

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Kamilla Paes de Siqueira

**O papel de galectina-3 no desenvolvimento de carcinoma
espinocelular de pele**

BAURU
2018

Kamilla Paes de Siqueira

**O papel de galectina-3 no desenvolvimento de carcinoma
espinocelular de pele**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia oral.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli.

Versão Corrigida

BAURU
2018

Siqueira, Kamilla Paes

O papel de galectina-3 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele / Kamilla Paes de Siqueira. – Bauru, 2018.

71p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Campanelli

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 003/2016

Data: 15/03/2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus pais Pedro Geraldo de Siqueira e Zélia Maria Paes de Siqueira e toda minha família por permitirem e confiarem que eu viesse para Bauru.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profª Drª. Ana Paula Campanelli**, que me acolheu em seu laboratório, sem me conhecer e que me deu suporte com suas correções, pelo respeito, pela paciência e compreensão.

Ao Professor **Dr. Roger Chamma**s por ceder à linhagem de camundongos Gal3KO.

A professora **Drª Maria Renata S. Nogueira** que gentilmente me ajudou com as análises de histopatologia.

À Profª **Drª Thais Helena Gasparoto** pelo auxílio na realização do ELISA.

Ao **Prof. Dr. Sergio Torres** pelas conversas e conselhos.

Aos colegas de laboratório **Graziela Perri, Rosimeire Primolan França, André Luís da Silva, Dalva Ribeiro de Oliveira, Lívia Maria de Melo** pela amizade, pela ajuda, pelos experimentos, pelos bolos, pelos cafés, pelos pudins, pelas caronas e etc. e a mais nova integrante da turma **Raissa Gabrielle**.

Minha colega de mestrado **Vanessa Villas Boas** pela amizade, pelos ensinamentos de Power point, internet, tutoriais de maquiagem, idas infinitas ao biotério, faça chuva ou faça sol; pela paciência no dia que joguei as células fora depois de 8h de trabalho, mas no final de tudo deu tudo certo, né? Sobrevivemos ao temperamento uma da outra e terminamos o mestrado.

Aos amigos de outros departamentos: **a Suelen Paini, Rodrigo Fonseca**. Em especial a **Rafael Ortiz, Angélica Fonseca, Jessica Melchiades** pelas missas de quarta-feira. Ao **Silas Antônio Juvêncio de Freitas Filho** pela amizade desde os tempos de 6T lá na UFU-MG.

A grande ajuda e aos ensinamentos da **Nádia Ghinelli Amôr**, que me inspiram; o *pc* mais organizado que já vi.

Minha colega de apartamento **Rebeca Placa**, que entende minhas loucuras de limpeza e que meu cabelo cai bastante e meu gosto musical digamos... *peculiar*.

A família **Rodrigues, Seu João Batista, Dona Dirce, Larissa e Laís** que me acolheram num momento de muita fragilidade e quando os meus pais não puderam estar comigo eles estavam.

Ao grupo de oração **Fonte de Vida Eterna** da igreja São Cristóvão por me sustentarem na fé.

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo**, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos.

À **Comissão de Pós-Graduação da Área de Estomatologia e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP**, na pessoa de sua coordenadora, Prof^a. Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP**, na pessoa de seu chefe, Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet.

À **Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo (FMUSP)**, em especial ao **Prof. Dr. Roger Chammas** e toda a sua equipe de trabalho no biotério central por ceder à linhagem de camundongos Gal3KO.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** – código de Financiamento 001.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (CNPQ)**, pelo incentivo financeiro.

“Quando a minha alma está imersa no amor, resolvo claramente e depressa as questões mais complicadas - só o amor é capaz de passar por sobre abismos e pelos cumes das montanhas.”

Santa Faustina

RESUMO

A galectina-3 (GAL-3) é uma proteína multifuncional que pertence à família das lectinas e liga a carboidratos. A expressão de galectina-3 foi detectada em muitos tipos de tumores, como melanomas, astrocitomas e tumores da bexiga e de ovário. A galectina-3 é expressa por macrófagos e desempenha papel importante na polarização de macrófagos para o fenótipo M2. Sabe-se que macrófagos de fenótipo M2 estão associados com a progressão tumoral. Apesar dos avanços sobre o papel de galectina-3 na progressão tumoral, pouco se sabe sobre o papel desta lectina na ativação de macrófagos durante o desenvolvimento de carcinoma espinocelular (CEC). Desta forma, utilizando o modelo experimental de carcinoma espinocelular induzido quimicamente, testamos a hipótese de que a sinalização mediada por galectina-3 poderia modular a resposta imune e o desenvolvimento tumoral. Os resultados do presente estudo demonstraram que a ausência da galectina-3 está associada a menor progressão do carcinoma espinocelular. Além disso, observou-se o aumento nas percentagens de células TCD4⁺, TCD8⁺, associada a uma diminuição de células B, células dendríticas e macrófagos em amostras de tecido tumoral de animais Gal3KO. Em relação ao fenótipo dos macrófagos, os resultados evidenciaram uma menor porcentagem de macrófagos M2 em amostras de animais deficientes de galectina 3, bem como de citocinas do perfil Th2. Desta forma, os resultados do presente estudo fornecem evidências de que galectina-3 desempenha um papel importante na progressão do carcinoma espinocelular de pele e pode ser um alvo para futuras modalidades terapêuticas.

Palavras-chave: Galectina-3. Carcinoma espinocelular. Macrófagos.

ABSTRACT

Role of Galectin-3 in the development of skin squamous cell carcinoma

Galectin-3 (GAL-3) is a multifunctional protein belonging to the lectin family that binds to carbohydrates. Galectin-3 expression has been detected in many types of tumors, such as melanomas, astrocytomas, and bladder and ovary tumors. Galectin-3 is expressed by macrophages and plays an important role in the polarization of macrophages to the M2 phenotype. In addition, M2 macrophages are associated with tumor progression. Despite advances in the role of galectin-3 in tumor progression, little is known about the role of this lectin in the activation of macrophages during the development of squamous cell carcinoma (SCC). Thus, using the experimental model of squamous cell carcinoma, we tested the hypothesis that galectin-3-mediated signaling could modulate the immune response and tumor development. The results of the present study demonstrated that the absence of galectin-3 is associated with less progression of squamous cell carcinoma. In addition, increased percentages of CD4⁺ TCD8⁺ cells, TCD8⁺, associated with a decrease in B cells, dendritic cells and macrophages were observed in tumor samples from Gal3KO animals. Regarding the macrophages phenotype, the results showed a lower percentage of M2 macrophages in samples of Gal3KO mice, as well as Th2 profile cytokines. Thus, the results of the present study provide evidence that galectin-3 plays an important role in the progression of squamous cell carcinoma and may be a target for future therapeutic modalities.

Key words: Galectin-3. Squamous cell carcinoma. Macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1. A estrutura dos membros da família das galectinas.....	16
Figura 1. Análise do desenvolvimento tumoral.....	34
Figura 2. Análises histológicas da pele dos animais WT e Gal3KO coradas em H&E.....	35
Figura 3. Análise do infiltrado inflamatório	37
Figura 4. Análises do infiltrado inflamatório	38
Figura 5. A Gal-3 na caracterização dos leucócitos no microambiente Tumoral.....	39
Figura 6. A ausência de Gal-3 reduz a porcentagem de citocinas do perfil das células T CD4 ⁺	41
Figura 7. Análise dos níveis de citocinas.....	43

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APC	aloficocianina
BALB/c.....	<i>Bagg Albinos C Mice</i> , camundogno Bagg albino C
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina sérica bovina
Ca ²⁺	<i>Calcium</i> , cálcio
CBC	Carcinoma basocelular
CD.....	<i>Cluster of Differentiation</i> , agrupamentos de diferenciação
CEC	Carcinoma espinocelular
CRD.....	<i>Carbohydrate-recognition domain</i>
D	Maior diâmetro
d	Menor diâmetro
DC.....	<i>Dendritic Cell</i> , célula dendrítica
DMBA	<i>7,12-Dimethylbenz[a]anthracene</i> , 7,12-dimetilbenz[a]antraceno
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , ácido etileno-dimano-tetra acético
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> , separação celular ativada por fluorescência
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoersceína
g	<i>Grams</i> , gramas
GAL-3.....	<i>Galectin-3</i> , galectina-3
Gal3KO.....	<i>Gal-3 Knockout</i> , camundongo geneticamente deficiente de galectina-3
H&E.....	<i>Haematoxylin and Eosin</i> , hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	<i>Interleukin</i> , interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KRAS	Proto-oncogene, GTPase
LGALS3	Gene da Galectina-3
M1.....	<i>M1-polarized Macrophages</i> , macrófagos M1 polarizados
M2.....	<i>M2-polarized Macrophages</i> , macrófagos M2 polarizados
mg.....	<i>Milligram</i> , miligrama
mL.....	<i>Milliliter</i> , mililitros
mm.....	<i>Millimeter</i> , milímetro

NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> , fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer Cell</i> , célula matadora natural
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tapão fosfato salino
PE	<i>Phycoerythrin</i> , ficoeritrina
PercP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i> , proteína clorofil peridina
pH	<i>Hydrogenionic Potential</i> , potencial hidrogeniônico
PI	<i>Propidium Iodide</i> , iodeto de propídeo
PI3K	<i>Fosfatidilinositol 3-quinase</i>
PKB	<i>Protein Kinase B</i> , proteína quinase B
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i> , acetate miristato de forbol
RAF1	<i>Raf-1 Proto-Oncogene</i> , Serine/Threonine Kinase
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> , meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SD	<i>Standard Deviation</i> , desvio padrão
SSC	<i>Side Scatter</i> , parâmetro de análise celular por granularidade
TCR	<i>T cell receptor</i> , receptor de células T
T CD4+	<i>Helper T Lymphocyte</i> , linfócito T auxiliary
T CD8+	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> , linfócito T citotóxico
TGF- β	<i>Tumoral Growth Factor</i> , fator de transformação de crescimento
TH	<i>Helper T Lymphocyte</i> , linfócito T auxiliar
TH1	<i>Helper T Lymphocyte 1</i> , linfócito T auxiliar 1
TH2	<i>Helper T Lymphocyte 2</i> , linfócito T auxiliar 2
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> , fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
V	Volume
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , fator de crescimento vascular endotelial
WT	<i>Wild Type</i>
WT ^{CEC}	<i>Wild Type CEC</i> , camundongo selvagem com carcinoma espinocelular

LISTA DE SÍMBOLOS

%.....	Porcentagem
°C.....	Graus Celsius
µg.....	<i>Microgram</i> , microgramas
µL.....	<i>Microliter</i> , microlitros
µM.....	<i>Micromolar</i> , micromolar
µm.....	<i>Micrometer</i> , micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2	PROPOSIÇÃO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Aspectos Éticos e Animais de experimentação.....	27
3.2	Carcinogênese química	27
3.3	Eutanásia e coleta de tecidos.....	27
3.4	Análise Histopatológica	28
3.5	Separação de leucócitos da lesão	28
3.6	Citometria de fluxo	29
3.7	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas e quimiocinas	29
3.8	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Ausência de galectina-3 afeta o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele.....	33
4.2	Caracterização dos leucócitos no microambiente tumoral.....	36
4.3	A ausência de galectina-3 influencia a produção de citocinas por células T CD4 ⁺	40
4.4	A ausência de Galectina-3 diminuiu o nível de IL-10 no microambiente tumoral.....	40
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As lectinas são definidas como proteínas que ligam carboidratos sem alterá-los enzimaticamente (GOLDSTEIN et al., 1983; LIENER et al., 1986). As lectinas foram descobertas a mais de 100 anos, em plantas, e a primeira ideia de que as lectinas existiam em animais surgiu na década de 1960 (STILMARK, 1988; SHARON E LIS, 1972). A primeira evidência direta da existência de uma lectina em mamíferos surgiu durante um estudo de mecanismos que controlavam o turnover de glicoproteínas na circulação sanguínea (DRICKAMER e TAYLOR, 1993).

As lectinas compreendem uma classe de proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD, *carbohydrate-recognition domain*) e que se ligam especificamente a açúcares, de maneira reversível (LIU e RABINOVISCH, 2005; NAKAHARA; OKA; RAZ, 2005). Estão presentes em todos os organismos vivos, como plantas, vírus, bactérias e mamíferos. As lectinas de mamíferos fazem parte de um importante grupo de moléculas que participam da resposta imune, especialmente da imunidade inata, atuando na primeira linha de defesa (GABIUS, 1997). As lectinas participam da interação célula á célula, adesão, proliferação, apoptose, splicing do RNA e também na modulação das respostas celulares (DINGS et al., 2018).

