crescimento tumoral em camundongos MyD88KO inoculados com a linhagem celular B16F10 e tratados com Davanat™ não observamos diferença estatisticamente significativa entre o crescimento tumoral dos animais tratados em comparação com o grupo controle. No entanto podemos perceber uma tendência de maior crescimento tumoral no grupo tratado com o inibidor Davanat™ em comparação ao grupo controle (Figura 10a), da mesma forma que observamos nos camundongos MyD88KO inoculados com a linhagem celular TM1M e tratados com o mesmo inibidor (Figura 6a). Os tumores desses animais foram processados para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 10b-c).

Crescimento tumoral – B16F10 – inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 10. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino B16F10. Curva de crescimento tumoral. **Curva azul:** grupo controle (n=3), PBS i.p. todos os dias. **Curva verde:** grupo inibidor (n=5), 30mg/kg de Davanat™ i.p. todos os dias. Representação de 1 experimento independente.

5.2.3 ANIMAIS WILD-TYPE (WT) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02)

Utilizamos o segundo inibidor funcional de galectinas, GR-MD-02, nos camundongos WT inoculados com a linhagem celular B16F10. Nesses experimentos com o GR-MD-02 administrado diariamente não encontramos diferenças de crescimento tumoral entre os animais estudados (Figura 11a), assim como observados nos tumores inoculados com TM1M e tratados com esse mesmo inibidor funcional de galectinas (Figura 7). Os tumores desses animais foram processados para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 11b-c).

Crescimento tumoral – B16F10– inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 11. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos wild-type (WT) inoculados com células de melanoma murino B16F10. Curva de crescimento tumoral. **Curva preta:** grupo controle (n=3), PBS i.p. todos os dias. **Curva roxa:** grupo inibidor (n=3), 30mg/kg de GR-MD-02 i.p. todos os dias. Representação de 1 experimento independente.

5.2.4 ANIMAIS KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (GR-MD-02)

Para avaliar o envolvimento das galectinas no crescimento tumoral via TLRs, realizamos ensaios de crescimento tumoral em animais geneticamente deficientes da proteína MyD88 submetidos ao tratamento com o inibidor funcional de galectinas GR-MD-02. O mesmo comportamento observado quando tratamos diariamente com o inibidor GR-MD-02 os camundongos MyD88KO inoculados com TM1M (Figura 8) foi encontrado nos camundongos da mesma linhagem e tratamento, porém inoculados com B16F10 (Figura 12a). Uma vez que não observamos diferenças de crescimento tumoral quando comparados com o grupo controle. Os tumores desses animais foram processados para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 12b-c).

Crescimento tumoral – B16F10– inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 12. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, GR-MD-02, em camundongos MyD88 knockout (MyD88KO) inoculados com células de melanoma murino B16F10. Curva de crescimento tumoral. **Curva azul:** grupo controle (n=3), PBS i.p. todos os dias. **Curva vermelha:** grupo inibidor (n=4), 30mg/kg de GR-MD-02 i.p. todos os dias. Representação de 1 experimento independente.

5.2.5 CAMUNDONGOS BALB/C NUDE TRATADOS DIARIAMENTE COM OS INIBIDORES DE GALECTINAS (DAVANAT™ E GR-MD-02)

Para avaliar o envolvimento do sistema imune adaptativo na resposta ao crescimento tumoral frente ao tratamento com os inibidores funcionais de galectinas foram utilizados 28 camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Balb/c *nude*. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento utilizado [controle (n=11) , Davanat™ i.p. 30mg/kg (n=11) e GR-MD-02 i.p. 30mg/kg (n=6)].

No ensaio com o inibidor funcional Davanat não observamos diferenças de crescimento tumoral quando comparados com o grupo controle (Figura 13a). Os tumores desses animais foram processados para análise histológica. Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 13b). Comportamento semelhante encontrado no tratamento com GR-MD-02 onde não encontramos diferenças no crescimento tumoral entre os camundongos Balb/c *nude* tratados com GR-MD-02 quando comparados com os camundongos tratados com PBS (Figura 14a). Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas vascularizadas (Figura 14b).

Crescimento tumoral – B16F10– inibidor galectinas – tratamento diário

a.

b.

Figura 13. Análise do crescimento tumoral em camundongos fêmeas Balb/c nude frente ao tratamento diário com PBS e Davanat™. Os animais foram inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma murino B16F10 e submetidos aos diferentes tratamentos. . **a.** Gráfico de crescimento tumoral. **Linha preta**, grupo controle (n=11, camundongos tratados com PBS todos os dias). **Linha vermelha**, grupo inibidor de gal-3 (n=11, camundongos tratados i.p. com 30mg/kg de Davanat™ todos os dias). **b.** Gráficos representativos da porcentagem de área necrótica e de área vascularizada, por coloração hematoxilina-eosina. Quantificação de 20 campos independentes de cada tumor feita pelo programa Image J. Representação de 1 experimento independente.

Crescimento tumoral – B16F10– inibidor galectinas – tratamento diário

Figura 14. Análise do crescimento tumoral em camundongos fêmeas Balb/c nude frente ao tratamento metronômico com PBS e os inibidores de gal-3 extracelular Davanat™ e GR-MD-02. Os animais foram inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma murino B16F10 e submetidos aos diferentes tratamentos. **Linha preta**, grupo controle (n=11, camundongos tratados com PBS todos os dias). **Linha vermelha**, grupo inibidor de gal-3 (n=11, camundongos tratados i.p. com 30mg/kg de Davanat™ todos os dias). **Linha verde**, grupo inibidor de gal-3 (n=6, camundongos tratados i.p. com 30mg/kg de GR-MD-02 todos os dias). Representação de 1 experimento independente.

