

MARIANNA MAINARDI KOGA

**O PAF COMO REGULADOR ENDÓGENO
DO FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

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
2015

MARIANNA MAINARDI KOGA

**O PAF COMO REGULADOR ENDÓGENO
DO FENÓTIPO E FUNÇÃO DAS
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

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 Negro

Co-orientador: Dr. Francisco J. Oliveira Rios

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Koga, Marianna Mainardi.

O PAF como regulador endógeno do fenótipo e função das células dendríticas / Marianna Mainardi Koga. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Mediadores lipídicos na imunidade inata.

Versão do título para o inglês: PAF as an endogenous modulator of dendritic cells phenotype and function.

1. Fator de ativação de plaquetas 2. Células dendríticas 3. Prostaglandinas 4. Interleucina 10 5. Receptores 6. Adjuvantes imunológicos I. Negro, Profa. Dra. Sonia Jancar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0136/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marianna Mainardi Koga.

Título da Tese: O PAF como regulador endógeno do fenótipo e função das células dendríticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

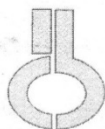
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

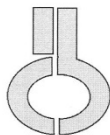
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 102 nas fls. 92 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Sonia Jancar, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Modulação do fenótipo de células dendríticas pelo receptor para o fator ativador de plaquetas (PAFR) e conseqüências na resposta imune** do qual participam o(s) alunos **Marianna Mainardi Koga e o pesquisador Francisco José Oliveira Rios**, 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 **21.09.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 27 de setembro de 2010.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP



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

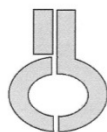
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **132** nas fls. **134** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Sonia Jancar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Modulação do fenótipo de células dendríticas pelo receptor para o fator ativador de plaquetas (PAFR) e consequências na resposta imune.*" do qual participam o(s) aluno(s) **Bruna Bizarro, Michele Silva de Barros, Marianna Mainardi Koga** e o pesquisador **Anderson de Sá Nunes**, 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 **24.08.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 29 de agosto de 2012.

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

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



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 **103** nas fls. **10** 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 "*Modulação do fenótipo de células dendríticas pelo receptor para o fator ativador de plaquetas (PAFR) e consequências na resposta imune* " do qual participam o(s) aluno(s) **Marianna Mainardi Koga, Ildelfonso Alves da Silva Jr, Bruna Bizzarro, Mateus Fila Pecenin, Especialista de Laboratório Marlise Bonetti Agostinho Montes e o pesquisador Anderson de Sá Nunes**, 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 **13.08.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
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 2010/09120-0, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Aos meus primeiros e mais importantes
professores: Ciro e Iara, meus pais.**

Au cher copain du début à la fin: Alain.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo a todos os professores de ciências que tive. Tive sorte de ter conhecido tantos mestres que despertaram minha curiosidade e dividiram seu conhecimento comigo, mesmo quando eu ainda era bem menininha. Agradeço o professor Antero, por ter me apresentado um microscópio quando eu tinha 7 anos! O professor Camaroto, por sempre ter tido paciência com a minha curiosidade infinita sobre o “funcionamento” dos bichos e sobre o sistema ABO! À professora Ana Lúcia, por despertar em mim a vontade de ser bióloga e ao professor José Carlos cuja implicância me fez estudar química até aprender. Aos professores do cursinho, malabaristas! Aos professores da faculdade, figuras raras. E, finalmente, aos meus professores-cientistas: Jacqueline Salotti (que me adotou como IC e me ensinou basicamente tudo sobre tudo); professor Hugo Armelin (nossa, quanto conhecimento em uma pessoa só! Foi uma honra poder ter feito parte do seu grupo!); Alexandre Dermagos, Gilson Murata, Tatiana Matos, Matheus Dias, Paromita Majumder e tantos outros – agradeço todos os ensinamentos, os cafés e a amizade compartilhada.

Em especial, agradeço imensamente à professora e orientadora Sonia Jancar, que me recebeu de portas abertas para este doutorado e depositou tanta confiança na ‘baixinha’ aqui. Seu conhecimento e generosidade ultrapassam os limites almejados por (e esperados de) qualquer mestre. Digo com orgulho que fui e serei eternamente sua aluna! Muito obrigada por (exatamente) tudo!

Agradeço também ao Francisco Rios, professor, co-orientador, exemplo, amigo! E mesmo longe, sempre presente. Esta tese também é sua.

Agradeço aos outros professores/colegas que tive o prazer de conhecer e com quem aprendi (e ainda aprendo) bastante: amigos Matheus Ferracini, Luciano Filgueiras, Camila Stumm, Mariana Morato, Edson Ishizuka, Ildefonso Jr, e nos últimos meses, Theresa Rachel e Marco Lapa. Às queridas e indispensáveis Silvana Silva e Marlise Montes! O que seria de nós sem vocês?

Muito obrigada aos tantos professores do programa de Imuno que tive o prazer de conhecer e que sempre estiveram à disposição! Em especial aos professores Momtchilo, Anderson, Ana, Niels e Barbuto, sempre dispostos a dar ideias, sugestões, conselhos e, às vezes, receitas!

Obrigada aos colegas dessa empreitada: Michele, Lorena (parceira querida!), Esther, Lú Miroti, Anderson Daniel, Lucas, Matheus Costa, Eliseu, Bianca, Simone, Renata, Camila Bonin, Fernanda, Priscila, Eliane, Karla, e tantos outros que além de terem me dado apoio moral, também deram apoio braçal e intelectual! Em especial à minha “sócia” Bruna Bizzarro! Desejo que todos vocês sempre encontrem pessoas tão generosas quanto vocês nessa vida.

Agradeço também todos os funcionários do Departamento de Imuno, em especial à Lili, Meire, Tânia, Marlene, Eni, Jotelma, Amanda, João, Áurea, Andrea, Rogério. Ao pessoal da portaria, da informática, manutenção, vigilância, limpeza, biotério... obrigada por todo apoio!

Muito obrigada aos amigos “de fora”, que sempre tiveram toda a paciência do mundo em ouvir minhas histórias de bancada, e me presentear com seu generoso carinho e amizade. São muitos! Como sou uma pessoa feliz por poder dizer isso! Aprendi e espero continuar aprendendo muito com todos vocês!

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES, meus mais sinceros agradecimentos pelo financiamento deste projeto e de tantos outros que, paralelamente, participei.

Por fim, agradeço imensamente à minha família. Por acreditar, apoiar, participar e torcer por todas as minhas conquistas e vitórias! Obrigada por estarem ao meu lado nas quedas e derrotas também. Este trabalho – e todo o resto – não teria sido possível sem vocês.

Ciro, Iara e Alain, a realização desta tese é também graças a vocês três. Muito obrigada! Vocês foram, são, e sempre serão essenciais!

“The most important thing is to never stop questioning”

- **Albert Einstein**

“But time is short and science is infinite ...”

- **Thomas Hardy, *Two on a Tower***

RESUMO

Koga MM. O PAF como regulador endógeno do fenótipo e função das células dendríticas. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

O Fator Ativador de Plaquetas (PAF) é um mediador lipídico da inflamação que sinaliza por um receptor associado à proteína G (PAFR), expresso nas membranas plasmática e nuclear de diversos tipos celulares. Em macrófagos, há evidências de que a ativação do PAFR modula o seu fenótipo para um perfil regulador. As Células Dendríticas (DCs), também expressam PAFR, mas nestas células pouco se conhece sobre a sua função. O objetivo do presente trabalho foi estudar as consequências da ativação do PAFR em DCs na resposta imune inata e adaptativa. DCs murinas derivadas de medula óssea (BM-DCs) foram obtidas após 6 dias de cultura com GM-CSF. A maturação foi induzida por LPS. Vimos que BM-DCs maduras e imaturas expressam PAFR e que o estímulo com LPS aumentou a produção endógena de ligantes do PAFR, além de induzir a produção de IL-12, IL-6, IL-1 β , IL-10 e PGE₂. O bloqueio do PAFR pelos antagonistas (WEB2086, WEB2170 ou PCA4248), dados 30 min antes do LPS, não alterou a produção das citocinas pró-inflamatórias e diminuiu a de IL-10, de tal modo que a relação IL-12/IL-10 aumentou de 1 para 2,1 vezes. A expressão gênica de IL10 e COX2 também foi reduzida pelos antagonistas, indicando que o PAF pode agir em nível transcricional. O agonista do receptor, metilcarbamil-PAF (cPAF) dado junto com LPS, potencializou a produção de IL-10 e PGE₂, e a expressão de COX-2. O bloqueio do PAFR em DCs também potencializou a proliferação antígeno-específica de linfócitos T em ensaio *in vitro* e isto foi acompanhado de aumento de IFN- γ . DCs tratadas com inibidores da síntese de PG (indometacina, nimesulida ou NS-398), ou com anticorpo bloqueador da IL-10, também potencializaram a proliferação de linfócitos T. A seguir, transferimos DCs pulsadas com OVA (BM-DC/OVA), tratadas ou não com antagonistas de PAFR, para camundongos *naïve*. Após 14 dias, os esplenócitos foram co-cultivados com novas BM-DCs/OVA. As células T CD4⁺ dos camundongos que receberam DCs tratadas com antagonista de PAFR, proliferaram mais do que as controle, indicando que o PAFR modula negativamente o potencial de ativação de linfócitos T pelas DCs. Para investigar se antagonistas do PAFR podem também potencializar a resposta imune *in vivo*, injetamos camundongos com OVA combinada ou não ao antagonista WEB2170. Após 14 dias, encontramos que os linfonodos do grupo OVA/WEB apresentaram maior número de células e 30 vezes mais anticorpo IgG2a OVA-específico no sangue. Num protocolo de imunização com OVA em adjuvante completo de Freund, a adição de WEB2170 aumentou a produção de IgG1 e IgG2a OVA-específicos. No caso de imunização com OVA em alum não foram observadas diferenças nos níveis de anticorpo entre os grupos tratado e não-tratado. A partir destes resultados, propomos que a ativação do PAFR por ligantes endógenos faria um ajuste fino no estado de ativação das DCs regulando a resposta imune adaptativa.

Palavras-chave: Receptor do PAF. Células Dendríticas. Prostaglandina E₂. Interleucina 10. Imunização.

ABSTRACT

Koga MM. PAF as an endogenous modulator of Dendritic Cells phenotype and function. [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The Platelet-Activating Factor (PAF) is a lipid mediator of inflammation that acts through a G protein-coupled receptor (PAFR) present in plasma and nuclear cell membranes of many different types of cells. There is evidence that PAFR activation can shift macrophages to a regulatory phenotype. Dendritic Cells (DCs), also express PAFR but in this case, little is known about its function. In the present work, we studied the consequences in innate and adaptive immunity by PAFR activation in DCs. Murine bone marrow-derived DCs (BM-DCs) were obtained after 6 days culture with GM-CSF. Maturation was induced by stimulation with LPS. We found that immature and mature BM-DCs express PAFR and that LPS stimulus enhanced endogenous production of PAFR ligands, besides inducing IL-12, IL-6, IL-1 β , IL-10, and PGE2 production. The PAFR-antagonists (WEB2086, WEB2170, or PCA4248) were added to DCs 30 min before LPS. The treatment did not affect pro-inflammatory cytokines levels, but IL-10 production was reduced which shifted the ratio IL-12/IL-10 from 1 to 2.1. IL10 and COX2 genes expression was also reduced by antagonists, indicating that PAF could be acting in a transcriptional level. When the receptor agonist, methylcarbamyl-PAF (cPAF), was added together with LPS, IL-10 and PGE2 production, and COX-2 expression levels were enhanced. Blocking PAFR in DCs also induced higher T cell proliferation followed by increased IFN- γ production in an in vitro antigen-specific proliferation assay. When DCs were treated with PG synthesis inhibitors (indomethacin, nimesulide or NS-398), or with IL-10 blocking antibody during maturation, they also induced higher T cell proliferation. We then transferred OVA-loaded BM-DCs (DC-OVA), treated or not with PAFR antagonist to naïve mice. After 14 days, splenocytes were co-cultured with fresh OVA-loaded BM-DCs. T CD4⁺ cells of mice that were immunized by antagonist-treated DCs proliferated more than the control ones, indicating that the PAFR negatively modulates DCs T cell activation potential. To investigate whether PAFR antagonists could also boost the immune response in vivo, mice were injected with OVA, combined or not with the PAFR antagonist WEB2170. After 14 days, OVA/WEB group draining lymph nodes cell number was increased and OVA-specific IgG2a antibody in the blood was 30 fold higher than in non-treated group. When OVA was given with Complete Freund's Adjuvant, addition of WEB2170 increased IgG1 and IgG2a antigen-specific antibodies production. When given with alum, no differences in antibodies levels were observed between treated and non-treated groups. By these results, we propose that PAFR activation by endogenous ligands would make a fine adjustment in DCs activation state, regulating the adaptive immune response.

Keywords: PAF receptor. Dendritic Cells. Prostaglandin E₂. Interleukin 10. Immunization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caracterização das DCs.....	43
Figura 2 – Expressão de PAFR em DCs.....	53
Figura 3 – LPS induz geração de agonistas de PAFR em DCs.....	55
Figura 4 – O tratamento com antagonista do PAFR não altera a expressão dos marcadores de maturação das DCs.....	56
Figura 5 – O bloqueio do PAFR não altera a produção de citocinas pró-inflamatórias por mDCs.....	57
Figura 6 – O bloqueio do PAFR diminui a produção de IL-10 por mDCs.....	58
Figura 7 – Efeito da adição de cPAF na produção das citocinas IL-10 e IL-12p40 por DCs.....	59
Figura 8 – Efeito de antagonistas de PAFR e do agonista cPAF na produção de PGE ₂ e expressão da COX-2.....	61
Figura 9 – Perfil temporal da produção de PGE ₂ e expressão de COX2.....	62
Figura 10 – Perfil temporal da expressão de mPGES-1, mPGES-2 e EP2.....	63
Figura 11 – DCs tratadas com antagonistas de PAFR induzem aumento na proliferação antígeno-específica de linfócitos T <i>in vitro</i>	66
Figura 12 – DCs tratadas com anticorpo bloqueador da IL-10 induzem aumento na proliferação antígeno-específica de linfócitos T <i>in vitro</i>	67
Figura 13 – Protocolo de diferenciação, tratamento, e transferência de DCs pulsadas com OVA para camundongos <i>naïve</i>	68
Figura 14 – Efeito da transferência de DCs pulsadas com OVA e tratadas com antagonista de PAFR para animais <i>naïve</i>	69
Figura 15 – Protocolo imunização de camundongos <i>naïve</i>	70
Figura 16 – O antagonista de PAFR potencializa a produção de IgG2a por camundongos imunizados com OVA.....	71

Figura 17 - Produção de anticorpos e citocinas <i>ex vivo</i> por esplenócitos de camundongos imunizados com OVA.....	73
Figura 18 - O antagonista de PAFR associado à adjuvante completo de Freund potencializa a produção de anticorpos e reduz a população de células Treg no baço de animais imunizados.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista da sequência de <i>primers</i>.....	44
Tabela 2. cPAF não afeta a expressão dos marcadores de maturação das DCs.....	57
Tabela 3. Efeito de inibidores da COX na proliferação antígeno-específica.....	67
Tabela 4. Produção de anticorpos por esplenócitos de camundongos imunizados com OVA ou OVA/WEB e re-estimulados <i>ex vivo</i> com OVA.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Araquidônico

Alum – Hidróxido de alumínio

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos (*Antigen Presenting Cells*)

BM-DCs – Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea (*Bone marrow-Derived Dendritic Cells*)

CCR7 – Receptor C-C para Quimiocina 7 (*Chemokine C-C motif Receptor 7*)

cDCs – Células Dendríticas convencionais

CFA – Adjuvante Completo de Freund (*Complete Freund Adjuvant*)

CFSE – Carboxyfluorescein succinimidyl ester

COX – Ciclooxygenase

cPAF – metilcarbamil-PAF (*methylcarbamyl-PAF*)

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

DCs – Células Dendríticas (*Dendritic Cells*)

Gapdh – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (*Granulocyte Macrophage-Colony stimulating Factor*)

iDCs – Células Dendríticas imaturas (*immature Dendritic Cells*)

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

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

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

LCs – Células de Langerhans (*Langerhans Cells*)

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

Lpcat2 – Lisofosfatidilcolina acil transferase 2 (*Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2*)

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – Leucotrieno

mDCs – Células Dendrítica madura (*mature Dendritic Cell*)

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

MHC II – Moléculas de Complexo de Histocompatibilidade Principal classe II (*Major Histocompatibility Complex class II*)

Mo-DCs – Células Dendríticas derivadas de Monócitos (*Monocyte-derived Dendritic Cells*)

nime – nimesulida

NO – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)

OVA – Ovalbumina

PAF – Fator Ativador de Plaquetas (*Platelet-activating Factor*)

PAFR – Receptor para o Fator Ativador de Plaquetas (*Platelet-activating Factor Receptor*)

PAFR-KO – camundongos deficientes para o PAFR (*Knock-Out PAFR mice*)

PCA – PCA 4248

pDCs – Células Dendríticas plasmocitóides (*plasmacytoid Dendritic Cells*)

PG – Prostaglandina

PGE₂ – Prostaglandina E₂

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

RNA_m – RNA mensageiro

RT-qPCR – reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction*)

TCR – Receptor de Célula T (*T Cell Receptor*)

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

Th – Linfócito T auxiliador (*T helper*)

TLR – Receptor do tipo Toll (*Toll-like Receptor*)

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral-alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)

Treg – Linfócito T regulador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 O Fator Ativador de Plaquetas (PAF).....	23
1.1.1 O receptor para o PAF (PAFR).....	24
1.1.2 O PAF/PAFR na Imunidade Inata.....	25
1.2 As Células Dendríticas.....	29
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais de experimentação.....	40
3.2 Geração de Células Dendríticas derivadas de Medula Óssea (BM-DCs).....	40
3.3 Tratamentos.....	41
3.4 Ensaio de viabilidade celular: MTT.....	41
3.5 Análise da expressão de PAFR e de marcadores fenotípicos em DCs por citometria de fluxo.....	41
3.5.1 Análise da expressão do PAFR em DCs.....	41
3.5.2 Análise da expressão de marcadores fenotípicos das DCs.....	42
3.6 RT-PCR em tempo real.....	43
3.6.1 Extração de RNA.....	43
3.6.2 Síntese de cDNA.....	44
3.6.3 RT-qPCR.....	44
3.7 Western blot.....	44
3.8 Bioensaio com células KBP/KBM para detecção de atividade agonista sobre o PAFR.....	45

3.8.1 Extração lipídica de BM-DCs.....	46
3.8.2 Estímulo em células KBP/KBM.....	45
3.9 Ensaio de proliferação celular <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>.....	46
3.9.1 Plaqueamento de DCs.....	46
3.9.2 Plaqueamento de esplenócitos totais.....	46
3.9.3 Marcação de linfócitos e análise por citometria de fluxo.....	47
3.10 Determinação da produção de citocinas e PGE₂ por imunoenensaio enzimático.....	47
3.11 Transferência de BM-DCs pulsadas com OVA para animais naïve.....	48
3.12 Imunização de camundongos naïve.....	48
3.13 Cultura <i>ex vivo</i> de esplenócitos de camundongos imunizados.....	48
3.14 Determinação da produção de anticorpos.....	49
3.14.1 Anticorpos no soro.....	49
3.14.2 Anticorpos no sobrenadante de esplenócitos de camundongos imunizados re-estimulados <i>ex vivo</i>	50
3.15 Análise estatística dos dados.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 A expressão de PAFR em DCs e a produção de ligantes do receptor.....	52
4.2 Efeitos do PAF na maturação e fenótipo das DCs.....	55
4.3 O eixo COX-2/PGE₂ na ativação do PAFR em DCs.....	60
4.4 A ativação do PAFR na função das DCs.....	64
4.4.1 O bloqueio do PAFR nas DCs potencializa a sua função apresentadora de antígeno <i>in vitro</i>	64
4.4.2 Transferência de DCs – bloqueio do PAFR em DCs potencializa a resposta imune <i>in vivo</i>	67
4.5 O bloqueio do PAFR potencializa a Resposta Imune <i>in vivo</i>.....	70
5 DISCUSSÃO.....	76

6 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES.....	98
APÊNDICE A- Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation.....	99
APÊNDICE B- Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR.....	101
APÊNDICE C- Activation of PAF-receptor induces regulatory dendritic cells through PGE₂ and IL-10.....	103
APÊNDICE D- Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Fator Ativador de Plaquetas (PAF)

O Fator Ativador de Plaquetas (PAF, do inglês *Platelet-activating Factor*) foi descrito pela primeira vez por Benveniste, Henson e Cochrane no começo da década de 1970. Inicialmente identificado como um “fator solúvel” liberado por leucócitos de coelhos imunizados e desafiados com o antígeno, o PAF recebeu este nome por promover a agregação de plaquetas e liberação de aminas vasoativas (1, 2).

A caracterização estrutural da molécula do PAF foi realizada alguns anos mais tarde através da síntese de compostos com propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes ao composto natural (3, 4), finalmente confirmada após o isolamento do PAF produzido por basófilos de coelhos imunizados e desafiados com o antígeno (5). A partir destes estudos foi possível identificar as vias metabólicas envolvidas na sua síntese e degradação, bem como a observação das suas propriedades biológicas.

O PAF (1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina) é produto da clivagem de fosfolípidios das membranas celulares, e sua biossíntese pode ocorrer através de dois diferentes mecanismos: a síntese por remodelamento e a síntese *de novo*, sendo a primeira, a via de síntese do mediador por células inflamatórias (6).

A via do remodelamento foi a primeira a ser descrita e é considerada a mais importante em diversas respostas inflamatórias e alérgicas, já que o PAF não é produzido em grandes quantidades por células não ativadas. A síntese do PAF por esta via é iniciada pela fosfolipase A₂ (cPLA₂), enzima essencial para a sua produção e induzível por estímulos inflamatórios (7). O primeiro produto a ser formado é liso-PAF, que deve ser acetilado por uma acetil-transferase (liso-PAFAT) para formar PAF (8). Atualmente, existem duas isoformas descritas da liso-PAFAT: a liso-PAF LPCAT1, que é constitutivamente expressa, e a liso-PAF LPCAT2, a isoforma induzível. A primeira é expressa nos pulmões e está ligada à síntese de PAF e de dipalmitoilfosfatidilcolina, componente principal do surfactante pulmonar (9). A segunda é principalmente expressa em células inflamatórias e, portanto, está mais envolvida na produção do PAF sintetizado a partir de estímulos inflamatórios (10). Shindou et al. (2005) (11), mostraram que macrófagos peritoneais estimulados com PAF têm a LPCAT2 ativada, o que sugere que o PAF formado por esta via pode induzir mais PAF, formando um *loop* positivo. Neste contexto inflamatório, tanto a cPLA₂ quanto a liso-PAFAT podem ser ativadas pelos mesmos estímulos, os quais produzem substrato para as duas enzimas

(12). O LPS, por exemplo, via sinalização por TLR4 ativa tanto a cPLA₂ (13) como também ativa a LPCAT2 em macrófagos (14).

Já na síntese *de novo*, o PAF é convertido, a partir de um intermediário da síntese dos fosfolípidios de membrana, por enzimas constitutivamente ativas que parecem ser reguladas pela disponibilidade de substrato (15). De modo geral, pouco se sabe sobre a geração de PAF por esta via, no entanto, Woodard et al. (1987) (16), propuseram na época, que pequenas quantidades de PAF seriam produzidas por síntese *de novo* para fins fisiológicos, visto que PAF tem um efeito tônico na pressão sanguínea.

O PAF é sintetizado por diferentes tipos celulares, entre eles células endoteliais, plaquetas, queratinócitos e células inflamatórias (17). Após sua síntese, ele pode permanecer associado a células ou ser secretado via vesículas de transporte ou ainda, ser diretamente translocado através da membrana plasmática via glicoproteína P (P-gp) (18). Já a sua degradação em produtos inativos é catalisada por acetil-hidrolases, segundos após a síntese do mediador. Estas enzimas estão presentes em diversas células e tecidos e são detectáveis também no plasma sanguíneo (19).

1.1.1 O receptor para o PAF (PAFR)

O receptor para o PAF (PAFR) pertence à classe dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Ele contém sete alças transmembrânicas, e foi detectado na membrana plasmática e nuclear de plaquetas e diversos tipos celulares, entre eles leucócitos mono- e polimorfonucleares (17).