A partir do CRD, as lectinas de mamíferos podem ser agrupadas em famílias e superfamílias estruturalmente relacionadas (SHARON e LIS, 2004). Essas proteínas foram classificadas em pelo menos 4 grupos: lectinas do tipo C, tipo P, tipo I e do tipo S (ou S-Lac), onde se encontram as galectinas, proteínas ligante de β -galactosídeos (BARONDES et al., 1994; RINI e LOBSANOV, 1999; KRZESLAK e LIPINSKA, 2004; LIU e RABINOVICH, 2005). Membros das galectinas são amplamente distribuídos na natureza, presente desde organismos primitivos como esponjas e nematoides até fungos e animais superiores (BONALUMI, 2014). Atualmente são identificados 15 tipos de galectinas que de acordo com sua estrutura são divididas em três subgrupos: o grupo proto, com um CRD representado pelas galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15; o grupo quimera, com um CRD e uma cauda N-terminal, representado apenas pela galectina-3; e o grupo *tandem repeat*, com dois CRD na mesma cadeia conectados por um peptídeo de ligação, representado pelas galectinas 4, 6, 8, 9 e 12 (Ilustração 1) (CHIARIOTTI et al., 2004; SCIACCHITANO et al., 2018).

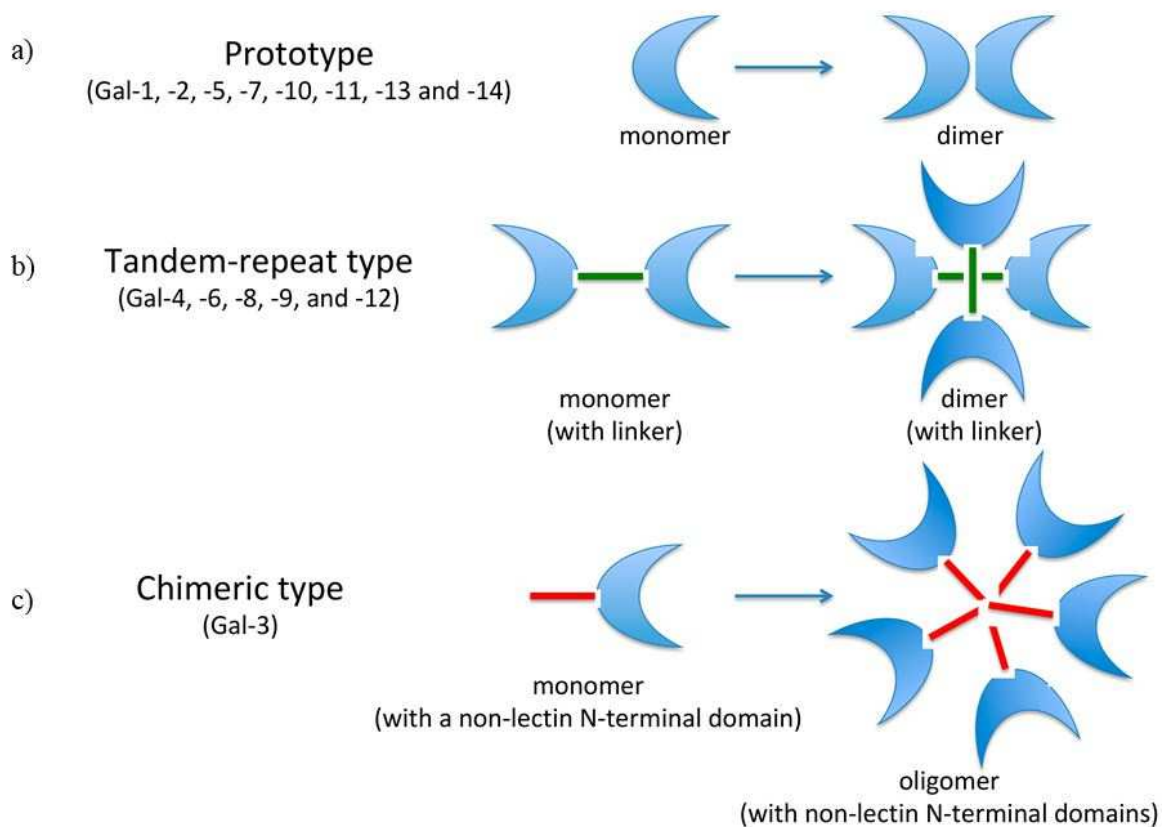


Ilustração 1. A estrutura dos membros da família das galectinas. Os membros da família das galectinas são divididos em três tipos: a) Proto com um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD); b) *tandem repeat*, com dois CRDs conectados por um ligante não conservado; c) quimera com um CRD e um domínio N terminal não lectina (ND). Algumas galectinas podem se associar em dímeros ou oligômeros. Retirado de Sciacchitano et al. 2018. (SCIACCHITANO et al., 2018).

As galectinas foram primeiramente isoladas como proteínas de ligação a β -galactosídeo constituem uma família de lectinas amplamente expressas em animais e evolutivamente conservadas que exibem similaridade no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e liga-se a glicoconjugados ricos em N-acetil-lactosamina (RABINOVICH, 1999; BARTOLAZZI, SCIACCHITANO, D’ALESSANDRIA, 2012). A galectina-3 é o membro mais estudado da família de galectinas (OCHIENG et al, 2004). A galectina-3 humana, pertence ao grupo quimera da família das galectinas, é codificada por um único gene, o gene LGALS3, é um monómero de 32-35kDa (KADROSFKE, OPENO, WANG, 1998). Sua estrutura é formada por um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD); e por um pequeno domínio amino-terminal de ligação protéica, que contém seqüências repetidas ricas em prolina, tirosina e glicina (LIU, 1990).

A galectina-3 pode ser encontrada no núcleo, citoplasma e na superfície de muitas células e a expressão desta proteína foi observada em vários tipos de tecidos como cólon, tireoide e próstata (LOTZ et al., 1993; PACIS et al., 2000; SAGGIORATO et al., 2004). A sua expressão em grande variedade de tipos celulares, como por exemplo, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos e células epiteliais (FLOTTE, SPRINGER, THORBECKE, 1983; HAINES et al., 1983; TRUONG et al., 1993). A galectina-3 é encontrada em solução como um monômero, mas pode formar oligômeros quando se liga a múltiplos carboidratos (AHMAD et al., 2004) formando estruturas supramoleculares conhecidas como *lattices*, que são importantes para aumentar a exposição de glicoproteínas na superfície celular influenciando a resposta celular (BOSCHER, DENNIS, NABI, 2011; FORTUNA-COSTA, 2014). As galectinas interagem com glicoconjugados enriquecidos com β -galactósídeos presentes em vários patógenos. Embora a natureza dessas interações não seja bem caracterizada, a formação da rede provavelmente desempenha um papel na ligação da galectina e o patógeno assim influenciando a resposta a este patógeno (RABINOVICH et al., 2007).

Em relação a suas atividades biológicas, a galectina-3 apresenta uma multifuncionalidade, regula o crescimento celular, a apoptose, transformações neoplásicas e aumenta sua expressão durante o processo inflamatório, induzindo a ativação de mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (HSU et al., 2000; SANO et al., 2000). Estudos demonstram que células que tiveram uma alta expressão de galectina-3 apresentaram aumento da resistência a apoptose quando induzida por óxido nítrico e radiação (TRUONG et al., 1993; YANG, HDSU, LIU, 1996). No processo de regulação da proliferação celular, a galectina-3 pode aumentar a expressão de fatores de transcrição atuando nas vias de sinalização celular (SHIMURA et al., 2004).

Em relação ao papel de galectina-3 na ativação e/ou inibição das células do sistema imunológico, dados indicam que galectina-3 apresenta importante papel na função dos macrófagos (YAN E LIU, 2003; OCHIENG, FURTAK, LUKYANOV, 2004). Estudos sugerem que esta proteína contribui para a migração destas células para o foco inflamatório. Além disso, demonstrou-se que galectina-3 expressa por células da linhagem monocítica atua como molécula pró-inflamatória induzindo a secreção de citocinas e quimiocinas (MELO et al., 2003). A ausência de galectina-3 em macrófagos compromete a atividade fagocítica (SANO et al., 2003). A ativação de macrófagos via a sinalização mediada por galectina-3 seria importante para a polarização destas células para o fenótipo M2 (MACHADO et al.,

2014). Dados também apontam para um papel de galectina-3 na ativação de linfócitos T. A galectina-3 é expressa por em vários subtipos de células T (PFOERTNER et al., 2006). Análises de *microarray* indicaram a expressão de galectina-3 na subpopulação de células T CD8, em resposta a *Yersinia pseudotuberculosis* (FAHRER et al., 2001). Em células de T CD4⁺ de memória observa-se aumento da expressão de galectina-3, quando comparado as células T *naïve* (HAINING et al., 2008), e a presença de RNAm para galectina-3 foi detectada em células T reguladoras (Tregs) (PFOERTNER et al., 2006).

Em relação ao papel de galectina-3 na ativação e/ou inibição das células T, dados indicam que a galectina-3 pode desempenhar papel negativo na ativação de células T, um processo que requer agrupamento de um número de receptores de células T (TCRs) no local de apresentação do antígeno. Quando a galectina-3 interage com glicanos modificados com Mgat5 na superfície das células T, restringindo o recrutamento do TCR para o local de apresentação de antígeno (DEMETRIOU et al., 2001), promovendo a anergia de células T. A galectina-3 induz a apoptose de células T, devido a sua ligação as moléculas CD45 e/ou CD71 (STILLMAN et al., 2006). A expressão de galectina-3 por linfócitos é induzida pelos sinais de ativação mediada pelo TCR e aumentada pelas citocinas IL-2, IL-4 e IL-7 (JOO et al., 2001). Em linfoma de células T, a galectina-3 desencadeia um influxo de Ca²⁺ que é bloqueado pela lactose, sugerindo que a galectina-3 liberada por outros tipos celulares como macrófagos também podem participar da sinalização de Ca²⁺ durante a ativação de células T (DONG E HUGHES, 1996).

Dentre as galectinas mais estudadas e relacionadas com o desenvolvimento tumoral destacam-se a galectina 1 e 3, estudos mostraram a importância dessas galectinas na progressão do câncer e metástase (LIU E CUMMINGS, 2009; SONG et al., 2014). A expressão de galectina-3 foi detectada em muitos tipos de tumores, como melanomas, astrocitomas e tumores da bexiga e de ovário. A expressão aumentada de galectina-3 geralmente está relacionada com a agressividade clínica do tumor e metástase (LIU E CUMMINGS, 2009). A galectina-1 pode promover a transformação maligna de células de glioma, contribuindo para a progressão tumoral (YAMAOKA et al., 2000). A galectina-1 correlacionar-se com o oncogênese RAS e a galectina-3 preferencialmente ao KRAS permitindo a ativação de RAF1 e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) colaborando com ativação das vias de sinalização e a regulação da expressão do gene (PAZ et al., 2001; ELAD-SFADIA et al., 2004). Além disso, as galectinas podem contribuir para a metástase ligando-se as integrinas ou regulando a expressão destas. A galectina-7 promove um perfil metastático e

resistência a apoptose em câncer de mama, a galectina 4 e 8 podem contribuir para a adesão das células cancerígenas ao endotélio vascular e assim contribuindo para a metástase (BARROW et al., 2011; CAMPION et al., 2013).

A expressão da galectina-3 foi detectada em diversos tipos de tumores como tireoide, colón, pâncreas, mama, cabeça e pescoço (CATRONOVO et al., 1996; PERILLO et al., 1998; CHOUFANI et al., 1999; COLI et al., 2002). Estudos demonstraram que em células epiteliais de mama a galectina-3 induz uma variedade de genes associados a processos biológicos alterados em neoplasias, como os processos de invasão e proliferação celular (MAZUREK et al., 2005). O aumento da adesão das células tumorais à matriz extracelular, induzido pela galectina-3, pode ter um papel importante no mecanismo de invasão e metástases tumorais (MATARRESE et al., 2000). A presença de galectina-3 acelera o crescimento tumoral em melanomas e favorece a angiogênese associado ao tumor (MACHADO et al., 2014). Um estudo envolvendo o silenciamento da expressão da galectina-3 em células de melanoma resultou na perda da tumorigenicidade e metástase acompanhada de um comprometimento na angiogênese e diminuição da invasão. Os autores apontaram que a galectina-3 pode ser um alvo para a terapia do melanoma (MOURAD-ZEIDAN et al., 2008).