5.3 CAMUNDONGOS INOCULADOS COM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO TM1M:

5.3.1 ANIMAIS *WILD-TYPE* (WT) E KNOCKOUT PARA GALECTINAS-1 (GAL-1KO) TRATADOS DIARIAMENTE COM INIBIDOR DE GALECTINAS (DAVANAT™)

Nos resultados anteriores, observamos que o tratamento com Davanat mostrou diminuição do crescimento tumoral nos camundongos inoculados com a linhagem celular de melanoma murino TM1M (Figuras 5 e 6). Comportamento não observado quando os tratamos com o inibidor GR-MD-02 (Figura 7). Uma vez que o inibidor Davanat™ apresenta um maior afinidade por gal-1 e o GR-MD-02 por gal-3, partimos para investigar se o comportamento que vemos no tratamento com Davanat™ seria em decorrência da inibição de gal-1 ou gal-3 no microambiente tumoral estudo.

Dessa forma, realizamos um experimento com camundongos gal-1KO, inoculados com a linhagem celular de melanoma murino, TM1M, e tratamento com Davanat™ diariamente.

Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa no crescimento tumoral entre o grupo controle e o grupo tratado com o inibidor de galectinas (Figura 15). Não observamos diferença estatisticamente significativa nas análises de porcentagem de áreas necróticas e áreas

vascularizadas (Figura 15b-c).Mostrando que realmente o inibidor Davanat inibe preferencialmente gal1.

Volume tumoral - Davanat diariamente - Gal1KO

b.

c.

Figura 15. Crescimento tumoral frente ao tratamento diário com inibidor de galectinas, Davanat™, em camundongos WT e gal1 KO, inoculados com células de melanoma murino TM1M. Curva de crescimento tumoral. **Curva verde:** animais WT, grupo controle (n=3), PBS i.p. todos os dias. **Curva preta:** animais WT (n=3), grupo inibidor, 30mg/kg de Davanat™ i.p. todos os dias. **Curva azul:** animais gal1 KO, grupo controle (n=3), PBS i.p. todos os dias. **Curva vermelha:** animais gal1KO, grupo inibidor (n=3), 30mg/kg de Davanat™ i.p. todos os dias. Representação de 1 experimento independente.

5.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS *WILD-TYPE* (WT), KNOCKOUT PARA GALECTINAS-3 (GAL3-KO) E KNOCKOUT PARA MYD88 (MYD88KO):

A fim de avaliar o possível papel das galectinas e dos receptores toll-like nos macrófagos presentes no microambiente tumoral e sua participação na produção de VEGF e na ativação desses macrófagos, realizamos experimentos de cultura de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT, gal-3KO e MyD88KO. Nesses ensaios, induzimos a polarização dos macrófagos para um perfil M1 ou M2 com o tratamento com LPS e IFN γ ou IL-4, respectivamente, além de submetê-los ao tratamento com o inibidor funcional de galectinas, Davanat. Ao final do ensaio, coletamos o sobrenadante da cultura e analisamos por Elisa a produção de VEGF e após extração de RNA avaliamos a expressão de genes envolvidos na polarização de macrófagos M1 (iNOS e IL1 β) e M2 (MRC1 e PPAR γ).

Para iniciar os ensaios é necessário realizar a fenotipagem das células aderidas para demonstrar que o protocolo de diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea foi suficiente para termos macrófagos aderidos nas placas de cultura celular. Dessa forma, fizemos marcação para CD11b e F4/80 e avaliamos a porcentagem de células duplo-positivas por citometria de fluxo. Os resultados a seguir mostram a fenotipagem das células aderentes na cultura onde obtivemos uma diferenciação para macrófagos entre 89 e 94% (Figuras 16, 17 e 18).

Assim, continuamos os ensaios de polarização M1 e M2 e tratamento com o inibidor funcional de galectinas.

Figura 16. Gráfico de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos extraídos da medula óssea de camundongos *wild-type*, análise por citometria de fluxo. **a.** Dot plot mostrando a população de células que analisadas. **b.** Histograma mostrando a fluorescência do anticorpo CD11b conjugado com FITC (canal BL1-A). **Curva roxa:** amostras duplamente marcadas com os controles de isotipo dos anticorpos CD11b e F4/80. **Curva vermelha:** amostras duplamente marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80. Em relação à marcação com CD11b obtivemos 90,798% de positividade. **c.** Histograma mostrando a fluorescência do anticorpo F4/80 conjugado com PE (canal BL2-A). **Curva roxa:** amostras duplamente marcadas com os controles de isotipo dos anticorpos CD11b e F4/80. **Curva vermelha:** amostras duplamente marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80. Em relação à marcação com F4/80 obtivemos 90,808% de positividade. **d.** Density plot mostrando a população marcada com o anticorpo anti-CD11b conjugado com FITC (canal BL1-A) e a população marcada com o anticorpo anti-F4/80 conjugado com PE (canal BL2-A). O quadrante R5 evidencia a população de células duplo positivas para CD11b e F4/80, a qual equivale a 89,848% da população total.

Figura 17. Gráfico de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos extraídos da medula óssea de camundongos gal-3KO, análise por citometria de fluxo. **a.** Dot plot mostrando a população de células que será analisada. **b.** Histograma mostrando a fluorescência do anticorpo CD11b conjugado com FITC (canal BL1-A). **Curva roxa:** amostras duplamente marcadas com os controles de isotipo dos anticorpos CD11b e F4/80. **Curva vermelha:** amostras duplamente marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80. Em relação à marcação com CD11b obtivemos 94,400% de positividade. **c.** Histograma mostrando a fluorescência do anticorpo F4/80 conjugado com PE (canal BL2-A). **Curva roxa:** amostras duplamente marcadas com os controles de isotipo dos anticorpos CD11b e F4/80. **Curva vermelha:** amostras duplamente marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80. Em relação à marcação com F4/80 obtivemos 94,470% de positividade. **d.** Density plot mostrando a população marcada com o anticorpo anti-CD11b conjugado com FITC (canal BL1-A) e a população marcada com o anticorpo anti-F4/80 conjugado com PE (canal BL2-A). O quadrante R5 evidencia a população de células duplo positivas para CD11b e F4/80, a qual equivale a 93,720% da população total.