A sinalização desencadeada pela ativação do PAFR pode ocorrer via subunidades $G\alpha_q$ ou $G\alpha_i$ do receptor acoplado a proteína G, e resulta no aumento dos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e Ca²⁺ intracelular, e diminuição dos níveis de AMP cíclico (cAMP) (17). Marrache et al. (2002) (20), reportaram a presença do PAFR na membrana nuclear e também que sua ativação estava associada à via de MAP quinases e NF- κ B, além da expressão de iNOS e COX2. Como a adição da toxina pertussis (PTX) – clássica inibidora de $G\alpha_i$ – inibiu sua ativação, foi sugerido que o PAFR expresso na membrana nuclear estaria ligado à $G_{i/o}$. Além disso, foi proposto que a ativação do PAFR expresso na membrana citoplasmática das células induziria respostas imediatas e síntese de PAF, que agiria nos PAFRs expressos no núcleo para a indução da síntese de citocinas e enzimas responsáveis pela síntese de prostanóides e óxido nítrico (NO) (21, 22). Após

ser estimulado, o receptor para o PAF é rapidamente dessensibilizado, evento dependente da sua fosforilação, internalização para compartimento endossomal, e degradação (23).

Além do ligante natural PAF, o PAFR também pode ser ativado por lipídeos oxidados (moléculas PAF-like). Estas moléculas possuem características estruturais semelhantes ao PAF e podem ser produzidas por estresse oxidativo e irradiação ultravioleta. Marathe et al. (1999) (24) mostraram que vários lipídeos oxidados tem atividade PAF-like e podem sinalizar via PAFR. O mesmo grupo mostrou em 2005(25), que lipídeos oxidados também podem ser formados por irradiação UVB em queratinócitos e que estas moléculas também agem como agonistas do PAFR. (24, 25). A geração das moléculas PAF-like não é controlada como a do PAF, e estes lipídeos podem ter diferentes afinidades pelo PAFR(26).

O receptor para o PAF foi clonado pela primeira vez em 1991 por Honda et al. (27). Diversos compostos antagonistas do PAFR foram desenvolvidos e estudos mostraram envolvimento do PAF em asma experimental. Entretanto, em estudos clínicos os antagonistas não foram efetivos. Os antagonistas do PAFR podem ser divididos em compostos naturais, análogos ou sintéticos. Um dos representantes dos antagonistas naturais do PAFR é o BN 52021 ou Ginkgolide B, terpenóide derivado de folhas de *Ginkgo biloba* (28). Já entre os compostos sintéticos então o WEB 2086 (apafant) (29) e o WEB 2170 (bepafant) (30), que não possuem estrutura análoga ao PAF ou qualquer outro lipídeo. O uso destes compostos nas últimas décadas tem contribuído de forma significativa para a melhor compreensão da ativação do receptor, bem como de suas vias de sinalização (revisado em (31)).

1.1.2 O PAF/PAFR na Imunidade Inata

Por mais de 30 anos, estudos sobre o PAF focaram predominantemente no seu papel em inflamação e alergia. De fato, o PAF é um potente mediador inflamatório, ativo em concentrações nanomolares que aumenta a permeabilidade vascular, contração de músculo liso, migração de neutrófilos e cicatrização (26). Além destas e outras funções já extensivamente estudadas, há evidências de que o PAF também tem atuação importante na imunidade inata.

Os macrófagos são células centrais da resposta imune inata. Eles possuem receptores de membrana essenciais para a resposta imune inata, os Receptores Reconhedores de Padrões Moleculares (PRRs; do inglês *Pattern Recognition Receptors*). Os PRRs reconhecem os chamados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), moléculas expressas na membrana celular de microorganismos. A sua capacidade de reconhecer patógenos, fagocitá-los e eliminá-los, compreende algumas das suas principais características, que são fundamentais para o controle de infecções. Os mecanismos de defesa antimicrobianos dos macrófagos incluem os dependentes de oxigênio e nitrogênio como as espécies reativas de oxigênio (ROI) e o óxido nítrico (NO), e os independentes de oxigênio representados pelas enzimas contidas nos lisossomos. Além disso, uma variedade de citocinas e mediadores contribuem para a ativação dos macrófagos aumentando sua capacidade microbicida (32).

No caso de infecção por *Leishmania*, a atividade microbicida dos macrófagos é de grande importância para o controle e eliminação do parasita (33). Com o uso de antagonistas do PAFR, Lonardon et al. (1994)(34), observaram que durante a infecção de macrófagos peritoneais por *Leishmania amazonensis*, o PAF é gerado endogenamente e contribui para a ativação do fagócito e eliminação do parasita. Além disso, os autores observaram que a adição exógena de PAF aos macrófagos infectados reduziu ainda mais a infecção das células, de maneira dose-dependente. Algum tempo depois, os mesmo autores observaram que camundongos tratados com o antagonista do PAFR eram mais susceptíveis ao mesmo parasita num protocolo de infecção experimental. Estes animais receberam o antagonista sistemicamente antes da injeção do parasita, e o tratamento resultou em significativo aumento das lesões decorrentes da infecção por *Leishmania*, acompanhado de aumento da carga parasitária no baço e linfonodos, sugerindo que o PAF produzido endogenamente durante a infecção tem efeito semelhante ao observado *in vitro* (35).

Outro relato da ação do PAF na atividade microbicida dos macrófagos foi feito por Aliberti et al. (1999) (36). Neste estudo, foi mostrado que o tratamento com agonista do receptor aumentou a produção de NO e, conseqüentemente, a atividade microbicida de macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Já o tratamento com antagonista do PAFR promoveu maior parasitemia nas células e morte prematura de animais infectados. Resultados obtidos em camundongos deficientes para o PAFR (PAFR^{-/-}) infectados pelo

mesmo parasita sugeriram ainda que a ativação do receptor para o PAF estaria envolvido no controle da replicação do *T. cruzi in vivo*, pois estes animais apresentaram maior parasitemia, inflamação tecidual e letalidade em relação aos camundongos selvagens (37).

Soares et al. (2002) (38), reportaram que a sinalização do PAFR também é importante para a contenção da infecção por *Klebsiella pneumoniae* ao observar a migração e ativação de neutrófilos no pulmão de animais infectados. Neste estudo, camundongos PAFR^{-/-} ou camundongos selvagens tratados com antagonista do PAFR foram infectados com a bactéria gram-negativa e foi observado que, na ausência do receptor ou no seu bloqueio por antagonista, a quantidade de bactérias nos pulmões dos animais aumentou, acelerando sua morte. Apesar da ausência do receptor não ter influenciado na migração nos neutrófilos para o pulmão, estas células fagocitaram menor número de bactérias (38).

Por outro lado, os macrófagos tem uma função fisiológica fundamental que é a remoção de células alteradas e de moléculas oxidadas. Isto é realizado via receptores que reconhecem padrões moleculares presentes nestas células e moléculas, conhecidos como DAMPs (do inglês, *damage-associated molecular patterns*). Enquanto a remoção de patógenos desencadeia um processo inflamatório, a remoção de células/moléculas danificadas não induz inflamação (39).

De fato, Fadok et al. (1998) (40), mostraram que macrófagos peritoneais murinos que fagocitaram células apoptóticas, quando estimulados com LPS, produziram menos citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8, TNF- α) e mais mediadores anti-inflamatórios TGF- β e prostaglandina E₂ (PGE₂). Isto foi atribuído a geração de PAF por macrófagos durante a fagocitose de células apoptóticas visto que o tratamento com antagonista de PAFR restaurou a produção das citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que o PAF endógeno favorece o estabelecimento de um perfil anti-inflamatório em macrófagos.

Mais tarde, trabalhos do nosso laboratório mostraram que este efeito do PAF em macrófagos que fagocitam células apoptóticas se deve a associação do PAFR com um dos receptores que reconhece DAMPs, o CD36. Ferracini et al. (2013) (41), mostraram que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos murinos derivados de medula óssea, induz produção de mediadores com predominância dos anti-inflamatórios. Estes apresentaram a relação IL-10^{high}/IL-12^{low} que, de acordo com Mosser et al. (2008) (42), define um fenótipo “regulador”. Este fenótipo foi dependente da co-localização de PAFR

e CD36 na membrana plasmática, e o bloqueio do PAFR alterou o fenótipo dos macrófagos para perfil ativador.

Há evidências que os fosfolipídios de membranas das células apoptóticas ao serem oxidados, geram compostos modificados na sua superfície que se assemelham estruturalmente aos compostos lipídicos presentes nas lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL, do inglês *oxidized low-density lipoprotein*) (43). Em nosso laboratório mostramos que a captação da oxLDL por macrófagos murinos também envolve o PAFR em conjunto com o receptor CD36 (44). Além disso, foi demonstrado a oxLDL recruta os dois receptores para o mesmo *lipid raft* promovendo a sinalização em conjunto (45). Em outro estudo, foi ainda mostrado que macrófagos murinos e humanos, quando diferenciados na presença de oxLDL, desenvolveram um fenótipo “regulador”, com indução dos marcadores Il10, Tgfb1, arginase1. Quando os macrófagos foram tratados com antagonistas de PAFR ou com o anticorpo bloqueador de CD36, a expressão destes marcadores foi claramente reduzida, mostrando que a ativação de PAFR, assim como a do CD36, está envolvida no desenvolvimento do fenótipo regulador (46).

Está bem estabelecido que macrófagos associados a tumores expressam um perfil anti-inflamatório que favorece o crescimento tumoral. Neste contexto, os macrófagos infiltrados no tumor podem fagocitar as células apoptóticas aí presentes, direcionando os macrófagos para um perfil supressor. De fato, Correa et al. (2005) (47), mostraram que a injeção de células apoptóticas em conjunto com uma dose sub-tumorigênica de melanona promoveu o crescimento do tumor. Em seguida mostraram que o crescimento tumoral estimulado pela adição de células apoptóticas foi inibido quando os camundongos eram tratados com injeções diárias de antagonistas do PAF, demonstrando que células apoptóticas contribuem para a progressão tumoral do melanoma via PAFR (48).

Fecchio et al. (1990) observaram que em um modelo de crescimento de Tumor Ascítico de Ehrlich (EAT) no peritônio de camundongos, os macrófagos presentes na ascite tumoral em comparação com macrófagos de cavidade peritoneal sem tumor, perderam suas características de ativação (espraiamento em lâminas de vidro e produção de H₂O₂). No entanto, quando os animais foram tratados com antagonista de PAFR, os macrófagos peritoneais voltaram a apresentar características de ativação e o crescimento tumoral foi drasticamente reduzido (49). O mesmo fenômeno foi observado em modelo experimental de melanoma B16F10. O tratamento com antagonista do PAFR

reduziu significativamente o volume do tumor nos camundongos injetados. Além disso, a produção de PGE₂ e de TGF- β , assim como a expressão de galectina-3, considerados marcadores de imunossupressão, também foram reduzidos, sugerindo que neste tumor a ativação de PAFR também está associada ao estabelecimento de um fenótipo supressor, e que o uso de antagonistas de PAFR pode modular os macrófagos para um fenótipo “ativador” reduzindo o crescimento tumoral (50).

Durante o crescimento tumoral, PAF ou moléculas PAF-like podem ser produzidas tanto por células do microambiente tumoral como por células do próprio tumor. Bussolati et al. (2000) (51), observaram que fatores naturalmente presentes em ambiente tumoral *in vivo* (como VEGF, FGF-2, TNF e trombina) foram capazes de induzir a produção de PAF por células de tumor de mama cultivadas *in vitro*. Eles ainda mostraram que o bloqueio do receptor por antagonistas reduziu a proliferação celular das linhagens malignas em cultura.

Em modelo de indução de metástase pulmonar experimental por melanoma B16F10, a sinalização via PAFR está envolvida na colonização do pulmão por células tumorais, pois os animais injetados com PAF após a injeção do tumor apresentaram aumento significativo do número de colônias no tecido pulmonar. Já o tratamento com o antagonista diminuiu consideravelmente a colonização do pulmão e promoveu redução da produção de TNF- α e IL-1 α , indicando um importante papel do PAF endógeno no estabelecimento da metástase, que também é induzida por estas citocinas (52).

Quanto às células dendríticas (DCs), sabe-se muito pouco da modulação do seu fenótipo pela ativação do PAFR. Todavia, as DCs também participam da imunidade inata, pois tem alta capacidade de migração para os tecidos e focos inflamatórios. Partindo do fato de que as DCs expressam o PAFR (53, 54) e que são células igualmente fagocíticas, pode-se considerar que as DCs podem, à semelhança dos macrófagos, ter seu fenótipo modulado pela ativação do PAFR, o que poderia resultar em consequências relevantes para a imunidade inata e adquirida.

1.2 As Células Dendríticas

Descritas por Steinman e Cohn no início da década de 1970(55), as Células Dendríticas (DCs) têm sido amplamente estudadas desde então devido à sua singular capacidade em capturar, processar e apresentar antígenos, iniciando e modulando

respostas imunes. Também conhecidas como as células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs, do inglês *Antigen Presenting Cells*), as DCs localizam-se nos mais diversos tecidos e constituem um grupo heterogêneo de células com grande capacidade de se comunicar com diferentes populações de linfócitos, formando uma interface entre o ambiente externo e interno com o sistema imune adaptativo. Como sentinelas a patrulhar os tecidos, as DCs tem capacidade para detectar uma extensa gama de antígenos através dos seus receptores inatos podendo assim, coletar as “pistas” necessárias para indução de respostas imunológicas tão diversas quanto imunidade ou tolerância (56, 57).

As DCs foram inicialmente identificadas como células de formato estelar com alta capacidade de ativar linfócitos T *naïve* e, atualmente, podem ser classificadas por diferentes parâmetros e em diversos níveis, incluindo sua localização, fenótipo, ontogenia, perfil de expressão gênica e especialização das suas funções. As DCs são originadas de células progenitoras da medula óssea, porém a dificuldade na identificação de um precursor comum para todos os seus subtipos descritos, bem como a ausência de um marcador fenotípico comum, fazem com que diferentes classificações sejam sistematicamente propostas.

Uma delas é a divisão em quatro grupos principais: DCs convencionais (cDCs), que predominam em estado basal e podem ainda ser agrupadas em DCs migratórias e DCs residentes em tecidos linfóides; Células de Langerhans (LCs), que também são migratórias e apresentam antígenos, mas são derivadas de um precursor diferente das cDCs; DCs plasmocitóides (pDCs), cuja principal característica é a produção massiva de interferon tipo I em resposta à estímulos virais; e DCs Derivadas de Monócitos (também chamadas de Mo-DCs ou DCs inflamatórias), que têm diferenciação induzida durante uma resposta infecciosa ou inflamatória, infiltrando órgãos e tecidos secundários (58, 59). Uma outra proposta é a divisão em pDCs e cDCs, sendo que este último grupo engloba todos os demais subgrupos (residentes ou não de tecidos linfóides) (60). Mais recentemente, ainda outro tipo de divisão foi proposto, no qual as DCs derivadas de monócitos (ou apenas Células Derivadas de Monócitos, MC) seriam consideradas um grupo à parte das DCs, mas que compartilhariam diversas capacidades funcionais com elas (61).

Em todo caso, são as DCs residentes em tecidos não-linfóides, que apresentam as características típicas conferidas às DCs, quais sejam: células com alta capacidade de

processamento e apresentação de antígenos, ampla habilidade para migrar e apresentar antígenos nas zonas de linfócitos T dos linfonodos, além de primar linfócitos T *naïve* em estado basal ou inflamatório (revisado por (60)).

Os diferentes tipos de DCs ainda podem ser subdivididos e identificados de acordo com a expressão de fatores de transcrição e/ou expressão de diversos marcadores específicos na membrana. Além do mais, diversas subpopulações de DCs podem ser encontradas no mesmo tecido ou órgão. No baço de camundongos, por exemplo, os subtipos de DCs encontrados incluem pDCs (B220⁺ CD11c^{int} GR1⁻), Mo-DCs (B220⁻ CD11c^{int} GR1[±]), e cDCs (B220⁻ CD11c^{high} GR1⁻), que ainda podem ser divididas em CD8 α ⁺ (CD11c^{high}, B220⁻ DEC205⁺ CD24^{high} CD11b⁻) e CD8 α ⁻ (CD11c^{high} B220⁻ DEC205⁻ CD24^{low} CD11b⁺ CD172⁺ CD4[±]), apesar de haver controvérsias quanto à expressão dos marcadores citados (60, 62). Já cDCs encontradas em outros tecidos, podem apresentar diferentes expressões dos mesmos marcadores, além de outros tantos, o que demonstra a complexidade e heterogeneidade destas células.

A obtenção de DCs naturais em número suficiente para estudos é logisticamente difícil de ser realizada. Além disso, a necessidade da realização de uma grande quantidade de procedimentos para a obtenção de uma população relativamente homogênea pode levar as células a se ativarem ou ainda, aumentar a sua susceptibilidade a contaminações por produtos microbianos. Este fato já foi reportado por Vremec et al. (2010) (63), que mostraram que DCs isoladas de tecidos linfóides de camundongos e postas em cultura se ativam progressivamente, o que dificulta análises das células em condições basais. Assim, a maior parte dos estudos realizados com DCs é fruto do desenvolvimento de protocolos experimentais de geração de DCs *in vitro*, que são amplamente aceitos em pesquisa.

O protocolo para estudo das DCs humanas conta com a diferenciação de DCs a partir de monócitos do sangue pelo tratamento com GM-CSF/IL-4 (64). Já no modelo murino, o sistema de geração de DCs mais utilizado é o da cultura de DCs derivadas de medula óssea (BM-DCs, do inglês *Bone Marrow-Derived DCs*), diferenciadas pelo tratamento dos seus progenitores com GM-CSF (e IL-4, dependendo do protocolo (65)). Este modelo garante alto rendimento, e gera uma população CD11b^{high} B220⁻ relativamente homogênea que, segundo Xu et al. (2007), se assemelha às DCs inflamatórias quanto aos seu aspecto e padrão de secreção de mediadores inflamatórios (66). Outros protocolos também usam o ligante de receptor de tirosina-quinase-3

semelhante à *fms* (*Flt3*) para a geração das BM-DCs, resultando em uma população mista de cDCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$, além de pDCs, o que implica no aumento da manipulação das células para a separação das populações (67). Estes protocolos, apesar de garantirem a geração de DCs em grande quantidade, nem sempre garantem que as células obtidas sejam idênticas às DCs naturais. No entanto, as células obtidas *in vitro* compartilham características fenotípicas e funcionais com as obtidas *in vivo*, e é este fato que as qualifica para estudo destas células.

As DCs constituem o elo entre a imunidade inata e a adaptativa. No entanto, para este fim, elas devem passar por um processo contínuo de captura de antígenos e maturação, que compreende uma série de eventos coordenados cujo resultado final pode ser desde a manutenção de tolerância até indução de imunidade.

De modo geral, as DC residem nos diversos tecidos como DCs imaturas (iDCs), e neste estágio, as células são incapazes de estimular linfócitos T. As iDCs possuem baixa expressão de MHC II e de moléculas co-estimuladoras, porém têm alta capacidade endocítica e fagocítica, características estas de grande importância na captura de antígenos (56).

Assim como os macrófagos, as DCs possuem um repertório único de receptores essenciais para a resposta imune inata, como os receptores do tipo Toll (TLRs; do inglês *Toll-like Receptors*), os NLRs (do inglês *NOD-like receptors*), CLRs (*C-type lectin receptors*), receptores para Fc entre outros. Estes receptores reconhecem PAMPs como LPS, DNA de bactérias, e RNA de fita dupla, que constituem um sinal de “ameaça” e, portanto, seu reconhecimento é essencial para o início da defesa do organismo (68, 69). As DCs, a semelhança dos macrófagos, também expressam receptores que reconhecem epítopos presentes em células apoptóticas (DAMPs) e nesta situação é fundamental que não se ativem mantendo um perfil tolerogênico para evitar autoimunidade (43).

Ao serem estimuladas diretamente pelo reconhecimento dos PAMPs ou DAMPs, as DCs dão início à produção de citocinas e mediadores em resposta aos sinais recebidos. Ao mesmo tempo, estas DCs podem ser afetadas por fatores produzidos por elas próprias ou por outras células presentes no tecido. Estes fatores compreendem moléculas que funcionam como mensageiros secundários, e que agem de forma autócrina/parácrina/ou mesmo endócrina, amplificando a resposta antígeno-específica. Entre eles, foram reportadas citocinas pró- ou anti-inflamatórias, quimiocinas, eicosanoides, proteínas de choque térmico, entre outras (70).

Ligantes de TLRs, por exemplo, em geral estimulam a produção maciça de IL-12 por DCs e a presença de IFN- γ durante a sua fase de ativação pode induzir níveis ainda maiores de IL-12 em cultura, como observado por Vieira et al. (2000) em DCs diferenciadas de monócitos humanos e ativadas por LPS (71). Já citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β podem ser críticas durante a fase da ativação das DCs, podendo inibir a sua maturação ou ainda induzir o desenvolvimento de mDCs reguladoras. Steinbrink et al. (2002) (72), mostraram que DCs humanas maturadas na presença de IL-10 induziram linfócitos T anérgicos com alta expressão de CTLA-4, molécula reguladora negativa da ativação de linfócitos T. Sato et al. (2003) (73), mostraram que DCs murinas diferenciadas na presença de IL-10 e TGF- β , mesmo após maturação induzida por LPS ou TNF- α , dão origem à DCs reguladoras que podem, por sua vez, suprimir as funções efectoras de linfócitos T já ativados, sugerindo um potencial imunoterapêutico dessas DCs em casos de doença do enxerto contra o hospedeiro. Já Xiao et al. (2007) (74), relataram que DCs tratadas com TGF- β exibiram características típicas de iDCs mesmo após indução de maturação, com baixa capacidade de estimular linfócitos T. Em experimentos *in vivo*, eles ainda mostraram que DCs tratadas com TGF- β ainda exibiram potencial terapêutico em modelo de encefalomielite auto-imune experimental, acompanhado de aumento de IL-10 nos linfonodos e redução do quadro inflamatório no sistema nervoso.

Quanto aos mediadores da inflamação como os eicosanoides, as DCs tanto respondem a eles, como os produzem rapidamente em resposta a estímulos inflamatórios. Foi mostrado que DCs ativadas por LPS produzem leucotrienos (LTs) e prostaglandinas e estes mediadores podem, por sua vez, induzir a produção de outros mediadores e citocinas. Harizi et al. (2002) (75), mostraram que as DCs rapidamente produzem PGE₂ quando ativadas por LPS e que, a esta PGE₂ induz a produção de IL-10 nestas células. O mesmo grupo também mostrou que além da PGE₂, as DCs também produziram LTB₄ quando estimuladas por LPS. A síntese do LTB₄, por sua vez, foi inibida pela IL-10 produzida pela PGE₂ induzida pelo LPS, o que sugere a existência de uma via supressora induzida por PGE₂/IL-10 (76). Já Alvarez et al. (2011) (77), trataram as DCs com LTC₄ exógeno e observaram que a capacidade fagocítica e endocítica tanto das iDCs como das mDCs foi aumentada. Eles também relataram que a produção de IL-12 induzida por LPS é completamente abolida enquanto que a de IL-23 é aumentada quando as células são tratadas com o mediador. Observaram ainda, que a proliferação de

linfócitos T co-cultivados com as DCs tratadas com LTC₄, levou a uma resposta adaptativa do tipo Th17, o que mostra a influência que as condições de ativação das DCs podem ter sobre a resposta imune adaptativa. Kalinski et al. (1998) (78), mostraram que a PGE₂ potencializa a maturação promovida pelos estímulos inflamatórios IL- β e TNF- α , porém as mDCs resultantes induzem resposta imune adaptativa do tipo Th2. Consequentemente, estes sinais podem modular o comprometimento das DCs com um programa de diferenciação que irá capacitá-las para ativar os linfócitos T. Por conta disso, as condições e microambiente da ativação das DCs se tornam fundamentais para o tipo de resposta imune adaptativa que estas células poderão induzir (70).

Em seguida aos sinais ativadores, inicia-se o processo contínuo da maturação das DCs, que compreende o declínio da capacidade de captura de antígenos e a sua preparação para apresentá-los. A célula passa então por diversas modificações fenotípicas, tais como perda de receptores endocíticos e fagocíticos, aumento da expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86, mudanças de morfologia, e ativação do processamento antigênico nos compartimentos lisossomais (79). O perfil de produção de citocinas também é alterado nesta fase e as DCs passam a expressar o receptor para quimiocinas CCR7, que direciona sua migração para órgãos linfóides secundários, onde apresentam o antígeno a linfócitos T (80, 81). Este encontro induz a ativação dos linfócitos que, por sua vez, enviam os sinais que completam a fase de maturação das DCs (56).