Em carcinoma espinocelular de língua foi demonstrado um aumento da expressão de galectina-3 no citoplasma de células epiteliais enquanto que a expressão nuclear diminuiu (HONJO et al., 2000). Avaliando a relação entre a expressão de galectina-3 e níveis de apoptose de células T em tecido de carcinoma de células renais e características clínicas e patológicas, os resultados sugerem que galectina-3 é um das moléculas alvo para modular o escape imunológico do carcinoma de células renais (TOMOHARU et al., 2008). Análises imuno-histoquímicas de galectina-3 e CD68 em biópsias de pacientes com carcinoma oral evidenciaram alta expressão de galectina-3 (WEBER et al., 2017). Dependendo do microambiente tumoral e localização da galectina-3 ela pode ter atividade pró ou antitumoral. Em carcinoma de células escamosas foi observada a diminuição dos níveis de galectina-3 ao passo que em melanoma foi observado um aumento destes níveis (PRIETO, 2006). Sendo galectina-3 associada com os mecanismos de invasão e metástase tumoral e com a migração de neutrófilos e macrófagos para o microambiente inflamatório estudos sugerem que o bloqueio da função da galectina-3 limite a metástase tumoral (HSU et al., 2000; KAPUCUOGLU et al., 2009; SONG et al., 2014). A expressão da galectina-3 foi relatada em carcinoma espinocelular e carcinoma basocelular e correlaciona-se com o grau de

diferenciação tumoral. Em amostras de carcinoma espinocelular há uma maior expressão do que em carcinoma basocelular (LARSEN et al., 2009; KAPUCUOGLU et al., 2009).

O câncer de pele é a neoplasia maligna mais comum no mundo e representa mais da metade dos diagnósticos de câncer (INCA, 2018). Os cânceres de pele podem ser de dois tipos: não melanoma e melanoma. O câncer de pele não melanoma é o tumor mais incidente no Brasil, com 165.580 novos casos, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018). O câncer não melanoma, por sua vez, tem origem a partir das células epidérmicas, variando apenas a localização na camada da epiderme. Quando originado de células da camada basal da epiderme, resulta em carcinoma basocelular (CBC) e, se originado da camada espinhosa resulta no desenvolvimento de carcinoma espinocelular (CEC) (SIMÕES, SOUZA, PAIS, 2015). Assim, o termo câncer de pele não melanoma abrange, principalmente, o carcinoma basocelular e o espinocelular. Esses dois tumores malignos apresentam-se de forma diferente ao exame clínico e ao exame histopatológico (HOLMES, 2014). No entanto, ambos são muito parecidos quanto ao prognóstico: apresentam baixa letalidade, ou seja, raramente levam à morte e as metástases são raras (QUINN e PERKINS, 2010). O carcinoma espinocelular é segundo mais prevalente dentre todos os tipos de câncer (*Skin Cancer Foundation*, 2018). Pode se desenvolver em todas as partes do corpo como trato digestivo superior, pulmão, cavidade oral, língua, cavidade nasal, seios paranasais, laringe e faringe (incluindo a nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), embora seja mais comum nas áreas expostas ao sol, como orelhas, rosto, couro cabeludo, pescoço (YAN et al., 2011).

O mecanismo envolvido na progressão tumoral do carcinoma espinocelular é desconhecido. Estudos recentes têm demonstrado que existe uma relação direta entre a resposta imune Th1-relacionados e um melhor prognóstico em pacientes com carcinoma espinocelular (SPARANO et al., 2004). Estes resultados levaram-nos a hipótese de que a resposta imune do tipo Th1 protetora contra o carcinoma espinocelular pode ser prejudicada por fatores endógenos (SHARMA et al., 1999; SPARANO et al., 2004; CHEN et al., 2009; CHOW et al., 2012) como por exemplo, galectina-3. A galectina-3 teria importante papel na polarização de macrófagos para o fenótipo M2, e estas células estariam associadas com a inibição de células T e, conseqüentemente, a progressão tumoral (MACKINNON et al., 2008; JIA et al., 2013). Assim, diante de tudo que foi descrito anteriormente e considerando a importância da galectina-3 nos fenômenos biológicos que podem influenciar na formação e progressão tumoral, o objetivo deste trabalho foi analisar se a ausência da sinalização de galectina-3 afeta o desenvolvimento do carcinoma espinocelular induzido quimicamente.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Baseado no exposto, a hipótese a ser testada é se a expressão de galectina-3 influenciaria a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2 e, por consequência, levaria a progressão neoplásica. Para testar essa hipótese, propomo-nos a cumprir dois objetivos principais:

1. Avaliar o desenvolvimento e progressão do carcinoma espinocelular em camundongos geneticamente deficientes de galectina-3 (GAL3KO);
2. Analisar o fenótipo das células do infiltrado inflamatório presente em lesões do carcinoma espinocelular;
3. Analisar o perfil de citocinas presentes no microambiente tumoral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos e Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c (WT) e geneticamente deficientes de galectina-3 (Gal3KO), fêmeas, de 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alocados, ao acaso, em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições apropriadas, com livre acesso à água e a uma dieta padrão de laboratório.

3.2 Carcinogênese química

O protocolo de indução de carcinogênese química empregado compreendeu duas fases: iniciação e promoção, como descrito por Moore et al. em 1999. Antes da aplicação do agente iniciador, a região dorsal de cada camundongo era submetida à assepsia por álcool 70% v/v e à tricotomia com auxílio de lâminas de barbear Gillette aço inox. Os animais do grupo controle, após a tricotomia, receberam apenas acetona, veículo diluente do carcinógeno. Os camundongos do grupo experimental ($n=15$) receberam uma primeira dose de 50 μ g de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) diluído em 200 μ L de acetona; seguida por mais três doses (DMBA, 25 μ g/100 μ L de acetona), aplicadas uma vez por semana. Durante a fase de promoção, cada animal recebeu 10 μ g de Phorbol Miristato Acetato (PMA) diluído em acetona, três vezes por semana, durante 18 semanas. O desenvolvimento tumoral foi acompanhado visualmente no transcorrer de todo o período experimental e as alterações morfológicas devidamente registradas. As dimensões dos tumores foram medidas com auxílio de um paquímetro, e o volume calculado segundo a fórmula: $Dxd^2/2$ aonde D e d são os diâmetros maior e menor respectivamente (OWEN e STEEL, 1977).

3.3 Eutanásia e coleta de tecidos

Os animais foram submetidos à eutanásia no período de 18 semanas após o início da aplicação do carcinógeno. A eutanásia foi realizada com o uso do barbitúrico Tiopental

Sódico 2,5% (200mg/kg) por via intraperitoneal, associado com anestésico local (cloridrato de lidocaína na dosagem de 10 mg/kg). Após a confirmação do óbito, fragmentos das lesões e órgãos (coração, pulmão, fígado, baço e linfonodos) foram coletados e armazenados em solução salina a 4°C e, em seguida, encaminhados para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB/USP. Após a remoção cirúrgica, as lesões foram divididas em duas partes: um fragmento separado para a confecção de lâminas histológicas e o segundo fragmento destinado a realização do processo de digestão enzimática do tecido para o isolamento de leucócitos.

3.4 Análise Histopatológica

Amostras de tecido tumoral, coletadas como descrito acima foram fixadas em solução de paraformaldeído 10%, pH 7.4, em temperatura ambiente, pelo tempo máximo de 6h. O material foi processado pelos métodos histológicos de rotina e incluídos em parafina. Cortes seriados com espessura de 5µm foram obtidas através de um micrótomo, montados em lâminas (Sigma), e corados com coloração em hematoxilina & eosina. A análise histopatológica foi realizada através da análise de cortes seriados em microscopia ótica, seguindo os critérios adotados pela Organização Mundial de Saúde 2005 em: displasia epitelial discreta, quando na presença alterações arquiteturais limitadas ao terço basal do epitélio, acompanhado de atipia citológica; displasia epitelial moderada, lesões com alterações arquiteturais se estendendo ao terço médio do epitélio, considerando-se que a análise do grau de atipia citológica pode aumentar o grau de displasia; e displasia epitelial intensa: presença de alterações arquiteturais em mais de dois terços do epitélio associadas à atipias citológicas. O infiltrado mononuclear de cada secção foi classificado quanto à intensidade em discreto, moderado ou intenso e de acordo com a localização em difuso, focal ou misto visando basicamente determinar as características histológicas do tecido tumoral e o infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral.

3.5 Separação de leucócitos da lesão

As biópsias de tecido tumoral foram fracionadas e incubadas por 40 minutos a 37°C com meio RPMI contendo 250 µg/mL de colagenase. Um ciclo de dissociação celular

foi realizado por 4 minutos usando Medimachine (BD Biosciences, CA, EUA). Os homogeneizados de tecido foram brevemente centrifugados e a suspensão de células foi passada através de um filtro de células de 30 μm utilizando o êmbolo de uma seringa de 2 ml (BD Bioscience). Todas as contagens de células foram determinadas usando uma câmara de Neubauer. As células mortas foram excluídas com base na coloração com azul trypan.

3.6 Citometria de fluxo

A fenotipagem da população de leucócitos isolados do tecido tumoral dos animais de experimentação foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se anticorpos específicos. As células (1×10^6 células) foram incubadas com soro de coelho para o bloqueio de ligações inespecíficas por 60 minutos a 4°C. Em seguida, os anticorpos foram incubados por 1 hora a 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas, por duas vezes, a 460G por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI incompleto e as amostras adquiridas em FACS Callibur (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ). As análises foram realizadas usando o programa CELL Quest (BD Immunocytometry Systems) de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas e quimiocinas

O perfil de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL17 e TGF- β) no microambiente tumoral foi determinado por ELISA (Opteia, BD Bioscience), de acordo com as especificações do fabricante. Em resumo, as placas de 96 poços de alta afinidade foram sensibilizadas com o anticorpo primário diluído em tampão de ligação (*Coating Buffer*) e incubadas *overnight*, a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS + Tween (BD Bioscience) e incubadas por 2 h em temperatura ambiente com a solução de bloqueio para ligações inespecíficas (*Assay diluent*, BD Bioscience). Após este período, as placas foram novamente lavadas com PBS Tween e incubadas *overnight*, a 4°C com quantidades previamente conhecidas das citocinas recombinantes. Após mais uma seção de lavagens as placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com anticorpo biotilado e estreptavidina diluídos em *Assay diluent*. Em seguida foi adicionado o substrato com peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, na proporção de 1:1 (BD Bioscience),

conforme as instruções do fabricante. Ao final adicionou-se a solução de paralisação da reação (ácido sulfúrico 4N) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm (Bio-Rad, EUA).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc., CA, USA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados com indicativo de significância.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Ausência de galectina-3 afeta o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de pele

A fim de determinar o papel de galectina-3 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular, inicialmente analisamos se a ausência desta lectina influenciaria no aparecimento das lesões papiloma-like. Com este protocolo observou-se que a partir da 9ª semana de indução a incidência de lesões do tipo *papiloma-like* mostrou-se maior em animais com ausência de galectina-3 (Gal3KO), quando comparado ao grupo controle (WT), apresentando diferença estatística na 13ª semana (Figura 1A). O desenvolvimento tumoral foi acompanhado visualmente no transcorrer de todo o período experimental (Figura 1B-C). Esta análise macroscópica das lesões demonstrou que os animais Gal3KO desenvolveram lesões com menor volume em relação aos animais WT (Figura 1D). Esses resultados sugerem haver diferenças no desenvolvimento das lesões entre o grupo controle (WT) e Gal3KO. Ademais, os dados evidenciaram um perfil semelhante de perda de peso entre os grupos estudados (dados não apresentados).