Figura 18. Gráfico de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos extraídos da medula óssea de camundongos MyD88KO, análise por citometria de fluxo. **a.** Dot plot mostrando a população de células que será analisada. **b.** Histograma mostrando a fluorescência do anticorpo CD11b conjugado com FITC (canal BL1-A). **Curva roxa:** amostras duplamente marcadas com os controles de isotipo dos anticorpos CD11b e F4/80. **Curva vermelha:** amostras duplamente marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80. Em relação à marcação com CD11b obtivemos 95,580% de positividade. **c.** Histograma mostrando a fluorescência do anticorpo F4/80 conjugado com PE (canal BL2-A). **Curva roxa:** amostras duplamente marcadas com os controles de isotipo dos anticorpos CD11b e F4/80. **Curva vermelha:** amostras duplamente marcadas com os anticorpos CD11b e F4/80. Em relação à marcação com F4/80 obtivemos 94,280% de positividade. **d.** Density plot mostrando a população marcada com o anticorpo anti-CD11b conjugado com FITC (canal BL1-A) e a população marcada com o anticorpo anti-F4/80 conjugado com PE (canal BL2-A). O quadrante R5 evidencia a população de células duplo positivas para CD11b e F4/80, a qual equivale a 94,170% da população total.

5.4.1 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS *WILD-TYPE* (WT):

Após polarização dos macrófagos e tratamento com o inibidor de galectinas, analisamos por PCR quantitativa em tempo real genes expressos em macrófagos de polarização M1 (iNOS e IL-1 β) e M2 (MRC1 e PPAR γ) (figuras 19 a 22) e galectina-3 (figura 18).

As figuras 19 e 20 representam a expressão relativa dos genes MRC1 (receptor de manose) e de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) frequentemente mais expressos em macrófagos de polarização M2.

Figura 19. Gráfico de expressão gênica relativa do gene MRC1 (receptor de manose) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT), análise por PCR quantitativa em tempo real. **Linha vermelha:** expressão relativa do grupo controle macrófagos sem polarização e tratados com meio de cultura.

Figura 20. Gráfico de expressão gênica relativa do gene PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT), análise por PCR quantitativa em tempo real. **Linha vermelha:** expressão relativa do grupo controle macrófagos sem polarização e tratados com meio de cultura.

Como esperado a expressão de MRC1 e PPAR γ nos macrófagos polarizados para M1 (barras verdes) é inferior aos macrófagos sem estímulo de polarização (barras cinzas e linha vermelha) e inferior aos macrófagos polarizados para M2 (barras azuis). O tratamento com o inibidor funcional de galectinas Davanat não alterou a expressão de MRC1 nos macrófagos polarizados para M1 (comparação entre as barras verdes). Comportamento diferente foi encontrado nos macrófagos polarizados para M2 (barras azuis). Quando comparado com o grupo controle de macrófagos não polarizados e não tratados, os macrófagos polarizados para M2 e não tratados apresentaram maior expressão relativa do gene MRC1. No entanto, ao serem tratados com

Davanat, a expressão de MRC1 nos macrófagos polarizados para M2 foi inferior ao seu grupo controle.

Com essas análises mostramos que o tratamento com Davanat diminui a expressão do receptor de manose e de PPAR γ nos macrófagos com estímulo de polarização M2. Mostrando que ao inibir as galectinas extracelulares alteramos a polarização dos macrófagos M2.

As figuras 21 e 22 representam a expressão relativa dos genes iNOS (nitric oxide synthase) e de IL1 β (interleukin-1 beta) frequentemente mais expressos em macrófagos de polarização M1.

Figura 21. Gráfico de expressão gênica relativa do gene iNOS (nitric oxide synthase) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT), análise por PCR quantitativa em tempo real. **Linha vermelha:** expressão relativa do grupo controle macrófagos sem polarização e tratados com meio de cultura.

Figura 22. Gráfico de expressão gênica relativa do gene IL1 β (interleukin-1 beta) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT), análise por PCR quantitativa em tempo real. **Linha vermelha:** expressão relativa do grupo controle macrófagos sem polarização e tratados com meio de cultura.

Como esperado a expressão de iNOS nos macrófagos polarizados para M1 (barras verdes) foi superior à expressão desse gene nos macrófagos sem estímulo de polarização (barras cinzas e linha vermelha) e superior aos macrófagos polarizados para M2 (barras azuis). O tratamento com o inibidor funcional de galectinas Davanat não alterou a expressão de iNOS nos macrófagos polarizados para M1 (comparação entre as barras verdes). Comportamento semelhante foi encontrado nos macrófagos polarizados para M2 (barras azuis). Assim, observamos que o tratamento com Davanat não altera a expressão iNOS nos macrófagos com estímulo de polarização M1. Mostrando que ao inibir as galectinas extracelulares mantemos a polarização dos macrófagos M1.

Entretanto, a expressão de IL1 β foi controversa; uma vez que essa interleucina é considerada um marcador de polarização M1 não deveria ser expressa em macrófagos do tipo M2. No entanto, não foi possível observar esse comportamento padrão no gráfico da figura 17, onde vemos a expressão de IL1 β nos macrófagos polarizados para M2 e não tratados com Davanat (barra azul claro). Esse não foi um bom marcador para esse tipo de análise. Essa expressão de IL1 β pode estar sendo influenciada por outra via de sinalização não estudada nesse experimento.

