ILDEFONSO ALVES DA SILVA JUNIOR

O RECEPTOR DO PAF NO MICROAMBIENTE TUMORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

ILDEFONSO ALVES DA SILVA JUNIOR

O RECEPTOR DO PAF NO MICROAMBIENTE TUMORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia Jancar

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Lepique

Versão Original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva-Junior, Ildefonso Alves da
O Receptor do PAF no microambiente tumoral /
Ildefonso Alves da Silva-Junior; orientadora Sonia
Jancar; coorientadora Ana Paula Lepique. -- São
Paulo, 2017.
83 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Receptor do PAF. 2. Macrófagos. 3.
Radioterapia. 4. Repopulação Tumoral. I. Jancar,
Sonia, orientador. II. Lepique, Ana Paula,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Ildefonso Alves da Silva Junior

Título da Tese: O Receptor do PAF no Microambiente Tumoral

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sonia Jancar Negro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **032** nas fls. **04** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Sonia Jancar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel do receptor do PAF em células tumorais e no fenótipo de macrófagos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ildelfonso Alves da Silva Junior** e os pesquisadores **Ana Paula Lepique**, **Marlise Bonetti Agostinho Montes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **12.06.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Papel do receptor do PAF em células tumorais e no fenótipo de macrófagos*", registrado sob o protocolo nº **130/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **23/12/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Sonia Jancar**

- Membros da Equipe: *Ana Paula Lepique (Pesquisador colaborador), Marlise Bonetti Agostinho Montes (Especialista de laboratório), Ildefonso Alves da Silva Junior (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*PAF receptor in tumor cells and macrophages phenotype*", protocol nº **130/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/23/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Sonia Jancar**

- Team members: *Ana Paula Lepique (Collaborator Researcher), Marlise Bonetti Agostinho Montes (Laboratory Technician), Ildefonso Alves da Silva Junior (Graduate Student)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6 WT	Macho/male	4 a 8 semanas/weeks	30
	C57BL/6 PAFR KO	Macho/male	4 a 8 semanas/weeks	30
	C57BL/6 RAG KO	Macho/male	4 a 8 semanas/weeks	30

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil, e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/23538-3, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

***Aos que compartilharam este caminho
comigo e que acreditam que a ciência é uma
das mais belas formas de entender o
mundo.***

AGRADECIMENTOS

Na origem da palavra “agradecer” encontramos a expressão do latim “gratus” que significa gratidão ou ato de reconhecer um benfeitor. Para mim significa que chegou a hora de deixar registrado os meus melhores sentimentos, em forma de simples palavras de reconhecimento, por todas as pessoas que participaram da construção deste trabalho.

Em especial, quero começar agradecendo a grande mentora deste trabalho, minha querida orientadora Sonia Jancar, que me motivou a seguir neste caminho, sempre disponibilizando todos os recursos necessários ao sucesso deste projeto. Obrigado pelos conselhos (pessoais e científicos), pela paciência e generosidade em todos os momentos, pelo acolhimento afetuoso no laboratório e por toda a dedicação em me ensinar a ser “cientista”. Considero você minha “mãe-científica” paulistana.

Meus eternos sentimentos de gratidão à minha co-orientadora Ana Paula Lepique, foi ela quem me ensinou a cuidar da minha primeira cultura de células tumorais, sempre esteve atenta ao meu trabalho, esclarecendo todas as minhas dúvidas e movimentando todos os esforços para que os experimentos funcionassem... foi uma “Chef” sensacional (inclusive na cozinha... preparando umas comidinhas deliciosas de vez em quando...).

Muito obrigado às queridas técnicas de laboratório: Marlise, Silvana, Paula e Sandra. Vocês estiveram presentes desde o preparo do material até a execução de cada experimento e contribuíram muito para o sucesso deste trabalho. Também não posso esquecer da Lili, do Rogério e da Célia que conduziram todas as irradiações presentes neste trabalho.

Agradeço aos grandes amigos do laboratório de imunofarmacologia e imunomodulação: minha querida IC Barbara, o Edson, a Thereza, Luciano, Marcos, Matheus, Simone, Aleida, Renata, Karla, Caio, Gretel e Marcela, pela boa convivência e parceria nos experimentos. Vocês são os “The Best” da minha vida. Compartilhamos importantes momentos de discussões e trocas de ideias, viajamos para congressos e nos divertimos muito ampliando nosso conhecimento na área de imunologia. Também lembrarei para sempre dos momentos do lanche e do cafezinho, das fugidas do lab para ir ao cinema ou relaxar no karaokê. Vocês deram um gostinho especial ao período do meu doutorado.

Aos caros colegas do departamento de imunologia que dividiram comigo vários momentos durante as disciplinas da pós, no curso de férias de imunologia, seminários e também durante várias festas que realizamos no departamento. Vocês fizeram do meu mundo “imunológico” um lugar feliz.

Aos professores do Departamento, obrigado por todos os momentos, sejam eles nas aulas, nas conversas de corredor, ou nas reuniões do Departamento, que me fizeram entender o que é fazer ciência de qualidade.

Agradeço também todos os funcionários do departamento de imunologia, em especial à Eni, Jotelma, Amanda, João, Andrea, ao pessoal do CEFAP, ao pessoal da portaria e vigilância, da informática, da manutenção, limpeza, biotério... Obrigado por todo apoio!

Gratidão também ao pessoal do ICESP, principalmente ao Prof. Roger, que inspirou diretamente o tema desta tese.

Gostaria de agradecer a todas as sugestões, críticas e elogios feitos pela minha banca de qualificação, composta pelos professores Barbutto, Nancy e Luciana. Obrigado pela análise criteriosa. Suas observações foram muito importantes para fazer desta tese o que ela é agora.

Agradeço profundamente aos meus amigos de São Paulo que fizeram da minha estadia nesta cidade muito feliz, em especial a Michele, Marilu, Khaterin, Layane, Leosdan, Dania, Arthur, Alice, Fernanda Izidorio, Bruno, Magdiel, Juliano e muitos outros que passaram pela minha vida nestes últimos 4 anos. Obrigado por todo apoio emocional, psicológico e afetivo.

Aos meus queridos amigos da FEESP (que é meu cantinho especial de refazimento e aprendizado), quero deixar registrado meus eternos sentimentos de gratidão por estarem presentes na minha caminhada evolutiva, em especial ao pessoal da Área de Infância (AIJM) e aos mosqueteiros e mosqueteiras do curso de expositores, que torceram por mim e me incentivaram para que eu chegasse até aqui. Vocês são luzes no meu caminho.

Ao pessoal de Goiânia: Fátima, Camila, Juliana, Hanster, Tchesca, Rose e tantos outros da época da faculdade que estimularam minha vinda para o doutorado em SP e que continuam sendo amigos especiais apesar da distância!

Deixo registrado meus sinceros agradecimentos a todos os brasileiros que através das agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES financiaram este projeto e pagaram meu salário. Nunca perdi isso de vista e espero que meu esforço esteja à altura do investimento.

Agradeço à Universidade de São Paulo e principalmente ao ICB, por ter fornecido a estrutura e as condições para a realização do meu doutorado.

Por fim agradeço imensamente à minha família, tios e tias, primos e primas. Por acreditar, apoiar, participar e torcer por todas as minhas conquistas e vitórias! Vocês são essenciais na minha vida, e mesmo morando longe, estão presentes diariamente no meu coração.

Muito obrigado!

“Do trabalho e da experiência, aprendeu o homem a ciência.”

- Provérbio Português

RESUMO

Silva-Junior IA. O receptor do PAF no Microambiente Tumoral. [tese (Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Estudos experimentais indicam que o PAF (fator ativador de plaquetas) pode exercer papel fundamental na patogênese de diversos tipos de tumores. Os efeitos biológicos do PAF são mediados pela ligação ao seu receptor (PAFR) que está expresso em diversos tipos celulares, inclusive em células tumorais. O presente estudo teve como objetivo investigar a participação do PAFR no microambiente tumoral e no fenômeno de repopulação tumoral pós-irradiação. Para isto, o trabalho foi dividido em 3 partes: na primeira analisamos o crescimento de dois tipos de tumores murinos, o melanoma B16F10 e o carcinoma TC-1 comparando camundongos geneticamente deficientes do PAFR (PAFR KO) com os WT. Observamos que os animais PAFR KO comparados com os WT são mais resistentes ao crescimento destes tumores. Pela análise do infiltrado celular nos tumores os PAFR KO apresentaram frequência aumentada de linfócitos CD4⁺ neutrófilos e de macrófagos M1. As células CD45⁺ isoladas e estimuladas com LPS, apresentaram níveis mais elevados de óxido nítrico e baixa atividade de arginase. Estes resultados indicam que durante o crescimento tumoral, são geradas substâncias ligantes do PAFR que, ao ativar o PAFR expresso em macrófagos tumorais, reprogramam estas células para um fenótipo supressor M2 que favorece o crescimento tumoral. Na segunda parte do trabalho, investigamos o papel do PAFR em células de carcinoma humano (linhagens C33, SiHa, HeLa, SSC78 e SSC90). Observamos que todas elas expressam PAFR (mRNA e proteína) em maior quantidade que um queratinócito (HaCat) utilizado como controle. A proliferação destas células *in vitro* foi reduzida por um antagonista de PAFR e aumentada pela adição de PAF. A exposição destas células a radiação gama induziu ligantes de PAFR e aumentou a expressão gênica do PAFR. O bloqueio do PAFR durante a radioterapia aumentou a morte induzida pela irradiação. Estes dados sugerem um papel relevante do PAFR na proliferação e sobrevivência de células tumorais. Durante a radioterapia, as células tumorais que sobrevivem tem um crescimento acelerado que leva a repopulação tumoral. Na terceira parte do trabalho, estudamos o papel do PAFR num modelo experimental de repopulação usando uma linhagem de carcinoma humano que não expressa o PAFR (KBM) e a mesma célula transfectada com o PAFR (KBP). A coinjeção de KBP viáveis com KBM irradiadas em camundongos RAG induziu um tumor muito maior que aquele resultante da coinjeção de KBM viáveis com KBM irradiadas. A repopulação correlacionou-se com aumento de macrófagos M2 (CD206⁺) nos tumores KBP. Em conjunto, estes resultados sugerem que a geração de ligantes de PAFR durante a irradiação, ativa o PAFR nas células tumorais aumentando a sua sobrevivência e proliferação ao mesmo tempo que ativa o PAFR nos macrófagos reprogramando-os para um perfil pró-tumoral. Isto pode ser relevante na repopulação tumoral pós radioterapia. Sugerimos que a associação da radioterapia com antagonistas de PAFR pode ser uma estratégia terapêutica promissora.

Palavras-chave: Receptor PAF. Macrófagos. Radioterapia. Repopulação Tumoral

ABSTRACT

Silva-Junior IA. PAF receptor in Tumor Microenvironment. [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Experimental studies indicate that PAF (platelet activating factor) play an important role in the pathogenesis of different types of tumors. The biological effects of PAF are mediated by PAF receptor (PAFR) which is expressed in several cell types, including tumor cells. The aim of this study was investigate the participation of PAFR in the tumor microenvironment and in the post-irradiation tumor repopulation phenomenon. This thesis was divided in 3 parts: in the first one we analyzed the growth of two types of murine tumors, B16F10 melanoma and TC-1 carcinoma comparing genetically deficient PAFR (PAFR KO) mice with WT. We observed that PAFR KO are more resistant to the growth of these tumors compared to WT. When we analyzed the cellular infiltrate in the tumor, PAFR KO presented an increased frequency of CD4 lymphocytes, neutrophil and M1 macrophages. These results indicate that during tumor growth, PAF receptor agonistic activity upon tumor macrophage, reprogram these cells to an M2 anti-inflammatory phenotype that promotes tumor growth. In the second part of the study, we investigated the role of PAFR in human carcinoma cells (C33, SiHa, HeLa, SSC78 and SSC90). We observed that all these tumor cells express PAFR (mRNA and protein) more than a keratinocyte (HaCat) used as a control. The proliferation of these cells *in vitro* was reduced by a PAFR antagonist and enhanced by the addition of cPAF. Exposure of these cells to gamma radiation induced PAFR ligands and increased PAFR expression. Blocking PAFR during radiotherapy increased radiation-induced death. These data suggest a relevant role of PAFR in the proliferation and survival of tumor cells. During radiotherapy, tumor cells that survive the treatment have a high proliferation rate that lead to tumor repopulation. In the third part of this work, we studied the role of PAFR in an experimental model of repopulation using a human carcinoma cell line that does not express PAFR (KBM) and the same cell transfected with PAFR (KBP). Co-injection of viable KBP with irradiated KBM into RAG mice induced a tumor much larger than that resulting from the co-injection of viable KBM with irradiated KBM. Tumor repopulation correlated with increased M2 (CD206⁺) macrophages in KBP tumors. Taken together, these results suggest that PAFR ligands generated during tumor irradiation activates PAFR in tumor cells and enhance their survival and proliferation while the activating of PAFR in tumor macrophages reprogramming them to a pro-tumor profile. This may be relevant in tumor repopulation phenomenon after radiotherapy. We propose that PAF receptor represents a possible target for improving the efficacy of radiotherapy through inhibition of tumor repopulation.

Keywords: PAF receptor. Macrophages. Radiotherapy. Tumor Repopulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais PAFR KO são mais resistentes ao crescimento tumoral que animais WT...	33
Figura 2 - Infiltrado leucocitário em tumores provenientes de animais WT e PAFR KO.....	35
Figura 3 - Avaliação do infiltrado de linfócitos CD4 e CD8 em tumores provenientes de animais WT e PAFR KO.....	36
Figura 4 - Avaliação do infiltrado de neutrófilos (Gr1 ⁺) e macrófagos (F4/80 ⁺) em tumores provenientes de animais WT e PAFR KO.	37
Figura 5 - Na ausência do PAFR os macrófagos intratumorais apresentam fenótipo M1.	39
Figura 6 - Na ausência do PAFR os macrófagos intratumorais apresentam alta produção de nitrito e baixa atividade de arginase e produção de IL-10.	39
Figura 7 - Esplenomegalia associada aos tumores está diminuída em animais PAFR KO.	41
Figura 8 - Populações de linfócitos (CD4/CD8) no baço de animais PAFR KO e WT injetados com melanoma B16F10 ou TC-1.....	41
Figura 9 - Populações de neutrófilos (Gr1) e macrófagos (F4/80) no baço de animais PAFR KO e WT injetados com melanoma B16F10 ou TC-1.	42
Figura 10 - Expressão de PAFR em linhagens de carcinoma.	43
Figura 11 - Agonistas de PAFR estimulam a proliferação das linhagens de carcinoma.	46
Figura 12 - Antagonistas do receptor do PAF inibem a proliferação das linhagens de carcinoma.....	47
Figura 13 - Agonistas de PAFR aumentam a proliferação de células de carcinoma humano (KB) que expressam altamente o receptor do PAF (KBP).....	48
Figura 14 – O PAF induz a produção de IL-8 em células KBP.....	50
Figura 15 – A irradiação induz a produção de ligantes de PAFR em linhagens de carcinoma ..	52
Figura 16 - Irradiação das células tumorais aumenta a expressão do receptor de PAF.....	53
Figura 17 – Antagonista do receptor do PAF, CV3938, aumenta a morte celular induzida por radioterapia.....	55
Figura 18 - A irradiação aumenta a expressão do receptor PAF em células TC-1 e induz a geração de agonistas do receptor PAF.	58
Figura 19 – Antagonistas de PAFR bloqueiam parcialmente a proliferação celular induzida por radioterapia.....	59
Figura 20 – Ensaio de repopulação in vivo.	60
Figura 21 - A irradiação induz a produção de PGE ₂ de modo dependente de PAFR.....	62
Figura 22 - A repopulação é dependente da expressão do receptor PAF nas células tumorais.....	64
Figura 23 - A repopulação em tumores PAFR ⁺ (KBP) é acompanhado por um aumento de macrófagos M2 (CD206 ⁺).....	65
Figura 24 - Hipótese sobre o fenômeno de repopulação tumoral dependente de PAFR.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Araquidônico