O destino da diferenciação dos linfócitos T é determinado pelos chamados “três sinais” promovidos pelas APCs. O primeiro sinal de ativação é resultante da ligação dos receptores dos linfócitos T com o complexo MHC-peptídeo das DCs e determina a resposta antígeno-específica. O segundo sinal, a co-estimulação, garante o desenvolvimento da resposta imune, pois na sua ausência os linfócitos se tornam anérgicos, o que pode levar à indução de tolerância. Já o terceiro sinal refere-se aos sinais transmitidos pelas DCs por meio da produção de citocinas e mediadores, cujo balanço pró-/anti-inflamatório depende das condições de ativação/maturação destas células e contribui para determinar o tipo da resposta dos linfócitos T (revisto por (82)).

Diversas moléculas produzidas por DCs que promovem a indução dos linfócitos Th (T *helper* ou T auxiliares) já foram identificadas. IL-12 e IFN- γ , por exemplo, polarizam linfócitos T para o fenótipo Th1, enquanto a produção de IL-4 estaria envolvida na polarização Th2. Já combinações como TGF- β e IL-10, ou TGF- β e IL-6,

estariam envolvidos nas polarizações para linfócitos T reguladores (Treg) e Th17, respectivamente (70, 83). Além disso, existem evidências que a interação entre eicosanóides e citocinas pode ainda afetar em grande escala a resposta imune. O balanço entre as respostas adaptativas Th1 e Th2, por exemplo, pode em parte ser decorrente da razão IL-12/PGE₂ produzidas pelas APCs (84). Assim, o resultado final da ativação dos linfócitos T depende basicamente dos sinais secretados pelas APCs, os quais são induzidos por outros sinais aos quais elas foram previamente submetidas.

Além da indução de imunidade, as DCs também são imprescindíveis para a regulação da resposta imune adaptativa. Elas desempenham um papel fundamental na tolerância imunológica central ao mediar a seleção negativa de linfócitos T no timo (85), e também promovem tolerância periférica através de diversos mecanismos como a geração de linfócitos T anérgicos e/ou reguladores, alterando o fino balanço da resposta adaptativa (86).

As propriedades tolerogênicas das DCs podem também depender do seu estado de maturação, da natureza do estímulo, e de sinais do microambiente envolvido. Apesar de ser geralmente aceito que estímulos de maturação confirmam função imunogênica às DCs, alguns destes estímulos podem promover um perfil de ativação capaz de induzir linfócitos T tolerogênicos. DCs isoladas de placas de Peyer, pulmões ou da câmara anterior do olho, por exemplo, exibem um fenótipo maduro e mesmo assim secretam IL-10, mas não IL-12, impulsionando o desenvolvimento de Tregs (87). Já as DCs de ambientes tão imunogênicos como as mucosas, são tolerogênicas, prevenindo a inflamação excessiva em resposta à organismos comensais, alimentos ou antígenos ambientais (86). Sun et al. (2007) (88), mostraram que DCs da lâmina própria do intestino delgado de camundongos têm alta expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras, porém induzem Treg FoxP3⁺ *in vitro*, por mecanismos dependentes de TGF- β e ácido retinóico (RA), metabólito da vitamina A presente em grandes quantidades no tecido linfóide associado à mucosa. Outro relato concomitante, aponta para uma população de DCs presentes nos linfonodos mesentéricos com fenótipo CD11c^{high} CD103⁺, também capazes de induzir Tregs (89). Essas evidências indicam que o estado de maturação de DCs, por si só, não é uma característica essencial para definir se elas irão desempenhar uma função imunogênica ou tolerogênica, apontando para a necessidade de mais estudos que busquem elucidar os mecanismos de ativação de DCs.

As DCs também reconhecem células senescentes ou mortas por mecanismos envolvendo os receptores *scavenger*, CD36 e o receptor para a vitronectina (90). Kushwah et al. (2010) (91), relataram que após a fagocitose de células apoptóticas, as DCs se tornaram resistentes à maturação induzida pelo LPS e passaram a secretar altos níveis de TGF- β , e ainda, foram capazes de induzir geração de células Treg.

Em macrófagos, discutimos acima que a fagocitose de células apoptóticas induz um fenótipo regulador resultante da associação do CD36 com o PAFR. As DCs, como citado anteriormente, expressam o PAFR e é, portanto, plausível supor que a fagocitose de células apoptóticas por DCs induza um fenótipo tolerogênico dependente de PAFR.

Pelo exposto, fica evidente a relevância de se estudar a ativação do PAFR em DCs e as consequências desta ativação no fenótipo e função destas células.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este projeto teve por objetivo investigar a ativação do PAFR em DCs e suas consequências na resposta imune.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a expressão do PAFR e a produção de ligantes do receptor pelas DCs;
- Investigar os efeitos do PAF endógeno na maturação das DCs através do tratamento com antagonistas seletivos do receptor;
- Observar os efeitos do PAF exógeno na maturação das DCs através da estimulação do PAFR com o seu agonista estável (cPAF);
- Estudar a modulação do fenótipo das DCs pela ativação ou bloqueio do PAFR através do perfil de citocinas e mediadores produzidos;
- Estudar o efeito do PAF na função apresentadora de antígenos das DCs;
- Avaliar o efeito do bloqueio do PAFR em DCs na imunidade por transferência de DCs;
- Avaliar um possível efeito adjuvante de antagonistas do PAFR na resposta imune *in vivo*.

3.1 Animais de experimentação

Camundongos machos das linhagens BALB/c e DO11.10 foram obtidos e mantidos em condições livres de patógenos específicos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Os animais utilizados neste trabalho tinham entre 8-10 semanas de idade e foram acondicionados em microisoladores coletivos contendo no máximo cinco animais. Os animais foram mantidos com ciclo artificial claro/escuro de 12 h, temperatura ambiente constante de 22 °C, e acesso à água e alimentação *ad libitum*. Todos os protocolos de estudo envolvendo animais de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP).

3.2 Geração de Células Dendríticas derivadas de Medula Óssea (BM-DCs)

Fêmures de camundongos BALB/c foram extraídos após eutanásia e banhados em solução de álcool 70%. As epífises dos ossos foram removidas, e as células de medula óssea foram coletadas através de jato no canal medular com meio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), utilizando seringa e agulha de 26-G x ½”, em ambiente estéril. As células foram submetidas à centrifugação de 300 g por 10 min e o sobrenadante foi substituído por meio R10 (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB - GIBCO, GO, Brasil) e antimicótico/antibiótico (GIBCO, Grand Island, NY, EUA)). Para a diferenciação em BM-DCs, as células foram acondicionadas em placas de cultura de tecido de 100 mm (10^6 células/mL) e foram adicionados 20 ng/mL do recombinante murino de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA). As placas de cultura foram mantidas em incubadoras, a 37 °C e 5% de CO₂. Após três dias, metade do meio de cultura das placas foi removido e submetido à centrifugação de 300 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células foram re-suspendidas no mesmo volume de meio R10, e devolvidas à placa de origem. GM-CSF foi novamente adicionado às culturas celulares na mesma concentração dada anteriormente. No sexto dia de cultura, as células não-aderentes foram coletadas e centrifugadas à 300 g por 10 min. Após descarte do sobrenadante, as células foram re-suspendidas em meio R10 e transferidas para novas placas, na confluência de 10^6 células/mL (adaptado de (92)).

3.3 Tratamentos

As DCs recém-diferenciadas (DCs imaturas – iDCs) foram tratadas com antagonistas do receptor de PAF WEB 2170 (30) (gentilmente cedido pela Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemanha), WEB 2086 (93) ou PCA 4248(94) (ambos da Tocris Biosciences, Ellisville, MO, EUA), ou inibidores de COX indometacina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), nimesulida ou NS-398 (ambos da Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA), por 30 min. Para a obtenção de células maduras (mDCs), as DCs foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). O agonista estável do receptor metilcarbamil-PAF (cPAF, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) foi dado simultaneamente ao LPS. Já o anticorpo bloqueador de IL-10 de camundongo (clone JES5-16E3) (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) foi adicionado após 1 h do LPS. As doses escolhidas para os experimentos realizados foram baseadas em estudos prévios com macrófagos e DCs, e/ou em curvas dose-resposta em experimentos-piloto feitos pelo nosso grupo.

3.4 Ensaio de viabilidade celular: MTT

DCs no sexto dia de diferenciação foram transferidas para placas de 96 poços (10⁴ células/poço) e tratadas nas mesmas condições acima descritas. O MTT (M5655 – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi então adicionado ao meio (concentração final de 500 mg/mL) e após 3 h de incubação à 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂, a solução de 10% SDS em 0,01 M HCl foi adicionada para a solubilização dos cristais. Após uma nova incubação de no mínimo 4 h protegida da luz, as placas foram lidas em espectrofotômetro de placa SpectraMax 190 em λ 570 nm, e a análise foi realizada pelo software SoftMax Pro 4.0 (ambos da Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

3.5 Análise da expressão de PAFR e de marcadores fenotípicos em DCs por citometria de fluxo

3.5.1 Análise da expressão do PAFR em DCs

O peptídeo bloqueador para o PAFR e o anticorpo monoclonal anti-PAFR (ambos da Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) foram misturados em proporções iguais e

incubados por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, esta mistura foi adicionada à DCse as células foram incubadas por 30 min no gelo. Em paralelo, um grupo de DCs foi marcado apenas com anticorpo anti-PAFR. Após lavagem com tampão de marcação (PBS/0,02% azida sódica/1% SFB), as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho IgG-FITC (clone Poly4064) (BioLegend, San Diego, CA, EUA) e com CD11c-APC (clone HL3) (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) no gelo e escuro por 30 min. Após serem lavadas por duas vezes, as células foram fixadas com solução de Formaldeído 3,7% em PBS por 10 min, lavadas novamente, e analisadas no citômetro de Fluxo FACSCantoII (BD Biosciences). Foram coletados resultados referentes a 30.000 eventos e a análise foi feita com o auxílio do software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA). Células CD11c⁺ foram consideradas DCs e a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) foi utilizada para determinar o nível de expressão do PAFR nas iDCs e mDCs. Os valores considerados como expressão real do PAFR são referentes ao MFI de células marcadas com o anticorpo anti-PAFR menos o MFI das células marcadas com anti-PAFR e peptídeo bloqueador para a exclusão da formação de complexos anticorpo-proteína não específicos.

3.5.2 Análise da expressão de marcadores fenotípicos das DCs

Para a análise de marcadores fenotípicos, as células foram incubadas por 30 min, no escuro, com os anticorpos CD11c-FITC (clone N418), CD80-PerCP Cy5.5 (clone 16-10A1), CD86-PE Cy7 (clone GL-1), IA^d-AlexaFluor647 (clone 39-10-8) (BioLegend, San Diego, CA, EUA) e CD40-PE (clone 5C3) (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Controles “fluorescência menos um” (FMO) foram realizados para todos os anticorpos utilizados. Em seguida, as células foram lavadas, fixadas, e analisadas como descrito acima. Células mortas e *doublets* foram excluídos. As DCs foram caracterizadas como sendo CD11c⁺/MHC II⁺ e pela expressão de moléculas co-estimuladoras (Figura 1). A mediana de intensidade de fluorescência (MFI) foi determinada em células CD11c⁺ (Figura 1B).

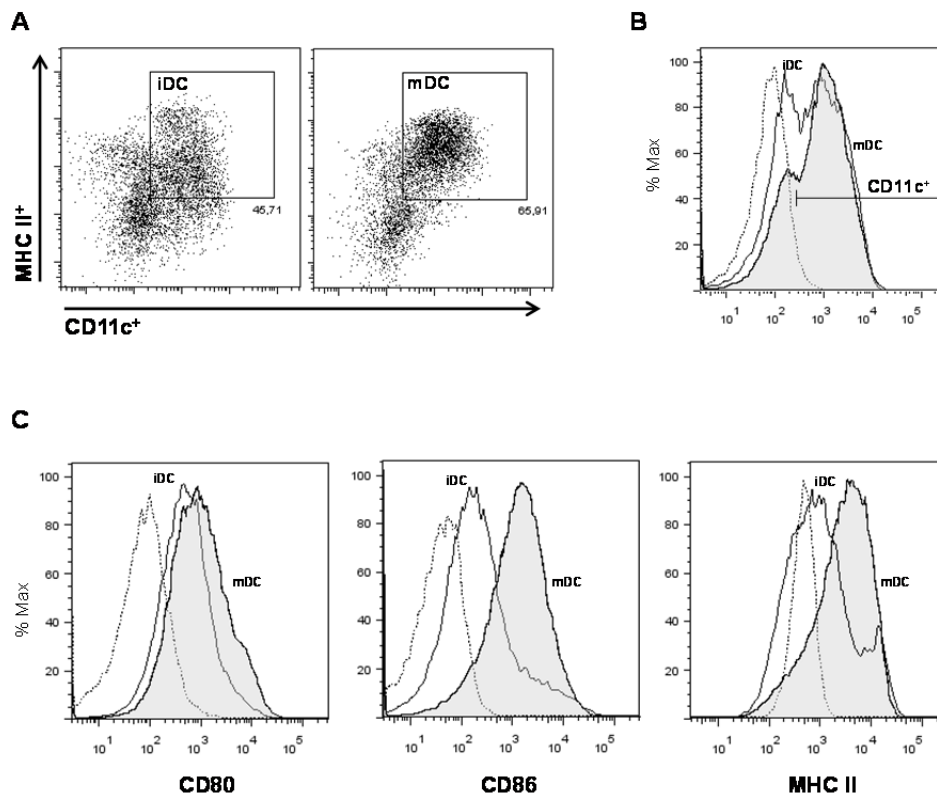


Figura 1 – Caracterização das DCs. Células de medula óssea de camundongos foram cultivadas com GM-CSF (20 ng/mL). Após 6 dias, as células não-aderentes (iDCs) foram coletadas e transferidas para novas placas. LPS (1 µg/mL) foi dado como estímulo de maturação. Após 24 h, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** DCs foram caracterizadas como CD11c⁺/MHC II⁺. **(B)** Gate nas células CD11c⁺. **(C)** Expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC II em células CD11c⁺. Linhas pontilhadas indicam controles “fluorescência menos um” (FMO, do inglês *Fluorescence Minus One*). Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes. iDC, DCs imaturas. mDCs, DCs maduras.

3.6 RT-PCR em tempo real

3.6.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA, as células foram coletadas e o RNA extraído com TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), segundo instruções do fabricante. Após a solubilização do RNA total em água MilliQ livre de RNases, as concentrações foram obtidas por leituras em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop, Waltham, MA, EUA). A qualidade das amostras foi determinada pelas relações 260/230 nm e 260/280 nm.

3.6.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total, utilizamos o kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Fermentas, Vilnius, Lituânia) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.3 RT-qPCR

Para as reações de PCR em tempo real, utilizamos *primers* específicos para cada alvo estudado (Tabela 1) e *master mix* SYBR Green (SYBR Green Master Mix – Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), com temperaturas e ciclos recomendados pelo fabricante. As reações de amplificação foram obtidas no Stratagene MxPro3005PTM QPCR Systems (Santa Clara, CA, USA) ou no Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A expressão relativa dos genes estudados foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (95), sendo Gapdh o gene-referência.

Tabela 1. Lista da sequência de *primers*

Gene	Forward	Reverse
Ptarf	5'-GCAGTGCTTTGCTCTGTTTCC-3'	5'-GCCATTGTGCTCCATTGCTCT-3'
Lpcat2	5'-CCAGGTGGCATTTAAGCTCT-3'	5'-TCTTGGCATATTCTGGGTGC-3'
Ccr7	5'-CAGGTGTGCTTCTGCCAAGAT-3'	5'-GGTATTCTCGCCGATGTAGTCA-3'
IL-10	5'-CAGAGCCACATGCTCCTAGA-3'	5'-TGTCCAGCTGGTCCCTTGT-3'
IL-12p40	5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3'	5'-ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3'
COX2	5'-CTCCCTGAAGCCGTACACAT-3'	5'-ATGGTGCTCCAAGCTCTACC-3'
Ptges	5'-CCCATTTGGAGCCACTTACA-3'	5'-TGGTTAAGAGGGAGTGTGGT-3'
Ptges2	5'-TGCTGACCTGGCAGTGTATG-3'	5'-ACCAAGGCTGGATGTGTGAG-3'
Ptger2	5'-GAACGCTACCTCTCCATCGG-3'	5'-ATAGATGACAGGCAGCACCG-3'
IgG2a PS	5'-GACCTCTCCGAAACCAGGC-3'	5'-GGGCCAGTGGATAGACCGA-3'
Gapdh	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

3.7 Western blot

DCs foram lisadas com tampão RIPA contendo ortovanadato de sódio (1 mM), fluoreto de sódio (5 mM), e coquetel inibidor de proteases (Roche Scientific, Indianapolis, IN, EUA). A dosagem de proteínas foi feita com o Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

Quantidades iguais de proteína foram separadas por eletroforese em gel de SDS-acrilamida (10%) e transferidas para membranas de PVDF (Amersham Hybond-P – GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Nonfat Dry Milk – Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) em tampão TBS 0,1% Tween-20 (TBST) e incubadas a 4 °C *overnight* com os anticorpos anti-COX-2 murina (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA), e anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) ou de coelho (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) conjugados com peroxidase. A detecção foi realizada com agente quimioluminescente ECL (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Os autoradiogramas foram analisados com o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

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

3.8.1 Extração lipídica de BM-DCs

DCs no sexto dia de diferenciação foram lavadas com meio RPMI 1640 sem soro e transferidas para tubos contendo o mesmo meio, com volume final de 1 mL. As células foram tratadas com 1 μ M do inibidor de serino-protease AEBSF (A8476 – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por 30 min. Em seguida, foi adicionado 1 μ g/mL de LPS ao grupo “mDC” e as células foram incubadas por 30 min. Foram adicionados 2 mL de metanol gelado por tubo, seguidos de homogeneização em gelo. A seguir, foram adicionados 2 mL de diclorometano em cada tubo seguido de homogeneização vigorosa e os mesmos foram vedados para evitar a oxidação das amostras. Após centrifugação a 2500 g por 10 min, a fase inferior das amostras foi transferida para novos tubos de vidro e o solvente foi evaporado por jato de nitrogênio. Após vedação dos tubos, as amostras foram armazenadas à -80 °C.

3.8.2 Estímulo em células KBP/KBM

As células KBP consistem uma linhagem de células imortalizadas de carcinoma epidermóide oral humano e transduzidas com vetor retroviral MSCV2.1 contendo a

sequência para o receptor do PAF (MSCV2.1PAF-R), conforme descrito por Pei et al. (1998) (96). A ativação do PAFR destas células por PAF ou moléculas PAF-like induz aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular e a produção da quimiocina IL-8. Já as células KBM são células KB transduzidas com o vetor viral vazio e, portanto, não expressam PAFR. Tanto as células KBP quanto as KBM foram plaqueadas (2×10^5 células/mL) em placas de 12 poços, com meio R10 e mantidas em incubadoras *overnight*. Antes do estímulo, o meio de cultura foi retirado das placas, os poços foram lavados com meio de cultura sem soro, e as células deixadas neste meio por 30 min. Neste intervalo, os sedimentos resultantes da extração lipídica das DCs foram reconstituídos em etanol absoluto e o volume equivalente ao extrato lipídico de $2,5 \times 10^6$ DCs foi adicionado às células KBP e KBM. Como controles, foram utilizados 100 nM do agonista estável de PAFR metilcarbamil-PAF (cPAF, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), 10 nM de acetato miristato de forbol (PMA – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), ou veículo (etanol). Após 5 h os sobrenadantes foram coletados e congelados para posterior determinação da produção de IL-8 por ELISA.

3.9 Ensaio de proliferação celular *in vitro* e *ex vivo*

3.9.1 Plaqueamento de DCs

Para os ensaios de proliferação *in vitro*, as DCs no sexto dia de diferenciação foram tratadas e estimuladas com LPS como descrito anteriormente (ver 3.3), e pulsadas com 100 μ g/mL de OVA (Ovalbumina grau V, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Para os ensaios de proliferação *ex vivo*, as DCs foram apenas pulsadas com OVA e estimuladas com LPS, sem tratamentos adicionais. Após 24 h, as DCs foram coletadas e lavadas por duas vezes com meio de cultura R10 para a remoção total da OVA, e transferidas para placas de cultura de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço).

3.9.2 Plaqueamento de esplenócitos totais

Após eutanásia, o baço de camundongos transgênicos DO11.10 (com TCR específico para OVA) (97) ou de camundongos BALB/c imunizados via transferência de DCs pulsadas com OVA, foi coletado e macerado. As células foram re-suspendidas em

meio de cultura e passadas por uma peneira com malha de 70 μ M para a remoção de tecidos conectivos. Os esplenócitos foram incubados com tampão de lise de hemácias (ACK Lysis Buffer – GIBCO, Grand Island, NY, EUA) re-suspendidos em meio de cultura sem soro, e marcados com CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit – Invitrogen, Eugene, OR, EUA) de acordo com recomendações dos fabricantes. As células foram lavadas por duas vezes para a remoção do CFSE remanescente e transferidas para os poços contendo as DCs (10^5 células/poço, numa razão de 1 DC : 4 esplenócitos). As coculturas permaneceram em incubadora por 72 h.

3.9.3 Marcação de linfócitos e análise por citometria de fluxo

As células não aderentes foram coletadas das placas de co-cultura, lavadas com tampão de marcação e incubadas por 30 min no gelo e escuro com os anticorpos CD4-APC (clone L3T4) e CD3-PE (clone 17A2) (ambos da BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Após lavagem, as células foram analisadas no citômetro de Fluxo FACSCantoII (BD Biosciences). Foram coletados resultados referentes a 50.000 eventos e a análise foi feita com o auxílio do software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA). Foi realizado um *gate* nas células CD4⁺ e a proliferação celular foi determinada pela porcentagem de células com marcação CFSE^{low}.

3.10 Determinação da produção de citocinas e PGE₂ por imunoensaio enzimático

Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados após períodos específicos de tratamentos, centrifugados a 300 g por 10 min para eliminação de corpos celulares, e congelados a -80 °C. As produções de IL-8, IL-6, IL-12p40, TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, e IL-13 foram determinadas por kits de ELISA (BD OptEIA – BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e a produção de PGE₂ foi determinada pelo Monoclonal Prostaglandin E2 EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), de acordo com instruções dos fabricantes. Após a reação, a absorbância foi avaliada a 450 nm pelo espectrofotômetro de placa. Os níveis de citocina e PGE₂ foram determinados a partir de curvas de recombinantes corridos em paralelo.

3.11 Transferência de BM-DCs pulsadas com OVA para animais naïve

DCs foram diferenciadas *in vitro*, tratadas com antagonista de PAFR WEB 2086 e estimuladas com LPS como previamente descrito (ver 3.2 e 3.3). As células foram pulsadas com OVA (100 µg/mL) e, após 24 h, as mesmas foram lavadas com PBS e re-suspensas em salina na concentração de 10^6 células/100 µL. $3-5 \times 10^6$ células foram injetadas em camundongos BALB/c naïve via intraperitoneal. Como controle, um grupo de animais foi imunizado com OVA (5 µg) em salina, pela mesma via. Após sete dias, os procedimentos foram repetidos e ao fim de quatorze dias, os animais foram submetidos à eutanásia. Foram coletados o sangue para determinação de anticorpos no soro, e o baço para ensaio de proliferação *ex vivo*.

3.12 Imunização de camundongos naïve

Camundongos BALB/c naïve foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg) e imunizados com 5 µg de OVA injetada via subcutânea, nos flancos inferiores do dorso dos animais, de acordo com os seguintes protocolos: a) OVA em salina; b) OVA em 15% hidróxido de alumínio (alum – Reheis, Berkeley Heights, NJ, EUA); ou c) OVA em 50% Adjuvante Completo de Freund (CFA – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Após sete dias, os animais foram injetados com reforço de 5 µg de OVA em salina, 15% hidróxido de alumínio, ou 50% Adjuvante Incompleto de Freund (IFA – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), respectivamente. Para cada protocolo um grupo de camundongos foi injetado com o antagonista de PAFR WEB 2170 (5 mg/kg) junto à OVA. Ao final de quatorze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia. O sangue, baço e linfonodos inguinais foram coletados para análises.

3.13 Cultura *ex vivo* de esplenócitos de camundongos imunizados

Os baços dos camundongos imunizados foram macerados. As células foram re-suspendidas em meio de cultura e passadas por uma peneira com malha de 70 µM para a remoção de tecidos conectivos. Os esplenócitos foram incubados com tampão de lise de hemácias (ACK Lysis Buffer – GIBCO, Grand Island, NY, EUA) segundo recomendações do

fabricante, re-suspendidos em meio R10, e transferidos para placas de cultura (10^6 células/mL). As células foram re-estimuladas com OVA (100 $\mu\text{g/mL}$) por 72 h. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas e anticorpos totais foi determinada por ELISA e CBA, respectivamente.