Analizamos também a expressão de galectinas-3 nos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos WT, polarizados ou não para M1 e M2 e tratados com Davanat. Podemos observar que os macrófagos polarizados para M1 apresentam uma maior expressão de gal-3 quando comparados com os macrófagos sem estímulo de polarização e não tratados (Figura 23, linha vermelha) e também em comparação com os sem estímulo de polarização e tratados com as diferentes concentrações de Davanat. Os macrófagos polarizados para M1 apresentam uma maior expressão de gal-3 em comparação com os macrófagos polarizados para M2. Já os macrófagos polarizados para M2 apresentam uma maior expressão de gal-3 quando não tratados com Davanat em comparação com os macrófagos tratados com Davanat (Figura 23).

Figura 23. Gráfico de expressão gênica relativa do gene Gal-3 (galectinas-3) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT), análise por PCR quantitativa em tempo real. **Linha vermelha:** expressão relativa do grupo controle macrófagos sem polarização e tratados com meio de cultura.

5.4.2 MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA

Os macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos WT, gal3KO e MyD88KO foram plaqueados em lamínula e após 24h em presença de estímulos de polarização M1 e M2 e 24h de tratamento com Davanat foram incubados com faloidina e DAPI, no intuito de visualizar as fibras de actina e o núcleo, respectivamente. Mostrando, dessa forma, a morfologia dessas células em cultura celular.

Nas figuras 24, 25 e 26 podemos observar a morfologia dos macrófagos derivados da medula. Os macrófagos sem estímulo de polarização são menores que os macrófagos polarizados para M1. Não vemos diferenças no tamanho celular dos macrófagos não polarizados ou polarizados para M1 quando tratados com Davanat, independente da concentração (Figura 24 e 25). No entanto, nos macrófagos polarizados para M2 vemos as células mais espalhadas quando tratamos com Davanat (Figura 26).

Figura 24. Morfologia dos macrófagos sem estímulo de polarização (M0) após diferentes concentrações de tratamento com Davanat. Fotomicrografias dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT) (coluna 1), knockout para galectina-3 (gal3KO) (coluna 2) e knockout para MyD88 (MyD88KO) (coluna 3) e tratados com zero (linha 1), 4 μ g/mL (linha 2), 20 μ g/mL (linha 3) ou 100 μ g/mL (linha 4) de Davanat, marcados com faloidina (vermelho) e DAPI (azul). Aumento de 20x.

Figura 25. Morfologia dos macrófagos com estímulo de polarização M1 após diferentes concentrações de tratamento com Davanat. Fotomicrografias dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT) (coluna 1), knockout para galectina-3 (gal3KO) (coluna 2) e knockout para MyD88 (MyD88KO) (coluna 3) e tratados com zero (linha 1), 4 µg/mL (linha 2), 20 µg/mL (linha 3) ou 100 µg/mL (linha 4) de Davanat, marcados com faloidina (vermelho) e DAPI (azul). Aumento de 20x.

Figura 26. Morfologia dos macrófagos com estímulo de polarização M2 após diferentes concentrações de tratamento com Davanat. Fotomicrografias dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos wild-type (WT) (coluna 1), knockout para galectina-3 (gal3KO) (coluna 2) e knockout para MyD88 (MyD88KO) (coluna 3) e tratados com zero (linha 1), 4 µg/mL (linha 2), 20 µg/mL (linha 3) ou 100 µg/mL (linha 4) de Davanat, marcados com faloidina (vermelho) e DAPI (azul). Aumento de 20x.

5.4.3 ELISA PARA VEGF

A fim de avaliar o papel dos macrófagos e das galectinas na produção de VEGF foi realizado o ensaio de Elisa com o sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos WT, gal3KO e MyD88KO. Nas figuras 27, 28 e 29 podemos observar a quantidade de VEGF produzida pelos macrófagos sem estímulo de polarização, polarizados para M1 e polarizados para M2, respectivamente e submetidos ao tratamento com Davanat em concentrações de 4, 20 ou 100 µg/mL.

Figura 27. Quantificação de VEGF por Elisa do sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos wild-type (WT), knockout para gal-3 (gal3KO) e knockout para MyD88 (MyD88KO) sem estímulo de polarização (M0), tratados com diferentes concentrações de Davanat (0, 4, 20, 100 µg/mL).

Ao observarmos a produção de VEGF pelos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos WT sem estímulo de polarização e frente ao tratamento com Davanat nas diferentes concentrações (Figura 27), vemos um aumento estatisticamente significativo na quantidade de VEGF no sobrenadante da cultura celular (Figura 27, barras branca e cinzas). Esse aumento na quantidade de VEGF é dose dependente nesses animais, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa nas comparações entre controle (tratamento com PBS) e os tratamentos com 4 e 20µg/mL e ao comparar os tratamentos de 4 e 20µg/mL.

Comportamento não observado nos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos gal3KO sem estímulo de polarização (Figura 27, barras verdes). Não há diferença na quantidade de VEGF no sobrenadante dessa cultura celular independente do tratamento com Davanat.

No entanto, entre os macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos MyD88KO sem estímulo de polarização (Figura 27, barras azuis) observamos uma diminuição, estatisticamente significativa, de VEGF no sobrenadante somente na comparação do controle com o tratamento com Davanat na concentração de 100µg/mL.

Não encontramos diferenças nas quantidades de VEGF no sobrenadante dos macrófagos sem polarização ao compararmos os macrófagos derivados da medula dos camundongos WT, gal3KO e MyD88KO (Figura 27).

Após estímulo de polarização com LPS e IFN γ , os macrófagos polarizados para M1 foram submetidos ao tratamento com Davanat em concentrações de 4, 20 ou 100 µg/mL (Figura 28).