ATCC - *American Type Culture Collection*

AUC – Area sob a curva (*Area Under the Curve*)

B16F10 – Linhagem de Melanoma Murino

BCA – Ensaio de dosagem de proteína (*Bicinchoninic Acid Assay*)

bFGF - Fator Crescimento de Fibroblastos básico (*basic Fibroblast Growth Factor*)

CFSE – *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*

COX – Ciclooxygenase

cPAF – Metilcarbamil-PAF

cPLA₂ – Fosfolipase A₂ Citoplasmática (*cytoplasmatic Phospholipase A₂*)

DAG – Diacilglicerol (*Diacylglycerol*)

DP – Desvio Padrão

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EPM – Erro padrão da Média

GAPDH – Gliceradeído-3-Fosfato Desidrogenase

HEC-1A - Adenocarcinoma de útero humano

IFN- γ – Interferon gama

IL- Interleucina

IP3 - Trifosfato inositol (*triphosphoinositol*)

KBM – Células KB Controle (*KB mock cells*)

KBP – Células KB que expressam PAFR (*KB PAFR expressing cells*)

LDH - Desidrogenase láctica (*Lactate dehydrogenase*)

LDL - Lipoproteína de baixa densidade (*Low-density Lipoprotein*)

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MFI – Mediana de intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity*)

MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B (*factor nuclear kappa B*)

NO – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)

PAF – Fator Ativador de Plaquetas (*Platelet Activating Factor*)

PAF-like – Moléculas Similares ao PAF

PAFR – Receptor do Fator Ativado de plaquetas

PAFR KO – Camundongos deficientes para o PAFR (*Knock-out PAFR mice*)

PBS - Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PGE₂ – Prostaglandina E2

PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase (*Phosphatidil-Inositol-3-Kinase*)

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PKC – Proteína quinase C (*Protein Kinase C*)

PLC - Fosfolipase C (*Phospholipase C*)

PMA – Acetato Miristato de Forbol (*Phorbol Myristate Acetate*)

RLU – Unidades relativas de luminescência (*Relative Luminescence Units*)

RNA_m – RNA mensageiro

ROI - Intermediários de reativos do oxigênio (*Reactive Oxygen Intermediates*)

RT-qPCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (Reverse Transcriptase- quantitative Polymerase Chain Reaction)

SFB – Soro Fetal Bovino

SP-1 – Fator de transcrição específico 1 (*Specificity Protein 1*)

STAT1 - Signal Transducer and Activator of Transcription 1

TAM – Macrófago Associados à Tumores (*Tumor-associated macrophages*)

TC-1 – Linhagem celular de carcinoma derivada do epitélio de camundongos

TC-1 FLUC - Linhagem TC-1 que expressa Luciferase (*firefly luciferase*)

TGF-β – Fator de Crescimento transformante- beta (*Transforming Growth Factor-beta*)

VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O PAF e seu receptor	19
1.2 Papel do PAFR no crescimento tumoral	21
1.3 Repopulação Tumoral	22
1.4 O PAFR e a Inflamação no Microambiente Tumoral	24
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Linhagens celulares	27
3.2 Cultivo celular das linhagens celulares	27
3.3 Animais	28
3.4 Avaliação do papel de PAFR em tumores de melanoma B16F10 e TC-1	28
3.4.1 Curva de crescimento tumoral em camundongos	28
3.4.2 Caracterização das células do infiltrado tumoral e do baço	28
3.4.3 Separação de leucócitos infiltrados no tumor	29
3.5 Avaliação do papel de PAFR em carcinomas	29
3.5.1 Citometria de fluxo	29
3.5.2 Extração de RNA e RT-QPCR em tempo real:	29
3.5.3 Avaliação do PAFR no crescimento de células tumorais	30
3.6 Avaliação do efeito da radioterapia na expressão do PAFR	30
3.7 Bioensaio com células KBP/KBM para detecção de atividade agonista sobre o PAFR	30
3.8 Ensaio de repopulação tumoral	31
3.9 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 PARTE I – O PAFR no infiltrado celular e crescimento tumoral	32
4.1.1 Ligantes do PAFR favorecem o crescimento tumoral.	32
4.1.2 Ligantes do PAFR modulam o infiltrado tumoral	34
4.1.3 Ligantes do PAFR em macrófagos induzem fenótipo pró-tumoral	38
4.1.4 A esplenomegalia associada a tumor está diminuída em animais PAFR KO...	40

4.2 PARTE II – A expressão e ativação do PAFR em células tumorais	43
4.2.1 Linhagens tumorais de carcinoma expressam PAFR.....	43
4.2.2 A ativação do receptor do PAF em células tumorais estimula sua proliferação .	44
4.2.3 A irradiação aumenta expressão de PAFR e induz produção de seus ligante .	49
4.2.4 O PAF protege as células tumorais da morte induzida por radioterapia.	54
4.3 Parte III - Ativação do PAFR no fenômeno de repopulação pós irradiação .	56
4.3.1 O PAFR está envolvido na repopulação tumoral.....	56
4.3.2 A repopulação tumoral é dependente da expressão de PAFR nas células tumorais e nos macrófagos.....	63
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE 1 – PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF) RECEPTOR AS A PROMISING TARGET FOR CANCER CELL REPOPULATION AFTER RADIOTHERAPY	84

1 INTRODUÇÃO

O fator ativador de plaquetas (PAF do inglês “platelet activating factor” é um mediador lipídico produzido em consequência da ativação de fosfolipases celulares que atuam sobre fosfolipídios da membrana celular. O PAF foi descrito em 1972 por Henson, Benveniste e Cochrane como um produto dos basófilos sensibilizados e desafiados com o antígeno e recebeu essa denominação devido a sua capacidade de induzir a agregação plaquetária(1). Durante mais de 40 anos, estudos focaram predominantemente sobre o seu papel na inflamação alérgica, sendo o PAF considerado um mediador dos eventos inflamatórios. Atualmente, é crescente o interesse no estudo da relação do PAF e seu receptor em células tumorais, pois várias evidências mostram que o PAF também desempenha um papel importante na transformação oncogênica(2), apoptose(3), metástase, e na angiogênese(4) em vários tipos de tumores.

1.1 O PAF e seu receptor

O PAF pode ser secretado por diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, células endoteliais, estromais, plaquetas e queratinócitos, sendo também produzido por alguns tipos de células tumorais(5). Assim como a maioria dos mediadores lipídicos, o PAF não existe pré-formado, mas pode ser produzido rapidamente após estímulos celulares específicos, tais como inflamação, stress oxidativo (incluindo stress induzido por tratamento radio e quimioterapêutico)(1,6,7) e irradiação com luz ultravioleta(8). Uma vez sintetizado, o PAF pode permanecer associado às células, ou ser secretado via vesículas de transporte. O PAF é ativo em concentrações da ordem Pico molar. Por essas características, pode funcionar tanto como um mediador intracelular como também um mensageiro de comunicação entre as células(9).

A síntese do PAF envolve dois passos metabólicos, primeiro, a fosfolipase A2 age hidrolisando o seu substrato (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina) gerando liso-PAF e ácido araquidônico livre. O liso-PAF é acetilado pela ação da enzima acetil transferase, dando origem ao PAF. Dois mecanismos para a síntese enzimática de PAF já foram descritos: (1) a via de remodelamento, responsável pela síntese deste mediador após um estímulo externo e (2) a via *de novo*, expressa na maioria dos tecidos, responsável por manter os níveis de PAF durante as funções

fisiológicas da célula(5)(9). Além da via enzimática de produção do PAF, a oxidação de fosfolípidos de fosfatidilcolina produz compostos com atividade agonista do receptor de PAF (5)(10)(11). Isto acontece pela ação de agentes oxidantes, como radicais livres e espécies reativas de oxigênio que atacam dupla ligações das moléculas lipídicas insaturadas gerando nelas porções similares às do PAF. Outros compostos que possuem atividade ligante de PAFR incluem a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada(12,13) e lisofosfatidilcolina(12,14,15). Normalmente, o tempo de vida do PAF é de poucos segundos, devido a uma degradação rápida e bem regulada por uma classe de enzimas chamada de PAF-acetil-hidrolases(16).

Os efeitos biológicos do PAF são mediados pela ligação ao seu receptor (PAFR), que já foi detectado na membrana plasmática e nuclear de vários tipos celulares, tais como as células endoteliais e inflamatórias como também em células tumorais(5,17). O gene do receptor do PAFR foi localizado no cromossomo 1 na região p35-p34.3(13). Ele possui dois promotores e pode gerar duas espécies de mRNA distintos (mRNA 1 e 2), porém produz um único tipo de PAFR(13,18). Os fatores de transcrição NF- κ B, SP-1 e a citocina TGF- β 2 regulam positivamente a expressão PAFR através dos elementos de consenso do promotor 1, enquanto o estrogênio, ácido retinóico e hormônio tireoidiano T3 tem atividade sobre o promotor 2 do PAFR(18).

O PAFR pertence à família de receptores transmembrânicos de sete α -hélices acoplados a proteína G. A ligação do PAF a este receptor induz a ativação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), gerando dois segundos mensageiros: o diacilglicerol (DAG) e 1, 4, 5 trifosfato inositol (IP₃), que irão ativar a proteína quinase C (PKC) e mediar a liberação de cálcio intracelular, respectivamente. O aumento de cálcio intracelular aciona várias enzimas dependentes de cálcio, contribuindo para os efeitos do PAF na célula. O PAFR ativa a via das MAPK (do inglês, "mitogen-activated protein kinases") e a via da PI3K (do inglês, "phosphatidil-inositol-3-kinase"), além da via Tyk2/Jak2, tirosina-quinase/STAT1 e NF κ B(19). A ativação de múltiplas vias de sinalização pelo PAFR explica os efeitos pleiotrópicos que o PAF pode desencadear, pois sua ativação pode ser mediada pelas diferentes subunidades G α_q ou G $\alpha_{i/o}$ da proteína G acoplada ao receptor, que em diferentes tipos celulares pode induzir atividades distintas na célula(3,17,20).

1.2 Papel do PAFR no crescimento tumoral

Existem evidências de que células tumorais podem produzir PAF e expressar o PAFR que ativado contribui direta ou indiretamente para a proliferação das células tumorais. Foi demonstrado que células derivadas de adenocarcinoma de útero humano (HEC-1A) secretam PAF e que o tratamento com antagonistas do receptor do PAF inibe sua proliferação(21). Em linhagens de células de leucemia(22) e células derivadas de câncer de esôfago, o PAF estimula a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que por sua vez foi associada com o crescimento do tumor(23,24). Além disso, o PAF é considerado um importante fator pro-angiogênico em tumores(25–27), pois induz a superexpressão de outros fatores angiogênicos, tais como o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular, VEGF(28), o Fator Crescimento de Fibroblastos básico, bFGF(29) e angiopoietinas(30). Assim, o PAF, quando liberado no microambiente tumoral pode agir de um modo autócrino ou parácrino sobre as células endoteliais saudáveis, sobre células do infiltrado inflamatório e também sobre células tumorais.

Um papel fisiopatológico do PAF tem sido proposto também em câncer de mama e coloretal, com base em resultados de amostras do tecido tumoral retirado de biopsias, onde a invasividade do tumor no tecido foi relacionada com expressão aumentada de PAFR(31–33). Bocceline e colaboradores também descreveram que o PAF atua como um indutor potente da motilidade de células tumorais de carcinoma renal(34). Eles demonstraram que nessa linhagem, o tratamento com o antagonista do PAFR, WEB-2170, aboliu a motilidade dependente de CD154(35).

Estudos investigando animais C57Bl/6 transgênicos que super expressam o PAFR mostraram que logo na segunda semana de vida, os animais apresentam hiperplasia da epiderme acompanhada de um aumento do número de melanócitos e o desenvolvimento de tumores de melanoma na fase tardia da vida(36,37). Em outro trabalho, foi demonstrado que a injeção de PAF juntamente com células de melanoma murino B16F10, em camundongos C57Bl/6 acelerou o crescimento tumoral(3). Além disto, a super expressão da enzima que degrada o PAF, a PAF-acetil-hidrolase e o tratamento sistêmico com o antagonista do PAFR (WEB2170) resultou na inibição do crescimento deste tumor experimental(38,39). Entretanto, até o momento não está claro se isto se deve ao PAFR expresso nas células tumorais ou nas células do infiltrado inflamatório.

1.3 Repopulação Tumoral

Existe um mecanismo homeostático que controla o crescimento celular em tecidos normais, o qual garante o equilíbrio entre a morte celular e regeneração do tecido. Porém, em tecidos tumorais, ocorre uma quebra desses mecanismos de controle homeostático, resultando numa proliferação celular exarcebada com consequente crescimento tumoral(40). Além disso, os tumores são constituídos por populações celulares heterogêneas, existindo uma população caracterizada por possuir um baixo índice proliferativo (células tronco tumorais), que é responsável pela iniciação da neoplasia e por dar origem à população com alto índice proliferativo chamada de “fração de crescimento” (growth fraction) do tumor. Uma outra população é constituída por aquelas células que não estão replicando por estarem em processos de morte celular (e.g., necrose, apoptose) ou metástase. Assim, a taxa de crescimento do tumor é representada por um balanço entre os sinais de proliferação celular e a capacidade de colonização do tecido.(41–43).

O fenômeno de repopulação tumoral refere-se à proliferação exarcebada das células tumorais, sobreviventes à tratamentos direcionados contra o tumor, tais como quimioterapia e radioterapia. A fim de permitir a recuperação das demais células do paciente, o tratamento quimioterápico ou radioterápico é realizado de maneira fracionada. Contudo, essa estratégia, ao mesmo tempo em que preserva tecidos normais, tem como efeito colateral a repopulação da massa tumoral por células progressivamente mais resistentes ao tratamento(44,45). Levar em conta este fenômeno é fundamental nos protocolos de *follow-up* de pacientes para evitar o surgimento de metástases e agravamento do quadro oncológico(46,47).

Em estudo realizado por Petersen e colaboradores(48) foi visto que células de carcinoma escamoso FaDu implantadas em camundongos *nude* quando submetidas a radioterapia fracionada tinham diminuição no índice de proliferação (medido através dos marcadores de proliferação BrdU e Ki67) logo no início da terapia em comparação aos animais não irradiados, porém, no decorrer do tratamento, o índice de proliferação tornou-se significativamente maior nos tumores irradiados, principalmente nas células próximas a capilares tumorais. Experimentos adicionais mostraram que, inicialmente, ocorre a morte das células próximas aos capilares, que, mais oxigenadas, são mais sensíveis à radioterapia. As células hipóxicas, menos sensíveis, sobrevivem, e com a morte das células próximas aos

vasos, ficam sujeitas a uma melhor oxigenação, entrando novamente no ciclo celular. Esse estudo indica que a cinética de repopulação do tumor em questão, em resposta à radioterapia fracionada, é determinada não apenas por processos intracelulares, mas também por uma complexa interação com um microambiente alterado(49).

Uma das explicações para a falha dos tratamentos baseados em morte celular é que mecanismos homeostáticos são acionados na presença de células mortas dentro dos tecidos que favorecem a sobrevivência de células residuais no microambiente tumoral. Huang e colaboradores (2012) demonstraram que células tumorais irradiadas que entram em apoptose liberam fatores que irão estimular o crescimento das células tumorais que sobrevivem à irradiação, e este mecanismo é dependente da ativação de caspase-3 e do metabolismo do ácido araquidônico(50).