Para a análise microscópica do desenvolvimento de carcinoma espinocelular, amostras de tecido tumoral foram coletadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E), e os resultados ilustrados na Figura 2. Inicialmente analisamos o grau de displasia e este foi estabelecido de acordo com o sistema de classificação da OMS (Organização Mundial da saúde). Os resultados indicaram que 83,3% dos animais com deficiência em galectina-3 apresentaram lesões classificadas como carcinoma espinocelular *in situ*. Enquanto que em 62,5% das amostras de animais do grupo controle observou-se o desenvolvimento de carcinoma espinocelular (Figura 2A). Em amostras de animais do grupo controle (WT) observou que 25% apresentaram displasia intensa, 12,5% apresentaram displasia moderada (Figura 2A). A presença de características de malignidade nas amostras foi determinada de acordo com os seguintes parâmetros: pleomorfismo celular, hiper cromatismo nuclear, perda de arquitetura, formação de gotas endocíticas, disqueratose e presença de ilhotas displásicas e pérolas córneas no tecido conjuntivo (AMÔR, 2015). As análises histopatológicas das lesões dos animais WT indicaram o aumento do número de células nas camadas epiteliais, com projeções epiteliais em forma de gota (Figura 2B-C). Em amostras de tecido de animais deficientes de galectina-3 (Gal3KO), os resultados evidenciaram predomínio de lesões com mais perda da polaridade das células do estrato basal, presença de células pleomórficas com núcleos hiper cromáticos com aumento do número de mitoses (Figura 2D-E). Estes resultados

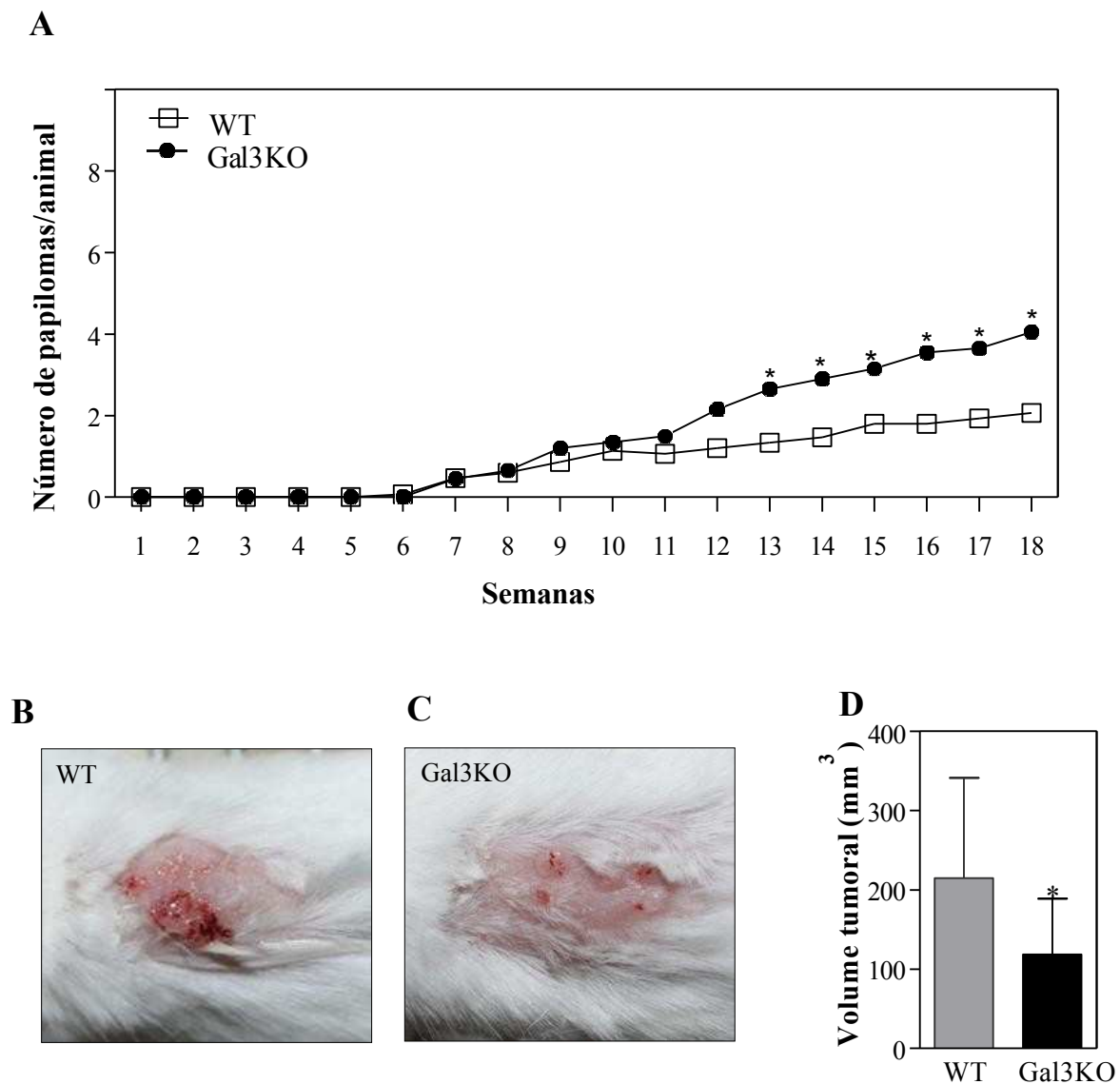


Figura 1. Análise do desenvolvimento tumoral. Os camundongos WT e Gal3KO receberam no dorso uma dose única de DMBA a 50 μ g/200 μ L seguida de mais 3 aplicações contínuas de DMBA á 25 μ g/100 μ L e promoção de 10 μ g/100 μ L de PMA três vezes por semana até a 18^o semana. O gráfico (A) representa o número de papilomas detectados semanalmente no dorso dos animais após 18 semanas de carcinogênese química. Fotomicrografias macroscópicas e sem escala de (B e C) mostram lesões características dos animais WT (B) e Gal3KO (C). O gráfico (D) representa o volume tumoral detectado após 18 semanas de indução carcinogênica.

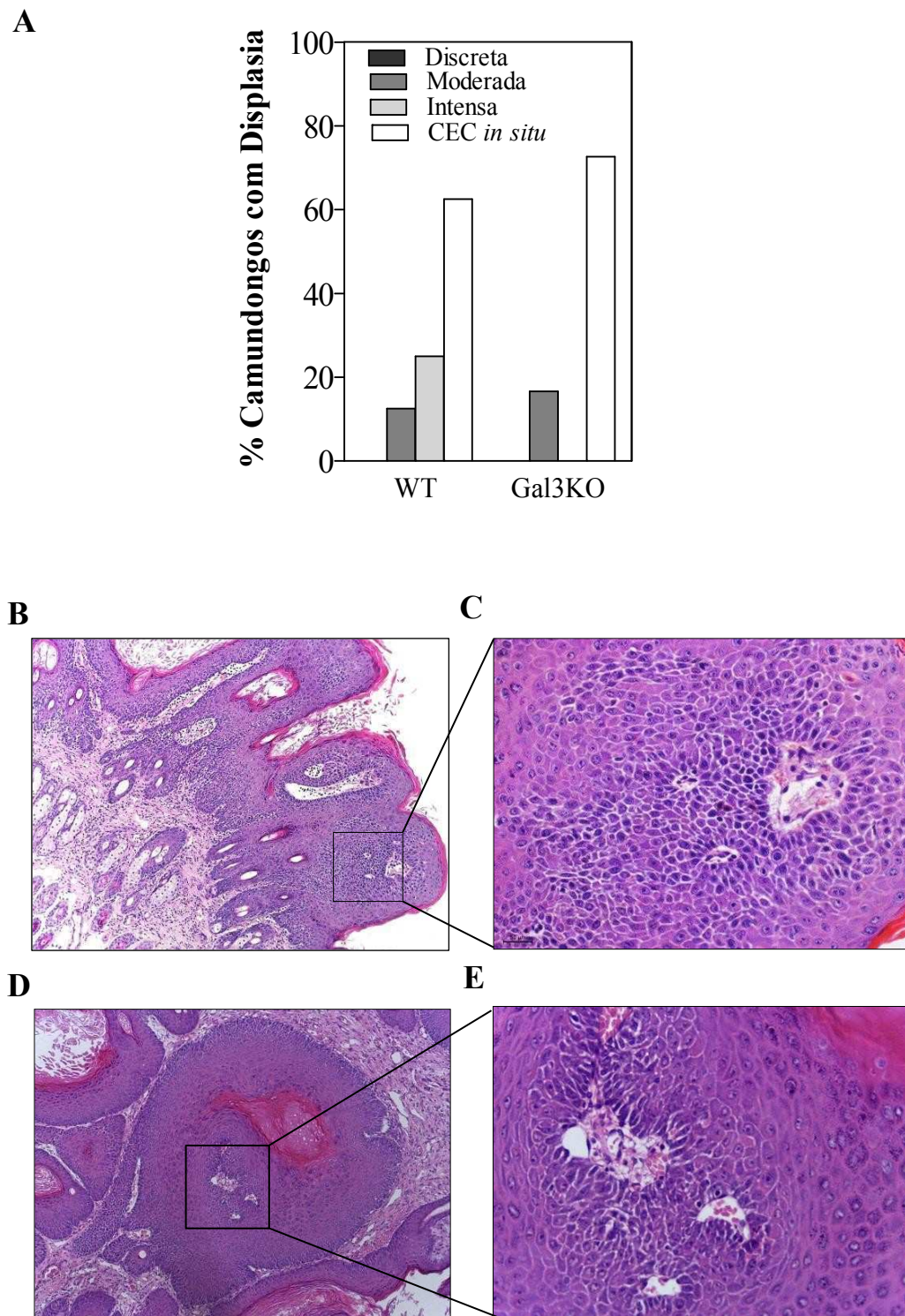


Figura 2. Análises histológicas da pele dos animais WT e Gal3KO coradas em H&E. (A) As barras representam a porcentagem do grau de displasia epitelial de acordo com o sistema de classificação da OMS. (B-E) Fotomicrografias de amostras das lesões de pele coletadas após 18 semanas de carcinogênese, dos animais WT em aumentos de 100 μ m (B) e 50 μ m (C); e dos animais Gal3KO em aumentos de 100 μ m (D) e 50 μ m (E).

evidenciam diferenças nos padrões de desenvolvimento das lesões tumorais entre os grupos estudados.

Sabendo que a intensidade do infiltrado inflamatório pode estar relacionada com a gravidade das lesões, em seguida analisou-se a presença, localização e intensidade das células inflamatórias no microambiente tumoral (Figuras 3 e 4). Em relação à localização, o infiltrado inflamatório pode ser classificado em focal, misto e/ou difuso (Figura 3A). Os resultados do presente estudo evidenciaram não há diferenças quanto à localização do infiltrado inflamatório em amostras de animais Gal3KO e do grupo controle (WT), e este foi classificado como sendo difuso na maioria das amostras analisadas (Figura 3B,C,D,E). De acordo com a OMS o infiltrado inflamatório pode ser classificado como moderado, discreto e intenso (Figura 4A), os resultados demonstraram que 50% das amostras analisadas apresentaram infiltrado moderado, tanto em amostras do grupo controle quanto de animais Gal3KO (Figura 4B,C,D,E).

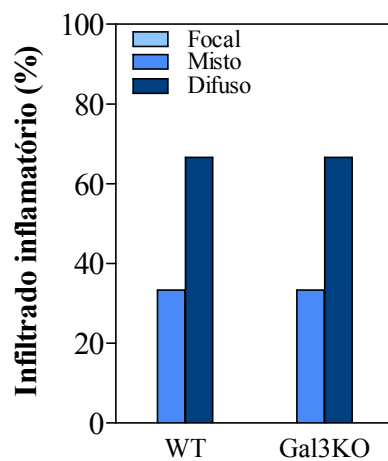
4.2 Caracterização dos leucócitos no microambiente tumoral

Sabendo que o perfil de leucócitos no microambiente tumoral pode estar relacionado com a progressão tumoral (LANÇA e SILVA-SANTOS, 2012), analisamos inicialmente o número total de células isoladas das lesões de cada grupo experimental, após a digestão enzimática. Os resultados evidenciaram maior número de leucócitos isolados das lesões de animais do grupo controle ($36,79 \times 10^5$) em comparação com os animais deficientes de galectina-3 ($13,25 \times 10^5$) (Figura 5A).

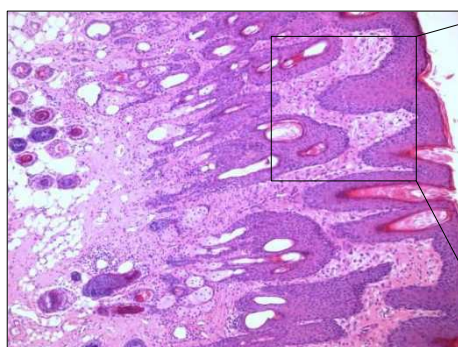
Após termos detectado diferenças quanto ao número total de células isoladas do microambiente tumoral de camundongos do grupo controle e deficientes de galectina-3, o próximo passo foi caracterizar por citometria de fluxo, as populações de leucócitos. Neste contexto caracterizamos inicialmente as populações de linfócitos. Os resultados evidenciaram que o número de células T CD4⁺ (Figura 5B) foi significante maior nos animais Gal3KO e as células T CD8⁺ também foi significante maior nas amostras de animais Gal3KO (Figura 5C). Comparando as duas linhagens de camundongos, os dados também evidenciaram que animais Gal3KO apresentaram menor número de células B (CD19⁺) isoladas do microambiente tumoral, em relação aos animais do grupo controle (WT) (Figura 5D). Em seguida, avaliamos a população de células dendríticas isolada das amostras de tecido tumoral de animais do grupo

controle (WT) e deficientes de galectina-3 (Gal3KO) (Figura 5E). Os resultados evidenciaram que em amostras de animais Gal3KO observou-se

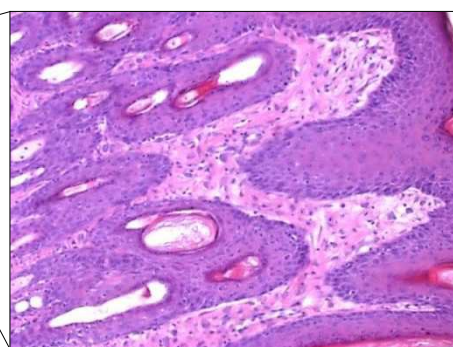
A



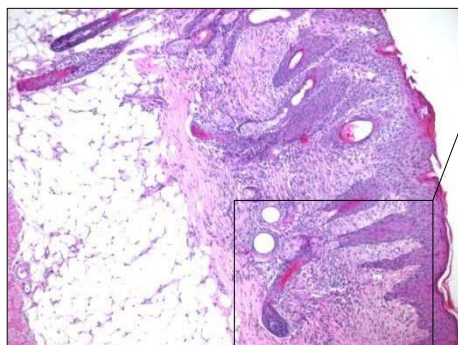
B



C



D



E

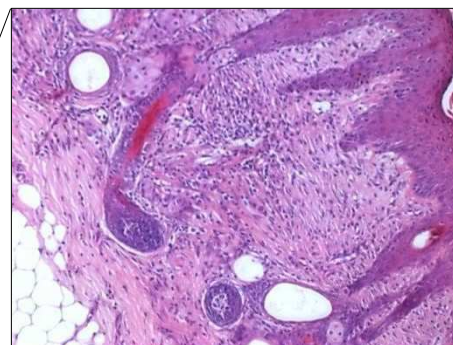


Figura 3. Análise do infiltrado inflamatório. (A) Representação gráfica da classificação do infiltrado mononuclear de cada secção, classificadas de acordo com a localização em difuso, focal ou misto. Fotomicrografias de secções representativas das lesões de pele apresentando o infiltrado inflamatório de camundongos do grupo WT em aumentos de 100µm (B) e 25µm (C) e do grupo Gal3KO 100µm (D) e 25µm (E).