Figura 28. Quantificação de VEGF por Elisa do sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos wild-type (WT), knockout para gal-3 (gal3KO) e knockout para MyD88 (MyD88KO) polarizados para M1, tratados com diferentes concentrações de Davanat (0, 4, 20, 100 µg/mL).

Nos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos WT polarizados para M1 observamos um aumento, estatisticamente significativo, na quantidade de VEGF no sobrenadante ao compararmos os tratamentos de 20 e 100 µg/mL (Figura 28, barras cinzas). Nos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos gal3KO polarizados para M1 não observamos nenhuma diferença na quantidade de VEGF no sobrenadante entre os tratamentos realizados. No entanto, nos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos MyD88KO polarizados para M1 observamos um aumento na quantidade de VEGF no sobrenadante ao compararmos o controle com o tratamento de 2 µg/mL.

Ao compararmos a quantidade de VEGF no sobrenadante dos macrófagos WT, gal3KO e MyD88KO polarizados para M1 vemos um aumento, estatisticamente significativo, entre macrófagos WT tratados com 4 µg/mL e macrófago gal3KO tratados com a mesma concentração de Davanat. Esse mesmo aumento, estatisticamente significativo, foi observado na comparação entre macrófagos WT e macrófagos MyD88KO tratados com 4 µg/mL de Davanat (Figura 28).

Nas culturas celulares dos macrófagos derivados da medula óssea e submetidos ao estímulo de polarização com IL-4 onde os macrófagos polarizados para M2 foram submetidos ao tratamento com Davanat em concentrações de 4, 20 ou 100 µg/mL não vemos diferenças nas quantidades de VEGF nos macrófagos WT (Figura 29, barras branca e cinzas) independentemente do tratamento com Davanat. Entre os macrófagos gal3KO também não encontramos diferenças na quantidade de VEGF no sobrenadante da cultura celular (Figura 29, barras verdes). Já entre os macrófagos MyD88KO encontramos um aumento, estatisticamente significativo, entre os macrófagos não tratados e os tratados com 4 ou 20 µg/mL (Figura 29, barras azuis).

Ao compararmos a quantidade de VEGF no sobrenadante dos macrófagos WT, gal3KO e MyD88KO polarizados para M2 vemos um aumento, estatisticamente significativo, nas comparações macrófagos WT controle e gal3KO controle, WT 4 µg/mL e gal3KO 4 µg/mL, WT 100 µg/mL e gal3KO 100 µg/mL, WT 20 µg/mL e MyD88KO 20 µg/mL, gal3KO 20 µg/mL e MyD88KO 20 µg/mL. E observamos uma diminuição, estatisticamente significativa entre gal3KO 100 µg/mL e MyD88KO 100 µg/mL (Figura 29).

Macrófagos polarização M2

* $p < 0,05$, Two-way Anova

Figura 29. Quantificação de VEGF por Elisa do sobrenadante da cultura celular dos macrófagos derivados da medula óssea dos camundongos wild-type (WT), knockout para gal-3 (gal3KO) e knockout para MyD88 (MyD88KO) polarizados para M2, tratados com diferentes concentrações de Davanat (0, 4, 20, 100 µg/mL).

6 DISCUSSÃO

Dentro do complexo microambiente tumoral, as galectinas 1 e 3 surgem como moléculas importantes na sobrevivência das células tumorais, no aumento de angiogênese e na promoção de estados inflamatórios que permitem o crescimento tumoral, bem como na ativação do sistema imune (RADOSAVLJEVIC *et al.* 2012, MATHIEU *et al.* 2012, JIA *et al.* 2013). É interessante ressaltar que o gradiente de gal-3 extracelular pode induzir efetivamente a migração de macrófagos do tipo M2 para o microambiente tumoral (JIA *et al.* 2013). Tendo em vista a importância de gal-1 e -3, nosso foco nesse trabalho foi mostrar o papel funcional dessas galectinas no crescimento tumoral e na interação dessas com macrófagos.

Avaliamos o papel da inibição de gal-1 e -3 extracelular no crescimento tumoral. Observamos que ao inibir funcionalmente essas galectinas com Davanat™ diariamente o crescimento tumoral foi menor que no grupo controle (PBS), nos camundongos inoculados com células de melanoma murino, TM1M. Ao contrário do que foi mostrado com o tratamento de Davanat™, não foi observada diferença no volume tumoral comparando o tratamento com GRMD-02 e PBS. Dados da literatura demonstraram que células tumorais (B16F10 e U87MG) sem Gal-1 e Gal-3, respectivamente, quando inoculadas ortotopicamente, apresentaram crescimento tumoral menor em comparação com as mesmas células expressando essas galectinas (MATHIEU *et al.* 2012, IKEMORI *et al.* 2014).

Brauer e colaboradores (2012) mostraram que ao inibir gal-3 com seu antagonista CS-100 há um aumento na secreção de IFN γ , IL-2 e TNF pelos linfócitos associados ao tumor. Fato importante para o bloqueio da apoptose das células T induzida pelas células tumorais do melanoma. Na nossa análise do perfil de citocinas do microambiente tumoral foi possível observar um aumento de IL-6 e de VEGF nos tumores inoculados com células de melanoma murino TM1M e tratados com o inibidor DavanatTM. Esse aumento juntamente com o menor crescimento tumoral em comparação com o grupo controle sugerem que em microambientes sem gal-1 e -3 extracelular haja um desvio para um perfil pró-inflamatório e consequentemente anti-tumoral.

Assim, é importante determinar o perfil de células imunes nos diferentes microambientes gerados pelos diferentes tratamentos abordados nesse estudo, com o intuito de elucidar qual resposta imunológica foi desencadeada na interferência quimioterápica utilizada. No entanto, acreditamos que a resposta tumoral frente a ação ao tratamento quimioterápico pode ser influenciada pelos macrófagos associados ao tumor.