É importante lembrar que o microambiente tumoral é complexo, formado por diversos elementos celulares, como infiltrado de leucócitos, células endoteliais e fibroblastos, além das células tumorais, e também de fatores acelulares, como a matriz extracelular, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e metabólitos(51).

Hoje se sabe que durante a fagocitose de células mortas ou em processo de morte (esferocitose), a produção de citocinas pro-inflamatórias é suprimida e isto foi associado a produção aumentada de PGE_2 e $TGF\beta$ (52). Mais recentemente, trabalho de nosso laboratório mostrou que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos ocorre através do receptor *scavenger* CD36 associado ao PAFR. Esta associação ocorre em plataformas lipídicas na membrana plasmática dos macrófagos e muda o seu fenótipo para um perfil anti inflamatório M2 (Ferracini et al., 2013). O bloqueio do PAFR nestes macrófagos, por antagonistas seletivos, reduziu a fagocitose de células apoptóticas e reprogramou os macrófagos para fenotipo pro-inflamatório M1. Dessa forma, a esferocitose poderia favorecer o crescimento tumoral por induzir um fenótipo M2 nos macrófagos. De fato, Correa et al. (2005), mostraram que a adição de células apoptóticas a uma dose sub-tumorigênica de melanoma murino promoveu o crescimento do tumor. Este fenômeno foi significativamente reduzido nos animais tratados com antagonistas do PAFR (53,54). Mais recentemente, Oliveira et al. (2006). mostraram que a inoculação de células apoptóticas favoreceu o crescimento tumoral e que a produção de PGE_2 e $TGF\beta$ ocorre de maneira dependente de PAFR(55),

Diante disso, é interessante perceber que os parâmetros discutidos acerca da cinética da repopulação tumoral (hipóxia, necrose, produção de prostaglandinas e PAF) influenciam, além das células tumorais, a atração de elementos da imunidade e a composição do infiltrado inflamatório tumoral. Esses elementos também poderão influenciar na repopulação tumoral.

1.4 O PAFR e a Inflamação no Microambiente Tumoral

Nas neoplasias de tumores sólidos, as células tumorais crescem no estroma, composto principalmente de vasos neoformados, células inflamatórias (principalmente macrófagos e linfócitos) e de tecido conjuntivo (fibroblastos e matriz extracelular). O crescimento e a evolução do tumor são criticamente dependentes do estroma.

Nos tumores malignos as células predominantemente encontradas no estroma são macrófagos, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos, em alguns tipos tumorais também há eosinófilos, granulócitos, células natural-killer (NK) e linfócitos B. O número e o tipo de células que constituem o infiltrado inflamatório nos tumores sólidos estão relacionados com a produção local de quimiocinas e de sinais que atraem os leucócitos do sangue. A presença de células inflamatórias nas neoplasias é vista, por alguns pesquisadores, como uma reação do organismo tentando controlar o crescimento desse tecido (56).

A inflamação crônica é uma das constantes do microambiente tumoral(51,57) e a presença de TAMs é fundamental para a evolução do tumor. Os macrófagos podem se diferenciar em sub-populações funcionalmente distintas dependendo do estímulo que recebem do microambiente em que se encontram. Segundo Mantovani e colaboradores (2004) os macrófagos podem ser classificados em M1, que produzem citocinas pro-inflamatórias e os M2, que produzem citocinas anti-inflamatórias. Os M2 foram mais tarde subdivididos em M2a, M2b e M2c(58). Fleming e Mosser (2011) propuseram uma classificação simplificada: os classicamente ativados, caracterizados por alta produção de óxido nítrico (NO), intermediários de reativos do oxigênio (ROI) e IL-12(59); os alternativamente ativados, identificados pela expressão de CD206 (receptor para manose), com alta atividade de arginase, baixa produção de NO e alta expressão de IL-10 e os reguladores (incluem os subtipos de M2b e M2c) cuja característica é a alta produção de IL-10 e baixa de IL12.

Os TAMs presentes em tumores de camundongos e humanos geralmente exibem um fenótipo alternativamente ativado, que está associado com a promoção do crescimento tumoral, remodelamento, angiogenese e supressão da imunidade adaptativa. A primeira evidência de que o PAF agiria modulando o fenótipo dos TAM foi a observação de Fecchio et al. (1990), onde durante o crescimento do tumor ascístico de Erlich, os macrófagos peritoneais perdiam as características de células ativadas (capacidade de espalhar sobre vidro e de produzir H_2O_2). O tratamento dos animais com antagonistas de PAFR reverteu este quadro, e reduziu o crescimento do tumor(60,61).

Em modelos experimentais, a associação de um quimioterápico com antagonista de PAFR reduziu crescimento do melanoma murino B16F10 e a mortalidade dos animais. A expressão de COX-2, os níveis de PGE_2 , VEGF e a densidade microvascular no interior da massa do tumor, foram significativamente reduzidas pelo tratamento associado do antagonista de PAFR com o quimioterápico(39). No microambiente tumoral, a fagocitose de células mortas também pode modular o fenótipo dos TAM por mecanismos que envolvem o CD36 em conjunto com o PAFR conforme discutido acima. Pelo exposto, tratamentos baseados em morte celular teriam o efeito adverso de induzir macrófagos de perfil supressor (alternativamente ativados) e desse modo, a associação da quimio ou radioterapia com antagonistas do PAFR poderia ser uma alternativa terapêutica interessante.

Os mecanismos moleculares desencadeadas pela ativação do PAFR em tumores são apenas parcialmente compreendidos. Os antagonistas do PAFR estão disponíveis e podem ser benéficos para o tratamento de determinados tumores, estes antagonistas foram utilizados em testes clínicos anteriores, e, por conseguinte, os dados sobre a sua dose eficaz e toxicidade em seres humanos podem ser facilmente recuperados para estudos futuros. Além disso, o modelo de tumor como somente um conjunto de células neoplásicas foi percebido pela comunidade científica como insuficiente, e a desmontagem dessa idéia permitiu a reconstrução de um novo conceito de tumor, dessa vez incluindo os elementos do meio em que as células neoplásicas crescem, o chamado microambiente tumoral, e em nosso trabalho resolvemos focar justamente neste aspecto.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar o papel do PAFR no microambiente tumoral e no fenômeno de repopulação tumoral pós-irradiação.

Para isto o papel do PAFR foi avaliado a) no crescimento tumoral e no infiltrado celular em tumores; b) Na proliferação *in vitro* de linhagens de células tumorais e o efeito da radioterapia na expressão de PAFR; c) No fenômeno de repopulação tumoral induzida por radioterapia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Para a realização deste trabalho foram utilizadas linhagens de câncer cervical (C33, SiHa e HeLa) e células tumorais derivadas de carcinoma escamoso de boca (SCC90 e SCC78). As linhagens SiHa, HeLa e SCC90 são positivas para infecção por HPV, enquanto as linhagens C33 e SCC78 possuem mutações em oncogenes que possibilitaram o surgimento do tumor. Uma linhagem de queratinócito imortal (HaCat) foi utilizada como controle experimental. Além dessas linhagens também utilizamos células de carcinoma epidermóide oral humano (KB cells, cedido pelo Dr. Travelers), cuja expressão do receptor do PAF foi inserida artificialmente, por transdução genética de plasmídeo contendo o gene do PAFR.

Para experimentos em animais utilizamos as linhagens tumorais murinas B16F10 (melanoma murino) e TC-1 (que é uma linhagem derivada do epitélio de camundongos C57Bl/6 transduzida com oncogenes E6/E7 de HPV 16 e gene K-ras) e TC-1 FLUC (Linhagem TC-1 transfectada com o vetor que codifica a Luciferase sob o controle do promotor de SV40, de forma que a expressão de Luciferase fosse constitutiva).

Essas linhagens foram testadas para presença de micoplasma (todas negativas) e mantidas em banco de células sediado no laboratório da Dra. Ana Paula Lepique, do Instituto de Ciências Biomédicas. As linhagens C33, SiHa, HeLa e HaCat são certificadas pela ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, EUA).

3.2 Cultivo celular das linhagens celulares

As células foram cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura de células (Falcon, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), suplementado com 10% soro fetal bovino (BovineCalfSera, GibcoTM, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada) e 5 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram incubadas inicialmente na concentração de 5×10^4 células / mL a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos com 7 a 8 semanas de idade (25-30 g) C57Bl/6 com deleção gênica (knock-out) para o receptor de PAF (PAFR KO) e C57Bl/6 selvagem como controle (WT). Alguns experimentos utilizando as linhagens KBM e KBP foram realizados utilizando animais RAG KO. Todos os animais utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo biotério do departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos a temperatura ambiente, sob atmosfera de 50-60% de umidade relativa do ar, submetidos a um ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração ad libitum. Todos os protocolos de manipulação dos animais seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP em protocolo aprovado nº 158/2013 e nº 130/2015.

3.4 Avaliação do papel de PAFR em tumores de melanoma B16F10 e TC-1

3.4.1 Curva de crescimento tumoral em camundongos

Animais foram injetados no dorso com suspensão contendo 5×10^5 células tumorais viáveis. Utilizamos dois grupos de animais: 1) WT controle e 2) PAFR KO. Os animais foram avaliados quanto ao crescimento tumoral por 15 dias e, em seguida, sacrificados. Os tumores e o baço foram coletados, e suspensões celulares deste material foram obtidas após maceração e digestão das amostras com colagenase (1 mg/mL em PBS por 30 min a 37 °C em agitação). As células foram mantidas no gelo em solução de 1X HANK's contendo 5% de SFB e DNase (0.5 U/mL) e a viabilidade avaliada por exclusão de *trypan blue*.

3.4.2 Caracterização das células do infiltrado tumoral e do baço

Na citometria, as populações de células foram analisadas como descrito por Lepique e colaboradores (2009)(62), onde determinamos as frequências de células positivas para os marcadores CD45 (leucócitos), CD4 e CD8 (linfócitos), CD11b (células mielóides), Gr1 (neutrófilos) e F4/80 (Macrófagos). Dentro da população de macrófagos foi analisada a expressão de CD11c e CD206 como marcadores de macrófagos M1 e M2, respectivamente.

3.4.3 Separação de leucócitos infiltrados no tumor

Realizamos a purificação de células CD45⁺ infiltradas no tumor por coluna magnética. Brevemente, após a dissociação do tumor, uma parte das células foram incubadas com beads magnéticas Anti-CD45 (Milteni Biotec, San Diego, CA, EUA) e separadas em coluna magnética. As células isoladas foram estimuladas com uma baixa dose de LPS (10 ng/mL) por 72 horas. No sobrenadante desta cultura foi determinada a produção de nitritos pelo método de Griess e após extração proteica, foi determinada a atividade da arginase¹.

3.5 Avaliação do papel de PAFR em carcinomas

A expressão do receptor do PAF nas linhagens tumorais de carcinoma foi avaliada por citometria de fluxo e RT-QPCR em tempo real:

3.5.1 Citometria de fluxo:

Suspensões celulares previamente ajustadas na concentração de 10⁶ células/mL em PBS foram incubadas com anticorpo IgG de cabra anti-PAFR humano (1:100, Santa Cruz, CA, EUA). Após 30 min de incubação no gelo, as células foram lavadas em PBS-BSA (3%) e incubadas com anti-IgG de cabra marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100, Sigma Aldrich, St Louis, MO - EUA), lavadas em PBS-BSA (2x) e posteriormente analisadas no aparelho de citometria de fluxo.

3.5.2 Extração de RNA e RT-QPCR em tempo real:

A expressão gênica do receptor PAFR foram analisada por PCR em tempo real utilizando primers específicos. Brevemente, após a cultura celular por 48 horas em carenciamento (meio sem SFB), o RNA das células foi extraído utilizando o reagente Trizol. O cDNA das amostras foi sintetizado utilizando RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante. A seguir foi adicionado à reação a PCR-masternix (Power SyBr® Green, Applied Biosystems, Warrington, UK) contendo os primers específicos para hPAFR (**F**: 5'-GGGGACCCCCATCTGCCTCA-3'; **R**: 5'-GCGGGCAAAGACCCACAGCA-3') ou GAPDH (**F** GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT; **R** TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o aparelho Stratagene Mx3005PTM QPCR Systems (Santa Clara, CA, USA). A expressão relativa dos genes foi calculada pela metodologia $2^{(\Delta\Delta C(T))}$, como descrito por Livak & Schmittgen (2001)(63).

3.5.3 Avaliação do PAFR no crescimento de células tumorais

As linhagens tumorais cultivadas em meio de cultura foram tratadas ou não com o agonista cPAF (100 nM) ou com os antagonistas de PAFR PCA 4280 ou CV 3982 (10 μ M) por 9 dias. Após incubação, as células foram coletadas, contadas e a viabilidade das células analisada pelo teste de exclusão com *trypan blue*. A proliferação celular foi analisada pela contagem do número de células na cultura e a toxicidade dos reagentes foi avaliada por teste de MTT. Os valores de toxicidade foram expressos em percentagem relativamente à absorvência determinada nas células controle (sem tratamento).

3.6 Avaliação do efeito da radioterapia na expressão do PAFR

As linhagens tumorais foram cultivadas em meio de cultura e irradiadas (Fonte de cobalto 60, MDS Norton, Canadá) nas doses de 2, 4 e 8 Gray (Gy) e após 6 horas de incubação, o RNA das células foi extraído e utilizado para análise da expressão do receptor do PAF por RT-QPCR em tempo real, como explicado no tópico anterior.

3.7 Bioensaio com células KBP/KBM para detecção de atividade agonista sobre o PAFR

Para testar a capacidade da irradiação gama induzir a produção de ligantes do receptor do PAF, usamos uma metodologia conforme descrito anteriormente(64). Brevemente, extratos lipídicos de células tumorais expostas ou não a radiação gama (lipídeos de $2,5 \times 10^6$ células em 1 mL/poço irradiadas com 2/4/8 Gy) foram diluídos em DMEM sem SFB e incubados com células KBM/KBP por 6 horas a 37 °C e 5% CO₂. A ativação do PAFR nestas células por PAF ou moléculas similares ao PAF (em inglês “*PAF-like molecules*”) induz aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular e a produção da quimiocina IL-8. Assim, após o período de 5 horas de estímulo, o sobrenadante da cultura foi coletado e congelado para detecção da produção de IL-8 por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Como controle positivo da produção de IL-8 por células KBP e KBM, CPAF (100 nM) e PMA (10 nM) foram respectivamente adicionados às células.

3.8 Ensaio de repopulação tumoral

A linhagem tumoral TC-1 foi cultivada em RPMI 10% SFB a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas (2×10^5 células/poço) e irradiada com 0, 4 ou 8 Gy. Adicionalmente, 1000 células TC-1 Fluc (que expressam o gene da Luciferase) que foram pré-tratadas por 30 min com antagonistas do receptor do PAF (PCA4280 ou CV3988) foram adicionadas nas culturas de TC-1 irradiadas. Após 9 dias de cultura, as células foram coletadas, lisadas com tampão de lise (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent - Promega Corporation – Madison, USA), e após centrifugação (10000g, 10 min, 4° C) o sobrenadante foi transferido para a placa de leitura (96-Well Black Polystyrene Plate, Corning Costar – New York, USA) e incubado com o substrato D-luciferina (150 µg/ml). A leitura do ensaio foi realizada 1 minuto após incubação em sistema IVIS (Caliper Life Sciences Headquarters™, Hopkinton, Massachusetts, USA). Para ensaios *in vivo*, o crescimento das células tumorais marcadas (TC-1 Fluc) foi monitorizado por imagem não invasiva de bioluminescência. Os animais foram anestesiados com um fluxo contínuo de isoflurano e fotografados 10 min após injeção intraperitoneal com 150 mg / kg de D-luciferina em 200 µL de PBS. As imagens adquiridas foram analisadas seguindo as instruções do fabricante.