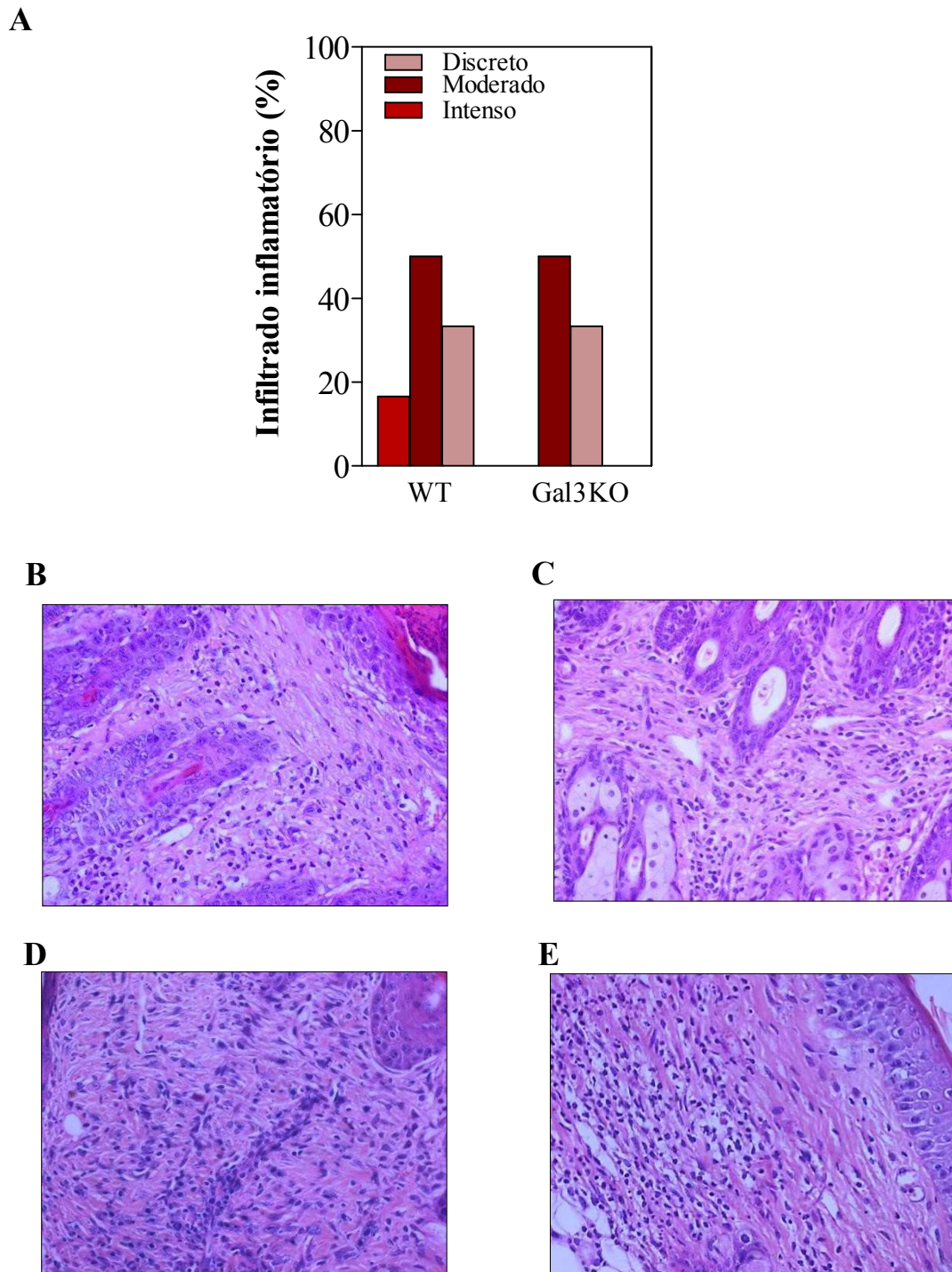


Figura 4. Análises do infiltrado inflamatório. (A) As barras representam a porcentagem do grau de classificação do infiltrado mononuclear de cada secção, classificadas quanto a intensidade em discreto, moderado ou intenso. (B-E) Fotomicrografias de amostras das lesões de pele coletadas após 18 semanas de carcinogênese, evidenciando a intensidade do infiltrado inflamatório dos animais WT (B-C) em aumentos de 50 μ m; e dos animais Gal3KO (D-E) em aumentos de 50 μ m.

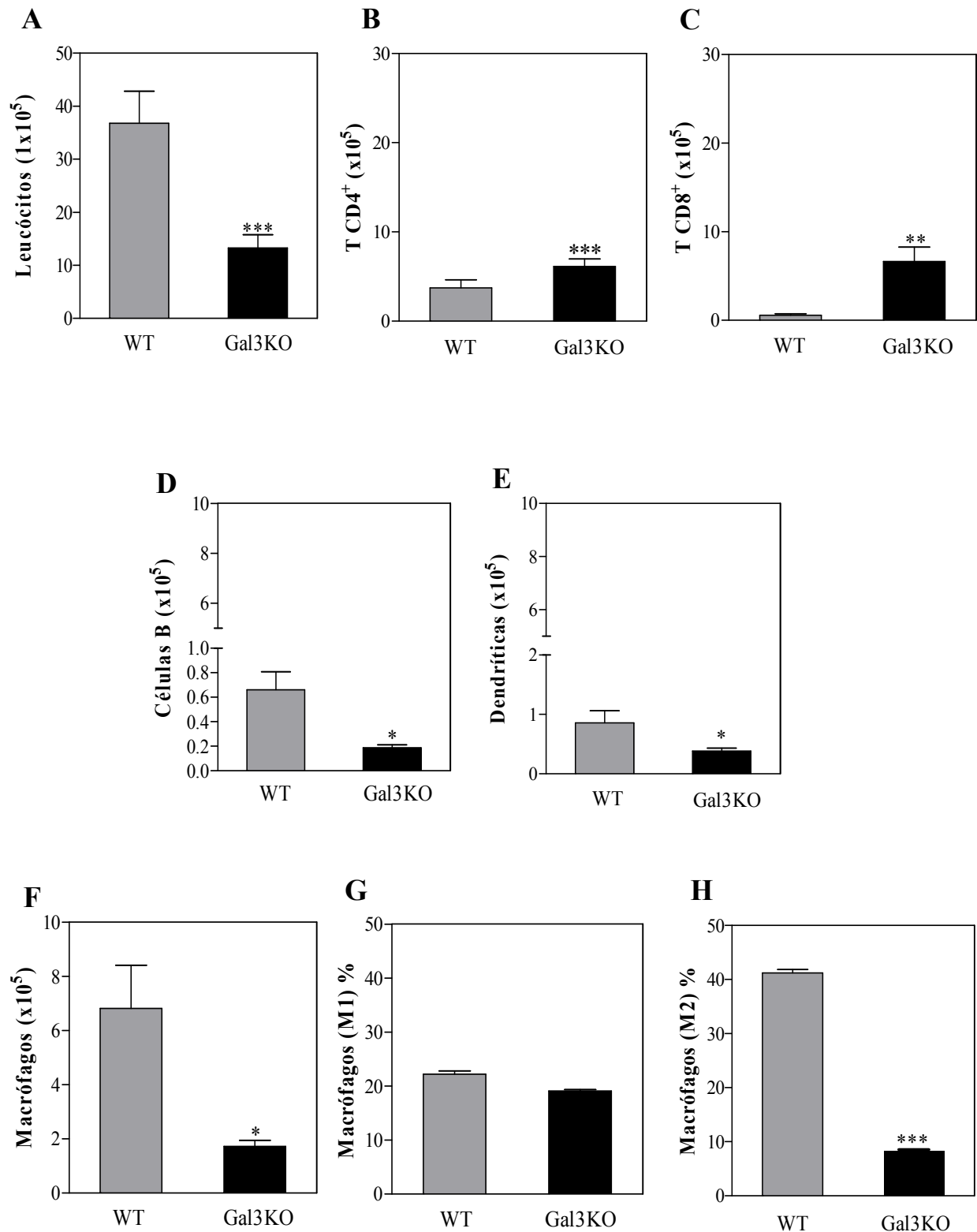


Figura 5. A Gal-3 na caracterização dos leucócitos no microambiente Tumoral: (A) O Número absoluto e o fenótipo dos leucócitos presentes nas lesões determinadas por citometria de fluxo das células TCD4⁺ (B), células TCD8⁺ (C), células B (CD19⁺) (D), células dendríticas (CD11b) (E), macrófagos (F4/F80) (F) e a percentagem de macrófagos com o fenótipo M1 (IFNR) (G) e M2 (IL4R) (H). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

menor número de células dendríticas, quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 5E).

Os macrófagos são células da linhagem mielóide e dependendo do microambiente em que se encontram apresentam uma ampla heterogeneidade fenotípica. Sabe-se que existem dois fenótipos distintos, os macrófagos ativados classicamente (M1) e os ativados alternativamente (M2) (SHOUT et al., 2005). Com o propósito de avaliar as populações de macrófagos M1 e M2, inicialmente avaliamos por citometria de fluxo o número de macrófagos presentes no microambiente tumoral (Figura 5). O número de macrófagos foi maior em amostras de animais do grupo controle (WT), em relação aos animais Gal3KO (Figura 5F). A análise da expressão de moléculas de superfície relacionadas aos macrófagos M2 evidenciou aumento significativo desta população de macrófagos em amostras de animais do grupo controle ($41\% \pm 0,64$), em relação às amostras de animais Gal3KO ($8,1\% \pm 0,25$) (Figura 5H). Em relação à população de macrófagos M1, não observamos diferenças significativas nas frequências desta população celular entre os grupos (Figura 5G).

4.3 A ausência de galectina-3 influencia a produção de citocinas por células T CD4⁺

Sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ participam da resposta imune antitumoral produzindo citocinas que ativam e polarizam outras células do sistema imune, como linfócitos B, macrófagos e linfócitos T CD8⁺ (SALUSTO, 2016). Com o objetivo de avaliar se a ausência de galectina-3 poderia interferir com a capacidade funcional destas células, linfócitos isolados do tecido tumoral foram avaliados por citometria de fluxo quanto à produção de IL-4, IL-10 e IL-17 (Figura 6). Linfócitos T CD4⁺ isolados de amostras de tecido tumoral de animais do grupo controle apresentaram maior percentagem de células que expressaram IL-4, IL-10 e IL-17, em comparação aos valores observados em amostras de animais do grupo Gal3KO (Figura 6A, B,C).

4.4 A ausência de Galectina-3 diminuiu o nível de IL-10 no microambiente tumoral

O microambiente tumoral é composto por mediadores solúveis que exercem funções importantes na inflamação com propriedades anti-inflamatórias e/ou pró-inflamatórias (MARTIN, WEI, LU, 2016). Sendo assim, para finalizar o estudo do microambiente tumoral, analisamos o perfil das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, TGF- β presentes no sobrenadante das amostras de tecido tumoral (Figura 7).