3.14 Determinação da produção de anticorpos

3.14.1 Anticorpos no soro

Para determinar a produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA por camundongos imunizados, o sangue coletado dos animais foi armazenado à 4 °C por 30 min, seguido de centrifugação (2.000 g, por 10 min). O soro foi coletado e armazenado à -80 °C. Placas próprias para ELISA foram sensibilizadas com OVA (20 $\mu\text{g/mL}$) em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5. Anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongos foram adicionados aos poços correspondentes à curva-padrão para cada isótipo. As placas foram incubadas a 4 °C, *overnight*. Em continuação, as placas foram submetidas a três ciclos de lavagem com PBS/0,05%Tween-20 (Synth, Diadema, SP, Brasil), e os poços foram bloqueados com PBS/10% SFB por 1 h à temperatura ambiente. Após três ciclos de lavagem, as amostras de soro em diversas diluições e as curvas-padrão foram adicionadas aos poços sensibilizados. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram submetidas a cinco ciclos de lavagem. Anticorpos IgG1-HPR (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) ou IgG2a-HPR (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) diluídos em PBS/SFB foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h. Após 7 ciclos de lavagem, a solução-substrato (TMB Substrate Reagent Set – BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) foi adicionada às amostras e após aproximadamente 30 min, a reação foi parada com adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) 1 M. As leituras das placas foram realizadas em espectrofotômetro de placas a 450 nm. A concentração de cada anticorpo presente nas amostras foi calculada com base na absorbância obtida da curva-padrão de cada anticorpo.

3.14.2 Anticorpos no sobrenadante de esplenócitos de camundongos imunizados re-estimulados *ex vivo*

Após re-estímulo *ex vivo* de esplenócitos de camundongos com OVA (ver seção 3.13), o sobrenadante das culturas foi coletado e o perfil de anticorpos totais foi determinado por CBA (Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit – BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os dados foram coletados no citômetro de fluxo FACSCantoII (BD Biosciences) e a análise foi realizada com auxílio de software FlowJo. Foram realizados *gates* em eventos positivos para cada isotipo testado e os resultados foram dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

3.15 Análise estatística dos dados

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para a comparação entre dois grupos experimentais distintos, foi utilizado o teste t-Student. Para mais de dois grupos experimentais, foi utilizada a comparação por análise de variância (ANOVA) e pós-teste Student-Newman-Keuls. A significância assumida foi de $P < 0,05$. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EUA).

4.1 A expressão de PAFR em DCs e a produção de ligantes do receptor

As células dendríticas (DCs) foram obtidas a partir de células de medula óssea de camundongos BALB/c, cultivadas por 6 dias em meio contendo GM-CSF (20 ng/mL), e caracterizadas como DCs imaturas (iDCs), pela expressão de CD11c⁺/MHCII⁺. Para induzir a maturação estas células foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 24h. As então DCs maduras (mDCs) foram caracterizadas pela expressão aumentada de MHC II e de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 na população CD11c⁺ (Figura 1).

A expressão do PAFR foi detectada na membrana citoplasmática das DCs por citometria de fluxo. Para a realização deste experimento, um grupo de iDCs e outro de mDCs foi incubado com o peptídeo bloqueador do PAFR além do anticorpo anti-PAFR. Este controle nos permitiu analisar a expressão do receptor excluindo a formação de complexos proteína-anticorpo inespecíficos. Na Figura 2A, podemos observar a expressão do PAFR tanto das iDCs quanto das mDCs, sem diferença significativa após as primeiras 24 h da maturação induzida por LPS. A expressão relativa do RNAm para o PAFR também foi equivalente nas iDCs e mDCs neste tempo, mas após 48 h a expressão do receptor foi significativamente reduzida (Figura 2B). Como a maior parte das nossas observações foi realizada durante as primeiras 24 h da indução de maturação, assumimos que a expressão do PAFR nas iDCs e mDCs é equivalente.

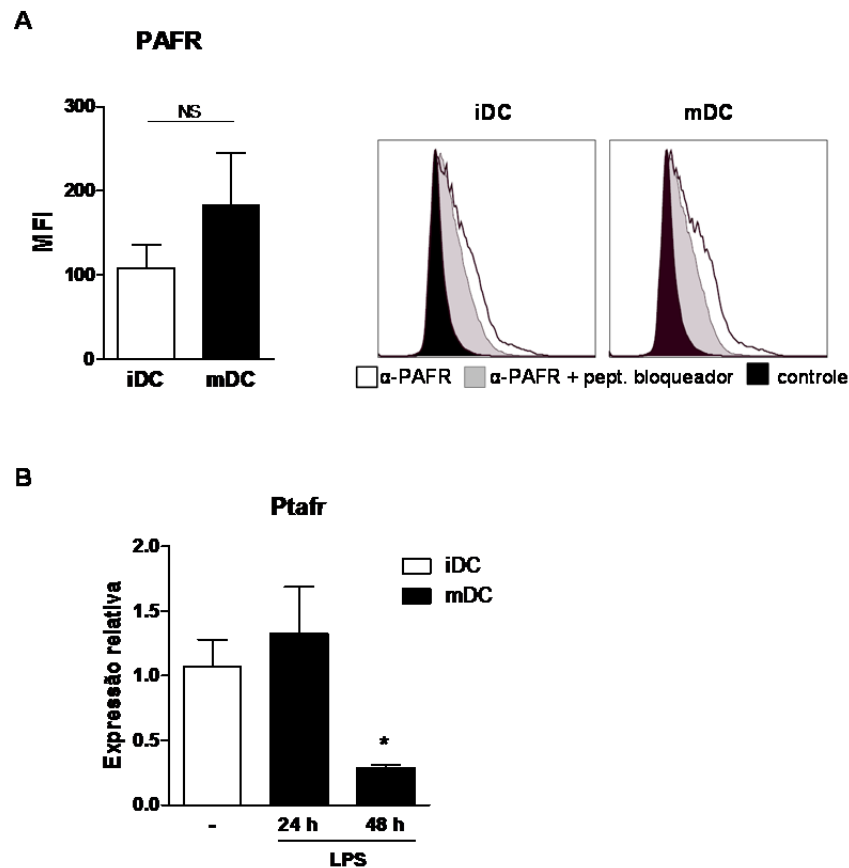


Figura 2 – Expressão de PAFR em DCs. (A) iDCs e mDCs foram tratadas com peptídeo bloqueador para o PAFR e marcadas com o anticorpo anti-PAFR. A expressão do PAFR foi analisada por citometria de fluxo e o resultado está expresso em mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Os valores considerados são o MFI de células marcadas apenas com anticorpo anti-PAFR menos o MFI de células tratadas com o peptídeo bloqueador e marcadas com anti-PAFR (exclusão da formação de complexos proteína-anticorpo não específicos). À direita, figuras representativas, onde curvas cheias indicam o controle não marcado. **(B)** expressão do RNAm do receptor de PAF (Ptafr) em iDCs e mDCs (24 e 48 h após o estímulo de LPS) avaliada por RT-qPCR. A expressão do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=3). *P<0,05. iDC, DCs imaturas. mDC, DCs maduras.

Outra questão investigada foi se as DCs são capazes de produzir PAF. Inicialmente estudamos a expressão da enzima-chave para a sua produção, a liso-PAF acetiltransferase (liso-PAFAT). Na figura 3A, podemos observar aumento na expressão do RNAm do gene codificador da enzima (Lpcat2) nas mDCs durante as primeiras horas da maturação, com pico em 8 h após o LPS. Ao fim de 24 h, a expressão da enzima voltou a ser equivalente à sua expressão nas iDCs. Estes dados indicam que o LPS foi capaz de aumentar a expressão da liso-PAFAT, o que sugere que as DCs podem produzir PAF quando estimuladas com LPS.

Uma outra abordagem foi avaliar a presença de ligantes do PAFR nas culturas de iDCs e mDCs. Para isto, utilizamos o sistema das células KB. Brevemente, este sistema consiste em células imortalizadas de carcinoma epidermóide oral humano (células KB), transduzidas com vetor viral contendo a sequência para o PAFR (KBP), ou transduzidas com vetor viral vazio (KBM). Quando o receptor de PAF nas células KBP é ativado por agonistas como o próprio PAF ou moléculas *PAF-like*, os níveis de Ca^{2+} intracelular aumentam e as células produzem a quimiocina IL-8(96). Portanto, de modo indireto, através da produção de IL-8 por células KBP, pode-se determinar a presença de ligantes de PAFR em um determinado extrato lipídico. Como controle negativo, em paralelo, o mesmo extrato lipídico deve ser colocado sobre células KBM.

As DCs foram mantidas em meio de cultura sem soro, tratadas com 1 μ M do inibidor de serino-protease AEBSF e estimuladas com LPS por 30 min. Em seguida, foi realizada a extração lipídica total das DCs e do seu sobrenadante. Células KBP e KBM foram incubadas com estes extratos lipídicos ou estimuladas com os controles positivos cPAF (metilcarbamil-PAF, agonista estável do PAFR) e acetato miristato de forbol (PMA). Após 5 horas, a concentração de IL-8 nas amostras foi determinada. Na figura 3B, podemos ver que as células KBP, mas não as KBM, produzem IL-8 quando estimuladas com cPAF. Já o estímulo inespecífico com PMA induziu resposta tanto nas células KBP quanto nas KBM, com níveis de produção de IL-8 equivalentes, validando o método utilizado.

Na figura 3C, a presença dos ligantes do PAFR está expressa em porcentagem da resposta de produção de IL-8 induzida por 100 nM de cPAF. Pode-se notar que as iDCs já produzem ligantes de PAFR e que as mDCs os produzem ainda mais. A IL-8 não foi detectada nos sobrenadantes das células KBM estimuladas com os extratos lipídicos das DCs.

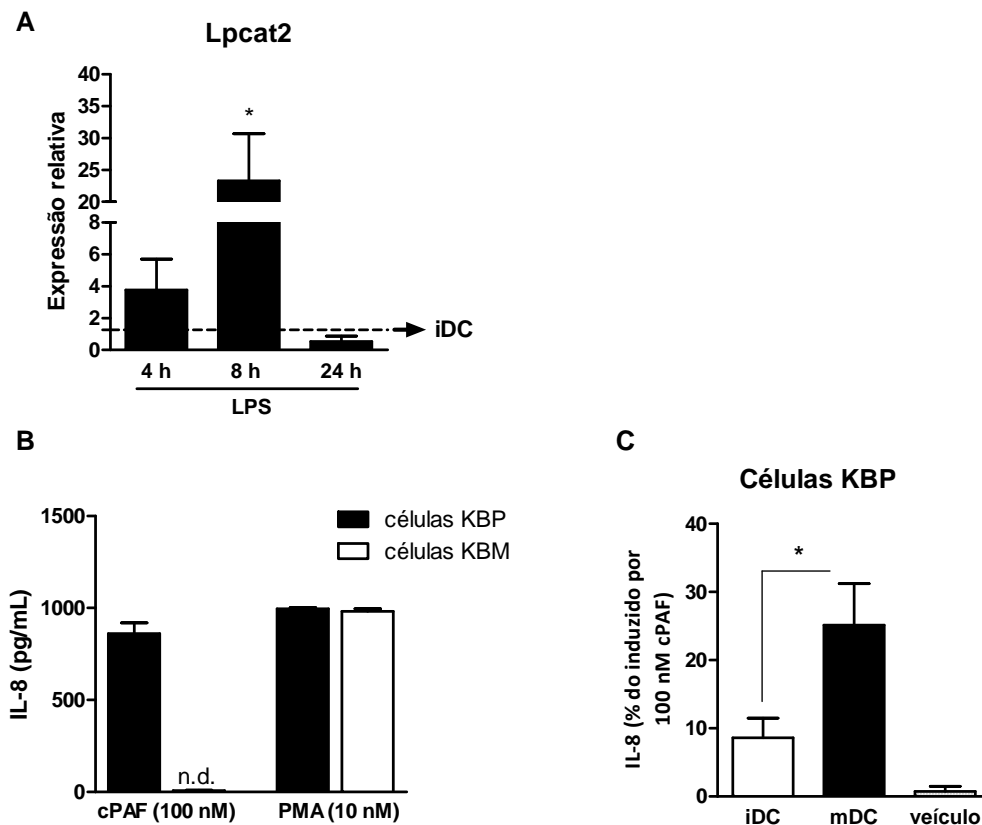


Figura 3 – LPS induz geração de agonistas de PAFR em DCs. **(A)** A expressão do RNAm da enzima liso-PAF acetiltransferase (Lpcat2) em iDCs e mDCs após diversos intervalos de estímulo de LPS foi determinada por RT-qPCR. A expressão do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh e calibradas pelo grupo iDC. **(B)** DCs foram tratadas com inibidor de proteases AESBF (1 μ M) e estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 30 min. Em seguida, as células foram submetidas à extração lipídica e quantidades correspondentes à $2,5 \times 10^6$ DCs foram adicionadas às células KBP (que expressam o PAFR) e KBM (não expressam PAFR). Após 5 h de incubação, a IL-8 produzida foi determinada por ELISA nos sobrenadantes das culturas e utilizada como indicador da produção de ligantes do PAFR. Como controle da produção de IL-8, células KBP e KBM foram estimuladas com cPAF ou PMA. **(C)** Porcentagem de IL-8 produzida relativa à quantidades induzidas por 100 nM de cPAF em células KBP. Dados referentes à pelo menos 3 experimentos independentes, mostrados como média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. iDC. iDC, DCs imaturas. mDC, DCs maduras. n.d., não detectado.

4.2 Efeitos do PAF na maturação e fenótipo das DCs

Pelo exposto, as DCs expressam PAFRe quando estimuladas com LPS produzem ligantes do receptor. Isto nos levou a questão seguinte: se o PAF gerado pelas mDCs, atuando autocrinamente, afetaria o seu processo de maturação.

É bem sabido que na maturação das DCs, dentre outros eventos, ocorre aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) e de MHC classe II, além de mudanças morfológicas e expressão do receptor para quimiocinas CCR7, o qual

direciona a migração da célula para órgãos linfóides secundários para apresentar antígenos. Assim, pelo bloqueio do PAFR com o antagonista WEB 2086, avaliamos o efeito do PAF endógeno e, paralelamente, o efeito da adição do agonista cPAF sobre a expressão destes marcadores de maturação.

A figura 4A mostra que, após 24 h do estímulo com LPS, ocorreu aumento na expressão de CD80, CD86, CD40 e MHC classe II. O bloqueio do PAFR não alterou a expressão destas moléculas. A expressão do RNAm do receptor para quimiocinas CCR7 também aumentou após 24 h do LPS, mas nenhuma alteração foi observada quando as células haviam sido previamente tratadas com o antagonista (Figura 4B). O tratamento com o agonista cPAF também não alterou a expressão destas moléculas (Tabela 2).

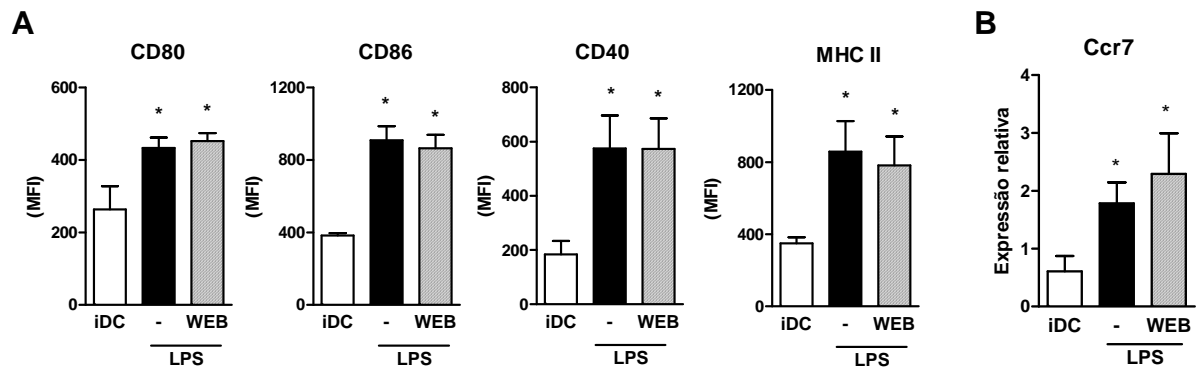


Figura 4 - O tratamento com antagonista do PAFR não altera a expressão dos marcadores de maturação das DCs. DCs no 6º dia de diferenciação foram tratadas com antagonista do PAFR WEB 2086 (50 μ M) por 30 min e estimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 24h. **(A)** A expressão dos marcadores de maturação em DCs foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD11c⁺. **(B)** A expressão do RNAm para o receptor de quimiocinas CCR7 foi normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh e determinada por RT-qPCR. Dados referentes a pelo menos 3 experimentos independentes, mostrados como média \pm SEM. *P<0,05 vs. iDC. iDC, DC imatura; WEB, DC tratada com WEB 2086.

Tabela 2. cPAF não afeta a expressão dos marcadores de maturação das DCs#

	mDC	cPAF		
		10 ⁻¹¹ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M
CD80	893 ± 37,6	873 ± 29,8	889 ± 39,4	824 ± 26,4
CD86	1163 ± 141	1363 ± 112	1408 ± 75,6	1201 ± 153
CD40	410 ± 9,8	522 ± 57,8	503 ± 57,5	499 ± 67,1
MHC II	3006 ± 301	2471 ± 200	2620 ± 240	2656 ± 113

Os valores foram expressos em MFI de células CD11c⁺ maturadas com LPS e tratadas com cPAF por 24 h.

Dados: Média ± SEM (n = 8)

No processo de ativação/maturação das DCs são produzidas citocinas essenciais para o direcionamento subsequente da resposta imune adaptativa. Nos perguntamos então se o PAF gerado endogenamente pelo estímulo de maturação, modificaria o fenótipo das DCs à semelhança dos macrófagos, onde a ativação do PAFR induziu um fenótipo regulador com produção aumentada de IL-10 (45). Para isto, tratamos as DCs com os antagonistas do PAFR, WEB 2086 ou PCA 4248 antes do estímulo de maturação. Após 24 h, foi observado que o tratamento com os antagonistas do receptor do PAF não afetou a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-12p40 induzidas por LPS (Figura 5).

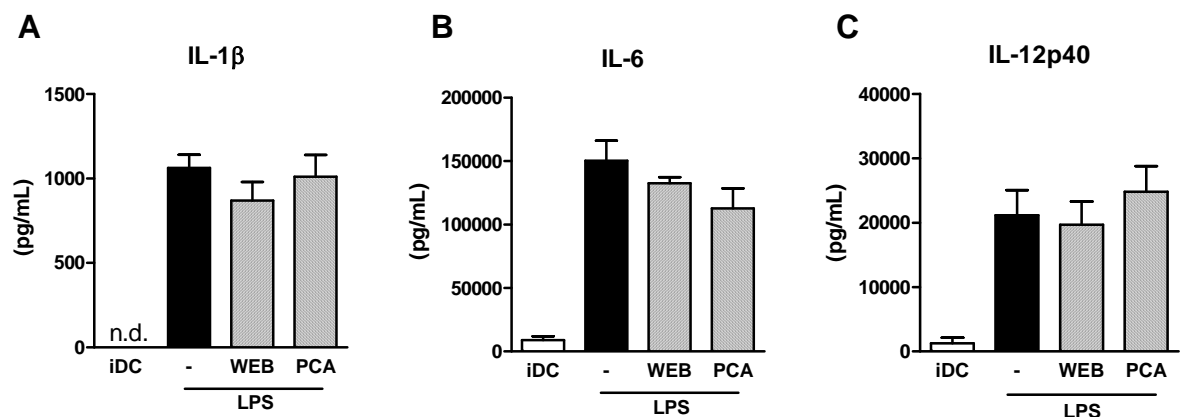


Figura 5 - O bloqueio do PAFR não altera a produção de citocinas pró-inflamatórias por mDCs. DCs foram tratadas com antagonistas do PAFR WEB 2086 (50 μ M) ou PCA 4248 (10 μ M) e após 30 min, 1 μ g/mL de LPS foi adicionado às culturas. Após 24 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas produzidas foram determinadas por ELISA. **(A)** IL-1 β ; **(B)** IL-6; **(C)** IL-12p40. As barras cheias correspondem às mDCs. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=5). iDC, DC imatura; mDC, DC madura; WEB, DC tratada com WEB 2086; PCA, DC tratada com PCA 4248; n.d., não detectado.

Ao analisarmos a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, pudemos observar que o tratamento com o antagonista WEB 2086 reduziu sua produção induzida por LPS de maneira dose-dependente (Figura 6A). O antagonista PCA 4248 (10 μ M), igualmente conferiu redução na produção de IL-10 após 24 h do LPS (Figura 6B). Na dose de 50 μ M, o antagonista WEB 2086 reduziu significativamente a expressão do RNAm de Il10 após 4 e 8 h da adição de LPS às células (Figura 6C). Este efeito de diminuição da expressão do RNAm de Il10 pelos antagonistas também foi observado após 24 h (WEB: $3.6 \pm 1.3^*$ e PCA: $4.8 \pm 2.5^*$ vs. controle mDC: 6.9 ± 2.0).

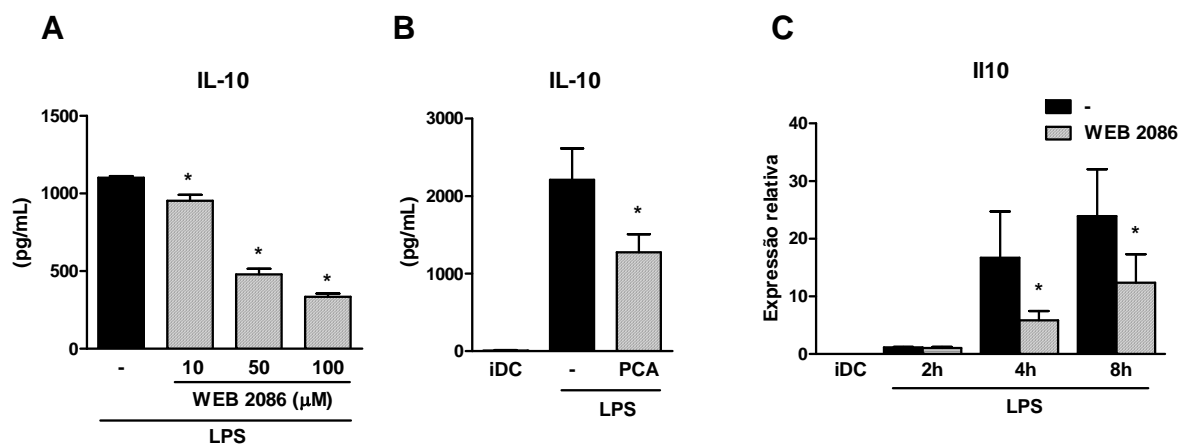


Figura 6 - O bloqueio do PAFR diminui a produção de IL-10 por mDCs. DCs foram tratadas com antagonistas do PAFR por 30 min, seguido de 1 μ g/mL de LPS por 24 h. **(A)** Curva dose-resposta do bloqueio de PAFR por WEB 2086; **(B)** produção de IL-10 por DCs tratadas com PCA 4248 (10 μ M); **(C)** RT-qPCR para a expressão do RNAm para IL-10 em DCs tratadas com WEB 2086 (50 μ M) e estimuladas com LPS. A expressão do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh e calibradas pelo grupo iDC. As barras cheias correspondem às mDCs. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=5). *P<0,05 vs. mDC. iDC, DC imatura; mDC, DC madura; WEB, DC tratada com WEB 2086; PCA, DC tratada com PCA 4248.

Por sua vez, o agonista cPAF não induziu alterações na produção de IL-12p40 (Figura 7A). Porém, na dose de 10^{-7} M, o cPAF aumentou a produção de IL-10 (Figura 7B), dados confirmados por expressão de RNAm (Figura 7C). Estes resultados sugerem que o PAF gerado na maturação das DCs, ao agir no seu receptor, potencializa a produção da IL-10 induzida pelo LPS, mas não afeta a de IL-12. Na figura 7D, podemos ver que o bloqueio do PAFR pelo WEB 2086 (50 μ M), aumentou a relação IL-12/IL-10 de 1,0 para 2,1 e portanto, para um fenótipo mais pró-inflamatório. Já o agonista (cPAF 10^{-7}

M), alterou a razão de 1,0 para 0,3, indicando que a adição de PAF exógeno pode alterar o perfil da DC para um fenótipo mais tolerogênico.

Nenhum dos tratamentos, tanto por antagonistas como pelo agonista, foram tóxicos para as DCs. Ensaios de MTT mostraram viabilidade >98% para todas as doses utilizadas.