3.9 Análise Estatística

Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão (DP) e analisados pelo programa estatístico GraphPadPrism 5 (GraphPad Software). Comparações entre grupos foram avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 PARTE I – O PAFR no infiltrado celular e crescimento tumoral

Nesta primeira parte do projeto avaliamos o papel do PAFR no crescimento tumoral e no infiltrado celular utilizando dois tipos de tumores: um formado por células de melanoma B16F10 e outro formado pela inoculação de células da linhagem de carcinoma murino TC-1.

4.1.1 *Ligantes do PAFR favorecem o crescimento tumoral.*

Iniciamos este trabalho comparando o perfil de crescimento tumoral do melanoma B16F10 e do carcinoma TC-1 em camundongos com deleção do gene para o receptor do PAF (PAFR KO) em relação aos camundongos selvagens (WT). Nossos resultados mostraram que a injeção subcutânea das células tumorais forma tumores visíveis a partir do 6º dia. Porém, em animais PAFR KO, os tumores formados são significativamente menores quando comparados com animais WT durante todos os dias avaliados na curva de crescimento, tanto para o melanoma (**Figura 1A**) quanto para de carcinoma TC-1 (**Figura 1B**). A **Figura 1** também mostra o peso dos tumores no 15º dia após a inoculação das células tumorais (último dia avaliado), e foi observado que o peso dos tumores provenientes de animais PAFR KO foi significativamente menor em comparação aos tumores de animais WT.

A avaliação macroscópica dos tumores revelou a presença de grande quantidade de sangue e líquido amarelado (ascite) principalmente nos tumores de melanoma provenientes de animais WT, sendo que em alguns destes animais também foi detectado a presença de tumores satélites e metástases (dados não mostrados).

Esses resultados indicam que ligantes do receptor do PAF (PAF ou moléculas “PAF-like”) são produzidos durante o crescimento do melanoma e do carcinoma TC-1 e que a ativação do receptor do PAF presentes nas células do microambiente tumoral favorece o crescimento do tumor.

Figura 1 - Animais PAFR KO são mais resistentes ao crescimento tumoral que animais WT.

A linhagem tumoral B16F10 e TC-1 foram injetadas (5×10^5 células) no dorso de camundongos C57BL/6 WT ou PAFR KO. Em A são mostrados dados do tumor B16F10 e em B são mostrados dados dos tumores formados por células TC-1. No painel à esquerda são mostradas a curva de crescimento tumoral (o volume da massa tumoral foi calculado pela fórmula: $\text{diâmetro maior} \times (\text{diâmetro menor})^2 \times 0.52$), com medições periódicas dos tumores a cada dois dias. No centro são mostradas fotos dos dois tumores, a foto superior proveniente de um animal WT e a foto inferior proveniente de um animal PAFR KO, ambos fotografados no 15º dia. No painel à direita são mostrados o peso dos tumores. Os dados são mostrados como média $\pm$ DP. $n=10$ animais. * $p<0.05$.

4.1.2 Ligantes do PAFR modulam o infiltrado tumoral

O microambiente tumoral não é constituído somente por células neoplásicas, mas também por diversos tipos celulares não transformados, tanto pertencentes ao tecido de onde se originou o tumor, quanto recrutados da circulação^{4,5}. A presença de infiltrado leucocitário varia em tamanho, composição e distribuição no estroma tumoral. Essas células normalmente são recrutadas pelo próprio tumor e coletivamente podem atuar fornecendo sinais que inibam ou favoreçam o crescimento tumoral⁶⁻⁸. Assim, resolvemos investigar se a diminuição do crescimento tumoral em animais PAFR KO estaria relacionada com alterações no perfil de leucócitos que infiltram o tumor.

Para isto, tumores provenientes de animais WT e PAFR KO foram coletados no 15º dia de crescimento, processados e analisados por citometria de fluxo. Cerca de 1% a 2% das células presentes no tumor formado por células B16F10 são leucócitos, sendo que não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de leucócitos intratumorais (marcados com anti-CD45) entre os dois grupos de animais (**Figura 2A**). Já nos tumores formados por células TC-1, detectamos uma maior presença de leucócitos nos tumores provenientes dos animais WT (4% a 17%) em relação aos animais PAFR KO (2% a 7%, **Figura 2B**).

Dentro da população CD45⁺, os linfócitos (CD3⁺) representam cerca de 4-14% dos leucócitos, não havendo diferenças significativas entre os tumores avaliados (dados não mostrados). A seguir avaliamos dentro do tumor a presença de populações específicas de linfócitos T (CD4 e CD8). Notamos um aumento específico na população de linfócitos CD8 em animais PAFR KO injetados com tumores de melanoma quando comparados com animais WT (**Figura 3A**). Também notamos um aumento de linfócitos CD4 em animais PAFR KO injetados com tumores TC-1 quando comparados com aqueles tumores TC-1 provenientes de animais WT (**Figura 3B**).

Em relação as populações de leucócitos de origem mieloide (macrófagos e neutrófilos) que migraram para dentro do tumor, verificamos que dentro da população de células CD45⁺, em torno de 41 a 74% das células eram de linhagem mieloide (CD11b⁺) e dentro dessa população, cerca de 25-60% eram macrófagos (F4/80⁺), não havendo diferenças entre os tumores analisados (**Figura 4**). Em

relação a população de neutrófilos (Gr1^+) elas representam de 5-38% das células de origem mieloide, havendo um aumento nessa população em animais PAFR KO contendo tumores B16F10 (**Figura 4A**) e TC-1 (**Figura 4B**) em comparação aos animais WT.

Figura 2 - Infiltrado leucocitário em tumores provenientes de animais WT e PAFR KO.

Suspensões de células tumorais de B16F10 (**A**) ou TC-1 (**B**) provenientes de animais WT e PAFR KO após 15 dias de crescimento foram analisados por citometria de fluxo. No painel à esquerda são mostrados um exemplo da análise das células marcadas com anticorpo Anti-CD45 PE onde 50.000 eventos foram adquiridos por amostra. No painel à direita são mostrados a mediana $\pm$ EPM da porcentagem de células intratumorais que expressam CD45. $n=10$ animais. $P < 0,05$.

Figura 3 - Avaliação do infiltrado de linfócitos CD4 e CD8 em tumores provenientes de animais WT e PAFR KO.

Suspensões de células tumorais de B16F10 (**A**) ou TC-1 (**B**) provenientes de animais WT e PAFR KO após 15 dias de crescimento foram analisados por citometria de fluxo. No painel à esquerda são mostrados um exemplo da análise dos linfócitos intratumorais marcados com anticorpos Anti-CD8 e Anti-CD4. No painel à direita são mostrados a mediana $\pm$ EPM da porcentagem de células intratumorais que expressam CD4 ou CD8. $n=10$ animais. * $p < 0,05$.

Figura 4 - Avaliação do infiltrado de neutrófilos (Gr1⁺) e macrófagos (F4/80⁺) em tumores provenientes de animais WT e PAFR KO.

Suspensões de células tumorais de B16F10 (**A**) ou TC-1 (**B**) provenientes de animais WT e PAFR KO após 15 dias de crescimento foram analisados por citometria de fluxo. No painel à esquerda são mostrados um exemplo da análise das células mieloides (CE45⁺CD11b⁺) presentes nos tumores e que expressam F4/80 ou Gr1. No painel à direita são mostrados a mediana $\pm$ EPM da porcentagem de células intratumorais que expressam Gr1 ou F4/80. n=10 animais. *p< 0,05.

4.1.3 Ligantes do PAFR em macrófagos induzem fenótipo pró-tumoral

Os macrófagos expressam PAFR e a ativação deste receptor modifica o fenótipo dos macrófagos para um perfil anti-inflamatório(65). Resolvemos então investigar o fenótipo dos macrófagos intratumorais através do estudo de marcadores. Embora estas células apresentem uma grande heterogeneidade é aceita a classificação em dois subtipos extremos: os classicamente ativados M1, que tem perfil pro-inflamatório secretando TNF, IL-1, IL-6, IL-12, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os macrófagos alternativamente ativados M2, que apresentam um perfil anti-inflamatório e expressam arginase, TGF β e IL10. Assim, usamos o marcador CD11c para identificar os macrófagos M1 e o marcador CD206 para identificar macrófagos M2 na massa tumoral.

A figura 5 mostra que nos animais PAFR KO há um aumento na frequência de macrófagos intratumorais expressando a molécula CD11c (M1) e uma consequente diminuição na frequência de macrófagos CD206 (M2), tanto no melanoma (**Figura 5A**) quanto no TC-1 (**Figura 5B**) quando comparados ao grupo de animais WT.

Para confirmar o fenótipo destes macrófagos isolamos as células CD45⁺ do tumor e estimulamos com LPS. Observamos que os leucócitos provenientes de animais PAFR KO apresentavam altos níveis de produção de nitrito (**Figura 6A**) e baixa atividade de arginase (**Figura 6B**) quando comparados com animais WT. Também notamos uma produção menor de IL-10 no sobrenadante daquelas culturas provenientes de tumores dos animais PAFR KO (**Figura 6C**). Estes dados sugerem que na presença do PAFR os macrófagos intratumorais desenvolvem um fenótipo M2 que favorece o crescimento tumoral.

Figura 5 - Na ausência do PAFR os macrófagos intratumorais apresentam fenótipo M1.

Suspensões de células tumorais de B16F10 (A) ou TC-1 (B) foram analisados por citometria de fluxo. No painel à esquerda são mostrados um exemplo da análise da população de macrófagos intratumorais (CD45⁺F4/80⁺). Essa população foi selecionada para análise da expressão dos marcadores CD11c (M1) e CD206 (M2). No painel à esquerda são mostrados a mediana $\pm$ EPM da porcentagem de macrófagos CD11c e CD206 provenientes de 6 animais. * $p < 0.05$.

Figura 6 - Na ausência do PAFR os macrófagos intratumorais apresentam alta produção de nitrito e baixa atividade de arginase e produção de IL-10.

Células CD45⁺ foram purificadas de suspensões tumorais de B16F10 ou TC-1 provenientes de animais WT e PAFR KO e estimuladas com 100 ng LPS. Como controle também coletamos macrófagos peritoneais de animais WT e PAFR KO saudáveis (pM). Após 72 horas de incubação o sobrenadante foi coletado para quantificação da produção de óxido nítrico (nitrito) pela reação de Griess (A) e IL-10 (C). O extrato celular foi utilizado para ensaio de atividade de arginase (B). Os dados foram normalizados utilizando a quantidade de proteína de cada amostra mensurada por kit BCA. $n = 6$ animais. * $p < 0.05$.

4.1.4 A esplenomegalia associada a tumor está diminuída em animais PAFR KO.

A progressão tumoral está associada a efeitos sistêmicos, com acúmulo de células mieloides em órgãos linfoides e no sangue (leucocitose). Em animais, o principal órgão linfóide secundário afetado é o baço, podendo ocorrer esplenomegalia, associada principalmente a expansão de células do sistema imune em resposta ao tumor.

Um aumento no número de células deste órgão foi observado nos animais WT em relação aos animais PAFR KO, no 15º dia do crescimento tumoral, este aumento também foi maior que em animais *naïve* (isto é, sem tumores) (**Figura 7**). Houve um aumento na porcentagem de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no baço dos animais PAFR KO com melanoma quando comparados com WT (**Figura 8**). Em relação a população de células mieloides (CD11b⁺), houve um aumento de neutrófilos (Gr1⁺) no baço dos animais PAFR KO em ambos os modelos tumorais (melanoma e TC-1) quando comparados com WT (**Figura 9**). Em relação a população de macrófagos (F4/80⁺) não houve diferenças significativas. Estes resultados indicam que a ativação de vias dependentes do PAFR durante o crescimento tumoral também exerce efeitos sistêmicos, aumentando a esplenomegalia associada ao tumor. Estudos mais aprofundados serão necessários para explicar este fenômeno, principalmente em relação às populações de células que estão expandidas no baço dos animais PAFR KO, que parecem proteger o animal contra o crescimento tumoral. Não foram detectadas diferenças significativas nas populações de linfócitos B (dados não mostrados).

Figura 7 - Esplenomegalia associada aos tumores está diminuída em animais PAFR KO.

Comparação do número de células do baço de animais selvagens e PAFR KO *naives* ou injetados com 5×10^5 células de melanoma B16F10 ou TC-1 no dorso (15 dias após inoculação). São mostradas a média $\pm$ DP de 10 animais por grupo. * $p < 0.05$.

Figura 8 - Populações de linfócitos (CD4/CD8) no baço de animais PAFR KO e WT injetados com melanoma B16F10 ou TC-1.

Animais selvagens e PAFR KO foram injetados com 5×10^5 células de melanoma B16F10 (A) ou TC-1 (B) no dorso. Após 15 dias da injeção os animais foram sacrificados e o baço coletado para análise das populações de células por citometria de fluxo. No painel à esquerda é mostrado um exemplo da análise das células do baço marcadas para expressão de CD4 e CD8. No painel à direita são mostrados a mediana $\pm$ EPM das porcentagens da população de linfócitos CD4 e CD8 presentes no baço dos animais. $n = 10$ animais. * $p < 0.05$.

Figura 9 - Populações de neutrófilos (Gr1) e macrófagos (F4/80) no baço de animais PAFR KO e WT injetados com melanoma B16F10 ou TC-1.

Animais selvagens e PAFR KO foram injetados com 5×10^5 células de melanoma B16F10 (A) ou TC-1 (B) no dorso. Após 15 dias da injeção os animais foram sacrificados e o baço coletado para análise das populações de células por citometria de fluxo. No painel à esquerda é mostrado um exemplo da análise das células do baço marcadas para expressão de Gr1 e F4/80. No painel à direita é mostrado a mediana $\pm$ EPM das porcentagens da população de células mieloides Gr1 e F4/80 presentes no baço dos animais. $n = 10$ animais. * $p < 0.05$.

4.2 PARTE II – A expressão e ativação do PAFR em células tumorais

4.2.1 Linhagens tumorais de carcinoma expressam PAFR.

Inicialmente avaliamos a expressão de PAFR em três linhagens de carcinoma cervical (C33, SiHa, HeLa) e em duas linhagens de células escamosas de carcinoma de boca (SSC90 e SSC78) e comparamos sua expressão em relação a um queratinócito imortalizado (HaCat), que serviu como controle. Nossos resultados mostraram que as células tumorais expressam maiores quantidades de mRNA para PAFR do que a linhagem de queratinócito controle HaCat (**Figura 10A**). Em relação à expressão proteica do receptor na membrana celular, avaliado por citometria de fluxo, observamos que as linhagens C33, SiHa, HeLa e SSC78 expressam maiores quantidades do receptor em relação ao queratinócito controle HaCat, enquanto que a linhagem SSC90 é a que expressa menores quantidades de PAFR na membrana (**Figura 10B**).

Figura 10 - Expressão de PAFR em linhagens de carcinoma.

Linhagens tumorais de carcinoma (C33, SiHa, HeLa, SCC90 e SCC78) e um queratinócito controle (HaCat) foram cultivados por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂. **(A)** Análise da expressão de mRNA de PAFR por RT-qPCR e **(B)** Análise da expressão de PAFR na membrana celular em linhagens de carcinoma por citometria de fluxo. Os dados são mostrados como a média ± DP do delta-CT comparativo de 3 experimentos independentes. *p<0.05 comparando as linhagens tumorais com a linhagem de queratinócito controle.