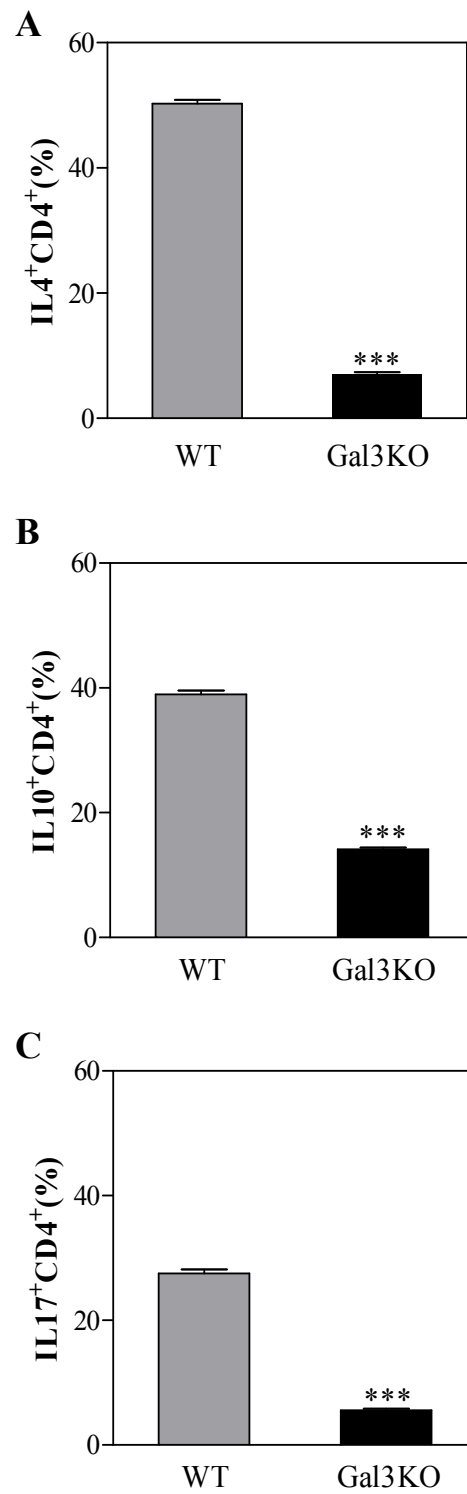


Figura 6. A ausência de Gal-3 reduz a porcentagem de citocinas do perfil das células T CD4⁺. A porcentagem de células IL4⁺CD4⁺ (A), IL10⁺CD4⁺ (B), IL17⁺CD4⁺ (C) presentes nas lesões tumorais foi determinada por citometria de fluxo. *** $p < 0,001$

A análise da produção de IFN- γ , IL-4 e IL-17 evidenciou uma tendência a maior nível destas citocinas em amostras do grupo controle, em comparação as amostras de animais Gal3KO, entretanto não houve diferença estatística significativa (Figura 7). Com relação aos níveis de IL-10, os dados evidenciaram que as amostras dos animais WT apresentaram nível elevado desta citocina ($P < 0,05$), em relação ao grupo Gal3KO (Figura 7C). Por fim, detectaram-se níveis similares de TGF- β nas amostras de animais do grupo controle e Gal3KO (Figura 7D).

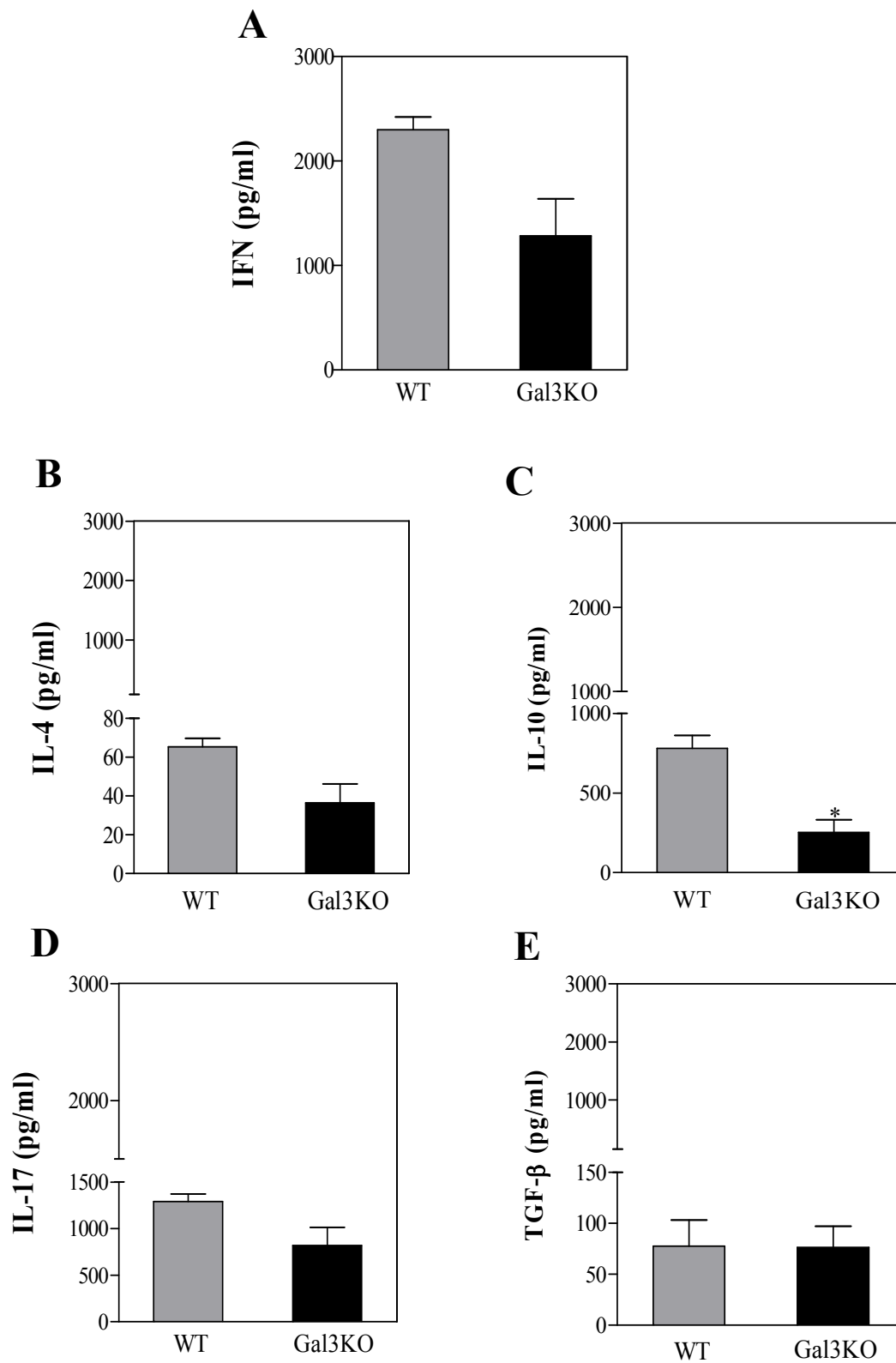


Figura 7. Análise dos níveis de citocinas. Os níveis de IFN (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IL-17 (D) e TGF-β (E) analisados dos sobrenadantes das amostras de tumor dos animais WT e Gal3KO usando ELISA. * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A galectina-3 apresenta importante papel na proliferação celular, adesão, angiogênese e apoptose (SONG et al., 2014). Evidências recentes indicam que galectina-3 está envolvida com progressão tumoral, invasão e metástase (FORTUNA-COSTA et al., 2014, DONDOO et al., 2017). Ademais, em diferentes tipos de câncer demonstrou-se que galectina-3, presente no microambiente tumoral, poderia influenciar e promover ambientes inflamatórios que permitiriam o crescimento tumoral (LIU E RABINOVISCH, 2005; ONUCHIC e CHAMMAS, 2010; JIA et al., 2013); entretanto pouco se sabe sobre seu papel no carcinoma espinocelular de pele (DANGUY, CAMBY, KISS, 2002). Uma vez que galectina-3 é expressa por células do sistema imune e dados indicam que células de carcinoma espinocelular humano também expressam esta lectina (PLZÁK et al., 2001; LARSEN et al., 2011), buscamos esclarecer qual seria o papel funcional de galectina-3 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular e, inicialmente, avaliamos o desenvolvimento de tumores em animais geneticamente deficientes de galectina-3.

Os dados obtidos demonstraram que galectina-3 apresentam um importante papel no desenvolvimento tumoral. Ao analisarmos o desenvolvimento de carcinoma espinocelular detectamos elevada frequência de papilomas nestes animais, contudo as lesões apresentaram volume menor ao observado em animais do grupo controle. Após 16 semanas de carcinogênese química, constatou-se o desenvolvimento de CEC moderadamente diferenciado em animais deficientes de galectina-3. Conhecendo a diferença no padrão de desenvolvimento das lesões tumorais entre os grupos, analisamos o perfil de displasias das amostras de animais do grupo controle e deficientes de galectina-3. Os resultados da gradação das lesões de acordo com a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005), demonstraram que em amostras de animais deficientes de galectina-3 apresentaram grau de displasia mais elevado, quando comparado com animais do grupo controle. Sugerindo que ausência da galectina-3 no microambiente tumoral pode favorecer o desenvolvimento tumoral mais agressivo. Estudos com animais em outros modelos tumorais também demonstraram resultados semelhantes, onde animais deficientes galectina-3 tiveram um maior desenvolvimento tumoral (JIA et al., 2013; PEREIRA et al., 2016). Um estudo com melanomas mostrou que a presença de galectina-3 acelera o crescimento tumoral e favorece a angiogênese associado ao tumor (MACHADO et al., 2014).

As células inflamatórias têm importante papel no comportamento biológico e na interação das células tumorais e estroma em diferentes tipos de cânceres (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN; 2010). Estudos em diferentes tipos de tumores têm demonstrado que as neoplasias são infiltradas por população heterogênea de células do sistema imune, constituída de diferentes proporções de linfócitos T, linfócitos B, células NK e macrófagos (AALTOMAA et al., 1992; CAMP et al., 1996). Sabendo que uma das principais funções da galectina-3 é a regulação das respostas inflamatórias (RUVOLO et al., 2016), analisamos a extensão e perfil do infiltrado inflamatório no sítio tumoral. Os resultados demonstraram que o número de leucócitos se apresentou diferente entre os grupos. Os animais do grupo controle apresentaram maior número de leucócitos totais isolados do microambiente tumoral, como predomínio de macrófagos e no microambiente tumoral. De modo contrário, os resultados evidenciaram em amostras de animais deficientes de galectina-3 (Gal3KO) o predomínio de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e diminuição de macrófagos. As células T CD4⁺ contribuem para a regressão do tumor, orquestrando respostas imunes que atingem o tumor, sabe-se também que deficiência de células TCD4⁺ foi associada a uma diminuição no desenvolvimento tumoral em animais induzidos quimicamente (GIRARDI et al., 2004; PERALES e WOLCHOK, 2004). A menor percentagem de T CD4⁺ observada nos animais WT poderia estar associada ao menor grau de displasia encontrado nesses animais.

Estudos demonstram o papel da galectina-3 na regulação da função e apoptose de células T (STOWEL et al., 2008), entretanto pouco se sabe sobre o papel da galectina-3 na regulação de células T reativas a tumores no microambiente tumoral, tem se demonstrado que a galectina-3 interage diretamente com a sinapse imunológica na superfície das células T reativas ao tumor e ativa as células T para a apoptose, dependendo do status das células T e suas concentrações proteicas (PENG et al., 2008).

Modelos experimentais demonstraram que a polarização para um perfil de resposta TH1 está associada com resolução do câncer, enquanto que a polarização para TH2 está associada com progressão tumoral (GHOSH et al., 1995; HU; URBA; FOX, 1998; LEE et al., 1997). Desta forma, analisamos as percentagens de células T CD4⁺ que produziam IL-10, IL-4 e IL-17. Os resultados de nosso estudo demonstraram menor percentagem de linfócitos T CD4⁺ em amostras de camundongos deficientes de galectina-3. Estudos recentes sugerem que a galectina-3 suprime a ativação dos eventos iniciais na transdução de sinal mediada por TCR e potencializa a regulação negativa do TCR em células ativadas pelo acoplamento do receptor (CHEN et al., 2009). Em um modelo animal de asma foi observado

que os animais deficientes de galectina-3 desenvolveram uma forma menos severa da doença e com níveis de IL-4 menores quando comparados com os animais WT, sugerindo a influência da galectina-3 na polarização das células Th2 (ZUBERI et al., 2004). De modo contrário, em um estudo de dermatite atópica foi observado que a galectina-3 pode promover uma polarização da resposta imune Th2 e contribuir para a inflamação alérgica (SAEGUSA et al., 2009). Em modelo de melanoma murino pode se observar uma desregulação das respostas imunes observada em camundongos Gal3^{-/-} em termos de diminuição da citotoxicidade de NK e respostas Th1 e Th2 (CHAUDHARI et., 2015). Assim, evidências apontam para a possibilidade de que o balanço das respostas Th1 e Th2 pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral.