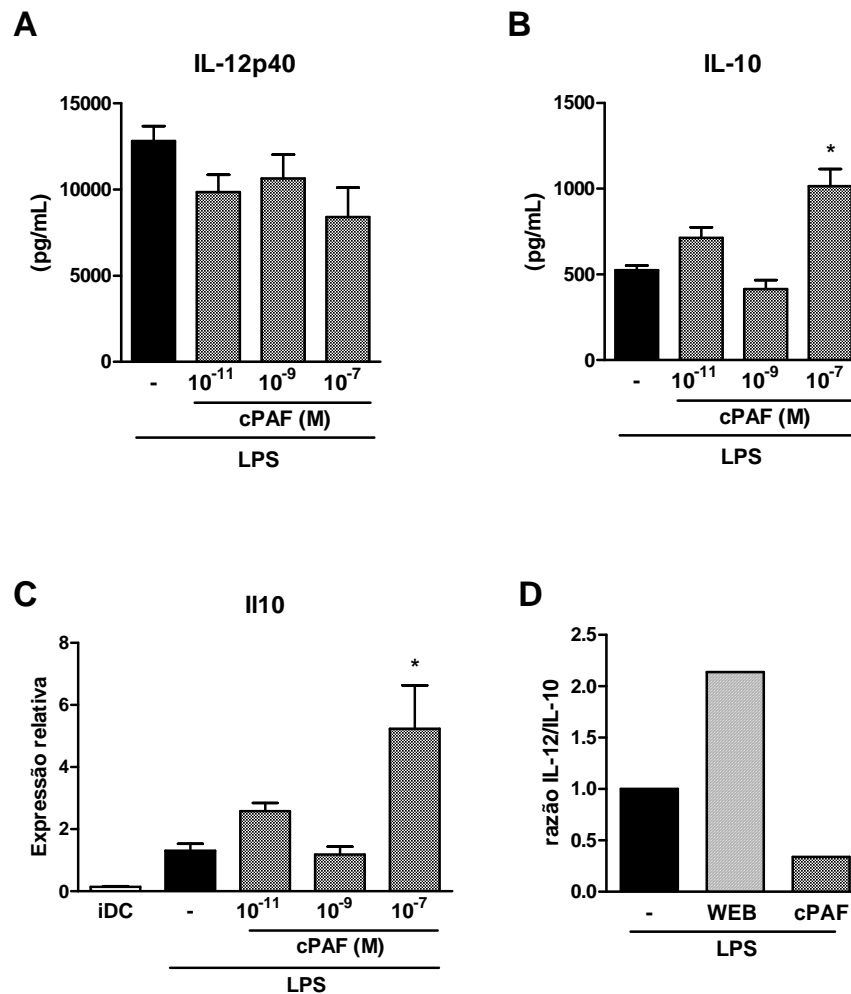


Figura 7 - Efeito da adição de cPAF na produção das citocinas IL-10e IL-12p40 por DCs. O agonista do PAFR cPAF foi dado à DCs simultaneamente ao LPS por 24 h. **(A)** Curva dose-resposta de cPAF na produção de IL-12-p40 por mDCs; **(B)** curva dose-resposta na produção de IL-10 por mDCs; **(C)** RT-qPCR para a expressão do RNA m para IL-10 normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh em DCs tratadas com cPAF; **(D)** razão IL-12/IL-10 da produção de citocinas por DCs tratadas com WEB 2086 (50 μ M) ou cPAF (10⁻⁷ M). As barras cheias correspondem às mDCs. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=5). *P<0,05 vs. mDC. iDC, DC imatura; mDC, DC madura; WEB, DC tratada com WEB 2086; cPAF, DC tratada com cPAF.

4.3 O eixo COX-2/PGE₂ na ativação do PAFR em DCs

Foi relatado que a produção de IL-10 estimulada por LPS é dependente de Prostaglandina E2 (PGE₂) em macrófagos (98) e DCs (75). A PGE₂ é um importante fator de regulação celular e induz supressão através dos receptores EP2 e EP4, cuja ativação aumenta a concentração de AMPc nas células (99). Resultados anteriores do nosso grupo indicaram que a ativação do PAFR em macrófagos induz um fenótipo regulador (46), o que pode ser devido à sua capacidade de potencializar a produção de IL-10 ou PGE₂. Como em DCs nós vimos que a produção de IL-10 induzida pelo LPS foi regulada pela ativação do PAFR, fomos investigar se a esta ativação também estaria regulando a produção da PGE₂.

Como descrito anteriormente, as DCs foram tratadas com antagonista ou agonista do PAFR, e estimuladas com LPS por 24 h. Como controle, DCs foram tratadas com inibidores da COX nimesulida (nime – 10 µM) ou indometacina (indo – 15 µM). Na figura 8A, podemos observar que o tratamento com antagonistas do PAFR reduziu de forma significativa a produção de PGE₂ induzida pelo LPS nas DCs. Já os inibidores da COX, apesar de terem bloqueado quase completamente a produção do mediador, não afetaram a produção de IL-10 pelas mDCs (Figura 8B). Por sua vez, o agonista cPAF promoveu considerável aumento na produção da PGE₂ nas doses de 10⁻⁹ e 10⁻⁷ M (Figura 8C).

O LPS induz a produção de PGE₂ através da ativação da ciclooxigenase (COX)-2, forma induzível da enzima que catalisa o passo limitante da biossíntese das prostaglandinas (100). Para determinarmos se a ativação da COX-2 estaria sendo regulada via PAFR, fomos estudar a sua expressão. A figura 8D mostra que após 24 h do LPS, a expressão da proteína COX-2 não foi alterada pelo antagonista do PAFR. No entanto, vimos que a dose de 10⁻⁷ M de cPAF regulou positivamente a sua expressão induzida por LPS.

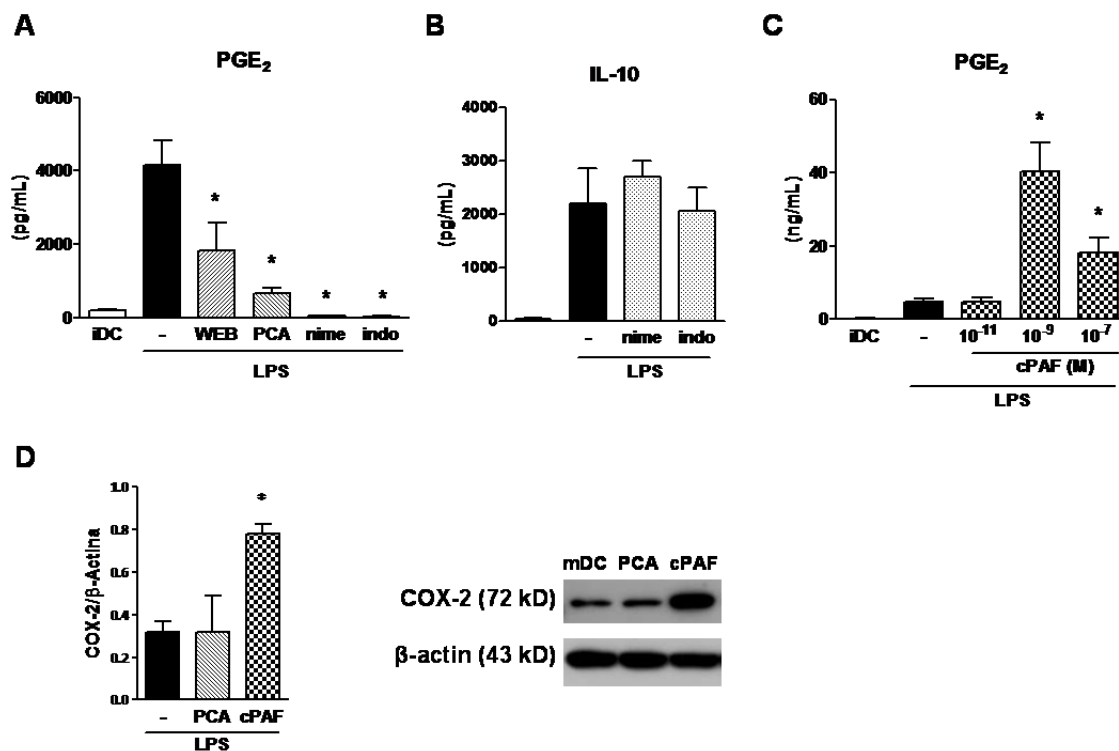


Figura 8 - Efeito de antagonistas de PAFR e do agonista cPAF na produção de PGE₂ e expressão da COX-2. DCs foram tratadas com WEB 2086 (50 μM), PCA 4248 (10 μM), ou com os inibidores da COX nimesulida (10 μM) ou indometacina (15 μM), por 30 min antes do LPS ser adicionado às culturas. O agonista cPAF (diversas concentrações) foi adicionado simultaneamente ao LPS. As análises foram realizadas após 24 h do estímulo de maturação. **(A)** Produção de PGE₂ por DCs tratadas com antagonistas de PAFR e inibidores da COX; **(B)** Produção de IL-10 por DCs tratadas com inibidores da COX; **(C)** Produção de PGE₂ por DCs tratadas com cPAF; **(D)** *Western blot* para COX-2 após tratamentos com PCA 4248 e cPAF (10⁻⁷ M). As barras cheias correspondem às mDCs. Todos os dados são mostrados como média ± SEM. (n=3). *P<0,05 vs. mDC. iDC, DC imatura; mDC, DC madura; WEB, DC tratada com WEB 2086; PCA, DC tratada com PCA 4248; nime, DC tratada com nimesulida; indo, DC tratada com indometacina; cPAF, DC tratada com cPAF.

O efeito sinérgico do cPAF e LPS na expressão da COX-2 justifica os altos níveis de PGE₂ observados nas culturas. Todavia, apesar do tratamento com antagonistas ter diminuído PGE₂, não foi possível observar diferença na expressão da COX-2 neste grupo. Como estes dados foram obtidos 24 h após estímulo com LPS, decidimos fazer uma análise temporal do eixo COX-2/PGE₂.

Na figura 9, podemos observar que até 4 h após estímulo com LPS, a PGE₂ não é detectada. Após este intervalo, sua produção é crescente atingindo um platô após 12 h e decaindo levemente após 20 h. O prévio tratamento com 10 μM do antagonista do PAFR PCA 4248 promoveu uma consistente redução na produção de PGE₂ em todos os pontos observados. Quanto à expressão do RNAm de COX2, pudemos observar que após 4 h, o

LPS induziu aumento na sua expressão relativa, atingindo um pico de expressão às 8 h do estímulo e decaindo em seguida. O tratamento com o antagonista do PAFR reduziu significativamente a expressão de COX2 em 4 e 8 h. Após 12 h, a expressão de COX2 ainda permaneceu alta, porém sem diferenças entre os grupos tratado e não-tratado.

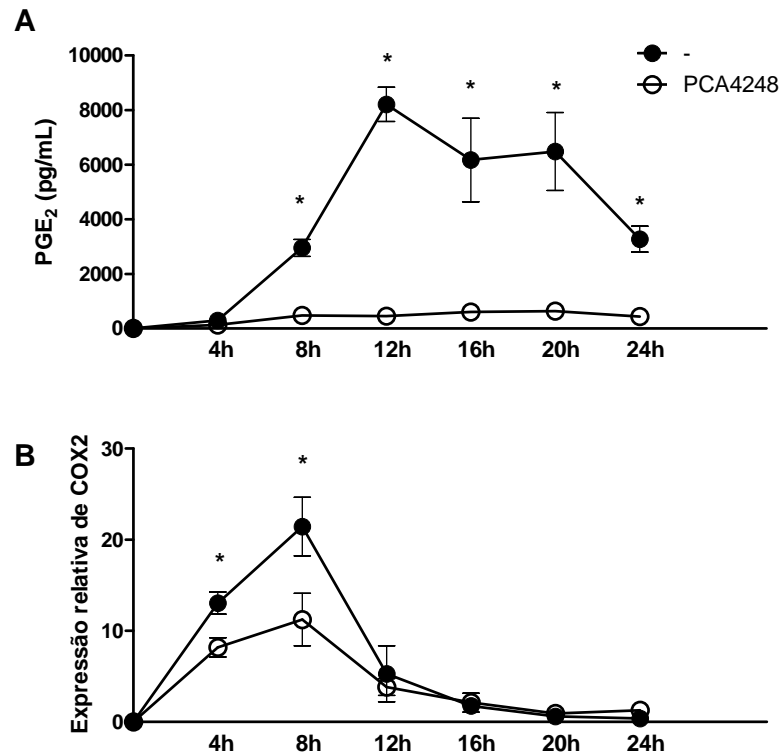


Figura 9 - Perfil temporal da produção de PGE₂ e expressão de COX2. DCs foram tratadas com PCA 4248 (10 μ M) por 30 min. 1 μ g/mL de LPS foi adicionado às culturas, e os sobrenadantes e lisados celulares foram coletados ao longo de 24 h. **(A)** A produção de PGE₂ foi determinada por ELISA; e **(B)** a expressão do RNAm para COX-2 foi normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh e determinada por RT-qPCR. Origem no eixo y referente à expressão de COX2 em iDCs. Os pontos cheios correspondem às mDCs. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=3). *P<0,05vs. mDC. mDC, DC madura; PCA, DC tratada com PCA 4248.

Como a produção da PGE₂ também depende de outras enzimas, como a PGE sintase microssomal 1 (mPGES-1 – isomerase induzível da PGE sintase microssomal), avaliamos o efeito do bloqueio do PAFR sobre a expressão desta enzima. Encontramos que a expressão do gene codificador para a mPGES-1, o Ptges, também foi induzida pelo LPS nas primeiras horas do estímulo, atingindo um pico após 8 h e decaindo nas horas subsequentes. O tratamento com o antagonista do PAFR não alterou sua expressão em nenhum dos tempos observados (Figura 10A). Como controle, investigamos a expressão

do RNAm para o *Ptges2*, gene codificador da mPGES-2, isoforma da PGE sintase constitutivamente expressa. O LPS não alterou de forma significativa sua expressão em nenhum dos pontos observados, assim como o tratamento com antagonista do PAFR (Figura 10B). Outro alvo investigado foi o EP2, receptor da PGE₂ cuja expressão é induzível e relacionada às atividades supressoras da PGE₂ através do aumento dos níveis de AMPc. Observamos que a expressão do seu RNAm é regulada negativamente pelo LPS e que não há diferenças entre os grupos controle e tratado com PCA4248 (Figura 10C).

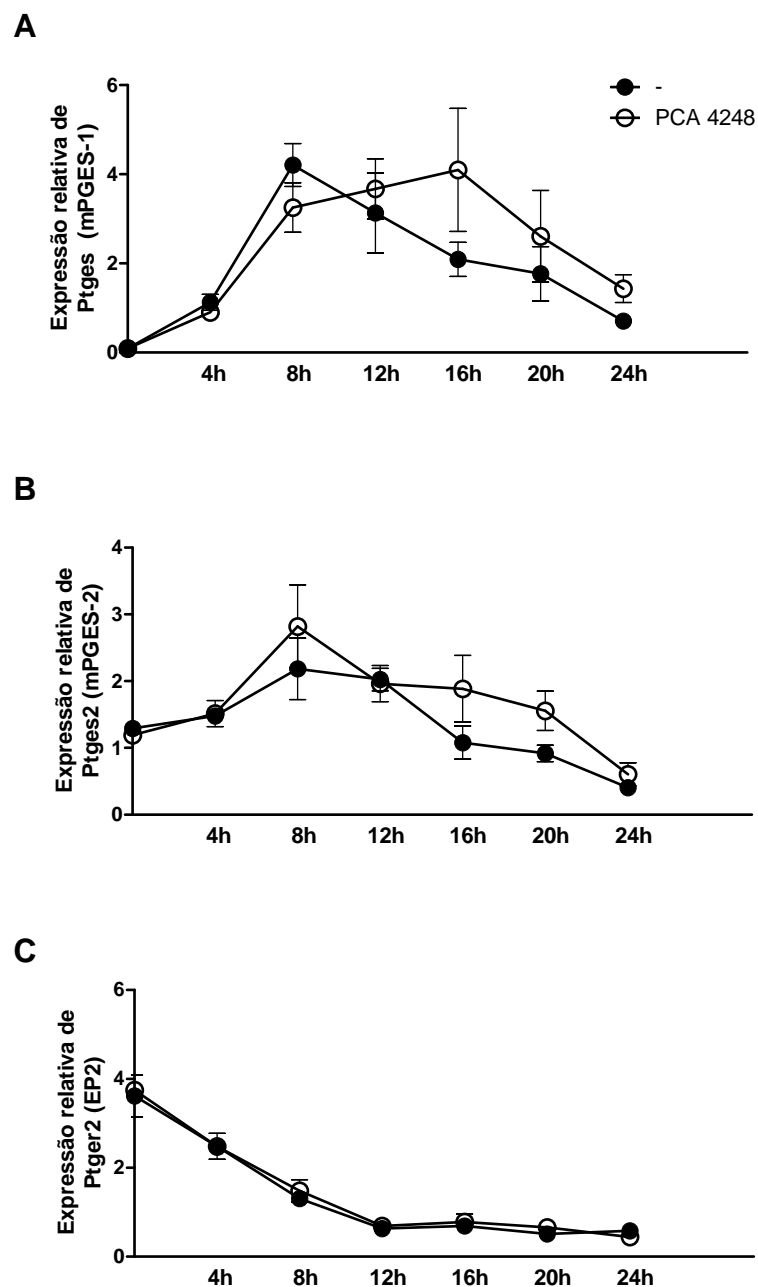


Figura 10 – Perfil temporal da expressão de mPGES-1, mPGES-2 e EP2. DCs foram tratadas com PCA 4248 (10 μ M) por 30 min. 1 μ g/mL de LPS foi adicionado às culturas e os lisados celulares foram coletados ao longo de 24 h. A expressão do RNAm foi determinada por RT-qPCRe normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh. **(A)** Expressão do Ptges (mPGES-1); **(B)** expressão do Ptges2 (mPGES-2); **(C)** expressão do Ptger2 (EP2). Origem no eixo y referente à expressão dos genes em iDCs. Os pontos cheios correspondem às mDCs. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=3). PCA, DC tratada com PCA 4248.

4.4 A ativação do PAFR na função das DCs

Os dados apresentados até o momento indicam que a maturação das DCs por LPS induz a produção de ligantes de PAFR que, ao atuarem autócrinamente nas células, potencializam a produção de IL-10 e PGE₂, favorecendo um fenótipo regulador. Já o bloqueio do receptor durante a fase de maturação da DC reverte o seu perfil, visto que a produção destes dois mediadores é diminuída e, portanto, a sua disponibilidade no microambiente da ativação fica reduzida. Nosso próximo passo foi então investigar quais as consequências do bloqueio do PAFR na função apresentadora de antígeno das DCs.

4.4.1 O bloqueio do PAFR nas DCs potencializa a sua função apresentadora de antígeno *in vitro*

Para a realização de ensaios de proliferação antígeno-específica, as DCs foram tratadas por 30 min com os antagonistas WEB 2170 (50 μ M) ou PCA 4248 (10 μ M), pulsadas com OVA (100 μ g/mL) e estimuladas com LPS. Após 24 h, as células foram extensivamente lavadas em meio fresco para a remoção da OVA livre, e co-cultivadas por 72 h com esplenócitos de camundongos DO11.10, cujos linfócitos T têm TCR específico para OVA (97). A proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ induzida por DCs tratadas com antagonistas foi maior do que a proliferação induzida pelo grupo controle, isto é, mDCs não-tratadas pulsadas com OVA (Figura 11A e B). Isto foi acompanhado de concentração aumentada de IFN- γ nos sobrenadantes das co-culturas de DCs tratadas com antagonista (Figura 11C). Já a produção de IL-2 nas co-culturas foi similar nos grupos tratado e não-tratado (Figura 11D). Citocinas de perfil Th2 como a IL-4, IL-5, e IL-13, não foram detectadas.

O bloqueio da IL-10 pelo tratamento das DCs com anticorpo bloqueador (α -IL10 – 1 μ g/mL) também aumentou a proliferação de linfócitos T, acompanhado do aumento da produção de IFN- γ (Figura 12B). O tratamento das mDCs com inibidores da COX NS-398

(10 μM), nimesulida (10 μM) ou indometacina (15 μM) potencializou a proliferação de linfócitos T, fato que reforça a ideia de que a PGE_2 produzida pelas mDCs pode, assim como a IL-10, agir de maneira autócrina/parácrina como um fator supressor celular, influenciando seu estado funcional (Tabela 3). Em conjunto, estes dados indicam que a ativação do PAFR na fase inicial de maturação das DCs contribui para a produção de IL-10 e PGE_2 que, agindo na própria célula neste breve intervalo de tempo, desencadeiam transformações de grande importância para a resposta adaptativa a ser formada em seguida.

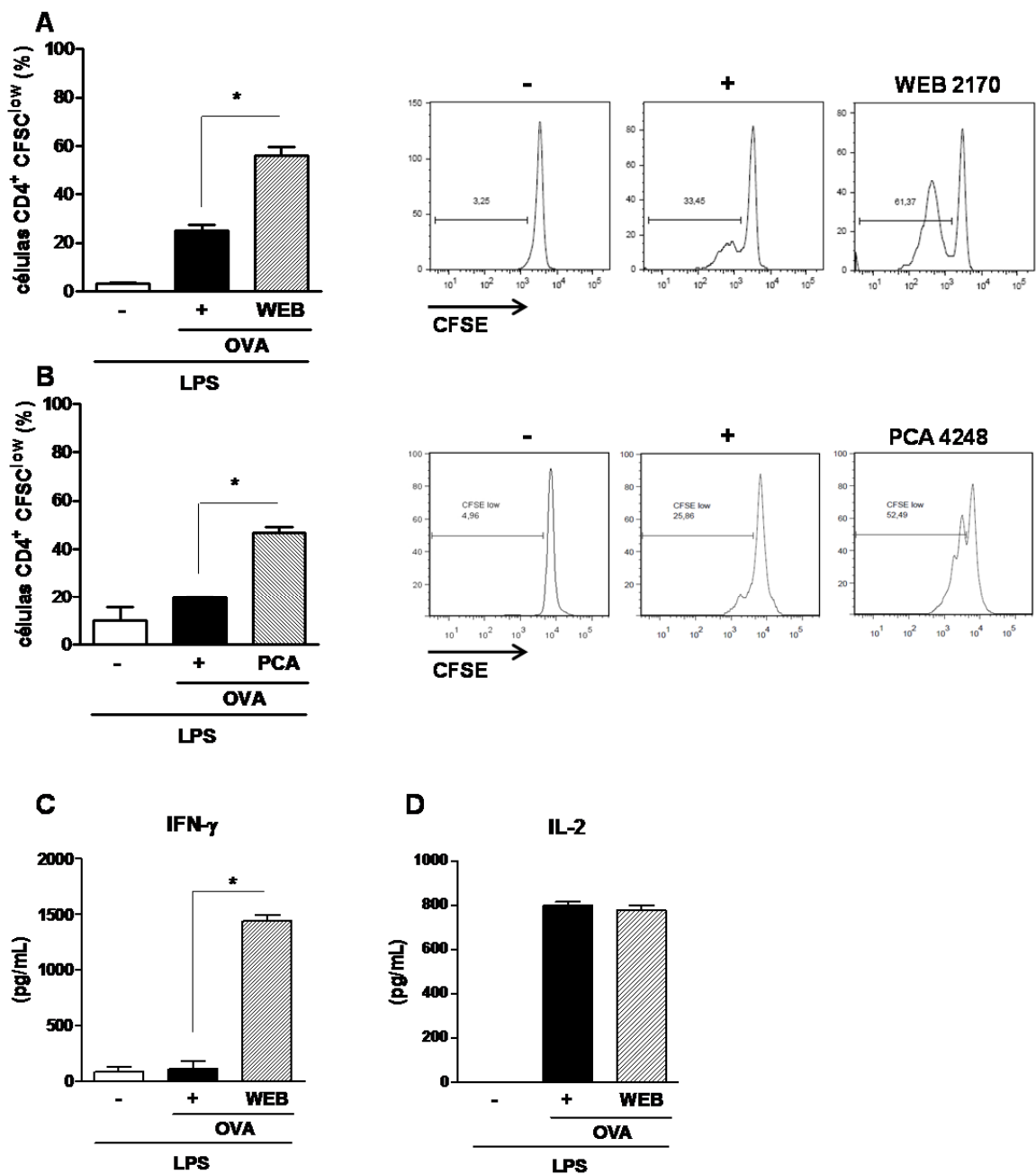


Figura 11 – DCs tratadas com antagonistas de PAFR induzem aumento na proliferação antígeno-específica de linfócitos T *in vitro*. DCs foram pulsadas com OVA (100 μ g/mL) e tratadas com **(A)** WEB 2170 (50 μ M) ou **(B)** PCA 4248 (10 μ M) 30 min antes da adição de 1 μ g/mL de LPS. Após 24 h, as células foram extensivamente lavadas e co-cultivadas com esplenócitos de camundongos DO11.10 marcados com CFSE. Após 72 h, a proliferação antígeno-específica de células CD4⁺ foi determinada por citometria de fluxo (porcentagem de população CFSE^{low}); A produção de **(C)** IFN- γ e **(D)** IL-2 após 72 h de co-cultura DCs-esplenócitos foi determinada por ELISA. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. Dados referentes a pelo menos 3 experimentos independentes com n=3. *P<0,05 vs. mDC pulsada com OVA. (-), mDC; (+), mDC pulsada com OVA; WEB, DC pulsada com OVA e tratada com WEB 2170; PCA, DC pulsada com OVA e tratada com PCA 4248.