4.2.2 A ativação do receptor do PAF em células tumorais estimula sua proliferação

Uma vez que demonstramos que as linhagens de carcinoma expressam PAFR e sabendo-se que o PAF tem papel importante no crescimento de alguns tipos de tumores, analisamos em seguida o efeito da ativação e do bloqueio deste receptor sobre o crescimento *in vitro* das linhagens de carcinoma.

Inicialmente procuramos a concentração de agonistas e antagonistas que não fosse tóxica para as células tumorais, utilizando para isto o ensaio de MTT com as células tratadas por 24 horas com 3 doses diferentes de cada uma das drogas. Nestes ensaios também dosamos a presença da enzima LDH no sobrenadante das culturas para avaliar se houve alguma lise celular induzida pelos tratamentos com os antagonistas. Nenhuma das concentrações do agonista cPAF foi tóxica para as linhagens celulares e nem induziu a lise das células. Os antagonistas PCA e CV diminuíram a viabilidade das linhagens SiHa e HeLa na dose de 100 uM, porém não induziram lise das células (dados não mostrados). Assim, escolhemos a dose de 10 uM dos antagonistas (WEB, PCA e CV) e 100nM do agonista cPAF para os experimentos.

Para os ensaios de proliferação, tratamos as linhagens tumorais por 9 dias com um agonista do receptor do PAF (cPAF), contando o número de células na cultura a cada 3 dias. Não foi observado efeitos do agonista sobre o crescimento da linhagem controle HaCat (Fig. 11A) e das linhagens tumorais HeLa (Fig. 11D) e SSC90 (Fig. 11F), porém, o PAF foi capaz de aumentar o crescimento das linhagens C33 (Fig. 11B), SiHa (Fig. 11 C) e SSC78 (Fig. 11E) em relação ao controle não tratado.

O bloqueio do receptor com os antagonistas PCA 4280 e CV 3938 inibiu significativamente o crescimento das linhagens de carcinoma C33, SiHa, HeLa e SSC78 como mostrado nas **Figuras 12B, 12C, 12D e 12E**, respectivamente, sendo que para a linhagem controle HaCat e SSC90, estes antagonistas não surtiram efeito significativo no crescimento (**Fig. 12A e 12F**). Estes dados sugerem que as células de carcinoma secretam substâncias “PAF-like” que agem como fatores de crescimento para as células tumorais e o bloqueio do receptor interferem nesta sinalização.

Ainda, realizamos experimentos de proliferação celular com outra linhagem tumoral, proveniente de um carcinoma epidermóide oral humano (KB cells, cedido pelo Dr. Travers), na qual o receptor do PAF foi inserido artificialmente, por transdução genética de plasmídeo contendo o gene do PAFR. Assim, obtemos uma linhagem de células KB que altamente expressa o receptor do PAF (KBP) e outra linhagem que não expressa este receptor, onde foi inserido um plasmídeo vazio (KBM).

O tratamento com o agonista cPAF estimulou significativamente a proliferação da linhagem KBP (que expressa o PAFR, **Fig. 13A**) e não afetou o crescimento da linhagem KBM (que não expressa o receptor do PAF, **Fig. 13B**). O tratamento com o antagonista CV3988 não afetou o crescimento de nenhuma das duas linhagens (**Fig. 13A e 13B**).

Assim, concluímos nesta parte do trabalho que a ativação de PAFR nas linhagens de carcinoma estimula a proliferação celular. Além disso, possivelmente as linhagens C33, SiHa, HeLa e SSC78 sintetizam PAF ou moléculas “*PAF-like*” e utilizam esta via para proliferação, pois o bloqueio farmacológico deste receptor diminuiu o crescimento dessas linhagens durante a curva de proliferação.

Figura 11 - Agonistas de PAFR estimulam a proliferação das linhagens de carcinoma.

Linhagens tumorais de carcinoma (C33, SiHa, HeLa, SCC90 e SCC78) e um queratinócito controle (HaCat) foram cultivados por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂ e tratadas ou não com o agonista do PAFR cPAF (100 nM). A cada três dias as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Os dados são mostrados como a média ± DP de 3 experimentos independentes. * p<0.05 Tratado vs controle.

Figura 12 - Antagonistas do receptor do PAF inibem a proliferação das linhagens de carcinoma.

Linhagens tumorais de carcinoma (C33, SiHa, HeLa, SCC90 e SCC78) e um queratinócito controle (HaCat) foram cultivados por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂ e tratadas ou não com antagonistas do receptor do PAFR (10 µM de PCA 4280 ou CV 3938). A cada três dias as culturas foram tripsinizadas e as células contadas em câmara de Neubauer. Os dados são mostrados como a média ± DP de 3 experimentos independentes. * p<0.05 Tratado vs controle.

Figura 13 - Agonistas de PAFR aumentam a proliferação de células de carcinoma humano (KB) que expressam altamente o receptor do PAF (KBP).

(A) Células KBP e (B) Células KBM foram tratadas ou não com cPAF (100 nM) ou CV 3938 (10 μ M). O crescimento das células tumorais foi avaliado a cada 3 dias até o 9º dia. Os dados representam a média $\pm$ DP do número de células (painel esquerdo) ou da área sobre a curva (AUC, painel direito) de 6 experimentos independentes. * $p < 0.05$ Veículo vs cPAF.

4.2.3 A irradiação aumenta expressão de PAFR e induz produção de seus ligantes

Inicialmente padronizamos um método para quantificar ligantes do PAFR a partir de metodologia desenvolvida anteriormente por Travers et al. (1995). O ensaio se baseia na capacidade das células de carcinoma KB transduzidas com o gene do PAFR (KBP) em produzir a quimiocina IL-8 quando o receptor do PAF é ativado. A concentração de ligantes de PAFR nos extratos lipídicos das amostras irradiadas pode ser calculada em relação a uma curva de dose resposta ao cPAF (agonista sintético do PAFR) sobre as células KBP, que induz a produção de IL-8 que então é quantificada no sobrenadante por ELISA(64).

Como pode ser visto na **Figura 14A**, células KBP quando expostas ao agonista cPAF produziram IL-8 de maneira dose dependente, enquanto as células KBM (estas negativas para PAFR e utilizadas como controle) não produziram essa a citocina (**Fig. 14B**). O estímulo com PMA foi utilizado como controle positivo da produção de IL-8 pelas duas linhagens.

Figura 14 – O PAF induz a produção de IL-8 em células KBP.

(A) Células KBP (que expressam PAFR) ou (B) KBM (Controle negativo) foram tratadas com o agonista estável do receptor (cPAF, 100 ou 10 ng/mL), 0,5% de etanol (veículo) ou 10 nM de PMA. Seis horas depois, os sobrenadantes foram coletados e a citocina IL-8 dosada por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ DP da concentração de IL-8 produzida por 2×10^5 células (em triplicata) de 2 experimentos independentes.

Este ensaio foi então utilizado para determinar se as células de carcinoma (C33, SiHa, HeLa, SSC78 e SSC90) produzem ligantes de PAFR quando submetidas a doses crescentes de irradiação gama. Para isto, foi preparado o extrato lipídico das culturas de células de carcinoma após uma hora do tratamento com doses crescentes de radiação gama. Este extrato foi adicionado sobre as células KBP e a concentração de IL-8 foi mensurada. Os resultados foram expressos como % da resposta de IL-8 induzida por 100 nM de cPAF em células KBP consideradas como controles. Como mostrado na **Figura 15**, a irradiação com 2, 4 ou 8 Gy gerou produção significativa de ligantes do PAFR em todas as linhagens estudadas.

Também avaliamos a expressão do receptor do PAFR nas células irradiadas após 4 horas do tratamento e observamos um aumento significativamente a expressão de mRNA do PAFR nas linhagens tumorais assim como no queratinócito controle (HaCat) (**Fig. 16**), sugerindo de forma indireta que moléculas “PAF-like” geradas pela radiação estimulam a expressão do PAFR.

Figura 15 – A irradiação induz a produção de ligantes de PAFR em linhagens de carcinoma.

Queratinócitos imortalizados (HaCat) (A) e células tumorais C33 (B), SiHa (C), HeLa (D), SSC78 (E) e SSC90 (F), foram cultivadas em RPMI 10% SFB a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas em alta densidade (10⁸ células) e irradiadas com 2, 4 ou 8 Gy. Extratos lipídicos foram obtidos após 1 hora da irradiação e então adicionados às células KBP. Um grupo recebeu 100 nM de cPAF como controle positivo. Após 6 horas, a IL-8 no sobrenadante foi quantificada por ELISA como medida da atividade agonista sobre o PAFR. Os resultados são expressos como medianas ± EPM das porcentagens da produção de IL-8 relativa às quantidades induzidas por 100 nM de cPAF (controle positivo) dos extratos lipídicos das linhagens irradiadas, n=3, * p < 0,05.

Figura 16 - Irradiação das células tumorais aumenta a expressão do receptor de PAF.

Queratinócitos imortais (A) e células tumorais de carcinoma C33 (B), SiHa (C), HeLa (D), SSC78 (E) e SSC90 (F) foram cultivadas em RPMI 10% SFB a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas e irradiadas com 4 ou 8 Gy. Após 4 horas o RNA total das células foi extraído para análise da expressão de PAFR por RT-QPCR em tempo real. Os dados são mostrados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ Irradiado vs controle.

4.2.4 O PAF protege as células tumorais da morte induzida por radioterapia.

Como mostrado, o PAF estimulou a proliferação das células de carcinoma e a irradiação induziu a produção de ligantes de PAFR. Assim hipotetizamos que a ativação do PAFR nas células tumorais induziria as células a entrarem em ciclo proliferativo, tornando-as resistentes aos danos causados pela radiação. Para avaliar esta hipótese, pré-tratamos as células tumorais com o antagonista do PAFR CV3938 e em seguida irradiamos as células com duas doses diferentes de radiação gama (4 e 8 Gy) e avaliamos a viabilidade celular.

A radiação gama reduziu, de maneira dose-dependente, a viabilidade das células tumorais (**Fig. 17**) e o bloqueio de PAFR com o antagonista CV3938, diminuiu ainda mais a viabilidade celular. Isto sugere que os ligantes do PAFR induzidos pela radiação protegem as células tumorais da morte induzida pela radiação.

Figura 17 – Antagonista do receptor do PAF, CV3938, aumenta a morte celular induzida por radioterapia.

Células tumorais C33 (A), SiHa (B) e HeLa (C) foram tratadas ou não com antagonistas do receptor do PAFR (10 μ M CV3938) e posteriormente irradiadas com doses de 4 e 8 Gy. Após 3 dias, as culturas foram tripsinizadas e as células coradas com *trypan blue* e posteriormente contadas em câmara de Neubauer. Os dados são mostrados como mediana da porcentagem do número de células viáveis em relação ao controle (não tratado). N = 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ Irradiado vs controle; # $p < 0.05$ tratados vs não tratado com CV3938.

4.3 Parte III - Ativação do PAFR no fenômeno de repopulação pós irradiação

A repopulação tumoral refere-se à capacidade de crescimento acelerado das células tumorais resistentes a radiação que pode ocasionar o surgimento de novos tumores, mais agressivos e resistentes ao tratamento. Por esta razão, na radioterapia, protocolos rígidos quanto ao tempo de duração e fracionamento das doses são seguidos afim de evitar este importante efeito colateral. Com base na nossa observação anterior de que o PAF aumenta a resistência das células tumorais à morte celular induzida pela irradiação, ensaiamos a hipótese de que os ligantes do PAFR geradas durante a irradiação do tumor poderiam estar envolvidos no fenômeno de repopulação tumoral pós tratamento.

4.3.1 O PAFR está envolvido na repopulação tumoral.

Nesta parte do estudo, utilizamos como modelo para simular o fenômeno de repopulação tumoral a linhagem de carcinoma TC-1. Primeiramente avaliamos como a linhagem TC-1 responde a radiação *in vitro*. Detectamos que doses crescentes de radiação gama aumentaram a expressão do PAFR na membrana das células (**Fig. 18A**) e também o seu RNA mensageiro (**Fig. 18B**). A irradiação das células TC-1 também induziu a geração de moléculas ligantes de PAFR em grande quantidade, pois nota-se que as células TC-1 irradiadas com 8 Gy geraram atividade agonística do receptor PAF equivalente a 100 nM de PAF (**Fig. 18C**).

Posteriormente avaliarmos que a irradiação induziu morte celular de maneira dose-dependente sobre as células TC-1 (**Fig. 18D**). O pré-tratamento das células TC-1 com o antagonista do receptor PAF (CV3988), aumentou significativamente este processo de morte celular, comprovando o efeito protetor do PAF sobre células irradiadas.

Para ensaiar a hipótese de que o PAF poderia estar atuando no fenômeno de repopulação tumoral, padronizamos um modelo *in vitro* com base em Huang et al. (2012) adequado para o estudo deste evento, utilizando células TC-1 transformadas com um plasmídeo contendo o gene da luciferase, gerando uma linhagem de células luminescentes (TC-1 Fluc).

A capacidade das células TC-1 irradiadas em estimular o crescimento de células TC-1 Fluc foi testada de acordo com o protocolo ilustrado na **Fig. 19A**. Tratamos com diferentes doses de radiação um *feeder* de células TC-1 (2×10^5) e adicionamos na cultura, imediatamente após a radioterapia, uma pequena quantidade (1000 células) de TC-1 Fluc não irradiadas. Desse modo, o *feeder* de células irradiadas que morre serve de estímulo para promover a proliferação das células TC-1 Fluc que foram adicionadas. Essa proliferação das células TC-1 Fluc pode ser mensurada por meio de um ensaio de luminescência e nota-se na **Figura 19B** que a luminescência das células TC-1 Fluc foi linear com o número de células presentes na cultura.

Nossos resultados mostraram que a presença de um “*feeder*” de células irradiadas potencializou significativamente a proliferação das células TC-1 Fluc (**Fig. 19C**). Quando as células TC-1 Fluc foram tratadas com os antagonistas do receptor PAF antes da irradiação (4 Gy) o PCA 4288 causou uma redução de 40% na proliferação celular e o CV3988 causou uma redução de 80% quando comparada com as células não irradiadas e tratadas com veículo. Após o tratamento com dose mais elevada de irradiação (8 Gy), ambos os antagonistas do receptor PAF foram igualmente eficazes em reduzir a proliferação celular (**Figura 19D**).

Para avaliarmos o fenômeno de repopulação *in vivo*, injetamos células TC-1 em camundongos C57Bl6, em dois locais do flanco inferior. Como ilustrado na **Figura 20A**, no lado direito injetamos uma mistura de células TC-1 irradiadas (10 Gy) com células TC-1 Fluc não irradiadas (na proporção de 1000 células TC-1 Fluc para 500 mil células TC-1 normais). No lado esquerdo, injetamos a mesma proporção de células TC-1, só que não irradiadas (controle positivo). O crescimento tumoral foi acompanhado por 15 dias e ao final da curva de crescimento, os animais foram injetados com luciferina (substrato da luciferase) para avaliar o sinal que corresponde a quantidade de células TC-1 Fluc presentes nos tumores. Um grupo de animais também recebeu tratamento com antagonista do receptor do PAF (CV3988).

Conforme ilustrado na **Figura 20C**, quando as células TC-1 vivas foram misturadas com células irradiadas, o volume tumoral foi significativamente maior do que as misturadas com células viáveis. O tratamento com o antagonista do receptor

PAF reduziu o crescimento do tumor formado pela mistura de células vivas com células irradiadas (**Fig. 20D**). Em consonância com a observação *in vitro* (**Figura 19C**), as células irradiadas promoveram aumento significativo da proliferação das células TC-1 Fluc, avaliado no 15º dia (**Figura 20E**), e o tratamento com CV3988 diminuiu o tamanho do tumor. Além disso, os extratos lipídicos dos tumores irradiados apresentaram maior produção de ligantes do receptor do PAF que os tumores não irradiados (**Figura 20B**).