As células T CD8⁺ tem um importante papel na atividade antitumoral seus efeitos citotóxicos podem mediar diretamente à morte de células tumorais, e também são capazes de liberar citocinas que previnem e suprimem o desenvolvimento dos tumores (SCHOENBERGER et al., 1998). Em nosso estudo observou-se que a deficiência de galectina-3 levou a aumento no número de linfócitos T CD8⁺ no microambiente tumoral. Pouco se sabe sobre os efeitos de galectina-3 na função das células T CD8⁺. A galectina-3 extracelular se liga a LAG-3 nas células T CD8⁺ e, possivelmente, suprime a função destas células (KUOU et al., 2015). Assim com em células T CD8⁺ derivados de tumores, a expressão da galectina-3 tem sido associada à perda da localização do marcador TCR e CD8⁺ na sinapse imunológica e perda subsequente da função efetora (DEMOTTE et al., 2010). Estes dados indicariam que galectina-3 pode direta ou indiretamente influenciar e controlar a ativação das células T regulando a sinapse imunológica.

A participação de macrófagos no desenvolvimento de neoplasias e seu papel no estabelecimento de uma inflamação crônica vêm ganhando importância e complexidade crescentes. Os macrófagos associados a tumores (TAMs – tumor-associated macrophages) estão envolvidos em processos de inflamação crônica e parecem estar associados à progressão tumoral e metástase (revisto por Chammas, 2010). Macrófagos associados a tumores são as principais células inflamatórias que infiltram tanto tumores humanos e murinos (MONTOVANI et al., 1992), estudos epidemiológicos indicam uma correlação entre a densidade de TAMs e o mau prognóstico em vários cânceres humanos (POLLARD, 2009). Sabe-se que galectina-3 atua como fator quimiotático e de adesão tem um papel importante no recrutamento de monócitos e macrófagos, em nosso estudo observou-se que a deficiência de

galectina-3 levou a diminuição no número de macrófagos no microambiente tumoral. Estes dados indicariam que galectina-3 atua de uma forma na regulação dos macrófagos.

Sabe-se que macrófagos apresentam plasticidade fenotípica e funcional e contribuem para a inflamação, resposta antitumoral, imunorregulação, remodelação tecidual e/ou promoção tumoral; e essas funções são dependentes dos sinais que estes recebem do microambiente (GRIVENNIKOV, GRETEN, KARIN, 2010). Estudos indicam dois fenótipos funcionais para macrófagos: o estado de ativação clássica (M1) e o de ativação alternativa (M2) (SICA, ALLAVENA, MANTOVANI, 2008). A ativação de macrófagos depende de sinais do microambiente circundante a múltiplos estímulos, que desempenham um papel importante no desenvolvimento do tumor, com isto os macrófagos podem sofrer uma polarização, e se diferenciar em dois tipos: M1 também chamado de via de ativação clássica em resposta à estimulação com fatores microbianos, como o LPS, e citocinas pró-inflamatórias Th1, como $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, ou uma combinação dos dois e os M2 também chamados de via alternativa, em resposta as citocinas Th2, IL-4, IL-13, as citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e $TGF\beta$, ou glicocorticoides (MANTOVANI et al., 2004; EDWARDS et al., 2006). A ausência de galectina-3 levou a diminuição na percentagem de macrófagos M2 no microambiente tumoral. Assim, demonstramos que a presença de galectina-3 no microambiente tumoral estudado pode favorecer a diferenciação de macrófagos para o perfil M2. Em concordância, resultados recentes demonstraram que galectina-3 é um importante regulador da via de ativação alternativa dos macrófagos. Neste estudo, macrófagos residentes e derivados do lavado peritoneal de camundongos deficientes para galectina-3 e submetidos ao estímulo de polarização M2 (IL-4 e IL-13) apresentaram baixa diferenciação para o fenótipo M2 (MACKINNON et al., 2008). De modo contrário, a galectina-3 desempenha um papel na promoção da ativação clássica dos macrófagos durante a patogênese da hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (DRAGOMIR et al., 2012).

Em relação a células dendríticas os animais Gal3KO apresentaram uma diminuição no número de células dendríticas, este resultado pode estar relacionado com o fato de a galectina-3 regular a migração de células dendríticas e animais deficientes em galectina-3 apresentarem uma migração defeituosa de células dendríticas (HSU et al., 2009 YAN et al., 2012).

Citocinas e quimiocinas possuem importante papel na resposta imune ao câncer e, em alguns casos, podem contribuir para o processo de carcinogênese (LANDSKRON et al.,

2014). Estas moléculas podem ser envolvidas com a iniciação tumoral, progressão e metástase (BUCKMAN et al., 1998; MOORE et al., 1999; SUGANUMA et al., 1999; CHAN et al., 2004; LIND et al., 2004). Algumas citocinas podem ser consideradas promotoras do desenvolvimento tumoral, enquanto outras podem inibir o desenvolvimento e a progressão do tumor (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN; 2010). IFN- γ é uma citocina cuja atividade biológica está convencionalmente associada a mecanismos citotóxicos e antitumorais durante a resposta imune adaptativa mediada por células. Entretanto, dados da literatura indicam que IFN- γ , além de exercer efeito tóxico direto sobre células neoplásicas, apresenta atividade que inibe a angiogênese (CORTHAY et al., 2005), embora sua capacidade de promover a evasão tumoral às respostas imunológicas já tenha sido relatada (HE et al., 2005). Ao analisarmos a produção de IFN- γ os resultados evidenciaram que um leve aumento na concentração de IFN- γ em amostras de animais do grupo controle. De fato, dados da literatura indicam que galectina-3 inibe a resposta celular, à transdução de sinal induzida por IFN- γ , e inibe o crescimento de células de câncer gástrico (TSENG et al., 2016).

A citocina IL-17 promove o crescimento tumoral e angiogênese em modelos de câncer de mama, fibrosarcoma e adenocarcinoma de cólon (NUMASAKI et al., 2003; DU et al., 2012). Entretanto, dados de outros modelos indicaram que esta citocina pode inibir o crescimento tumoral pela ativação de CTLs (BENCHETRIT et al., 2002; MARTIN-OROZCO et al., 2009), além de erradicação de tumores em modelos de melanoma murino (MURANSKI, et al.; 2008). Em relação a IL-17 e a galectina-3 a maioria dos estudos tem sido em relação a infecções parasitárias e doenças autoimunes, entretanto num estudo de carcinoma colorretal a Galectina-3 está envolvida na inflamação durante a progressão do carcinoma aumentando a produção IL-17 (PETROVIC et al., 2016). A galectina-3 regula negativamente as respostas da IL-17 à infecção pelo *Histoplasma* através da regulação negativa da produção de citocinas do eixo IL-23 / IL-17A pelas DCs. A maior produção de IL-23 em camundongos deficientes de galectina-3 não apenas ativa Th17 preferencialmente, como também induz a produção de IL-17A por neutrófilos (WU et al., 2013). Durante a encefalomielite aguda experimental, demonstrou-se que camundongos deficientes de galectina-3 produziram menos IL-17 e IFN- γ e tiveram a gravidade da doença atenuada (JIANG et al., 2009).

IL-10 é uma citocina imunossupressora potente produzida principalmente por células Th2, macrófagos e células B ativadas (MANNINO et al., 2015). Os resultados do presente estudo evidenciaram diferença na produção de IL-10 entre os grupos controle (WT) e

Gal3KO, observou-se uma menor produção de IL-10 em amostras de animais deficientes de galectina-3. Dados da literatura demonstraram que as concentrações séricas de galectina-3 em pacientes com câncer colorretal são inversamente correlacionadas com a produção de IL-10 (SHIMURA et al., 2016). O modelo proposto sugere um efeito da galectina-3 e a produção de IL-10.

Não observamos diferenças entre os grupos estudados na quantidade de TGF- β , entretanto sabe-se que o TGF- β modula processos como invasão celular, regulação imunológica e modificação do microambiente tumoral, correlacionando tanto com a supressão quanto a promoção tumoral, uma resposta TGF- β é altamente contextual ao longo do desenvolvimento, através de diferentes tecidos e células (MASSAGUÉ, 2008). Em metástases ósseas de câncer de mama, o TGF- β aumentou a expressão de genes associados a metástases ósseas, incluindo PTHRP, IL11, CTGF, CXCR4, MMP1 e JAG1 (YING et al., 1999; KANG et al., 2005). Contraditoriamente embora a sinalização de TGF- β elevada na pele previna a indução química de papilomas benignos, o TGF- β aumenta sua conversão maligna em CEC e promove metástase (CUI et al., 1996; MASSAGUÉ, 2012), muitos estudos atribuem esses efeitos aparentemente distintos do TGF- β a mudanças genéticas cumulativas durante a tumorigênese (TIAN et al., 2015). Em relação ao TGF- β e a galectina-3 resultados sugerem que a redução da galectina-3 na superfície celular reduz a expressão da superfície celular do TGF β R sem afetar a expressão total do TGF β R ou a afinidade do receptor pelo TGF- β 1 (MACKINNON et al., 2012).

De acordo com os resultados obtidos, mostramos que a ausência da galectina-3 está associada a uma maior progressão do carcinoma espinocelular de pele. Além disso, observou-se o aumento das células TCD4⁺, TCD8⁺, entretanto uma diminuição de células B, dendríticas além da diminuição de macrófagos e uma menor porcentagem dos macrófagos M2 e citocinas do perfil Th2. Desta forma, nossos resultados fornecem evidências de que a galectina-3 desempenha um papel importante na progressão do carcinoma espinocelular de pele.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir:

- 1) Os animais deficientes de galectina-3 apresentaram menor progressão tumoral lesões em comparação aos animais do grupo controle.
 - 2) Os animais deficientes em galectina-3 apresentaram aumento na percentagem de células TCD4⁺, TCD8⁺, associada à diminuição de células B, dendríticas e macrófagos no microambiente tumoral. Dentro da população de macrófagos, os dados evidenciaram menor percentagem dos macrófagos M2 no microambiente tumoral.
 - 3) Os animais deficientes em galectina-3 apresentaram baixos níveis de IL-10 no microambiente tumoral.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjänen K. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer*. 1992;28(4-5):859-64.

Ahmad, N. Gabius, H.J. André, S. Kaltner, H. Sabesan, S. Roy R, et al. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes *J. Biol. Chem*. 2004; 279(12): 10841-7.

Amôr, Nádia Ghinelli. Papel do receptor ST2 no desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente [dissertação]. Bauru (SP):Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2015.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994; 76(4): 597-8.

Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int J Cancer*. 2011; 129(1):1-8.

Bartolazzi A, Bellotti C, Sciacchitano S. Methodology and technical requirements of the galectin-3 test for the preoperative characterization of thyroid nodules. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012; 20(1):2-7.

Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2114-21.

Bonalumi JKR. Caracterização estrutural e avaliação de aspectos funcionais de galectinas humanas do grupo *tandem-repeat*. [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Boscher C, Dennis JW, Nabi IR. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr. Opin Cell Biol*. 2011; 23(4):383-392.

Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP: COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*. 1998; 19:723–729.

Camp BJ, Dyhrman ST, Memoli VA, Mott LA, Barth RJ Jr. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Ann Surg Oncol*. 1996; 3:176-84.

Campion CG, Labrie M, Lavoie G, St-Pierre Y. Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53. *PLoS One*. 2013 Aug 14;8(8).

Castronovo V, Van Den Brûle FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol*. 1996; 179(1):43-8.

Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, DiGiovanni J:Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest*.2004; 114:720–728.

Chaudhari AD, Gude RP2, Kalraiya RD, Chiplunkar SV. Endogenous galectin-3 expression levels modulate immune responses in galectin-3 transgenic mice. *Mol Immunol*. 2015 Dec;68(2 Pt A):300-11.

Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 25;106(34):14496-501.

Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J*. 2004; 19(7-9): 441–449.

Choufani G, Nagy N, Saussez S, Marchant H, Bisschop P, Burchert M, et al. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and Thomsen–Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in Head and Neck Cancers. *Cancer*. 1999; 86(11): 2353-2362.

Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology*. 2002; 40(1): 80-87.

Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, Haraldsen G, Bogen B. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):371-83.

Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain, et al. TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*. 1996 Aug 23;86(4):531-42.

Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta (BBA)*. 2002; (1572)2–3:285-293.

Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001; 409(6821):733-9.