Uma vez que as galectinas podem funcionar como co-receptores de DAMPs (damage-associated molecular patterns) e dessa forma, serem reconhecidas juntamente com os DAMPs agregados por galectinas pelos receptores toll-like presentes nos macrófagos desencadeando uma resposta, via MyD88, anti ou pró-tumoral, dependendo do perfil de citocinas gerado no microambiente tumoral (SATO *et al.* 2009). Assim, para mostrar o envolvimento dos receptores toll-like e as galectinas no crescimento tumoral utilizamos camundongos knockout para MyD88 (MyD88KO). Foi possível observar um

menor crescimento tumoral nos camundongos MyD88KO controle. Evidenciando que há uma relação intrínseca entre galectinas e receptores toll-like para favorecer o crescimento tumoral. O maior crescimento tumoral observado nos camundongos MyD88KO tratados com o inibidor Davanat mostra que o microambiente é capaz de encontrar outra via de sinalização para manter o crescimento tumoral, mecanismo não elucidado nesse trabalho.

Adicionalmente, para saber de que forma o tratamento interfere na resposta imune, foram utilizados camundongos Balb/c nude os quais não possuem a imunidade adaptativa. Uma vez que não foi observada diferenças de crescimento tumoral entre os animais tratados com Davanat™ e o grupo controle, concluímos que tanto a resposta imune inata quanto adaptativa são necessárias para atuar contra o crescimento tumoral em um ambiente desprovido de gal-1 e -3.

Considerando a maior eficácia de Davanat no controle do crescimento tumoral, e que esse inibidor tem maior afinidade por gal-1 em relação a gal-3, realizamos experimentos com camundongos knockouts para gal-1 (gal1KO), com o intuito de demonstrar que essa diminuição do crescimento tumoral frente ao tratamento com Davanat seria principalmente via gal-1. Nossos resultados mostram que o uso do inibidor Davanat não foi suficiente para diminuir o crescimento tumoral nos animais gal1KO. Dessa forma, podemos inferir que a resposta ao crescimento tumoral observado nos camundongos WT tratados com Davanat ocorre preferencialmente via gal-1 e não gal-3. Ao analisarmos a produção de VEGF pelos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos knockout para gal-3 (gal3KO) frente ao tratamento com o inibidor

Davanat, não vimos nenhuma diferença na produção de VEGF mostrando mais uma vez que o inibidor Davanat preferencialmente inibe gal1.

Assim, mostramos que a presença de gal-1 no microambiente tumoral estudado pode favorecer a adaptação, o sucesso evolutivo tumoral e a tumorigênese de neoplasias com valores de volume tumoral superiores aos ambientes desprovidos de gal-1. O que corrobora os achados recentes de Martínez-Bosh e Navarro (2014) que observaram em tumores de pâncreas depletados de gal-1 diminuição da proliferação celular, diminuição da angiogênese, ativação do estroma e aumento da resposta imune nos camundongos.

Estudos recentes do grupo (MACHADO *et al.* 2014) mostraram que a presença de gal-3 acelera o crescimento tumoral em melanomas e favorece a angiogênese associada ao tumor pelo aumento no nível de VEGF em camundongos WT inoculados com células de melanoma que expressam gal-3 em comparação com os baixos níveis de VEGF em camundongos gal3KO inoculados com células de melanoma que não expressam gal-3. Segundo Javelaud e colaboradores (2008), a produção de TGF β 1 pelo microambiente tumoral favorece o aumento de angiogênese na região peritumoral. TGF β 1 age indiretamente como potente quimioatrativo para macrófagos (WISEMAN *et al.* 1988). Os macrófagos liberam VEGF em resposta a esse aumento de TGF β 1 (DERYNCH *et al.* 2001). Acreditamos que essa resposta dos macrófagos a TGF β 1 ocorre na presença de gal-3 extracelular (MACHADO *et al.*, 2014).

De modo semelhante, analisamos a resposta de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT, gal3KO e MyD88KO frente à exposição

ao inibidor Davanat e a estímulos de polarização M1 e M2, bem como sua produção de VEGF.

Os macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT e submetidos ao estímulo de polarização M1, independentemente da concentração utilizada de Davanat não mudou seu perfil de expressão gênica característico de macrófagos anti-tumorais. Mostrando que o tratamento com o inibidor de gal-1 e -3 mantém o padrão de macrófagos do tipo M1 presentes no microambiente tumoral. Entretanto, ao inibir as galectinas extracelulares nos macrófagos com estímulo de polarização do tipo M2 mudamos o perfil de expressão gênica característico de macrófagos pró-tumorais. Enfatizando que o tratamento com Davanat foi capaz de desviar o perfil de polarização M2, fazendo com que o microambiente tumoral não seja mais favorável para o crescimento tumoral como numa situação sem nenhum tipo de tratamento.

É importante estudar o comportamento angiogênico nesses tumores onde a gal-1 foi inibida e resultou em menor crescimento tumoral uma vez que Croci e colaboradores (2014) mostraram que em tumores refratários à terapia anti-VEGF quando a célula inoculada foi transduzida com shRNA gal-1 e os tumores foram tratados com anti-VEGF apresentaram menor crescimento tumoral do que tumores inoculados com as células controle (scramble RNA) e tratados com anti-VEGF. Assim, vimos que em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT não submetidos ao estímulo de polarização apresentaram maior produção de VEGF, dose dependente ao tratamento com o inibidor Davanat. Mostrando que o microambiente se prepara

para a formação de novos vasos e para o recrutamento de células do sistema imune com o intuito de gerar uma melhor resposta anti-tumoral.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, podemos concluir que as galectinas 1 e 3 extracelulares são importantes para o crescimento tumoral de melanomas murinos pois são coordenadoras da mudança do perfil de macrófagos, uma vez que ao serem inibidas modulam o microambiente tumoral para um perfil de macrófagos do tipo M1, desencadeando uma resposta anti-tumoral. Esse comportamento mostra que há uma intrínseca relação entre as galectinas e os receptores do tipo toll-like desencadeando essa resposta tumoral via MyD88.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S, TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**. 2004; 4(7):499-511.