Figura 18 - A irradiação aumenta a expressão do receptor PAF em células TC-1 e induz a geração de agonistas do receptor PAF.

Células tumorais TC-1 (5×10^4) foram expostas a diferentes doses de radiação ionizante. **(A)** Análise da expressão do receptor de PAF por citometria de fluxo, são mostrados a média $\pm$ DP de valores do MFI (* $p < 0,05$ irradiados vs controle não irradiados); **(B)** Níveis de expressão do mRNA do receptor de PAF. Os dados representam a média $\pm$ DP (* $P < 0,05$ em comparação do controle não irradiado vs irradiado); **(C)** Extratos lipídicos de TC-1 recolhidos após 1 hora de irradiação foram ensaiados quanto à atividade agonística do receptor PAF, medida como mediana $\pm$ EPM da porcentagem de produção de IL-8 por células KBP que expressam o receptor PAF estimuladas com 100 nM de cPAF; **(D)** Bloqueio do receptor PAF com CV3988 aumenta a morte celular induzida por irradiação. Média $\pm$ DP de 4 experiências feitas em duplicata (* $p < 0,05$ comparando irradiado vs não irradiado e # comparando CV 3988 vs veículo).

A Modelo *in vitro* de repopulação tumoral

Figura 19 – Antagonistas de PAFR bloqueiam parcialmente a proliferação celular induzida por radioterapia.

Em (A) é mostrado uma ilustração da metodologia utilizada para avaliação do fenômeno de repopulação tumoral *in vitro*. Brevemente, a linhagem TC-1 foi cultivada em RPMI 10% SFB a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas (2×10^5 células/poço) e irradiadas com 2, 4 ou 8 Gy. Adicionalmente, 1000 células TC-1 Fluc (que expressam o gene da luciferase) foram adicionadas nas culturas de TC-1 irradiadas. Após 9 dias de cultura, as células foram incubadas com luciferina (substrato para ação da luciferase) para quantificação do crescimento celular. Em (B) é possível observar a linearidade do crescimento das células TC-1 Fluc com a capacidade de emissão de luminescência. Os resultados são mostrados como média de RLU (relative luminescence units) emitida pela cultura. Em (C) Atividade de luciferase (RLU) em co-culturas de células TC-1 irradiadas (4 ou 8 Gy) com células TC-1 Fluc. Em (D) é mostrado a porcentagem de inibição de RLU em culturas tratadas com antagonistas PCA4288 ou CV3988, em relação a culturas não tratadas. Os dados representam a média $\pm$ DP de 6 experimentos feitos em duplicatas. A diferença entre cada um dos grupos irradiados (4 e 8 Gy) e controles (0 Gy) e entre tratados ou não com antagonistas do receptor PAF foi estatisticamente significativa (* $P < 0,05$).

Figura 20 – Ensaio de repopulação *in vivo*.

(A) Representação esquemática do protocolo utilizado nestes experimentos, brevemente, foi injetado por via subcutânea uma mistura de células TC-1 irradiadas (10 Gy) ou controles não irradiados (5×10^5) em conjunto com células TC-1 Fluc em animais C57BL6. Estes animais foram tratados ou não com injeções intraperitoneais do antagonista do receptor PAF (CV3988) na dose de 10 mg / kg ou veículo (PBS) de dois em dois dias; (B) Atividade agonista do receptor PAF de extratos lipídicos da massa tumoral após 1 hora de 10 Gy, medida como produção de IL-8 por célula KBP ($n = 6$). (C) Efeito das células TC-1 irradiadas no crescimento de células tumorais TC-1 Fluc, mostrado como volume tumoral (mm³) mensurado durante 15 dias na presença ou ausência de CV3988; (D) diferenças no volume tumoral entre os grupos no 15º dia de crescimento; (E) no painel à esquerda são mostrados a quantificação de sinais bioluminescentes de tumores injetados nos animais. No painel à direita são mostradas imagens representativas da bioluminescência emitida pelos tumores nos animais tratados (à direita) ou não tratados (à esquerda) com o antagonista de PAFR ($n = 7$ animais).

Existem evidências de que prostaglandinas tem papel importante na repopulação tumoral pós-irradiação pois induzem proliferação das células tumorais via ativação do receptor EP2(50). Trabalhos anteriores do nosso laboratório sugerem que, dependendo do modelo experimental, a produção de PGE₂ pode ser dependente da ativação do PAFR. Por exemplo, os níveis elevados de PGE₂ encontrados no tumor ascístico de Erlich foram significativamente reduzidos em animais tratados com antagonistas de receptor de PAF(61). Assim, resolvemos avaliar a participação do PAFR na produção de PGE₂ em células TC-1. Foi observado que o tratamento das células tumorais com agonistas do receptor (cPAF) induziu produção de PGE₂. Além disso, a irradiação (8 Gy) das células TC-1 também induziu a produção deste mediador. Essa produção foi significativamente reduzida pelo bloqueio do receptor PAF com CV3988 (**Figura 21**).

Tomados em conjunto, os resultados utilizando a linhagem TC-1 indicam que a irradiação induz a produção de moléculas “*PAF-like*” que atuam aumentando a proliferação de células TC-1 Fluc de maneira dependente de PAFR, possivelmente com a participação de PGE₂.

Figura 21 - A irradiação induz a produção de PGE₂ de modo dependente de PAFR.

Sobrenadantes de culturas de células TC-1 foram colhidas após 1 hora de irradiação (8 Gy) e a concentração de PGE₂ foi mensurada por ELISA. Como controle, foram adicionados cPAF (100 nM) e indometacina a cultura. São mostrados a média $\pm$ DP, n = 7; *p < 0,05 comparando irradiado ou cPAF vs não irradiado e # comparando CV 3988 vs irradiado)

4.3.2 A repopulação tumoral é dependente da expressão de PAFR nas células tumorais e nos macrófagos.

Os experimentos de irradiação *in vivo* não permitem concluir se o efeito do PAFR na repopulação se deve ao receptor expresso nas células tumorais ou em macrófagos presentes no microambiente tumoral. Para responder esta questão fizemos um experimento de repopulação utilizando as células tumorais positivas (KBP) e negativas (KBM) para o receptor do PAFR. Neste experimento, as células foram injetadas em animais C57BL6 RAG KO para evitar a rejeição das células tumorais humanas.

Quando as células KBM e KBP foram injetadas simultaneamente em animais RAG KO (cada uma de um lado do flanco inferior do animal), ambos os tumores cresceram lentamente e após 30 dias, KBM e KBP desenvolveram tumores de volume semelhante (**Fig. 22A**). No entanto, quando células KBP foram misturadas com células KBM irradiadas (10 Gy), o tumor cresceu mais rápido e foi significativamente maior do que o tumor resultante da mistura de células KBM com células KBM irradiadas (**Figura 22B**). Considerando que a irradiação além de matar as células induz produção de ligantes de PAFR, quando injetamos células tumorais KBP viáveis + células KBM irradiadas, os ligantes de PAFR gerados pela irradiação estimulam a proliferação das KBP.

Neste modelo, ao mesmo tempo que as células tumorais são mortas pela irradiação elas deverão ser removidas pelos macrófagos tumorais, que neste processo adquirem fenótipo M2 (65). Para confirmar este dado, analisamos o perfil dos macrófagos infiltrados nos tumores formados pela mistura de células tumorais viáveis e irradiadas dos experimentos acima. Assim, após 30 dias de crescimento, os tumores foram retirados e examinados quanto à infiltração de leucócitos por citometria de fluxo. Para a análise, primeiramente fizemos uma seleção sobre a população de leucócitos (CD45⁺) e dentro dessa população analisamos a população de macrófagos (F4/80⁺). Esta última população foi então analisada para a presença de um marcador M2 (CD206). Foi observada uma clara relação entre a presença do receptor de PAF nas células tumorais KBP e um aumento no infiltrado de leucócitos CD45⁺ (**Fig. 23A**). Além disso, a frequência de macrófagos tumorais foi maior naqueles tumores formados por células KBP do que aqueles contendo somente

células KBM (**Fig. 23B**). Observamos também que os tumores PAFR⁺ continham um maior influxo de macrófagos M2 (CD206⁺, **Fig. 23C**).

Estes resultados sugerem que as células irradiadas quando injetadas *in vivo*, podem criar um "nicho" no qual teriam um crescimento celular acelerado, dependente da ativação do PAFR, tanto na célula tumoral bem como nos macrófagos intratumorais.

Figura 22 - A repopulação é dependente da expressão do receptor PAF nas células tumorais.

(A) Representação esquemática do protocolo experimental. Células KBM ou KBP (2×10^6) foram injetadas subcutaneamente em animais C57BL/6 RAG KO. (B) Mistura de células vivas e irradiadas KBP / KBM ou KBM / KBM. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para KBP em comparação com os tumores KBM irradiados. Os tumores foram mensurados a cada 5 dias durante 30 dias. Os dados são representados como média $\pm$ DP do volume tumoral ($n = 12$ animais por grupo).

Figura 23 - A repopulação em tumores PAFR⁺ (KBP) é acompanhado por um aumento de macrófagos M2 (CD206⁺).

Análises de macrófagos derivados de tumores formados por células KBM (esquerda) ou células KBP (direita) misturadas com células KBM irradiadas (10 Gy). Os resultados são apresentados à esquerda como gráficos representativos e a direita como médias $\pm$ DP. (N = 12 animais por grupo) da população (A) CD45⁺ (leucócitos) (B) F4/80⁺ (macrófagos) dentro da população de células CD45⁺ e (C) CD206⁺ dentro da população de células F4/80⁺ (macrófagos M2). * $p < 0,05$ para KBM em comparação com tumores KBP.

5 DISCUSSÃO

Na primeira parte do trabalho estudamos o papel do PAFR na função e fenótipo dos macrófagos intratumorais. **Na segunda parte do trabalho**, avaliamos a expressão do PAFR em linhagens de células de carcinoma humano, sua participação na proliferação celular e o efeito da radiação sobre a proliferação e expressão do receptor. **Na terceira parte** estudamos o papel do PAFR no fenômeno de repopulação tumoral pós irradiação.

O primeiro trabalho do nosso grupo que mostrou o envolvimento do PAFR no crescimento tumoral foi o de Fecchio et al. (1995) onde o bloqueio do PAFR com antagonista reduziu o crescimento do tumor ascítico de Erlich. Durante o crescimento deste tumor, chamou a atenção a elevada concentração de PGE_2 na ascite, que foi reduzido com o tratamento com o antagonista de PAFR. Outra observação foi a de que os macrófagos presentes na ascite, apresentavam morfologia de macrófagos não ativados e após o tratamento com antagonistas os macrófagos adquiriram morfologia de ativados. Mais recentemente mostramos que o bloqueio do PAFR com um antagonista reduziu também o crescimento do melanoma murino B16F10(39). No presente estudo retomamos estas questões no melanoma B16F10 e do carcinoma TC-1 comparando o crescimento tumoral em camundongos PAFR KO com os WT e constatamos que os tumores crescem menos nos PAFR KO. Quando analisamos o infiltrado celular no carcinoma TC-1, observamos que nos animais PAFKO houve uma diminuição significativa de leucócitos $CD45^+$ além de um aumento na frequência de linfócitos $CD4^+$ e neutrófilos ($Gr1^+$). Isto sugere que durante o crescimento tumoral, são produzidas quimiocinas que determinam a migração de leucócitos para o tumor, e que PAF ou moléculas “*PAF-like*” produzidas no microambiente do tumor estão envolvidas. Em trabalho anterior foi visto que nos animais PAFR KO aumento de macrófagos no tumor estava associado com elevados níveis das quimiocinas CXCL2 e CCL2 na ascite do tumor de Erlich (66).

Na literatura os estudos que correlacionam o infiltrado leucocitário, com o prognóstico são conflitantes. Vários estudos descrevem que um intenso infiltrado leucocitário, preferencialmente de neutrófilos e linfócitos $CD4^+$ ativados com perfil Th1 ou Th17, está associado a um bom prognóstico. Entretanto, há divergências e outros trabalhos mostram que este tipo de infiltrado pode favorecer o crescimento e

a progressão de determinados tumores(43,67–71). Em nosso estudo, o aumento da frequência de neutrófilos e linfócitos CD4⁺ intratumorais foi correlacionado com a diminuição do crescimento tumoral sugerindo que PAFR pode estar envolvido no recrutamento dessas células para o estroma tumoral. É fato que neutrófilos e CD4 podem ter papel anti ou pró-tumoral. Apesar de não termos investigado o fenótipo dessas células, especificamente, nossos dados indicam que em camundongos PAFR KO, essas células têm papel antitumoral.

Outro elemento importante controle do crescimento tumoral é o fenótipo de macrófagos presentes no microambiente tumoral. O papel desempenhado pelos macrófagos na biologia das neoplasias é complexo, pois macrófagos são células plásticas, que respondem ao microambiente, podendo assumir fenótipo anti ou pró-tumoral (72–74). Macrófagos de fenótipo M1 ou “classicamente ativados”, apresentam atividade antitumoral e os macrófagos do fenótipo M2 são considerados pró-tumorais. Em nosso trabalho, não encontramos diferenças significativas na quantidade de macrófagos que infiltram os tumores de melanoma e TC-1 quando comparamos animais PAFR KO e WT. Porém, quando analisamos o perfil de ativação destas células, observamos que nos animais PAFR KO houve um aumento de macrófagos que apresentam o perfil M1 com diminuição da produção de IL-10 por essas células. Isto sugere que durante o crescimento tumoral, PAF ou moléculas “PAF-like” são produzidas no microambiente do tumor e modulam o fenótipo dos macrófagos para o perfil supressor M2.

No microambiente tumoral temos que considerar também a presença de células em processo de morte. Sabe-se que macrófagos que fagocitam células apoptóticas adquirem um fenótipo supressor, M2 (52) e nosso laboratório demonstrou que este processo é dependente da ativação simultânea do receptor “scavenger” CD36 e do PAFR(65). Bachi et al. (2012) mostraram que a injeção de células apoptóticas com uma dose subtumorigênica de células viáveis (melanoma Tm1) resultou em crescimento tumoral. Isto foi significativamente reduzido quando os animais foram tratados com antagonista de PAFR(54). A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos também aumenta a expressão de COX2 que tem ação inibitória sobre os macrófagos, sendo que o tratamento dos macrófagos com antagonistas de PAFR reduziu tanto a fagocitose de células apoptóticas como a expressão de COX2(75). Portanto, a remoção de células apoptóticas por

macrófagos, que é dependente do PAFR, aumentaria a frequência de macrófagos M2 no ambiente tumoral favorecendo o seu crescimento.

A radioterapia, assim como a quimioterapia, aumenta ainda mais a densidade de células em processo de morte no microambiente tumoral. Além disso, durante a quimio e a radioterapia ocorre produção de moléculas que atuam como agonistas de PAFR(75,76). Portanto, estes procedimentos podem aumentar a proporção de macrófagos com perfil regulador, M2 no microambiente tumoral, tanto durante o processo de remoção de células apoptóticas como por induzirem moléculas “*PAF-like*”. Em modelo ectópico de melanoma humano Skmel37, a associação de quimioterapia com antagonistas do receptor do PAF foi mais efetiva em inibir o crescimento do melanoma do que qualquer um dos tratamentos isolados(77).