Demotte N, Wieërs G, Van Der Smissen P, Moser M, Schmidt C, Thielemans K, et al. A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Res*. 2010 Oct 1;70(19):7476-88.

Dings RPM, Miller MC, Griffin RJ, Mayo KH. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(3): 905.

Dondoo TO, Fukumori T, kdaizumoto K, Fukawa T, Kohzuki M, Kowada M, et al. Galectin-3 Is Implicated in Tumor Progression and Resistance to Anti-androgen Drug Through Regulation of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Anticancer Research* January 2017; 37 (1): 125-134.

Dong S, Hughes RC. Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca²⁺ in human Jurkat T-cells. *FEBS Lett*. 1996 Oct 21;395(2-3):165-9.

Dragomir A-CD, Sun R, Choi H, Laskin JD, Laskin DL. Role of Galectin-3 in Classical and Alternative Macrophage Activation in the Liver following Acetaminophen Intoxication. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;189(12):5934-5941.

Drickamer K, Taylor ME. Biology of Animal Lectins. *Annu Rev Cell Biol*. 1993; 9:1, 237-264.

Du JW, Xu KY, Fang LY, Qi XL. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. *Mol Med Rep*. 2012 Nov;6(5):1099-102.

Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*. 2006 Dec;80(6):1298-307.

Elad-Sfadia G, 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*. 2004; 277: 37169-37175.

Fahrer AM, Konigshofer Y, Kerr EM, Ghandour G, Mack DH, Davis MM, et al. Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(18):10261-6.

Flotte TJ, Springer TA, Thorbecke GJ. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am. J. Pathol.* 1983; 111(1):112-24.

Fortuna-Costa A, Gomes AM1, Kozlowski EO1, Stelling MP1, Pavão MS. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014; 16(4):138.

Gabius HJ. Animal lectins. *Eur J Biochem.* 1997; 243(3):543-76.

Ghosh P, Komschlies KL, Cippitelli M, Longo DL, Subleski J, Ye J, et al. Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Oct 4;87(19):1478-83.

Girardi M, Oppenheim D, Glusac EJ, Filler R, Balmain A, Tigelaar RE, et al. Characterizing the protective component of the alphabeta T cell response to transplantable squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2004 Mar;122(3):699-706.

Goldstein IJ et al. *Chemical taxonomy molecular biology and function of plant lectin*. New York: R. Liss Incorp, 1983, p.225-36.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):883-99.

Haines KA, Flotte TJ, Springer TA, Gigli I, Thorbecke GJ. Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(11):3448-51.

Haining WN, Angelosanto J, Brosnahan K, Ross K, Hahn C, Russell K, Druryet K, et al. High-throughput gene expression profiling of memory differentiation in primary human T cells. *BMC Immunol.* 2008; 9:44.

He YF, Wang XH, Zhang GM, Chen HT, Zhang H, Feng ZH. Sustained low-level expression of interferon-gamma promotes tumor development: potential insights in tumor prevention and tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Sep;54(9):891-7.

Holmes D. The cancer that rises with the sun. *Nature.* 2014 Nov 20;515(7527): S110-1.

Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(12): 4635-40.

Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen HY, Yu L, Grando SA, Liu FT. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2009b; 129:573–583.

Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2000; 156(3):1073-83.

Hu HM, Urba WJ, Fox BA. Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):3033-41.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Incidência do câncer no Brasil 2018.

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): 1821-1831.

Jiang HR, A Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, Fukada SY, Liu FT, Liew FY, Lukic ML. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009 Jan 15;182(2):1167-73.

Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 349(1):7–20.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C et al. . A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3:537–549.

Kapucuoglu N, Basak PY, Bircan S, Sert S, Akkaya VB. Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract.* 2009; 205:97–103.

Kouo T, Huang L, Pucsek AB, Cao M, Solt S, Armstrong T, Jaffee E. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015 Apr;3(4):412-23.

Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2004; 9(2):305-28.

Lança T, Silva-Santos B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes Implications for cancer surveillance and immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2012 Aug 1; 1(5): 717–725.

Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, and Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research*. 2014; 19.

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

Lee PP, Zeng D, McCauley AE, Chen YF, Geiler C, Umetsu DT, et al. T helper 2-dominant antilymphoma immune response is associated with fatal outcome. *Blood*. 1997 Aug 15;90(4):1611-7.

Liener, IE, N. Sharon and I.J. Goldstein. In: Liener, I.E., N. Sharon and I.J. Goldstein (Eds.). *Thelectins*. Orlando: Academic Press. 1986; 529-55.

Lind MH, Rozell B, Wallin RP, van Hogerlinden M, Ljunggren HG, Toftgard R, Sur I. Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:4972–4977.

Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem*. 1993; 218(1):1-27.

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

Liu FT, Cummings RD. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 33.

Liu, FT. Molecular biology of IgE-binding protein, IgE-binding factors and IgE receptors. *Crit. Rev. Immunol*. 1990; 10:289–306.

Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(8):3466–3470.

Machado CM, Andrade LN, Teixeira VR, Costa FF, Melo CM, dos Santos SN, et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGFβ1-induced macrophages. *Cancer Med*. 2014; 3(2):201-214.

MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2650-8.

Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, et al. Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Mar 1;185(5):537-46.

Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015 Oct 28;367(2):103-7.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992 Jul;13(7):265-70.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86.

Manzano AC, Altemani A, Martins AS, Del Negro A, Tincani AJ. Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocitário em biópsia de carcinoma espinocelular da língua e soalho oral e sua implicação prognostica. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2010; 39:270-6.

Martin M, Wei H, Lu T. Targeting microenvironment in cancer therapeutics. *Oncotarget*. 2016 Aug 9; 7(32):52575–52583.

Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, Hwu P, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009 Nov 20;31(5):787-98.

Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell*. 2008 Jul 25;134(2):215-30.

Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Oct;13(10):616-30.

Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int J Cancer*. 2000; 85(4):545-54.

Mazurek N, Sun YJ, Price JE, Ramdas L, Schober W, Nangia-Makker P, et al. Phosphorylation of galectin-3 contributes to malignant transformation of human epithelial cells via modulation of unique sets of genes. *Cancer Res*. 2005; 65(23):10767-75.

Melo F.H.M.; Junqueira M.S.; Chammas R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: FRG, Kowalski LP, Brentani MM. Bases da Oncologia. 2ª ed. São Paulo: Tedmed Editora; 201-226, 2003.

Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med.* 1999 Jul;5(7):828-31.

Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, Bar-Eli M. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 2008 Dec;173(6):1839-52.

Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 2008 Jul 15;112(2):362-73.

Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis.* 2005; 10(2):267-275.

Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):6177-89.

Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J.* 2004; 19(7-9):527-35.

Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista De Medicina.* 20 89(1), 21-31.

Owen, LN, Steel GG. The growth and cell population kinetics of spontaneous tumours in domestic animals. *Br J Cancer.* 1969 Sep; 23(3): 493-509.

Pacis RA, Pilat MJ, Pienta KJ, Wojno K, Raz A, Hogan V, et al. Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *Prostate.* 2000; 44(2):118-23.

Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene.* 2001 Nov 8;20(51):7486-93.

Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):7228-36.

Perales MA, Wolchok JD. CD4 Help and Tumor Immunity: Beyond the Activation of Cytotoxic T Lymphocytes. *Annals of Surgical Oncology*. 2004; 11(10):881–882.

Pereira JX, Azeredo MCB, Martins FS, Chammas R, Oliveira FL, Santos SN, et al. The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to enhanced tumor growth and bone marrow metastasis. *BMC Cancer*. 2016; 16:636.

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)*. 1998; 76(6):402-412.

Petrovic S, Radosavljevic GD, Pantic J, Jovanovic I, Jankovic N, Arsenijevic N. Circulating and tissue galectin-1 and galectin-3 in colorectal carcinoma: association with clinicopathological parameters, serum CEA, IL-17 and IL23. *J BUON*. 2016; 21(4):941-949.

Pfoertner S, Jeron A, Probst-Kepper M, Guzman CA, Hansen W, Westendorf AM. Signatures of human regulatory T cells: an encounter with old friends and new players. *Genome Biol*. 2006; 7(7): R54.

Plzák J, Smetana K Jr, Hrdlicková E, Kodet R, Holíková Z, Liu FT, et al. Expression of galectin-3-reactive ligands in squamous cancer and normal epithelial cells as a marker of differentiation. *Int J Oncol*. 2001 Jul;19(1): 59-64.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):71-8.

Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, Johnson MM, Lopez A, Diwan AH, et al. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(22):6709-15.

Quinn AG, Perkins W. Non-melanoma skin cancer and other epidermal skin tumors. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's textbook of dermatology*. 8th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2010. p. 52.1.

Rabinovich, GA., Toscano, MA., Jackson, SS., Vasta, GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology*. 2007; 17(5), 513-20.

Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer*. 2005 Apr 11; 92(7): 1188–1192.

Rabinovich, GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*. 1999; 6(8):711-21.

Rini JM, Lobsanov YD. New animal lectin structures. *Curr Opin Struct Biol.* 1999; 9(5):578-84.

Ruvolo PP. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Mar;1863(3):427-437.

Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA, Liu FT. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol.* 2009; 174:922–931.

Saggiorato E, Aversa S, Deandreis D, Arecco F, Mussa A, Puligheddu B, et al. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinoma. *J Endocrinol Invest.* 2004, 27(4):311-7.

Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol.* 2016 May 20;34:317-34.

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000; 165(4):2156-64.

Schoenberger SP, Jonges LE, Mooijaart RJ, Hartgers F, Toes RE, Kast WM, Melief CJ, Offringa R. Efficient direct priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte in vivo by an engineered APC. *Cancer Res.* 1998 Jul 15;58(14):3094-100.

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998 Jun 4;393(6684):480-3.

Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(2):379.

Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, Dubinett SM. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol.* 1999 Nov 1;163(9):5020-8.

Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.* 1972; 177(4053):949-59.

Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, *Glycobiology.* 2004; 14(11):53R–62R.

Shimura T, Shibata M, Gonda K, et al. Association between circulating galectin-3 levels and the immunological, inflammatory and nutritional parameters in patients with colorectal cancer. *Biomedical Reports*. 2016;5(2):203-207.

Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of χ -catenin. *Cancer Res*. 2004; 64: 6363-7.

Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett*. 2008 Aug 28;267(2):204-15.

Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: a review. *Cancer Lett*. 2015 Feb 1;357(1):8-42.

Skin Cancer Foundation, 2018.

Song L, Tang JW, Owusu L, Sun MZ, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr 20; 431:185-91.

Sparano A, Lathers DM, Achille N, Petruzzelli GJ, Young MR. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Nov;131(5):573-6.

Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu F-T, Baum LG. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol*. 2006; 176(2):778-89.

Stillmark H. Über, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen. *Aierbeten des Pharma Inst zu Dorpat*. 1888; 3:59-151.

Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, et al. Differential Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Regulating Leukocyte Viability and Cytokine Secretion. *J Immunol* March 1, 2008, 180 (5) 3091-3102.

Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res*. 1999 Sep 15;59(18):4516-8.

Tian B, Li X, Kalita M, Widen SG, Yang J, Bhavnani SK, et al. Analysis of the TGF β -induced program in primary airway epithelial cells shows essential role of NF- κ B/RelA signaling network in type II epithelial mesenchymal transition. *BMC Genomics*. 2015 Jul 18; 16:529.

Tomoharu F, Natsuo O, Hirofumi I, Masayuki T, Hiro-omi K. Galectin-3 is overexpressed in renal cell carcinoma and it regulates immune suppression through the induction of apoptosis of T cells. *J Urol.* 2008; 4:179.

Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1993; 23(12):3230-5.

Tseng P-C, Chen C-L, Shan Y-S, Lin C-F. An increase in galectin-3 causes cellular unresponsiveness to IFN- γ -induced signal transduction and growth inhibition in gastric cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(12):15150-15160.

Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2012 Jun;55(6):1954-64.

Weber M, Büttner-Herold M, Distel L, Ries J, Moebius P, Preid R, et al. Galectin 3 expression in primary oral squamous cell carcinomas. *BMC Cancer.* 2017; 17: 906.

Wu SY, Yu JS, Liu FT, Miaw SC, Wu-Hsieh BA. Galectin-3 negatively regulates dendritic cell production of IL-23/IL-17-axis cytokines in infection by *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol.* 2013 Apr 1;190(7):3427-37.

Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T. Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res.* 2000 Mar 15;59(6):722-30.

Yan W, Wistuba II, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Squamous Cell Carcinoma - Similarities and Differences among Anatomical Sites. *Am J Cancer Res.* 2011 Jan 1;1(3):275-300.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996; 93(13):6737-42.

Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60:267–276.

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R et al. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 1999; 103:197–206.

Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, Apgar JR, Kawakami T, Lilly CM, Liu FT. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol.* 2004 Dec;165(6):2045-53.