Belanis L, Plowman SJ, Rotblat B, Hancock JF, Kloog Y. Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of h-ras nanoclusters. **Mol Biol Cell**. 2008; 19(4):1404-14.

Braeuer RR, Zigler M, Kamiya T, Dobroff AS, Huang L, Choi W, McConkey DJ, Shoshan E, Mobley AK, Song R, Raz A, Bar-Eli M. Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. **Cancer Res**. 2012;72(22):5757-66.

Braeuer RR, Zigler M, Kamiya T, Dobroff AS, Huang L, Choi W, McConkey DJ, Shoshan E, Mobley AK, Song R, Raz A, Bar-Eli M. Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. **Cancer Res**. 2012; 72(22):5757-66.

Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: Friends or foes? **Clinical and Experimental Metastasis**. 2002; 19:247-258.

Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews. Cancer**. 2005; 5:231-237.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**. 2011; 473(7347):298-307.

Clausse N, van den Brûle F, Waltregny D, Garnier F, Castronovo V. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. **Angiogenesis**. 1999; 3(4):317-25.

Compagno D, Jaworski FM, Gentilini L, Contrufo G, González Pérez I, Elola MT, Pregi N, Rabinovich GA, Laderach DJ. Galectins: major signaling modulators inside and outside the cell. **Curr Mol Med**. 2014; 14(5):630-51.

Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, Toscano MA, Caramelo JJ, García-Vallejo JJ, Ouyang J, Mesri EA, Junttila MR, Bais C, Shipp MA, Salatino M, Rabinovich GA. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. **Cell**. 2014; 156(4):744-58.

Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, Ouyang J, Ilarregui JM, Toscano MA, Domaica CI, Croci MC, Shipp MA, Mesri EA, Albini A, Rabinovich GA. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. **J Exp Med**. 2012; 209(11):1985-2000.

Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. **Journal of Leukocyte Biology**. 2001; 70:478-490.

de Visser EA, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews. Cancer**. 2006; 6:24-37.

Delgado VM, Nugnes LG, Colombo LL, Troncoso MF, Fernández MM, Malchiodi EL, Frahm I, Croci DO, Compagno D, Rabinovich GA, Wolfenstein-Todel C, Elola MT. Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. **FASEB J**. 2011; 25(1):242-54.

Derynch R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**. 2001; 29(2):117-129.

D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, Baum L, Salmon I. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. **PLoS One**. 2013; 8(6):e67029.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2006; 1760:616–635.

Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. **J Biol Chem**. 2004; 279(33):34922-30.

Elad-Sfadia G1, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ, Kloog Y. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. **J Biol Chem**. 2002; 277(40):37169-75.

Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. **Mol Biol Cell**. 2004; 15(8):3580-90.

Gabius HJ, Wu AM. The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. **Med J**. 2006; 29(1):37-62.

GALLI, R., STARACE, D., BUSÀ, R., ANGELINI, D.F., PAONE, A., DE CESARIS, P., FILIPPINI, A., SETTE, C., BATTISTINI, L., ZIPARO, E., RICCIOLI, A. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. **J Immunol**. 201;184:6658-6669.

Gao X, Liu D, Fan Y, Li X, Xue H, Ma Y, Zhou Y, Tai G. The two endocytic pathways mediated by the carbohydrate recognition domain and regulated by

the collagen-like domain of galectin-3 in vascular endothelial cells. **PLoS One**. 2012; 7(12):e52430.

Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacol Rev**. 2000; 52(2):237-68.

Grose R. Common ground in the transcriptional profiles of wounds and tumors. **Genome Biol**. 2004; 5(6):228.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011; 144(5):646-674.

Herlyn M, Ferrone S, Ronai Z, Finerty J, Pelroy R, Mohla S. Melanoma biology and progression. **Cancer Res**. 2001; 61(11):4642-3.

Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, Jin YT, Hong TM, Chen YL. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. **Oncogene**. 2008; 27(26):3746-53.

Ikemori RY, Machado CM, Furuzawa KM, Nonogaki S, Osinaga E, Umezawa K, de Carvalho MA, Verinaud L, Chammas R. Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell survival. **PLoS One**. 2014; 9(11):e111592.

Javelaud D, Alexaki M, Mauviel A. Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**. 2008; 21(2):123-132.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. 2010; 60(5):277-300.

Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H, Takakura N. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. **Am J Pathol**. 2013; 182(5):1821-31.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**. 2011; 30:16-34.

Laderach DJ, Gentilini LD, Giribaldi L, Delgado VC, Nugnes L, Croci DO, Al Nakouzi N, Sacca P, Casas G, Mazza O, Shipp MA, Vazquez E, Chauchereau A, Kutok JL, Rodig SJ, Elola MT, Compagno D, Rabinovich GA. A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. **Cancer Res**. 2013; 73(1):86-96.

Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. **J Dermatol Sci**. 2011; 64(2):85-91.

Le Mercier M, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, Mijatovic T, Decaestecker C, Kiss R, Lefranc F. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2008; 67(5):456-69.

Lee ML Tomsu K, Von Eschen KB Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Research**. 2000; 10(1): 81-92.

Lefranc F, Mathieu V, Kiss R. Galectin-1-mediated biochemical controls of melanoma and glioma aggressive behavior. **World J Biol Chem**. 2011; 2(9):193-201.

Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumić J, Nilsson UJ, Leffler H. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. **Biochim Biophys Acta**. 2012; 1820(7):804-18.