Um outro aspecto a ser considerado é que durante o crescimento tumoral ocorre a liberação de sinais que podem influenciar a resposta sistêmica. Entre eles, sinais que aumentam a hematopoese, levando ao acúmulo, principalmente de células mieloides, em órgãos linfoides secundários, além de aumentar o número de leucócitos no sangue(78,79). Nos modelos experimentais, um dos órgãos linfoides afetados é o baço, no caso da linhagem TC-1 já foi descrito que este acúmulo de células no baço é composto por células mieloides supressoras.(80). Em nosso modelo de melanoma B16F10 e carcinoma TC-1, observamos esplenomegalia discreta, com aumento do número de células mieloides (neutrófilos) e linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) no baço. Nos animais PAF KO o tamanho do baço e o infiltrado celular foi muito menor que nos WT. A causa desta expansão de células nos órgãos linfoides secundários parece não ser fruto somente de recrutamento de células para estes locais, mas também da proliferação local de células em resposta a produção de fatores de crescimento liberados pelos tumores(81).

Ainda, Sahu e colaboradores (2013) mostraram que a radiação UVB provoca imunossupressão sistêmica causada por moléculas “*PAF-like*” geradas durante a exposição (82). Em estudos deste mesmo grupo, eles também observaram que a associação de UVB e quimioterapia diminuiu a imunidade antitumoral, em particular por um aumento de Tregs no sangue de animais com tumores B16F10 (6,83). Foi também observado que os efeitos do PAF não são

vistos quando os tumores são colocados em animais imunodeficientes(84), fortalecendo a ideia de que o PAF age sobre as células da resposta imune do hospedeiro para inibir o crescimento tumoral.

Foi mostrado que células de melanoma humano SKmel37 expressam PAFR(77) o que nos levou a perguntar qual seria a consequência da ativação deste receptor na célula tumoral. Assim inicialmente fizemos uma análise de expressão PAFR em três linhagens de carcinoma cervical (C33, SiHa, HeLa) e em duas linhagens de células escamosas de carcinoma de boca (SSC90 e SSC78). Encontramos que estas linhagens tumorais expressam PAFR (RNA e proteína) em maior quantidade que um queratinócito controle imortalizado (HaCat). Com base em trabalho recente que mostrou a administração de cPAF aumentou a proliferação de células de melanoma B16F10 transduzidas com o receptor do PAFR(76), fomos avaliar o efeito de antagonistas do PAFR adicionadas as culturas das células de carcinoma. Vimos que o antagonista inibiu significativamente a proliferação de células de carcinoma C33, SiHa, HeLa e SSC78, mas não afetou o queratinócito controle. Estes dados sugerem que as células de carcinoma em cultura secretam substancias similares ao PAF que agem como fatores de crescimento para estas células. O tratamento com os agonistas cPAF causou efeito contrário, estimulando a proliferação das linhagens C33 SiHa e SSC78, reforçando a ideia que o PAF age como fator de crescimento nestas linhagens tumorais.

Este efeito do PAFR sobre o crescimento das linhagens tumorais foi confirmado em um modelo onde comparamos a resposta proliferativa de KBP (que apresenta elevada expressão do PAFR) com células da linhagem controle (KBM) que não expressa o PAFR. Observamos que a KBP (PAFR+) prolifera em resposta ao agonista e a linhagem controle (KBM) não responde ao cPAF. O tratamento com os antagonistas do receptor do PAF não afetou o crescimento de nenhuma das duas células tumorais (KBM e KBP), possivelmente porque estas linhagens não devem produzir quantidades de PAF endógeno suficientes para estimular sua proliferação.

Estes resultados corroboram dados da literatura, onde foi demonstrado o tratamento com PAF induz a hidrólise do fosfatidilinositol, liberação de ácido araquidônico e ativação de MAP quinases que desencadeiam sinais proliferativos em células tumorais (32). Em outro modelo, utilizando células derivadas de

carcinoma epidermóide humano (HEC-1A) que secretam PAF, o tratamento com antagonistas do receptor do PAF inibiu a proliferação celular(21). Em linhagens de leucemia e células derivadas de câncer de esôfago, o PAF estimulou a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), o que foi associado com o crescimento do tumor(22,23). Um papel patofisiológico do PAF tem sido proposto também em câncer de mama e colo retal, com base em resultados de amostras de biopsias, onde a malignidade do tumor foi relacionada com expressão aumentada de PAFR(32,33).

Nós observamos neste trabalho que o tratamento *in vitro* das linhagens tumorais com diferentes doses de radiação induziu aumento significativo da produção de ligantes do PAFR. A irradiação também promoveu um aumento significativo da expressão do receptor do PAF nas células tumorais, o que indica que o PAF gerado pela radiação agiu sobre o receptor expresso na célula tumoral, induzindo ainda mais sua expressão. Quando associamos a radioterapia com um antagonista do PAFR observamos uma diminuição significativa na viabilidade das células. Isto sugere que os ligantes do PAFR induzidos pela radiação gama podem proteger as células tumorais da morte induzida pelo tratamento. Este resultado corrobora os de Heon Seo e colaboradores (2006) que demonstrou que o PAF regula positivamente a expressão de fatores anti-apoptóticos (Bcl-2 and Bcl-xL) em células tumorais de melanoma(3). Em trabalho anterior de nosso grupo, também foi observado que PAF protege a célula tumoral da morte induzida por quimioterapia, e que o bloqueio do receptor melhorou a eficácia do tratamento *in vivo*(39,77). Assim, a associação da radioterapia e quimioterapia com antagonista de PAFR poderia ser uma estratégia promissora para o tratamento de tumores que expressam PAFR.

Além disso, os ligantes de PAFR gerados durante a radiação podem ativar o PAFR expresso nas células tumorais, induzindo uma proliferação exacerbada das células tumorais radio-resistentes. Por isso, resolvemos ensaiar a hipótese de que o PAF poderia estar envolvido no fenômeno de repopulação tumoral. De fato, em nossos experimentos utilizando uma linhagem de carcinoma murino (TC-1), observamos que a irradiação de um *feeder* de células tumorais induziu uma maior proliferação de células TC-1 viáveis, e que o bloqueio do PAFR diminuiu significativamente a proliferação induzida pela irradiação. Recentemente, Huang e colaboradores (2012) demonstraram que células tumorais irradiadas que entram em apoptose liberam fatores que irão estimular o crescimento das células

tumorais que sobrevivem à irradiação, e este mecanismo é dependente da ativação de caspase-3 e PGE_2 (50). É interessante notar que a caspase-3 ativada conduz à ativação de cPLA2, que atua sobre a fosfatidilcolina na membrana, gerando uma molécula de ácido araquidônico e lisofosforilcolina (LPC). Enquanto araquidônico é um substrato para cicloxigenases levando a síntese de PGE_2 , O LPC converte-se em PAF. Portanto, a mesma reação que estimula a síntese de PAF pode estimular a produção de PGE_2 , exercendo um ciclo de realimentação positiva no fenômeno de repopulação tumoral. Como já discutido, no tumor ascístico de Erlich a produção de PGE_2 é dependente de PAFR(60)

Adicionalmente, verificamos em outro modelo, utilizando as linhagens positiva (KBP) e negativa (KBM) para PAFR que a injeção de um grande número de células KBM irradiadas misturadas com células KBP resultou num crescimento tumoral exacerbado, ao passo que isto não foi observado quando as células PAFR⁻ foram misturadas com células KBM irradiadas. Isto reforça a ideia de que a presença de células mortas no microambiente tumoral estimula o crescimento das células radio resistentes que expressam PAFR. Além disso, mostramos uma clara relação entre a presença do receptor PAF nas células tumorais e o aumento de infiltrado de leucócitos, composta principalmente de macrófagos expressando CD206, que é um marcador para a macrófagos M2 (pró-tumorais). Estes dados sugerem que mecanismos dependentes do receptor do PAF modificam o microambiente tumoral, incluindo o fenótipo de macrófagos tumorais. Essas interações geralmente são mediadas por sinalização desencadeadas por citocinas ou quimiocinas (revisto por (85)). Propomos aqui que estas interações também envolvem mediadores lipídicos, principalmente a via do PAFR, favorecendo a progressão tumoral por supressão das funções dos macrófagos.

Tomados em conjunto nossos resultados sugerem que o PAF e moléculas "*PAF like*" geradas pela radioterapia atuam sobre as células tumorais protegendo-as da morte celular induzida por radiação ao mesmo tempo que age sobre os macrófagos, estimulando o crescimento tumoral por induzir fenótipo supressor. Ainda, pode provocar alterações no microambiente tumoral que se refletem de forma sistêmica na resposta imune do hospedeiro. Portanto, a associação de terapias baseadas em morte celular com antagonistas do receptor do PAF pode ser uma estratégia promissora no tratamento de algumas neoplasias (**Fig. 24**).

Figura 24 - Hipótese sobre o fenômeno de repopulação tumoral dependente de PAFR.

Células tumorais que são irradiadas liberam ligantes de PAFR e PGE_2 que estimulam o crescimento das células tumorais que sobrevivem à irradiação, induzindo assim o fenômeno de repopulação tumoral. Ao mesmo tempo, células tumorais irradiadas que apoptose são fagocitadas por macrófagos presentes no microambiente tumoral, em um processo que envolve o reconhecimento de PS via CD36 e PAFR, reprogramando-os para um fenótipo supressor que contribui para a repopulação tumoral.

6 CONCLUSÃO

Primeira parte

- Dois tumores murinos (melanoma B16F10) e carcinoma (TC-1) quando inoculados em PAFR KO cresceram menos do que quando inoculados nos WT sugerindo que ligantes do PAFR favorecem o crescimento tumoral.
- O menor crescimento tumoral nos PAFR KO foi acompanhado de alterações no infiltrado de leucócitos no tumor, com aumento da população linfócitos, neutrófilos e macrófagos, os quais apresentaram fenótipo classicamente ativado com alta produção de nitrito e baixa atividade de arginase e produção de IL-10.
- Quanto a esplenomegalia associada aos tumores, o baço dos animais PAFR KO aumentou menos que nos WT sendo que as populações de linfócitos (CD4/CD8) e neutrófilos (Gr1) estão aumentadas nos PAFRKO.

Segunda parte

- Células de linhagens de carcinoma humano expressam maiores quantidades de PAFR do que a linhagem de queratinócito não tumoral.
- Agonistas de PAFR estimulam e antagonistas do PAFR inibem a proliferação das células de carcinoma.
- A irradiação das células tumorais induz a produção de ligantes de PAFR em linhagens de carcinoma e aumenta a expressão do receptor.
- Células tumorais irradiadas morrem menos quando tratadas com antagonistas de PAFR sugerindo que ligantes do PAFR produzidos durante a irradiação protegem as células tumorais da morte.

Terceira parte

- A irradiação de células de carcinoma murino TC-1 também aumenta a expressão do PAFR e induz a produção de ligantes do receptor.

Antagonistas de PAFR bloqueiam parcialmente a proliferação celular induzida por radioterapia *in vitro* e *in vivo*;

- A irradiação induz a produção de PGE_2 e antagonista de PAFR diminui esta produção, sugerindo que a produção de PGE_2 é consequente a estimulação do PAFR.
- A repopulação pós-irradiação é dependente da expressão do receptor PAF nas células tumorais.
- A repopulação de tumor formado por células de carcinoma humano transformadas com o PAFR (KBP) é acompanhada por aumento de macrófagos alternativamente ativados (CD206+).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a irradiação promove a geração de ligantes de PAFR, que ativando o PAFR presente nas células tumorais, aumenta a sua sobrevivência e proliferação. Ao mesmo tempo, estes ligantes ativam o PAFR nos macrófagos reprogramando-os para um perfil pró-tumoral. Isto pode ser relevante na repopulação tumoral pós-radioterapia.

A terceira parte destes resultados foi publicada na revista *Oncogenesis* (2017) e anexada no Apêndice 1 (86)

REFERÊNCIAS*

1. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* [Internet]. 1972 Dec;136(6):1356–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4118412>
2. Kume K, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) induces growth stimulation, inhibition, and suppression of oncogenic transformation in NRK cells overexpressing the PAF receptor. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22898–904.
3. Heon Seo K, Ko H-M, Kim H-A, Choi J-H, Jun Park S, Kim K-J, et al. Platelet-activating factor induces up-regulation of antiapoptotic factors in a melanoma cell line through nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* [Internet]. 2006 May 1;66(9):4681–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651419>
4. Denizot Y, Descottes B, Truffinet V, Valleix D, Labrousse F, Mathonnet M. Platelet-activating factor and liver metastasis of colorectal cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2005 Jan;113(3):503–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455343>
5. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev ...* [Internet]. 2000 Jan;69:419–45. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.69.1.419%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966465>
6. Sahu RP, Ocana JA, Harrison KA, Ferracini M, Touloukian CE, Al-Hassani M, et al. Chemotherapeutic agents subvert tumor immunity by generating agonists of platelet-activating factor. *Cancer Res* [Internet]. 2014 Dec 1;74(23):7069–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304264>
7. Sahu RP, Harrison KA, Weyerbacher J, Murphy RC, Konger RL, Garrett JE, et al. Radiation therapy generates platelet-activating factor agonists. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Mar 3;7(15). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959112>
8. Marathe GK, Johnson C, Billings SD, Southall MD, Pei Y, Spandau D, et al. Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Oct 21 [cited 2015 Oct 1];280(42):35448–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115894>
9. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM, Topham MK, et al. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 1996 Jan;416:297–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131163>

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-Activating Factor, a Pleiotrophic Mediator of Physiological and Pathological Processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2003 Jan [cited 2015 Oct 1];40(6):643–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708958>
11. Travers JB. Oxidative stress can activate the epidermal platelet-activating factor receptor. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1999 Mar [cited 2015 Sep 17];112(3):279–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10084302>
12. Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice [Internet]. *Progress in Lipid Research*. 2000. p. 41–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10729607
13. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68–69:599–609.
14. Nakamura M, Honda Z, Waga I, Matsumoto T, Noma M, Shimizu T. Endotoxin transduces Ca²⁺ signaling via platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett* [Internet]. 1992 Dec 14 [cited 2015 Oct 1];314(2):125–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1333988>
15. Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, et al. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2015 Sep 27];274(40):28395–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497200>
16. Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. *J Biol Chem* [Internet]. 1987 Mar 25 [cited 2015 Oct 1];262(9):4223–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3558407>
17. Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, et al. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* [Internet]. 1991 Jan;349(6307):342–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1846231>
18. Mutoh H, Bito H, Minami M, Nakamura M, Honda Z, Izumi T, et al. Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett*. 1993;322(2):129–34.
19. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* [Internet]. 1993 Jun;292 (Pt 3):617–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391253>
20. Franklin RA, Tordai A, Mazer B, Terada N, Lucas J, Gelfand EW. Platelet activating factor activates MAPK and increases in intracellular calcium via independent pathways in B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1995 Apr;209(3):1111–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7733966>

21. Baldi E, Bonaccorsi L, Finetti G, Luconi M, Muratori M, Susini T, et al. Platelet-activating factor in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 1994 Jun;49(4–6):359–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8043501>
22. Laurenzana A, Cellai C, Vannucchi AM, Pancrazzi A, Romanelli MN, Paoletti F. WEB-2086 and WEB-2170 trigger apoptosis in both ATRA-sensitive and -resistant promyelocytic leukemia cells and greatly enhance ATRA differentiation potential. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* [Internet]. 2005 Mar;19(3):390–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.leu.2403618>
23. Fang HY, Lin T-S, Lin J-P, Wu YC, Chow K-C, Wang L-S. Cyclooxygenase-2 in human non-small cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2003 Mar;29(2):171–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633561>
24. Wang LS, Chow KC, Wu YC. Effects of platelet activating factor, butyrate and interleukin-6 on cyclooxygenase-2 expression in human esophageal cancer cells. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(4):467–75.
25. Andrade SP, Vieira LB, Bakhle YS, Piper PJ. Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 1992 Aug;73(4):503–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1382541>
26. Jackson JR, Bolognese B, Mangar CA, Hubbard WC, Marshall LA, Winkler JD. The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1998 May;1392(1):145–52.
27. Axelrad TW, Deo DD, Ottino P, Van Kirk J, Bazan NG, Bazan HEP, et al. Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. *FASEB J* [Internet]. 2004 Jan 8;18(3):568–70. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-0479fje>
28. Seo KH, Lee H-S, Jung B, Ko H-M, Choi J-H, Park SJ, et al. Estrogen enhances angiogenesis through a pathway involving platelet-activating factor-mediated nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Sep 15;64(18):6482–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/64/18/6482>
29. Deo DD, Axelrad TW, Robert EG, Marcheselli V, Bazan NG, Hunt JD. Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jun;277(24):21237–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940567>
30. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood*. 2005 Feb;105(4):1523–30.