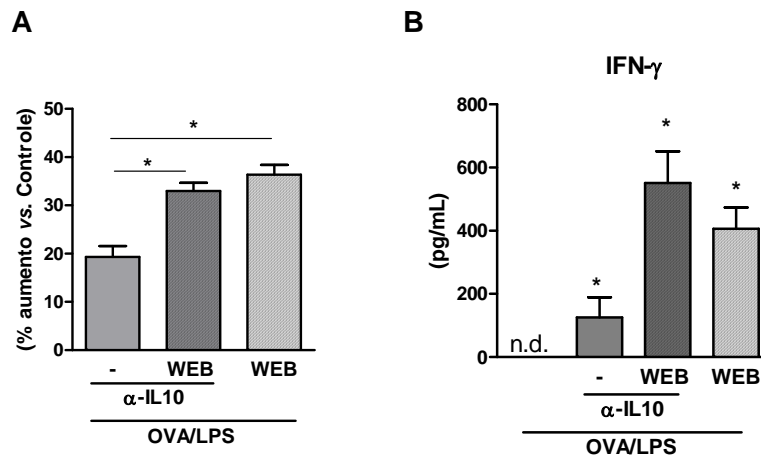


Figura 12 - DCs tratadas com anticorpo bloqueador da IL-10 induzem aumento na proliferação antígeno-específica de linfócitos T *in vitro*. DCs foram pulsadas com OVA (100 μ g/mL) e WEB 2086 (50 μ M) 30 min antes da adição de 1 μ g/mL de LPS. Após 1 h o anticorpo bloqueador de IL-10 (1 μ g/mL) foi adicionado às culturas. Após 24 h, as células foram extensivamente lavadas e co-cultivadas com esplenócitos de camundongos DO11.10 marcados com CFSE. A proliferação antígeno-específica de células T CD4⁺ foi determinada por citometria de fluxo (porcentagem de população CFSE^{low}) após 72 h de co-cultura. **(A)** porcentagem de aumento de proliferação de células CD4⁺CFSE^{low} em relação ao controle, induzida por DCs tratadas com anticorpo bloqueador de IL-10 e/ou WEB 2086; **(B)** produção de IFN- γ após 72 h de co-cultura DCs-esplenócitos. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=3). *P<0,05 vs. controle mDC pulsada com OVA. WEB, DC pulsada com OVA e tratada com WEB 2086.

Tabela 3. Efeito de inibidores da COX na proliferação antígeno-específica

Tratamento	CD4 ⁺ CFSE ^{low}	IFN- γ
	(% aumento vs. controle)	(aumento de produção vs. controle)
NS-398	39,7 \pm 3,1 *	61,9 \pm 33,9
nimesulida	31,0 \pm 4,3 *	64,9 \pm 42,1
indometacina	42,8 \pm 6,0 *	90,5 \pm 33,6

Dados: médias \pm SEM (n = 3). * P< 0,05 vs. controle mDC pulsadas com OVA.

4.4.2 Transferência de DCs – bloqueio do PAFR em DCs potencializa a resposta imune *in vivo*

Para avaliarmos se o bloqueio do PAFR em DCs *in vitro* também aumentaria sua função apresentadora de antígeno *in vivo*, desenvolvemos um protocolo de transferência de mDCs pulsadas com OVA, para camundongos *naïve*. Brevemente, as DCs foram diferenciadas por seis dias com GM-CSF como previamente descrito, coletadas, pulsadas

com OVA e tratadas com o antagonista do PAFR WEB 2086. Após 30 minutos, LPS foi adicionado para a indução de maturação. No 7º dia, as células foram extensivamente lavadas para a remoção da OVA residual livre no sobrenadante. As DCs foram contadas e re-suspendidas em solução salina e $3-5 \times 10^6$ células foram transferidas para camundongos *naïve* via intraperitoneal. Como controle, um grupo de animais foi imunizado com OVA pela mesma via. Após sete dias, o mesmo procedimento foi repetido e no 14º dia os animais foram submetidos à eutanásia. O sangue e o baço foram coletados para análises (Figura 13).

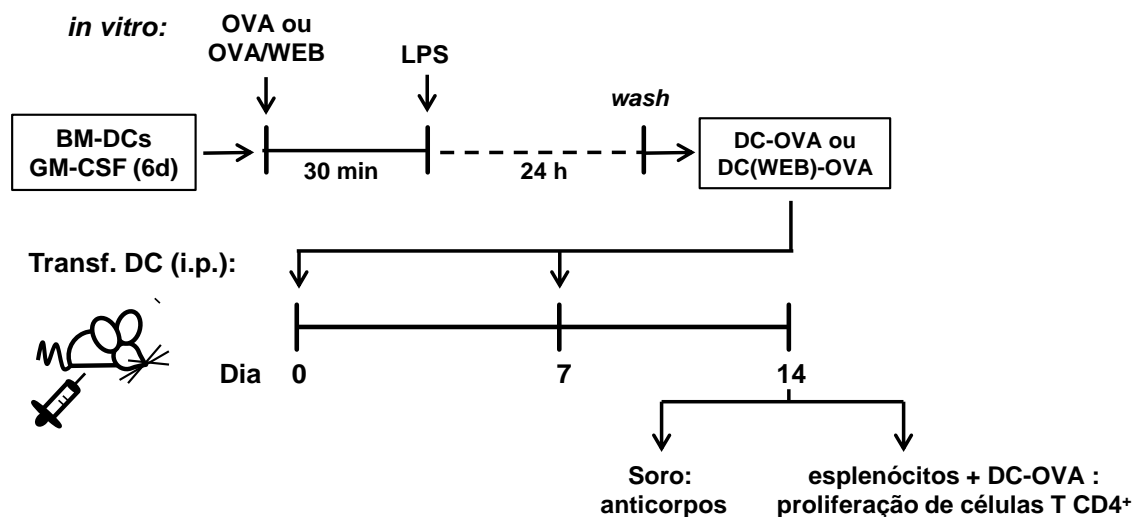


Figura 13 – Protocolo de diferenciação, tratamento, e transferência de DCs pulsadas com OVA para camundongos naïve. DCs foram diferenciadas *in vitro* com GM-CSF (20 ng/mL). No 6º dia de diferenciação as células foram pulsadas com OVA (100 µg/mL), tratadas com antagonista do PAFR WEB 2086 (50 µM) por 30 min e estimuladas com LPS (1 µg/mL) *overnight*. As células foram lavadas, re-suspendidas em salina e transferidas para camundongos *naïve* via injeção intraperitoneal. Após sete dias o mesmo protocolo foi repetido. Ao final de quatorze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia para análise dos anticorpos presentes no soro e proliferação antígeno-específica de linfócitos T.

Na figura 15A, podemos observar que o protocolo de transferência de DCs pulsadas com OVA (DC-OVA) foi satisfatório visto que induziu altos níveis do anticorpo IgG2a OVA-específico, detectados no soro dos animais. O tratamento das DCs-OVA com WEB 2086 (DC(WEB)-OVA) não alterou significativamente os níveis deste anticorpo.

Os baços destes camundongos foram processados e os esplenócitos foram marcados com CFSE e co-cultivados com novas mDCs diferenciadas *in vitro* e pulsadas com OVA. Após 72 h, determinamos a proliferação antígeno-específica de linfócitos *ex*

in vivo. Foi observado que os linfócitos T CD4⁺ do grupo de animais que recebeu transferência de DCs pulsadas com OVA proliferaram quando expostas a DC-OVA *in vitro*, e os linfócitos do grupo que recebeu transferência de DC-OVA que haviam sido tratadas com o antagonista (DC(WEB)-OVA) proliferaram significativamente mais. (Figura 14B). Isto indica que o bloqueio do PAFR em DCs potencializa sua capacidade de indução de proliferação de linfócitos T CD4⁺ também *in vivo*.

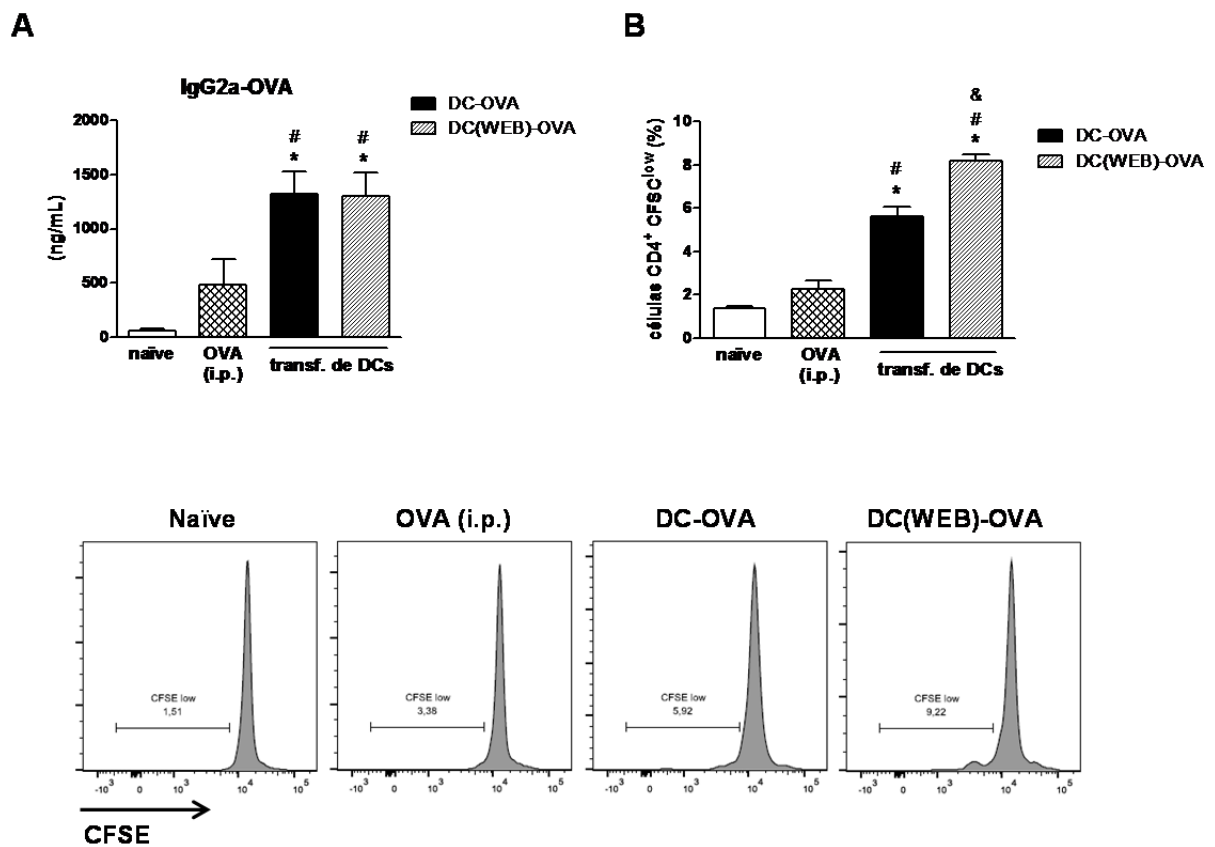


Figura 14 – Efeito da transferência de DCs pulsadas com OVA e tratadas com antagonista de PAFR para animais *naïve*. DCs foram tratadas com WEB 2086 (50 μ M), pulsadas com OVA (100 μ g/mL), maturadas *in vitro*, e transferidas via i.p. para camundongos *naïve*. Após sete dias, uma nova transferência foi realizada. Ao fim de quatorze dias, o soro e o baço dos camundongos imunizados foram coletados para análise. **(A)** Produção do anticorpo IgG2a OVA-específico no soro; **(B)** proliferação de células T CD4⁺provenientes do baço de camundongos que receberam transferência da DCs pulsadas com OVA e co-cultivadas com mDCs diferenciadas e pulsadas com OVA *in vitro*. Abaixo, histogramas ilustrativos. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=5). P<0,05 (* vs. grupo naïve; # vs. grupo OVA i.p.; & vs. grupo DC-OVA).

4.5 O bloqueio do PAFR potencializa a Resposta Imune *in vivo*

Em seguida, fomos investigar se a adição do antagonista de PAFR à um antígeno num protocolo de imunização experimental teria um efeito adjuvante na resposta imune. Para isto, inoculamos OVA (5 µg), subcutaneamente, em camundongos *naïve*. A um dos grupos, foi adicionado OVA junto com o antagonista WEB 2170 (5 mg/kg). Após sete dias, as inoculações foram repetidas, e ao final de 14 dias, os animais foram submetidos à eutanásia. Foram coletados o sangue, baço, e linfonodos inguinais (drenantes) (Figura 15).

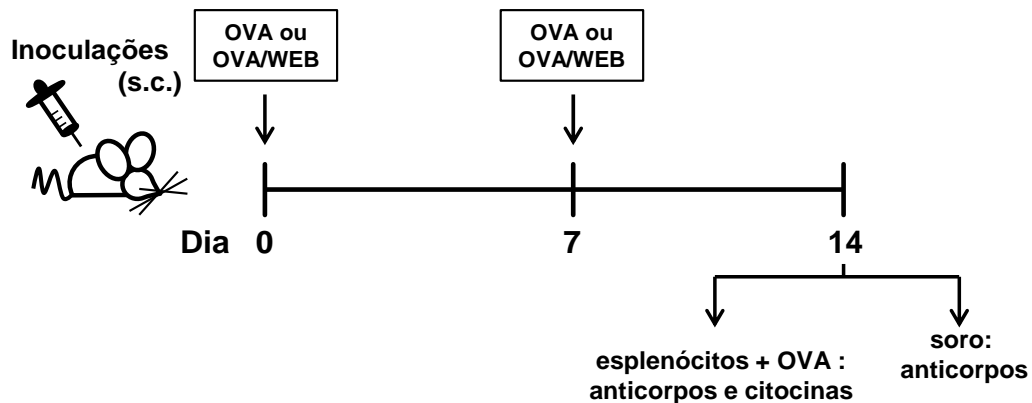


Figura 15 - Protocolo imunização de camundongos *naïve*. Camundongos *naïve* foram imunizados nos dias 0 e 7 com OVA (5 µg) ou OVA (5µg)/WEB 2170 (5 mg/kg) em salina. Após sete dias o mesmo protocolo foi repetido. Ao final de quatorze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia, seguido de análises.

Foi observado que os linfonodos drenantes dos animais que receberam OVA combinada ao WEB 2170 (OVA/WEB) eram consistentemente maiores e continham maior número de células do que os dos animais que receberam apenas OVA ($8,8 \pm 0,5 \times 10^6$ * vs. $5,7 \pm 0,7 \times 10^6$ células, respectivamente). Quanto à concentração de anticorpos IgG1 e IgG2a OVA-específicos, observamos níveis de produção de IgG1 semelhante nos 2 grupos, mas a produção de IgG2a pelo grupo “OVA/WEB” foi muito maior (cerca de 30 vezes a produção do grupo “OVA”) (Figuras 16A e B, respectivamente). Para confirmar este resultado, os esplenócitos totais dos camundongos imunizados foram submetidos a uma reação de RT-qPCR para determinar a expressão de transcritos para IgG2a pós-

switch de classe. Novamente, foi observado maior expressão de IgG2a pós-*switch* no grupo OVA/WEB (Figura 16C).

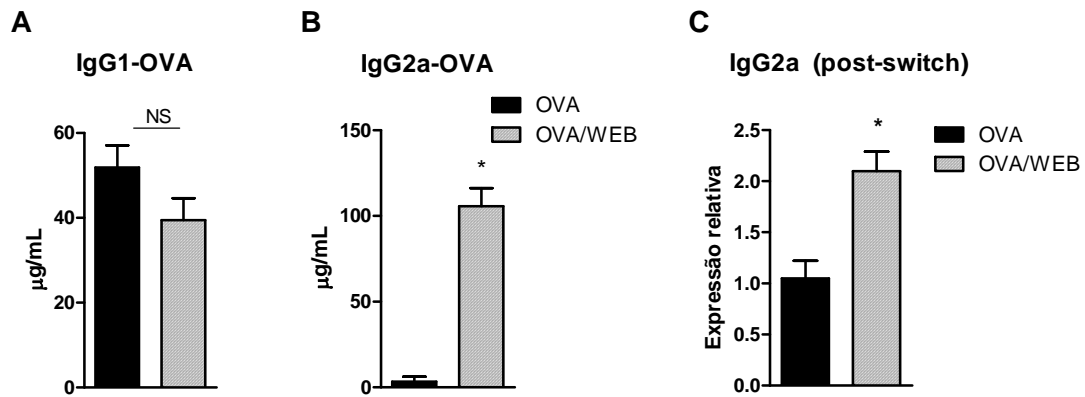


Figura 16 – O antagonista de PAFR potencializa a produção de IgG2a por camundongos imunizados com OVA. Camundongos *naïve* foram imunizados nos dias 0 e 7 com OVA (5 µg) ou OVA (5µg)/WEB 2170 (5 mg/kg) em salina. Após sete dias o mesmo protocolo foi repetido. Ao final de quatorze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia. **(A)** Os anticorpos IgG1 e IgG2a OVA-específicos foram analisado no soro dos camundongos imunizados por ELISA; **(B)** a expressão dos transcritos de IgG2a (pós-*switch*) nos esplenócitos totais dos camundongos foi analisada por RT-qPCR. A expressão do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno Gapdh. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=5). * P < 0,05 vs. grupo OVA.

Os esplenócitos dos animais imunizados (10^6 células/mL) foram re-estimulados *ex vivo* com OVA (100 µg/mL). Após 3 dias, analisamos a concentração de anticorpos e citocinas no sobrenadante das culturas. O estímulo *ex vivo* com OVA aumentou a secreção de todos os isotipos de anticorpos analisados (Tabela 4). À semelhança do observado no soro dos camundongos, os níveis de IgG1 detectados nos sobrenadantes de esplenócitos re-estimulados com OVA foi semelhante entre os grupos “OVA” e “OVA-WEB”. Já os isotipos IgG2a, IgG3 e IgE foram encontrados em maior quantidade nos sobrenadantes do grupo “OVA-WEB” (Figura 17A).

A análise das citocinas presentes nos sobrenadantes indicou que os esplenócitos do grupo “OVA-WEB” produziram níveis de IFN- γ e IL-4 mais elevados do que os do grupo “OVA”. A concentração de IL-2 observada nos sobrenadantes de esplenócitos do grupo “OVA-WEB” re-estimulados com OVA foi menor que no grupo não tratado, o que sugere que a citocina possa ter sido consumida por linfócitos em proliferação (Figura

17B). Estes resultados indicam que a presença do antagonista de PAFR durante a imunização potencializa a resposta adaptativa, particularmente a de perfil Th1.

Tabela 4. Produção de anticorpos por esplenócitos de camundongos imunizados com OVA ou OVA/WEB e re-estimulados *ex vivo* com OVA#

isotipo	estímulo <i>ex vivo</i>	grupo	
		OVA	OVA/WEB
IgG1	-	25,8 ± 2,9	40,9 ± 13,9
	OVA	51,9 ± 6,8*	58,8 ± 10,5*
IgG2a	-	12,5 ± 1,1	20,4 ± 7,2
	OVA	23,0 ± 2,0*	28,6 ± 6,4*
IgG2b	-	23,9 ± 1,5	35,3 ± 8,4
	OVA	69,0 ± 12,8*	80,9 ± 15,0*
IgG3	-	15,8 ± 1,3	24,6 ± 7,2
	OVA	29,8 ± 2,4*	36,3 ± 6,3*
IgE	-	11,6 ± 1,4	27,4 ± 10,6
	OVA	28,7 ± 3,4*	39,3 ± 9,2*

OVA (100 µg/mL) ou salina foram dados aos esplenócitos dos camundongos imunizados. Após 72 h a produção de anticorpos foi analisada.

Os valores estão expressos em mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Os dados são mostrados como médias ± SEM (n=5). *P < 0,05 vs. salina.

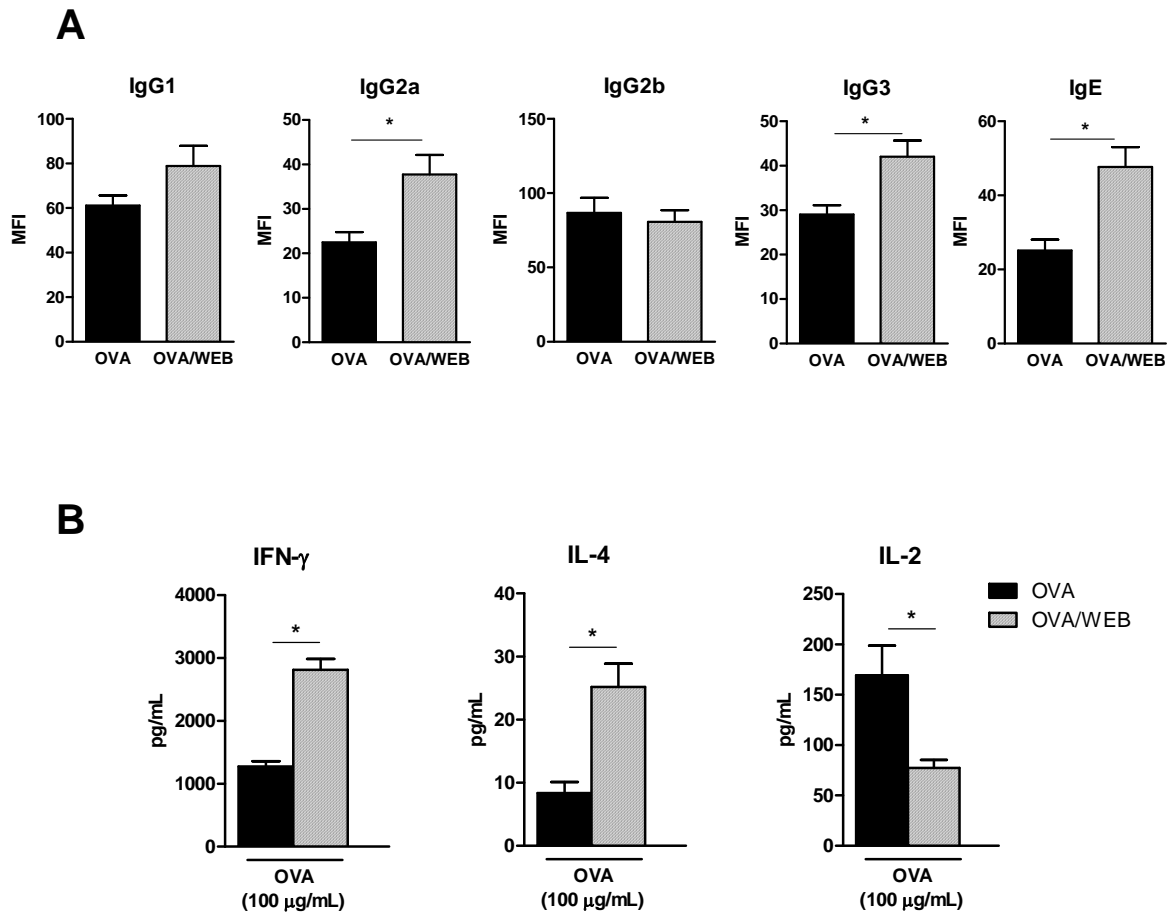


Figura 17 - Produção de anticorpos e citocinas *ex vivo* por esplenócitos de camundongos imunizados com OVA. Camundongos *naïve* foram imunizados nos dias 0 e 7 com OVA (5 µg) ou OVA (5µg)/WEB 2170 (5 mg/kg) em salina. Após sete dias o mesmo protocolo foi repetido. Ao final de quatorze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia. Os baços dos animais foram processados e esplenócitos foram re-estimulados *ex vivo* com OVA (100 µg/mL). Após 72 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados quanto à produção de anticorpos e citocinas. **(A)** A produção dos anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE totais foi analisada por CBA. Foram realizados *gates* em eventos positivos para cada isotipo testado e os resultados foram dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI). **(B)** A produção das citocinas IFN-γ e IL-2 foi determinada por ELISA. Todos os dados são mostrados como média ± SEM. (n=5). * P < 0,05.