Lev DC, Onn A, Melinkova, VO, Miller C, Stone V, Ruiz M, McGary EC, Ananthaswamy HN, Price JE, Bar-Eli M. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. **J Clin Oncol**. 2004; 22:2092-2100.

Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**. 2005; 5(1):29-41.

Lotan R, Belloni PN, Tressler RJ, Lotan D, Xu XC, Nicolson GL. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. **Glycoconj J**. 1994; 11(5):462-8.

Machado CML, Andrade LNS, Teixeira VR, Costa FF, Melo CM, Santos S, Nonogaki S, Liu FT, Bernardes ES, Camargo AMA, Chammas R. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reduction of VEGF secretion from macrophages induced by TGF β 1. **Cancer Medicine**. 2014; [Epub ahead of print]

MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. **J Immunol**. 2008; 180(4):2650-8.

Mantovani A, Schioppa T, Biswas SK, Marchesi F, Allavena P, Sica A. Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations. **Tumori**. 2003; 89(5):459-68.

Markowska AI, Jefferies KC, Panjwani N. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. **J Biol Chem**. 2011; 286(34):29913-21.

Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. **J Exp Med.** 2010; 207(9):1981-93.

Martínez-Bosch N, Navarro P. Targeting Galectin-1 in pancreatic cancer: immune surveillance on guard. **Oncoimmunology.** 2014; 3(8):e952201.

Mathieu V, de Lassalle EM, Toelen J, Mohr T, Bellahcène A, Van Goietsenoven G, Verschuere T, Bouzin C, Debyser Z, De Vleeschouwer S, Van Gool S, Poirier F, Castronovo V, Kiss R, Feron O. Galectin-1 in melanoma biology and related neo-angiogenesis processes. **J Invest Dermatol.** 2012; 132(9):2245-54.

Miller MC, Klyosov A, Mayo KH. The alpha-galactomannan Davanat™ binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. **Glycobiology.** 2009; 19(9):1034-1045.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas/2010 incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Moisa A, Fritz P, Eck A, Wehner HD, Mürdter T, Simon W, Gabius HJ. Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. **Anticancer Res.** 2007; 27(4B):2131-9.

Nangia-Makker P, Balan V, Raz A. Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. **Cancer Microenviron.** 2008; 1(1):43-51.

Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Trends Mol Med.** 2002; 8(4):187-92.

Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol.** 2000; 156(3):899-909.

Nangia-Makker P, Wang Y, Raz T, Tait L, Balan V, Hogan V, Raz A. Cleavage of galectin-3 by matrix metalloproteases induces angiogenesis in breast cancer. **Int J Cancer.** 2010; 127(11):2530-41.

Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M *et al.* Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103: 15136–15141.

Newlaczyl AU, Yu LG. Galectin-3 – a jack-of-all-trades in cancer. **Clinical Cancer Research.** 2011; 17:7035-46.

Piccolo E, Tinari N, Semeraro D, Traini S, Fichera I, Cumashi A, La Sorda R, Spinella F, Bagnato A, Lattanzio R, D'Egidio M, Di Risio A, Stampolidis P, Piantelli M, Natoli C, Ullrich A, Iacobelli S. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis. **J Mol Med (Berl)**. 2013; 91(1):83-94.

Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp Cell Res**. 2010; 316(8):1324-31.

Pollard, JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**. 2004; 4: 71-78.

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**. 2011; 146(6):873-87.

Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, Johnson MM, Lopez A, Diwan AH, Lazar AJ, Shen SS, Zhang PS, Reed JA, Gershenwald JE, Raz A, Bar-Eli M. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. **Clin Cancer Res**. 2006 Nov 15;12(22):6709-15.

Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nat Rev Immunol**. 2009;9(5):338-52.

Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunol Res**. 2012; 52(1-2):100-10.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. **Nat Rev Cancer**. 2009; 9(1):57-63.

Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). **Immunol Rev**. 2009; 230(1):172-87.

Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. **Neoplasia**. 2009; 11(7):615-28.

Sun W, Schuchter LM. Metastatic melanoma. **Curr Treat Options Oncol**. 2001; 2(3):193-202.

Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T *et al*. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005; **434**: 243–249.

TAKEDA, K, KAISHO, T, AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol.** 2003; 21: 335-76.

Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, Hackeng TM, Kiss R, Kloog Y, Poirier F, Griffioen AW. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. **Cancer Res.** 2010; 70(15):6216-24.

Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. **Am J Pathol.** 2008; 172(2):545-53.

Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, Griffioen AW. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. **Proc Natl Acad Sci.** 2006; 103(43):15975-80.

Thijssen VL, Rabinovich GA, Griffioen AW. Vascular galectins: regulators of tumor progression and targets for cancer therapy. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2013; 24(6):547-58.

van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut A, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology.** 2006; 211(6-8):487-501.

Veronesi U, Cascinelli N. Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. **Archives of Surgery.** 1991; 126(4):438-41.

Watnick RS. The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2012; 2(12):a006676.

Wesley UV, Vemuganti R, Ayvaci ER, Dempsey RJ. Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling. **Brain Res.** 2013; 1496:1-9.

Wiseman DM, Polverini PJ, Kamp DW, Leibovich SJ. Transforming growth factor-beta (TGF beta) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. **Biochem Biophys Res Commun.** 1988; 157(2):793-800.

Yang E, Shim JS, Woo HJ, Kim KW, Kwon HJ. Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. **Biochem Biophys Res Commun.** 2007; 363(2):336-41.

Zhao Q, Guo X, Nash GB, Stone PC, Hilkens J, Rhodes JM, Yu LG. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. **Cancer Res.** 2009; 69(17):6799-806.

APÊNDICE

CARTA APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**CAPÍTULO DO LIVRO FUNDAMENTOS EM ONCOLOGIA MOLECULAR (NO
PRELO)**

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA CANCER MEDICINE