31. Pitton C, Lanson M, Besson P, Fetissoff F, Lansac J, Benveniste J, et al. Presence of PAF-acether in human breast carcinoma: relation to axillary lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1989 Sep;81(17):1298–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2769781>
32. Bussolati B, Biancone L, Cassoni P, Russo S, Rola-Pleszczynski M, Montrucchio G, et al. PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *Am J Pathol* [Internet]. 2000 Nov;157(5):1713–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073830>
33. Denizot Y, Gainant A, Guglielmi L, Bouvier S, Cubertaond P, Mathonnet M. Tissue concentrations of platelet-activating factor in colorectal carcinoma: inverse relationships with Dukes' stage of patients. *Oncogene* [Internet]. 2003 Oct;22(46):7222–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562051>
34. Boccellino M, Biancone L, Cantaluppi V, Ye RD, Camussi G. Effect of platelet-activating factor receptor expression on CHO cell motility. *J Cell Physiol* [Internet]. 2000 May [cited 2015 Oct 1];183(2):254–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737901>
35. Bussolati B, Russo S, Deambrosis I, Cantaluppi V, Volpe A, Ferrando U, et al. Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int J Cancer*. 2002;100(6):654–61.
36. Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, et al. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *EMBO J* [Internet]. 1997;16(1):133–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009274>
37. Sato S, Kume K, Ito C, Ishii S, Shimizu T. Accelerated proliferation of epidermal keratinocytes by the transgenic expression of the platelet-activating factor receptor. *Arch Dermatol Res*. 1999;291(11):614–21.
38. Biancone L, Cantaluppi V, Del Sorbo L, Russo S, Tjoelker LW, Camussi G. Platelet-activating factor inactivation by local expression of platelet-activating factor acetyl-hydrolase modifies tumor vascularization and growth. *Clin Cancer Res*. 2003;9(11):4214–20.
39. de Oliveira SI, Andrade LNS, Onuchic AC, Nonogaki S, Fernandes PD, Pinheiro MC, et al. Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;10:200.
40. Zimmerman MA, Huang Q, Li F, Liu X, Li C-Y. Cell death-stimulated cell proliferation: a tissue regeneration mechanism usurped by tumors during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* [Internet]. Elsevier; 2013 Oct;23(4):288–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2013.05.003>

41. Pourel N, Py B, Safran D. Patient information duties in radiation oncology. *Cancer Radiother* [Internet]. 2014;18(5–6):545–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25201635>
42. Grinshpun A, Ben-Porath I, Peretz T, Salmon A. [Tumor, metastasis and what's in between]. *Harefuah* [Internet]. 2013;152(1):30–3, 59, 58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23461025>
43. Cho WCS. Conquering cancer through discovery research. *IUBMB Life* [Internet]. 2010;62(9):655–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20882644>
44. Brade AM, Tannock IF. Scheduling of radiation and chemotherapy for limited-stage small-cell lung cancer: repopulation as a cause of treatment failure? *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 Mar 1;24(7):1020–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505418>
45. Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2005 Jul;5(7):516–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15965493>
46. Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* [Internet]. 1988;27(2):131–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3390344>
47. Tannock IF. Cancer: Resistance through repopulation. *Nature* [Internet]. 2015 Jan 8;517(7533):152–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470047>
48. Mumm JB, Oft M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene* [Internet]. 2008 Oct 6;27(45):5913–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836472>
49. Petersen C, Eicheler W, Frömmel A, Krause M, Balschukat S, Zips D, et al. Proliferation and micromilieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2003;79(7):469–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530154>
50. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu F, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;17(7):860–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2385>
51. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar;144(5):646–74. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411001279/fulltext>
52. Fadok V a., Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998;101(4):890–8.

53. Correa M, Machado J, Carneiro CRW, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, et al. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer* [Internet]. 2005;114(3):356–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573371>
54. Bachi ALL, Dos Santos LC, Nonogaki S, Jancar S, Jasiulionis MG. Apoptotic cells contribute to melanoma progression and this effect is partially mediated by the platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm*. 2012;2012.
55. de Oliveira SI, Fernandes PD, Amarante Mendes JGP, Jancar S. Phagocytosis of apoptotic and necrotic thymocytes is inhibited by PAF-receptor antagonists and affects LPS-induced COX-2 expression in murine macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 2006 Jul;80(1–2):62–73. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098882306000499>
56. Raposo TP, Beirão BCB, Pang LY, Queiroga FL, Argyle DJ. Inflammation and cancer: till death tears them apart. *Vet J* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015 Aug;205(2):161–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.015>
57. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* (London, England) [Internet]. 2001 Feb;357(9255):539–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600040460>
58. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* [Internet]. 2002 Nov [cited 2016 Sep 28];23(11):549–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401408>
59. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Apr 18;82(2):244–52. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17475785&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnhttp://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17475785&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.>
60. Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. *Int J Immunopharmacol* [Internet]. 1990 Jan;12(1):57–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2303318>
61. Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation* [Internet]. 1990 Feb;14(1):125–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2323805>
62. Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, Lepique AP. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol* [Internet]. 2010;11:27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2898836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available from: [wos:000173949500003](#)
64. Travers JB, Huff JC, Rola-Pleszczynski M, Gelfand EW, Morelli JG, Murphy RC. Identification of Functional Platelet-Activating Factor Receptors on Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1995;105(6):816–23.
65. Rios FJ, Koga MM, Pecenin M, Ferracini M, Gidlund M, Jancar S. Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Oct 2];2013:198193. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3767076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Ferreira MAND, Barcelos LS, Teixeira MM, Bakhle YS, Andrade SP. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). *Life Sci*. 2007;81(3):210–7.
67. Tazawa H, Okada F, Kobayashi T, Tada M, Mori Y, Une Y, et al. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* [Internet]. 2003;163(6):2221–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633597>
68. Yamanaka T, Matsumoto S, Teramukai S, Ishiwata R, Nagai Y, Fukushima M. The baseline ratio of neutrophils to lymphocytes is associated with patient prognosis in advanced gastric cancer. *Oncology* [Internet]. 2007;73(3–4):215–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424885>
69. Yao C, Lin Y, Chua M-S, Ye C-S, Bi J, Li W, et al. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Int J Cancer* [Internet]. 2007;121(9):1949–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17621625>
70. Akizuki M, Fukutomi T, Takasugi M, Takahashi S, Sato T, Harao M, et al. Prognostic significance of immunoreactive neutrophil elastase in human breast cancer: long-term follow-up results in 313 patients. *Neoplasia* [Internet]. 2007;9(3):260–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401466>
71. Lin EY, Nguyen A V, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* [Internet]. 2001;193(6):727–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257139>
72. Vignaud JM, Marie B, Klein N, Plénat F, Pech M, Borrelly J, et al. The role of platelet-derived growth factor production by tumor-associated macrophages in tumor stroma formation in lung cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1994;54(20):5455–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923179>

73. Mantovani A, Vecchi A, Allavena P. Pharmacological modulation of monocytes and macrophages. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2014;17:38–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25062123>
74. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2008;18(5):349–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467122>
75. Ferracini M, Sahu RP, Harrison KA, Waeiss RA, Murphy RC, Jancar S, et al. Topical photodynamic therapy induces systemic immunosuppression via generation of platelet-activating factor receptor ligands. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2015 Jan;135(1):321–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050596>
76. Sahu RP, Ferracini M, Travers JB. Systemic chemotherapy is modulated by platelet-activating factor-receptor agonists. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015;2015:820543. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922565>
77. Onuchic AC, Machado CML, Saito RF, Rios FJ, Jancar S, Chammas R. Expression of PAFR as part of a prosurvival response to chemotherapy: a novel target for combination therapy in melanoma. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Sep 23];2012:175408. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3337612&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Chioda M, Peranzoni E, Desantis G, Papalini F, Falisi E, Solito S, et al. Myeloid cell diversification and complexity: an old concept with new turns in oncology. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2011;30(1):27–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267772>
79. Wilcox RA. Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2010;85(7):656–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592171>
80. Melani C, Chiodoni C, Forni G, Colombo MP. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* [Internet]. 2003;102(6):2138–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750171>
81. Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, Dowling J, Atkins RC. Local macrophage proliferation correlates with increased renal M-CSF expression in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2001;16(8):1638–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477167>
82. Sahu K, Sharma M, Bansal H, Dube A, Gupta PK. Topical photodynamic treatment with poly-L-lysine-chlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds of mice. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2013;28(2):465–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454129>

83. Sahu RP, Turner MJ, DaSilva SC, Rashid BM, Ocana JA, Perkins SM, et al. The environmental stressor ultraviolet B radiation inhibits murine antitumor immunity through its ability to generate platelet-activating factor agonists. *Carcinogenesis* [Internet]. 2012 Jul;33(7):1360–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542595>
84. Sahu RP, Yao Y, Konger RL, Travers JB. Platelet-activating factor does not mediate UVB-induced local immune suppression. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2012;88(2):490–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211638>
85. den Breems NY, Eftimie R. The re-polarisation of M2 and M1 macrophages and its role on cancer outcomes. *J Theor Biol* [Internet]. 2016 Feb 7;390:23–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551154>
86. da Silva-Jr IA, Chammas R, Lepique AP, Jancar S. Platelet-activating factor (PAF) receptor as a promising target for cancer cell repopulation after radiotherapy. *Oncogenesis* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 Jan 30;6(1):e296. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/oncsis.2016.90>

APÊNDICE 1 – PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF) RECEPTOR AS A PROMISING TARGET FOR CANCER CELL REPOPULATION AFTER RADIOTHERAPY

OPEN

Citation: *Oncogenesis* (2017) 6, e296; doi:10.1038/oncsis.2016.90

www.nature.com/oncsis

ORIGINAL ARTICLE

Platelet-activating factor (PAF) receptor as a promising target for cancer cell repopulation after radiotherapy

IA da Silva-Jr¹, R Chammas², AP Lepique¹ and S Jancar¹

A major drawback of radiotherapy is the accelerated growth of the surviving tumor cells. Radiotherapy generates a variety of lipids that bind to the receptor for platelet-activating factor, expressed by cells in the tumor microenvironment. In the present study, using the TC-1 tumor cell line, we found that irradiation induced a twofold increase in receptor expression and generated agonists of receptor. Irradiated cells induced a 20-fold increase in live TC-1 proliferation *in vitro*. Furthermore, subcutaneous co-injection of irradiated TC-1 cells with TC-1 expressing luciferase (TC-1 fluc⁺) markedly increased TC-1 fluc⁺ proliferation in a receptor-dependent way. Moreover we used a human carcinoma cell line not expressing the PAF receptor (KBM) and the same cell transfected with the receptor gene (KBP). Following co-injection of live KBP cells with irradiated KBM in RAG mice, the tumor growth was significantly increased compared with tumor formed following co-injection of live KBM with irradiated KBM. This tumor cell repopulation correlated with increased infiltration of tumor-promoting macrophages (CD206⁺). We propose that receptor represents a possible target for improving the efficacy of radiotherapy through inhibition of tumor repopulation.

Oncogenesis (2017) 6, e296; doi:10.1038/oncsis.2016.90; published online 30 January 2017

INTRODUCTION

Although radiotherapy is an effective way to control cancer locally, a major drawback of this treatment is the accelerated growth of surviving cells. This compensatory proliferation is an evolutionarily conserved process involved in tissue regeneration in lower animals, and is thought to occur with tumor cells treated with cytotoxic radiotherapy, as previously discussed.¹ The alkyl-acyl-glycerophosphocholine (GPC), platelet-activating factor (PAF), binds to the PAF receptor. Irradiation generates reactive oxygen species,² which act on membrane GPC to produce oxidized GPC, which also bind to the PAF receptor.³ Mass spectrometry revealed several different oxidized GPC molecules that bind to the PAF receptor.^{4,5} Moreover, apoptotic and necrotic cells are phagocytosed by macrophages through scavenger receptors,⁶ and this process involves the association of CD36 with the PAF receptor.⁷ These macrophages acquire an anti-inflammatory phenotype, which is thought to explain the silent nature of this process, as it does not induce inflammation.⁸ Tumor irradiation may induce an anti-inflammatory microenvironment that favors tumor growth. Indeed, injection of apoptotic cells with a sub-tumorigenic dose of melanoma cells was found to promote tumor growth, and this was reversed by blocking PAF receptor signaling.⁹ The generation of anti-inflammatory macrophages and PAF receptor agonists in the tumor microenvironment may therefore represent possible mechanisms underlying radiotherapy failure. Furthermore, some tumor cells express the PAF receptor, and activation of this receptor with PAF increased the proliferation of human SKmel-23 melanoma cells.¹⁰ In the present study, we examined the effect of gamma radiation on the proliferation of PAF receptor-expressing tumor cells, and tumor cell repopulation.

RESULTS

Irradiation increases the expression of the PAF receptor in TC-1 carcinoma cells and generates PAF receptor agonists

The murine carcinoma cell line TC-1 was analyzed for the expression of the PAF receptor by flow cytometry analysis. The unfilled peaks represent specific antibody binding to the PAF receptor and, irradiation (4 and 8 Gy) significantly increased PAF receptor expression (Figure 1a). PAF receptor mRNA levels also increased with irradiation (2, 4 or 8 Gy), in a dose-dependent manner (Figure 1b). The lipid extract from the irradiated culture of TC-1 cells was then assayed for PAF receptor agonistic activity. This was achieved with an assay that uses KBM cells transfected with the PAF receptor (KBP cells), which secrete (interleukin) IL-8 in response to receptor activation. This is a very useful assay as it allows the detection of the collection of PAF receptor agonists generated by irradiation. Figure 1c shows that irradiation increased PAF receptor activation in a dose-dependent manner, compared with the non-irradiated cells. TC-1 cells irradiated with 8 Gy generated PAF receptor agonistic activity equivalent to 100 nM of PAF. Irradiation-induced dose-dependent apoptotic and necrotic cell death, shown in Figure 1d. Pre-treatment of TC-1 cells with the PAF receptor antagonist CV3988 before irradiation, significantly increased further cell death, supporting the protective effect of PAF on irradiated cells.

PAF receptor mechanisms are implicated in increased tumor cell proliferation induced by radiation

The ability of TC-1 cells to stimulate the growth of non-irradiated TC-1 cells was tested according to the protocol illustrated in Figure 2a. A 'feeder layer' of TC-1 cells (2×10^5) was left to rest in culture for 24 h before irradiation with 4 or 8 Gy. A smaller number (10^3 cells) of TC-1 fluc⁺ was then added to the cultures and a

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil and ²Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil. Correspondence: IA da Silva Junior, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo 05508-030, Brazil.
E-mail: iasjr@usp.br

Received 4 October 2016; revised 28 November 2016; accepted 7 December 2016