A fim de investigar se o antagonista do PAFR afetaria respostas imunes já direcionadas para perfil Th1 ou Th2, imunizamos os animais com OVA ou OVA/WEB combinados com Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou com hidróxido de alumínio (alum), respectivamente. No soro dos animais imunizados com OVA-alum, não foi detectada a presença de anticorpo IgG2a OVA-específico e a produção de IgG1 OVA-específica foi semelhante no grupo tratado e não tratado com o antagonista (Figura 18A). Já os animais imunizados com OVA-CFA produziram IgG1 e IgG2a, e o tratamento com WEB2170 aumentou significativamente a produção dos dois isotipos (Figura 18B).

Adicionalmente, analisamos a porcentagem de células CD4⁺ que expressam o marcador de células T reguladoras FoxP3 no baço dos camundongos por citometria de fluxo. Foi observado que os baços dos animais imunizados com OVA-CFA juntamente com o antagonista de PAFR apresentavam expressão diminuída do marcador (Figura 18C). Assim, pode-se especular que o antagonista potencializa a resposta imune por reduzir a população Treg sistêmica do animal. Em conjunto, estes resultados sugerem que, quando a resposta imune já está direcionada para Th2, a adição do antagonista não produz nenhum efeito, enquanto que a resposta já direcionada para Th1 é potencializada pelo antagonista do PAFR.

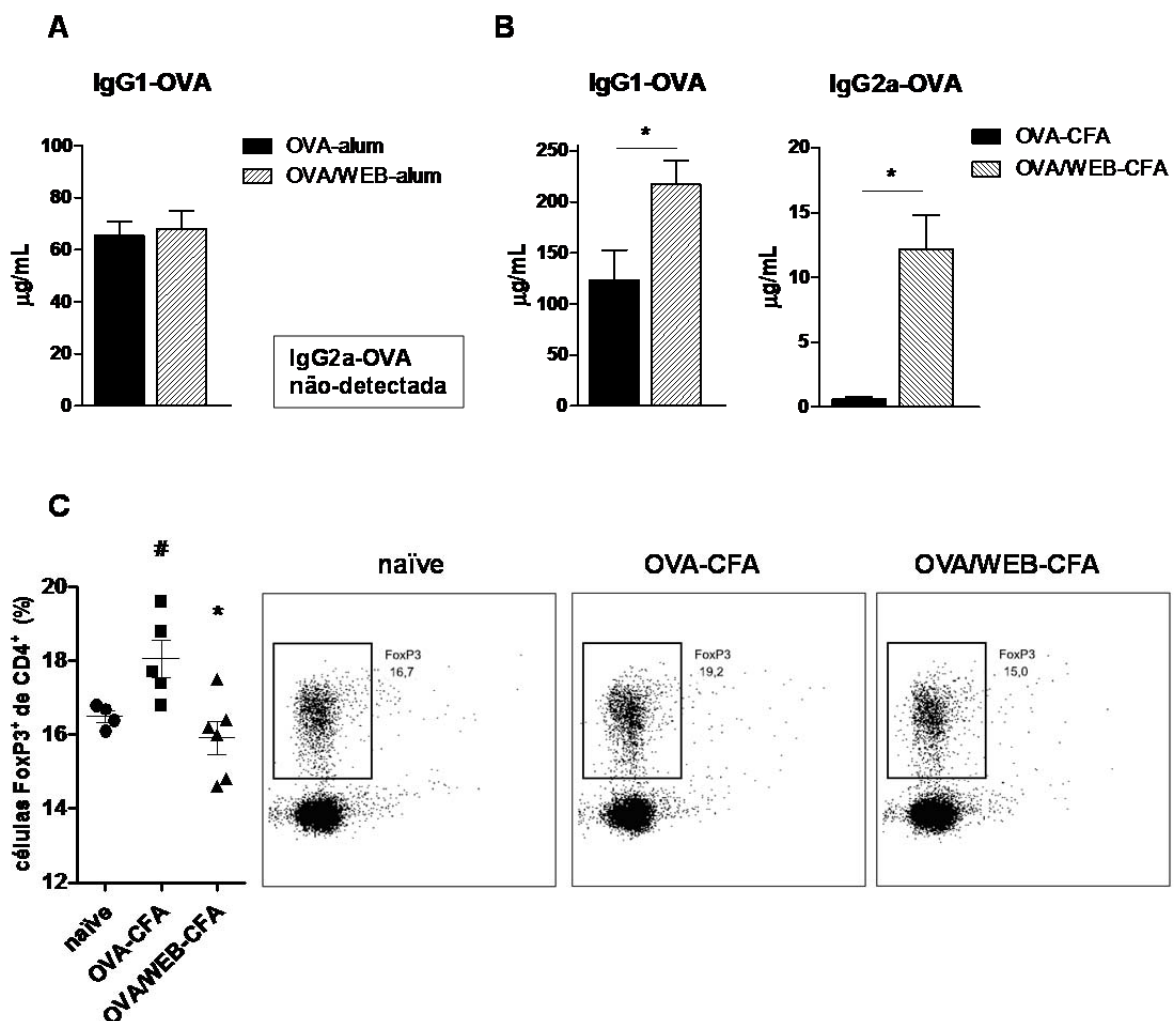


Figura 18 - O antagonista de PAFR associado à adjuvante completo de Freund potencializa a produção de anticorpos e reduz a população de células Treg no baço de animais imunizados. Camundongos naïve foram imunizados nos dias 0 e 7 com OVA (5 μg) ou OVA (5 μg)/WEB 2170 (5 mg/kg)

em adjuvante Th1 (Adjuvante Completo de Freund – CFA) ou adjuvante Th2 (hidróxido de alumínio – alum). Após sete dias o mesmo protocolo foi repetido. Ao final de quatorze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia. Os anticorpos IgG1 e IgG2a OVA-específicos foram analisado no soro dos camundongos imunizados com **(A)** OVA-alum e **(B)** OVA-CFA por ELISA. **(C)** A população CD4⁺FoxP3⁺ no baço dos camundongos imunizados com OVA-CFA foi determinada por citometria de fluxo. Todos os dados são mostrados como média \pm SEM. (n=5). P < 0,05 (* vs. grupo OVA-CFA; #vs. grupo naïve).

Na primeira fase deste trabalho, examinamos o efeito da ativação do PAFR no fenótipo das DCs derivadas de medula óssea. Inicialmente, estudamos a expressão do PAFR nas DCs e encontramos que iDCs e mDCs expressam níveis semelhantes de PAFR na membrana extracelular e de RNAm após 24 h do estímulo de LPS. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Sozzani et al. (1997) (53) e Angeli et al. (2004) (101), que reportaram expressão do PAFR em DCs derivadas de monócitos humanos e em DCs derivadas de medula óssea de camundongos, respectivamente. Após 48 h da adição do LPS às culturas, no entanto, observamos que a expressão do gene codificante do PAFR (*Ptarf*) foi reduzida. Estes dados estão de acordo com os observados por Dichmann et al. (2000) (54), que reportaram expressão diminuída do PAFR em DCs humanas após 48 h, e expressão não detectável do receptor após 96 h do estímulo de LPS. Como a maior parte das nossas observações foi feita nas primeiras 24 h da maturação das DCs por LPS, a expressão do PAFR foi considerada equivalente em iDCs e mDCs.

Quanto à capacidade das DCs produzirem PAF, a liso-PAFAT é enzima responsável pela conversão de liso-PAF (produto da clivagem do fosfolipídio de membrana pela cPLA₂) em PAF pela via do remodelamento (102). Nossos resultados mostram que o LPS aumenta a expressão da liso-PAFAT em DCs murinas, o que sugere que estas células têm potencial de produzir PAF quando estimuladas com LPS. Isto foi confirmado com um ensaio que detecta ligantes de PAFR no extrato celular e no sobrenadante da cultura. Este método indireto utiliza células transduzidas com o gene do PAFR (*KBP*), as quais produzem IL-8 quando o receptor é ativado (96). Vimos que as mDCs produzem ligantes do receptor já nos primeiros 30 min do estímulo com LPS. É digno de nota que, embora em níveis baixos, as iDCs em cultura já produzem ligantes do PAFR mesmo sem estímulo, e esta produção é aumentada com o estímulo de maturação.

A pergunta seguinte foi se o PAF endógeno, ao agir de maneira autócrina ou parácrina nas DCs, influenciaria sua maturação e fenótipo. Para isto, investigamos o efeito do tratamento das DCs com os antagonistas seletivos do receptor do PAFR, WEB 2170 (30), WEB 2086 (29), ou PCA 4248 (94), antes do LPS. Nossos resultados indicaram que o PAF, gerado endogenamente, não influenciou a expressão dos marcadores de maturação CD40, CD80, CD86, MHC II, e CCR7. Entretanto, como o PAF gerado poderia estar sendo degradado pelas acetil-hidrolases presentes no soro do meio de cultura, fizemos ainda um grupo ao qual foi adicionado, junto ao LPS, o composto

metilcarbamil-PAF (PAF sintético resistente à hidrolases). Este PAF exogenamente adicionado também não modificou a expressão de MHCII, das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86.

Apesar do PAF não afetar a maturação das DCs, ele foi capaz de modular o seu fenótipo. O bloqueio do PAFR promoveu consistente redução na produção de IL-10 sem alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Quando analisamos o clássico e preditivo balanço IL-12/IL-10, ficou claro que a ativação do PAFR contribui para o desenvolvimento de um perfil anti-inflamatório. Isto sugere que a ativação do PAFR por ligantes endógenos nas DCs contribui para regular o seu fenótipo após maturação.

A IL-10 é bem conhecida por inibir doenças inflamatórias, agindo em diferentes níveis da resposta imune (103). Tanto DCs quanto macrófagos produzem esta citocina ao serem estimulados por ligantes de TLR4 (103) e em geral, é bem aceito que a indução da IL-10 depende da ativação transcricional de CREB. Uma das vias de ativação da CREB é pela sinalização via PGE₂/receptores EP/AMPC/PKA, que já foi estudada tanto em macrófagos (98, 104) como em DCs, relatada por Harizi et al. (2002) (75). Diferentemente de Harizi et al., os nossos resultados mostram que a produção da IL-10 não é dependente de prostaglandinas, já que DCs tratadas com inibidores da ciclooxigenase, enzima responsável pela síntese de prostaglandinas, produziram a mesma quantidade de IL-10 que as DCs não tratadas. Esta diferença de resultados pode ser devida a diferenças no protocolo de diferenciação das BM-DCs utilizado. O protocolo, de Harizi et al., incluiu a adição de IL-4 ao meio de cultura durante o período de diferenciação das DCs e no nosso não adicionamos IL-4. Labeur et al. (1999) (105), relataram que diferentes protocolos de diferenciação geram diferentes populações de DCs. Segundo os autores, a adição de IL-4 ao GM-CSF durante o processo de diferenciação faz com que as DCs resultantes apresentem um fenótipo com características de maturação intermediária, o que pode acarretar distintos efeitos na função das DCs. Já Whittaker et al. (2000) (106), em um modelo de DCs humanas diferenciadas a partir de monócitos tratados com GM-CSF/IL-4 e maturadas com CD40L/IFN- γ obtiveram um resultado semelhante ao nosso, no qual inibidores da COX apesar de bloquear a produção de PGE₂, não interfeririam com a produção de IL-10.

Em seguida, fomos investigar a participação do PAF na produção da PGE₂, importante agente modulador na biologia das DCs (107). A análise temporal da produção da PGE₂ e da expressão das enzimas responsáveis pela sua síntese mostrou

que o LPS induz a transcrição do gene da enzima induzível COX2 nas DCs logo nas primeiras horas de ativação, com pico de expressão às 8 h e redução às 24h. A produção de PGE₂, por sua vez, foi identificada a partir de 8 h do estímulo de maturação, com pico de produção atingido após 12 h, que foi sustentado até 24 h após a adição do LPS, quando ainda era bem elevado. O bloqueio do PAFR claramente reduziu a produção de PGE₂ em todos os intervalos observados, e a expressão de COX2 principalmente após 4 e 8 h do LPS.

A COX é a enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico no intermediário instável PGH₂, que pode ser convertido em diversos prostanóides por diferentes sintases. A conversão de PGH₂ em PGE₂ é feita pelas PGE sintases cPGES (PGE sintase citosólica) e mPGES-1 e 2 (PGE sintases ligadas à membrana). A mPGES-1, é a isomerase induzível da enzima, e as outras duas são expressas constitutivamente. Nos entanto, das enzimas constitutivas, apenas a mPGES-2 converte PGH₂ produzido pela COX-2 (108). Fomos então investigar se a expressão das enzimas também estaria sendo afetada pela ativação do PAFR nas mDCs. Encontramos que o LPS aumentou a expressão da mPGES-1 mas ao contrário do observado na expressão da COX-2, a ativação desta enzima foi independente da sinalização via PAFR. Já a expressão da mPGES-2 não foi alterada pelo LPS e nem pelo tratamento com o antagonista, sugerindo que a PGE₂ formada pela ativação da COX-2 não conta com a participação desta isomerase.

A PGE₂ induz supressão através da sinalização, principalmente, dos seus receptores EP2 e EP4, que são receptores acoplados à proteína G e, quando ativados, induzem aumento de AMPc nas células (99, 109, 110). Quando medimos a expressão de EP2 nas DCs observamos redução de sua expressão ao longo do tempo, após o LPS. Esta regulação negativa da sua expressão não parece ter sido por conta da sua internalização induzida pelo agonista, visto que a expressão do EP2 já se encontrava diminuída após 4 h do LPS, quando a produção de PGE₂ ainda era baixa. O antagonista de PAFR não mudou este perfil de expressão. Dessa forma, a sinalização via PAFR aumentou a concentração dos níveis de PGE₂ intracelulares pela indução da expressão do gene para COX2 logo após estímulo com LPS, de forma independente da mPGES-1/mPGES-2 ou da ativação do receptor EP2.

A ativação autócrina do PAFR pelo PAF gerado durante a sinalização via TLR4 induziu uma alta e elevada produção de PGE₂, a qual pode estabilizar as DCs em um fenótipo supressor através de um mecanismo de retroalimentação positiva, no qual a

PGE₂ formada induz COX-2 que por sua vez, induz maior produção de PGE₂, como sugerido por Obermajer et al. (2011) (111). Já a sinalização conjunta dos dois receptores promovida pelo tratamento concomitante com cPAF e LPS, sugere que possa ocorrer algum tipo de interação entre o PAFR e o TLR4 para potencializar a produção de IL-10 e de PGE₂. Uma possibilidade é a de que os dois receptores estejam sendo recrutados para o mesmo *lipid raft*, o que acarretaria na amplificação da sinalização. Nosso grupo já relatou este tipo de interação do PAFR com o receptor *scavenger* CD36 em macrófagos estimulados com oxLDL. O estudo em questão mostrou que a co-localização dos dois receptores no mesmo *lipid raft* é necessária para a produção de IL-10 e que a desestabilização dos *lipid rafts* inibe a produção desta citocina em macrófagos estimulados com oxLDL. (44).

A fim de observar as consequências funcionais do bloqueio do PAFR nas DCs, realizamos ensaios de proliferação antígeno-específica *in vitro*. Nossos resultados mostraram que o tratamento das mDCs com antagonistas do PAFR potencializou a proliferação antígeno-específica de linfócitos T CD4⁺, evento acompanhado da produção de altos níveis de IFN- γ , detectados no sobrenadante das co-culturas. Estes dados indicam que a presença do PAF durante o processo de maturação das DCs induz mudanças funcionais nas células, que levam à uma regulação negativa da proliferação antígeno-específica o que implica que o PAF endógeno possa atuar como um “breque” da função apresentadora das DCs. O tratamento com os antagonistas do PAFR, ao tirar este “breque”, aumentou a sua capacidade de induzir proliferação de linfócitos T. Isto não pode ser atribuído a alterações na expressão de moléculas co-estimuladoras ou MHC II em DCs visto que o tratamento não alterou a expressão de CD40, CD80, CD86, ou MHCII. Entretanto, este efeito poderia ser atribuído aos fatores secretados pelas DCs.

Corinti et al. (2001) (112), utilizando DCs humanas derivadas de monócitos, reportaram que DCs maturadas com LPS na presença de anticorpo bloqueador de IL-10 foram mais eficientes em induzir proliferação de linfócitos T e sua diferenciação em células Th1. Estes autores ainda observaram que a síntese de IL-10 pelas mDCs tratadas com α -IL10 foi reduzida em comparação às mDCs controle, o que sugere um mecanismo de retroalimentação positiva na síntese da própria IL-10. Este efeito autócrino da citocina também foi observado em macrófagos humanos derivados de monócitos por Staples et al. (2007) (113). Neste estudo, foi mostrado que IL-10 induziu a expressão de RNAm e proteína IL-10, de maneira dose-dependente. Os autores ainda observaram que

esta indução ocorre via ativação do fator de transcrição Stat3 através da sinalização do receptor para a IL-10, expresso na membrana citoplasmática. Os nossos resultados mostram que o anticorpo bloqueador de IL-10 (α -IL10) adicionado durante a fase de maturação pelo LPS conferiu às DCs maior capacidade de induzir proliferação dos linfócitos T. Apesar da produção de IFN- γ ter sido aumentada nas co-culturas com DCs tratadas com α -IL10, foi possível detectar que apenas a redução da sinalização por esta citocina não foi suficiente para atingir os efeitos observados com o bloqueio do PAFR, tanto pela indução de proliferação, quanto pelos níveis de IFN- γ obtidos ao final das 72 h de co-cultura. Estes dados indicaram que um outro fator desencadeado pela sinalização do PAFR, além da IL-10, também poderia estar modulando as DCs durante a sua maturação, o que resultaria no desenvolvimento de um fenótipo mais ativador.

A inibição dos altos níveis de PGE₂ pelo bloqueio do PAFR também poderia explicar esta maior capacidade das DCs apresentar antígeno. Harizi et al. (2002) (75) e Whittaker et al. (2000) (106), reportaram que a inibição da síntese de prostaglandinas durante a maturação das DCs induzida por LPS aumentou a sua capacidade de apresentação de antígenos, estimulando a proliferação de linfócitos T alogeneicos em uma reação de leucócitos mistos. Em nossos experimentos, as DCs tratadas com inibidores seletivos de COX-2 (nimesulida ou NS-398), ou ainda com o inibidor não-seletivo indometacina, antes de serem colocadas em co-cultura com os esplenócitos, também potencializaram a proliferação antígeno específica de linfócitos T. Estes efeitos observados foram bem parecidos com os obtidos quando as DCs haviam sido tratadas com antagonistas de PAFR ou com o anticorpo bloqueador de IL-10. Em conjunto com os dados anteriores discutidos, nossos resultados indicam que tanto a IL-10 quando a PGE₂ formadas durante a maturação da DC por LPS podem regular sua capacidade apresentadora de antígeno e que isto depende do PAF gerado endogenamente durante o processo de maturação das DCs.

Aqui se faz necessário fazer uma consideração – apesar de nos nossos experimentos, as mDCs terem sido exaustivamente lavadas antes de serem colocadas em co-cultura com esplenócitos, não podemos descartar a possibilidade das células continuarem a produzir citocinas e prostaglandinas nas co-culturas. Weinlich et al. (2008) (114), mostraram que a PGE₂ produzida pelas APCs ativadas por LPS, também pode proteger os linfócitos T de morte celular induzida por ativação (AICD, do inglês *Activation-induced Cell Death*).

Inaba et al. (1990) (115) mostraram pela primeira vez que DCs pulsadas com antígeno *in vitro* eram capazes de promover imunidade ao serem transferidas para camundongos *naïve*. Nós transferimos mDCs pulsadas com OVA para camundongos *naïve* e o sucesso do protocolo de transferência de imunidade foi confirmado pela produção de anticorpo IgG2a OVA-específico. Quando cultivamos *ex vivo* os esplenócitos destes camundongos com novas mDCs pulsadas com OVA, observamos que as células T CD4⁺ dos animais que foram imunizados por transferência de mDCs tratadas com o antagonista de PAFR proliferaram mais do que as do grupo controle. Estes resultados mostraram que o bloqueio do PAFR nas DCs durante sua fase de maturação gerou DCs com maior potencial ativador de linfócitos T *in vivo*.

Visto que o bloqueio do PAFR em DCs aumentou seu potencial imunogênico, o uso de antagonistas de PAFR poderia funcionar como adjuvante de imunização. Para verificarmos isto, camundongos foram imunizados com OVA ou com OVA combinada à WEB 2170.

Nós observamos que os linfonodos drenantes dos animais imunizados com OVA/WEB eram maiores que os dos animais imunizados apenas com OVA. Quando medimos a concentração de anticorpos OVA-específicos no soro vimos que grupo OVA/WEB apresentou níveis superiores do anticorpo IgG2a OVA-específico quando comparado ao grupo que recebeu apenas OVA. Já os níveis do anticorpo IgG1 OVA-específico foram similares nos dois grupos. Ao estimularmos *ex vivo* os esplenócitos dos animais imunizados com OVA, também foi possível detectar anticorpos e citocinas nos sobrenadantes após 72 h de cultura. Encontramos que o re-estímulo de OVA nas células dos camundongos do grupo OVA/WEB induziu maior produção de IgG2a, IgG3, IgE, IFN- γ e IL-4. Em conjunto, estes resultados indicam que o antagonista do PAFR pode estimular a imunidade adaptativa, direcionando-a para uma resposta do tipo Th1, tanto por conta dos níveis de IgG2a no soro, quanto pela crescente produção de IFN- γ nas células re-estimuladas.

Para ver se o antagonista de PAFR afetaria respostas imunes já direcionadas para perfis Th1 ou Th2, nós repetimos o protocolo de imunização adicionando adjuvante de Freund (CFA) ou hidróxido de alumínio (alum) à OVA combinada ou não ao WEB 2170, respectivamente. Na resposta induzida pela imunização com OVA-alum, foram detectados anticorpos OVA específicos de isotipo IgG1 em níveis semelhantes nos grupos imunizados WEB 2170 ou não. IgG2a não foi detectada. Já na resposta induzida

pela imunização com OVA-CFA, foram produzidos IgG1 e IgG2a OVA-específicos e o antagonista WEB 2170 potencializou a produção dos dois isotipos. Além disso, observamos que a população T reguladora FoxP3⁺ induzida pelo adjuvante CFA é diminuída quando o antagonista é adicionado à emulsão OVA-CFA, sugerindo um outro mecanismo pelo qual o bloqueio do PAFR pode estar agindo. Estes dados indicam que a adição do antagonista de PAFR potencializa a indução de resposta imune direcionada para perfil Th1, mas não altera respostas já direcionadas para Th2.

É prematura qualquer tentativa de explicar como o bloqueio do PAFR afeta uma resposta imune *in vivo*. Nos experimentos de transferência de DCs tratadas com o antagonista o bloqueio do PAFR durante sua maturação mostrou ser suficiente para potencializar a resposta adaptativa. Porém, nos experimentos em que o antagonista de PAFR foi administrado juntamente com o antígeno é difícil entender o mecanismo do efeito potencializador. Tanto as DCs quanto as outras células presentes no sítio de inoculação do antígeno podem produzir PAF que, com base nos resultados *in vitro*, regularia a sua ativação. O bloqueio do receptor tiraria este “breque” para a apresentação de antígenos e indução de resposta efetora, tornando-as células “mais ativadoras”. Vários mediadores e citocinas podem ser gerados no sítio de inoculação do antígeno, principalmente quando são utilizados adjuvantes como CFA e alum. Mesmo assim, o bloqueio de um único receptor, o PAFR, continuou potencializando a resposta adaptativa. Ainda, não podemos descartar a possibilidade do antagonista estar sendo drenado para os linfonodos e agindo diretamente nos linfócitos B. Embora os linfócitos T não expressem PAFR (116), a expressão deste receptor foi encontrada em linfócitos B e a ativação do receptor por seus ligantes tem um efeito imunorregulador nestas células (117). Portanto, a possibilidade do antagonista estar modulando os linfócitos B não pode ser descartada.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a ativação do PAFR poderia estar exercendo um efeito atenuante na fase de ativação da DCs, “amortecendo” possíveis exacerbações da resposta induzida pelo meio no qual elas se encontram. Mecanismos reguladores são necessários para o controle da resposta imune, e o PAFR ativado por PAF endógeno ou moléculas PAF-*like* pode ter um papel bem definido neste contexto. No entanto, não podemos nos esquecer que nas condições fisiológicas, ligantes de PAFR também estão presentes e, portanto, este receptor deve ser constantemente ativado, o que não deve necessariamente significar que as células que o expressam estejam sendo

down reguladas o tempo todo. Por isto, a idéia de que a sua ativação pode promover um fino ajuste no fenótipo das DCs e que, dependendo da combinação de sinais simultaneamente captados, pode “sintonizá-la” para a indução de um tipo ou outro de resposta adaptativa. O sistema imune é complexo e redundante, no sentido de que uma função pode ser regulada por diversas vias. Mostramos aqui que a ativação do PAFR é uma das vias que regula a função das DCs e, conseqüentemente, a imunidade adaptativa.

Os dados aqui apresentados mostram uma nova face do PAFR, implicando-o em níveis de resposta imune ainda não explorados, e abrindo um leque de possibilidades a serem consideradas. Entre elas, a expectativa de um potencial de aplicação de antagonistas de PAFR em protocolos de vacinação baseados na transferência de DCs. As DCs têm sido utilizadas em diversos protocolos de imunoterapia relatados nas últimas décadas, e a eficácia das vacinas de DCs depende, entre outros fatores, da sua capacidade de induzir imunidade ou tolerância (118). Assim, acreditamos que o tratamento das DCs com antagonistas de PAFR durante sua maturação *in vitro* poderia ter um efeito potencializador na sua capacidade de induzir imunidade. Este estudo ainda sugere que antagonistas do PAFR poderiam ser utilizados como adjuvantes em protocolos de imunização, visto que o bloqueio do PAFR potencializou significativamente a resposta imune, particularmente a Th1.

1. As BM-DCs murinas expressam PAFR e produzem ligantes do receptor; o estímulo do LPS aumenta esta produção.
2. O bloqueio do PAFR com antagonistas não alterou a expressão dos marcadores de maturação das DCs.
3. Em relação ao fenótipo das DCs, o bloqueio do PAFR:
 - não alterou a produção induzida pelo LPS das citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6 e IL-1 β), mas reduziu a produção da IL-10, levando a um perfil ativador (IL-12^{high}/IL-10^{low});
 - reduziu a produção de PGE₂ e a expressão de COX2 induzidas pelo LPS desde as primeiras horas de ativação;
 - não alterou a expressão das PGE sintases 1 e 2, e nem a do receptor EP2;
4. Quanto à função apresentadora de antígenos das DCs:
 - o bloqueio do PAFR aumentou a indução de proliferação antígeno-específica de linfócitos T CD4⁺ *in vitro*;
 - também foi potencializada pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas e da IL-10;
 - em protocolo de imunização passiva por transferência de DCs pulsadas com OVA, o bloqueio do PAFR nas DCs *in vitro*, antes da transferência, aumentou seu potencial ativador de linfócitos T *in vivo*; este fato foi observado após o re-estímulo *ex vivo* dos esplenócitos de camundongos imunizados;
5. Em protocolo de imunização *in vivo*, o antagonista de PAFR ministrado junto com o antígeno OVA:
 - potencializou a resposta imune antígeno-específica;
 - não afetou a resposta imune já direcionada para Th2 por alum;
 - quando associado ao adjuvante completo de Freund potencializou a produção de anticorpos e reduziu a população de células Treg no baço de animais imunizados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med.* 1970;131(2):287-306.
2. 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.* 1972;136(6):1356-77.
3. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem.* 1979;254(19):9355-8.
4. Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks B, Muirhead EE. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979;90(4):1194-200.
5. Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J, Pinckard RN. Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem.* 1980;255(12):5514-6.
6. Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem.* 2002;131(6):773-9.
7. Shindou H, Ishii S, Uozumi N, Shimizu T. Roles of cytosolic phospholipase A(2) and platelet-activating factor receptor in the Ca-induced biosynthesis of PAF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271(3):812-7.
8. Wykle RL, Malone B, Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem.* 1980;255(21):10256-60.
9. Nakanishi H, Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Ogasawara R, Suwabe A, et al. Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J Biol Chem.* 2006;281(29):20140-7.
10. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, et al. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acyltransferase. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6532-9.
11. Shindou H, Ishii S, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, Shimizu T. Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A:lyso-platelet-activating factor acyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J Immunol.* 2005;175(2):1177-83.
12. Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res.* 1993;34(5):691-702.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: samplereferences. [updated 2011 Jul 15]. Available from:<http://www.icmje.org>

13. Qi HY, Shelhamer JH. Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem.* 2005;280(47):38969-75.
14. Morimoto R, Shindou H, Oda Y, Shimizu T. Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages. *J Biol Chem.* 2010;285(39):29857-62.
15. Blank ML, Lee YJ, Cress EA, Snyder F. Stimulation of the de novo pathway for the biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) via cytidylyltransferase activation in cells with minimal endogenous PAF production. *J Biol Chem.* 1988;263(12):5656-61.
16. Woodard DS, Lee TC, Snyder F. The final step in the de novo biosynthesis of platelet-activating factor. Properties of a unique CDP-choline:1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol choline-phosphotransferase in microsomes from the renal inner medulla of rats. *J Biol Chem.* 1987;262(6):2520-7.
17. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 1993;292 (Pt 3):617-29.
18. 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.* 1996;416:297-304.
19. Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE, Farr RS. Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *J Immunol.* 1986;136(9):3441-6.
20. Marrache AM, Gobeil F, Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, et al. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol.* 2002;169(11):6474-81.
21. Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, et al. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(3-4):287-97.
22. Zhu T, Gobeil F, Vazquez-Tello A, Leduc M, Rihakova L, Bossolasco M, et al. Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE2, PAF, and LPA1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(3-4):377-91.
23. Dupré DJ, Chen Z, Le Gouill C, Thériault C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M, et al. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(48):48228-35.
24. 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.* 1999;274(40):28395-404.

25. 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.* 2005;280(42):35448-57.

26. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:419-45.

27. 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.* 1991;349(6307):342-6.

28. Braquet P, Esanu A, Buisine E, Hosford D, Broquet C, Koltai M. Recent progress in ginkgolide research. *Med Res Rev.* 1991;11(3):295-355.

29. Casals-Stenzel J, Muacevic G, Weber KH. Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;241(3):974-81.

30. Heuer HO, Casals-Stenzel J, Muacevic G, Weber KH. Pharmacologic activity of bepagant (WEB 2170), a new and selective heptazepinoic antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255(3):962-8.

31. Koltai M, Guinot P, Hosford D, Braquet PG. Platelet-activating factor antagonists: scientific background and possible clinical applications. *Adv Pharmacol.* 1994;28:81-167.

32. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-55.

33. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol.* 1990;144(1):278-83.

34. Lonardoni MV, Barbieri CL, Russo M, Jancar S. Modulation of *Leishmania (L.) amazonensis* Growth in Cultured Mouse Macrophages by Prostaglandins and Platelet Activating Factor. *Mediators Inflamm.* 1994;3(2):137-41.

35. Lonardoni MV, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.* 2000;68(11):6355-61.

36. Aliberti JC, Machado FS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Silva JS. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect Immun.* 1999;67(6):2810-4.

37. Talvani A, Santana G, Barcelos LS, Ishii S, Shimizu T, Romanha AJ, et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Microbes Infect.* 2003;5(9):789-96.
38. Soares AC, Pinho VS, Souza DG, Shimizu T, Ishii S, Nicoli JR, et al. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *Br J Pharmacol.* 2002;137(5):621-8.
39. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
40. Fadok VA, 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-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101(4):890-8.
41. Ferracini M, Rios FJ, Pecenin M, Jancar S. Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:950273.
42. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
43. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res.* 2011;108(2):235-48.
44. Rios FJ, Koga MM, Ferracini M, Jancar S. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. *PLoS One.* 2012;7(5):e36632.
45. Rios FJ, Ferracini M, Pecenin M, Koga MM, Wang Y, Ketelhuth DF, et al. Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts. *PLoS One.* 2013;8(10):e76893.
46. 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.* 2013;2013:198193.
47. Correa M, Machado J, Carneiro CR, 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.* 2005;114(3):356-63.
48. Bachi AL, 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;2012:610371.
49. Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12(1):57-65.

50. de Oliveira SI, Andrade LN, 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.
51. 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*. 2000;157(5):1713-25.
52. Im SY, Ko HM, Kim JW, Lee HK, Ha TY, Lee HB, et al. Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. *Cancer Res*. 1996;56(11):2662-5.
53. Sozzani S, Longoni D, Bonecchi R, Luini W, Bersani L, D'Amico G, et al. Human monocyte-derived and CD34+ cell-derived dendritic cells express functional receptors for platelet activating factor. *FEBS Lett*. 1997;418(1-2):98-100.
54. Dichmann S, Rheinen H, Panther E, Herouy Y, Czech W, Termeer C, et al. Downregulation of platelet-activating factor responsiveness during maturation of human dendritic cells. *J Cell Physiol*. 2000;185(3):394-400.
55. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
56. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
57. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
58. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):101-13.
59. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1145-54.
60. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604.
61. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;41:9-22.
62. Fuertes Marraco SA, Grosjean F, Duval A, Rosa M, Lavanchy C, Ashok D, et al. Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front Immunol*. 2012;3:331.

63. Vremec D, O'Keeffe M, Wilson A, Ferrero I, Koch U, Radtke F, et al. Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture. *Innate Immun.* 2011;17(3):338-52.
64. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
65. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G, Brinster C. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol.* 2009;Chapter 3:Unit 3.7.
66. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol.* 2007;179(11):7577-84.
67. Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood.* 2000;96(9):3029-39.
68. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 2004;6(15):1382-7.
69. Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int.* 2007;56(3):183-91.
70. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(12):984-93.
71. Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kaliński P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol.* 2000;164(9):4507-12.
72. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 2002;99(7):2468-76.
73. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity.* 2003;18(3):367-79.
74. Xiao BG, Zhu WH, Lu CZ. The presence of GM-CSF and IL-4 interferes with effect of TGF-beta1 on antigen presenting cells in patients with multiple sclerosis and in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2007;249(1):30-6.
75. Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol.* 2002;168(5):2255-63.

76. Harizi H, Juzan M, Moreau JF, Gualde N. Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B4 production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003;170(1):139-46.
77. Alvarez C, Amaral MM, Langellotti C, Vermeulen M. Leukotriene C(4) prevents the complete maturation of murine dendritic cells and modifies interleukin-12/interleukin-23 balance. *Immunology.* 2011;134(2):185-97.
78. Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998;161(6):2804-9.
79. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:975-1028.
80. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13803-9.
81. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol.* 1999;29(5):1617-25.
82. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):476-83.
83. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):337-48.
84. Hilkens C, Snijders A, Vermeulen H, van der Meide P, Wierenga E, Kapsenberg M. Accessory cell-derived interleukin-12 and prostaglandin E2 determine the level of interferon-gamma produced by activated human CD4+ T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;795:349-50.
85. Brocke T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* 1997;185(3):541-50.
86. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev.* 2011;241(1):206-27.
87. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood.* 2006;108(5):1435-40.
88. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-85.

89. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. 2007;204(8):1757-64.
90. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*. 2001;108(7):957-62.
91. Kushwah R, Wu J, Oliver JR, Jiang G, Zhang J, Siminovitch KA, et al. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3⁺ Treg. *Eur J Immunol*. 2010;40(4):1022-35.
92. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999;223(1):77-92.
93. Dent G, Ukena D, Chanez P, Sybrecht G, Barnes P. Characterization of PAF receptors on human neutrophils using the specific antagonist, WEB 2086. Correlation between receptor binding and function. *FEBS Lett*. 1989;244(2):365-8.
94. Ortega MP, García MC, Gijón MA, de Casa-Juana MF, Priego JG, Sanchez Crespo M, et al. 1,4-Dihydropyridines, a new class of platelet-activating factor receptor antagonists: in vitro pharmacologic studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;255(1):28-33.
95. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
96. Pei Y, Barber LA, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW, Dy LC, et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol*. 1998;161(4):1954-61.
97. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science*. 1990;250(4988):1720-3.
98. Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med*. 1994;180(6):2365-70.
99. Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *J Leukoc Biol*. 2003;73(6):756-63.
100. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*. 2012;188(1):21-8.
101. Angeli V, Llodrá J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, Shimizu T, et al. Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2004;21(4):561-74.

102. Snyder F. Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J.* 1995;305 (Pt 3):689-705.
103. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81.
104. Kambayashi T, Jacob CO, Zhou D, Mazurek N, Fong M, Strassmann G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J Immunol.* 1995;155(10):4909-16.
105. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol.* 1999;162(1):168-75.
106. Whittaker DS, Bahjat KS, Moldawer LL, Clare-Salzler MJ. Autoregulation of human monocyte-derived dendritic cell maturation and IL-12 production by cyclooxygenase-2-mediated prostanoid production. *J Immunol.* 2000;165(8):4298-304.
107. Harizi H, Gualde N. Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol.* 2006;3(4):271-7.
108. Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7220-5.
109. Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol.* 2004;173(1):559-65.
110. Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, et al. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol.* 1994;46(2):213-20.
111. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood.* 2011;118(20):5498-505.
112. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 2001;166(7):4312-8.
113. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BM, et al. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol.* 2007;178(8):4779-85.
114. Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(12):1901-9.

115. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med.* 1990;172(2):631-40.
116. Simon HU, Tsao PW, Siminovitch KA, Mills GB, Blaser K. Functional platelet-activating factor receptors are expressed by monocytes and granulocytes but not by resting or activated T and B lymphocytes from normal individuals or patients with asthma. *J Immunol.* 1994;153(1):364-77.
117. Matsumura Y, Byrne SN, Nghiem DX, Miyahara Y, Ullrich SE. A role for inflammatory mediators in the induction of immunoregulatory B cells. *J Immunol.* 2006;177(7):4810-7.
118. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S53-60.

APÊNDICE A - Rios FJ, **Koga MM**, Ferracini M, Jancar S. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. PloS one. 2012;7(5):e36632.

Co-Stimulation of PAFR and CD36 Is Required for oxLDL-Induced Human Macrophages Activation

Francisco J. O. Rios*, Mariana M. Koga, Matheus Ferracini, Sonia Jancar

Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract

The oxidative process of LDL particles generates molecules which are structurally similar to platelet-activating factor (PAF), and some effects of oxidized LDL (oxLDL) have been shown to be dependent on PAF receptor (PAFR) activation. In a previous study, we showed that PAFR is required for upregulation of CD36 and oxLDL uptake. In the present study we analyzed the molecular mechanisms activated by oxLDL in human macrophages and the contribution of PAFR to this response. Human adherent monocytes/macrophages were stimulated with oxLDL. Uptake of oxLDL and CD36 expression were determined by flow cytometry; MAP kinases and Akt phosphorylation by Western blot; IL-8 and MCP-1 concentration by ELISA and mRNA expression by real-time PCR. To investigate the participation of the PI3K/Akt pathway, $G\alpha i$ -coupled protein or PAFR, macrophages were treated with LY294002, pertussis toxin or with the PAFR antagonists WEB2170 and CV3988, respectively before addition of oxLDL. It was found that the addition of oxLDL to human monocytes/macrophages activates the PI3K/Akt pathway which in turn activates the MAPK (p38 and JNK). Phosphorylation of Akt requires the engagement of PAFR and a $G\alpha i$ -coupled protein. The upregulation of CD36 protein and the uptake of oxLDL as well as the IL-8 production are dependent on PI3K/Akt pathway activation. The increased CD36 protein expression is dependent on PAFR and $G\alpha i$ -coupled protein. Transfection studies using HEK 293t cells showed that oxLDL uptake occurs with either PAFR or CD36, but IL-8 production requires the co-transfection of both PAFR and CD36. These findings show that PAFR has a pivotal role in macrophages response to oxLDL and suggest that pharmacological intervention at the level of PAFR activation might be beneficial in atherosclerosis.

Citation: Rios FJO, Koga MM, Ferracini M, Jancar S (2012) Co-Stimulation of PAFR and CD36 Is Required for oxLDL-Induced Human Macrophages Activation. *PLoS ONE* 7(5): e36632. doi:10.1371/journal.pone.0036632

Editor: Maurizio Pesce, Centro Cardiologico Monzino, Italy

Received: December 5, 2011; **Accepted:** April 4, 2012; **Published:** May 3, 2012

Copyright: © 2012 Rios et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2006/03982-5; 2009/05290-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fjorios@usp.br

Introduction

Accumulation of modified low-density lipoprotein (LDL), such as oxidized LDL (oxLDL), in the arterial wall, and the recruitment of monocytes to the subendothelial space are known to be the main early events in the development of atherosclerosis [1]. Macrophages express receptors that bind and internalize oxidized forms of LDL. It is known that CD36 receptor expression is not regulated by intracellular levels of cholesterol, and is increased in atherosclerotic lesions because of auto-regulation by components of the oxLDL particles [2]. This uncontrolled uptake leads to differentiation of the macrophage into foam cells that play a critical role in development and progression of the atherosclerotic plaque [3].

A number of laboratory studies have provided compelling evidence that CD36 is one of the main scavenger receptors involved in the uptake of oxLDL by monocytes/macrophages. Its deficiency greatly reduced the uptake of oxLDL and atherosclerotic lesions in mice models [4,5]. Moreover, monocytes from individuals lacking CD36, or experiments using functional blockage with antibodies, decreased oxLDL uptake by about 50% [4].

The mechanism of oxLDL-induced foam cell formation during the atherosclerotic process has been under intense investigation,

and appears to be dependent on several membrane and nuclear receptors that might act, either independently or synergistically, to mediate the cell response [1,6]. The uptake of oxLDL leads to activation of a MAPK pathway that exerts a crucial role in foam cell formation and is essential for IL-8 production, which mediates the cell recruitment to the plaque site, accelerating the atherogenic process and arterial thickness [7]. Moreover, MAPK activation has anti-apoptotic effects, contributing to macrophage proliferation and foam cell survival in the atherosclerotic plaque [8].

The oxidative process of LDL particles generates molecules which are structurally similar to the lipid mediator platelet-activating factor (PAF), and some effects of oxLDL have been shown to be dependent on PAFR activation [9,10]. Although these PAF-like compounds are less potent than PAF in binding to PAFR, they are considerably more abundant [9]. Our previous study revealed that oxLDL activates MAPK (ERK1/2 and JNK) and increases the expression of CD36 in human cells by PAFR-dependent mechanisms. Moreover we have shown that uptake of oxLDL is also dependent on PAFR [11]. Since the main receptor that mediates the oxLDL uptake by macrophages is CD36, which has a very short intracytoplasmic tail that hardly activates intracellular signaling pathways, we hypothesized that the effect of oxLDL might be caused by co-stimulation of CD36 and PAFR [11]. In the present study, we confirmed this hypothesis by

APÊNDICE B - 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 of Inflammation*. 2013;2013:198193.

Research Article

Oxidized LDL Induces Alternative Macrophage Phenotype through Activation of CD36 and PAFR

Francisco J. Rios,^{1,2} Marianna M. Koga,¹ Mateus Pecenin,¹ Matheus Ferracini,¹ Magnus Gidlund,¹ and S. Jancar¹

¹ Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes 1730, ICB IV—Sala 140/146, 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil

² BHF-Glasgow Cardiovascular Research Centre, Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8TA, UK

Correspondence should be addressed to Francisco J. Rios; fjorios@usp.br

Received 2 June 2013; Accepted 22 July 2013

Academic Editor: Ishak Tekin

Copyright © 2013 Francisco J. Rios et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

OxLDL is recognized by macrophage scavenger receptors, including CD36; we have recently found that Platelet-Activating Factor Receptor (PAFR) is also involved. Since PAFR in macrophages is associated with suppressor function, we examined the effect of oxLDL on macrophage phenotype. It was found that the presence of oxLDL during macrophage differentiation induced high mRNA levels to IL-10, mannose receptor, PPAR γ and arginase-1 and low levels of IL-12 and iNOS. When human THP-1 macrophages were pre-treated with oxLDL then stimulated with LPS, the production of IL-10 and TGF- β significantly increased, whereas that of IL-6 and IL-8 decreased. In murine TG-elicited macrophages, this protocol significantly reduced NO, iNOS and COX2 expression. Thus, oxLDL induced macrophage differentiation and activation towards the alternatively activated M2-phenotype. In murine macrophages, oxLDL induced TGF- β , arginase-1 and IL-10 mRNA expression, which were significantly reduced by pre-treatment with PAFR antagonists (WEB and CV) or with antibodies to CD36. The mRNA expression of IL-12, RANTES and CXCL2 were not affected. We showed that this profile of macrophage activation is dependent on the engagement of both CD36 and PAFR. We conclude that oxLDL induces alternative macrophage activation by mechanisms involving CD36 and PAFR.

1. Introduction

The stimulation of monocytes/macrophages by modified low density lipoprotein (LDL), such as oxidized LDL (oxLDL), is an early event in atherosclerosis development. These macrophages accumulate in the subendothelial space and differentiate into foam cells [1], which contribute to a chronic inflammatory response in the arterial wall and atherosclerotic plaque progression [2]. Several pattern recognition receptors are involved in oxLDL recognition by macrophages; CD36 is one of the most studied.

Macrophages can acquire distinct phenotypes according to stimuli from the microenvironment. M1 or classically activated macrophages are induced by Th1 cytokines and exhibit high microbicidal activity and induce inflammation. In contrast, M2 or alternatively activated macrophages are induced by Th2 cytokines and contribute to the resolution

of inflammation and tissue remodeling [3]. The atherosclerotic plaque provides a complex microenvironment for macrophages, and both populations, M1 and M2, have been found in human lesions [4]. It has been demonstrated that M1 macrophages are predominant in regions prone to rupture, while M2 macrophages are mostly detected in the adventitia and in stable plaque areas [5]. However, it is not known which role macrophages with such opposing functions play in the progression of atherosclerosis. M2 macrophages express high levels of CD36 and SR-A1 and are thus able to efficiently take up oxLDL and are more prone to differentiating into foam cells [6]. Macrophages also express receptors for platelet-activating factor (PAFR), and our previous work suggested that PAFR works in conjunction with CD36 for optimal oxLDL uptake and cytokine gene expression [7]. Moreover, preferential production of IL-10 over IL-12 was observed (submitted article).

APÊNDICE C - Koga MM, Bizzarro B, Sá-Nunes A, Rios FJ, Jancar S. Activation of PAF-receptor induces regulatory dendritic cells through PGE2 and IL-10. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2013;89(5):319-26.



Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plefa

Activation of PAF-receptor induces regulatory dendritic cells through PGE₂ and IL-10[☆]



Marianna M. Koga, Bruna Bizzarro, Anderson Sá-Nunes, Francisco J.O. Rios¹,
Sonia Jancar^{*,1}

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2013

Received in revised form

15 August 2013

Accepted 6 September 2013

Keywords:

DC

PAF

PGE₂

IL-10

Antigen-presentation

ABSTRACT

Activation of the platelet-activating factor receptor (PAFR) in macrophages is associated with suppressor phenotype. Here, we investigated the PAFR in murine dendritic cells (DC). Bone marrow-derived dendritic cells (BALB/c) were cultured with GM-CSF and maturation was induced by LPS. The PAFR antagonists (WEB2086, WEB2170, PCA4248) and the prostaglandin (PG) synthesis inhibitors (indomethacin, nimesulide and NS-398) were added before LPS. Mature and immature DCs expressed PAFR. LPS increased MHCII, CD40, CD80, CD86, CCR7 and induced IL-10, IL-12, COX-2 and PGE₂ expression. IL-10, COX-2 and PGE₂ levels were reduced by PAFR antagonists and increased by cPAF. The IL-10 production was independent of PGs. Mature DCs induced antigen-specific lymphocyte proliferation. PAFR antagonists or PG-synthesis inhibitors significantly increased lymphocyte proliferation. It is proposed that PAF has a central role in regulatory DC differentiation through potentiation of IL-10 and PGE₂ production.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The platelet activating factor (PAF) (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) is a lipid mediator produced upon cell activation, which has been extensively studied in inflammatory conditions [1]. The PAF receptor (PAFR) is a G-protein coupled receptor expressed in plasma and nuclear membranes of many cell types, including macrophages [2]. Early evidence indicated that PAF suppressed macrophage functions and that phagocytosis of apoptotic cells by murine macrophages induced preferential production of anti-inflammatory mediators [3]. Later on, it was shown that apoptotic cells expressed oxidized moieties with PAF-like activity in their membrane, which induced functional changes in macrophages, compatible with the suppressor phenotype [4]. Furthermore, data from our group showed that co-injection of apoptotic cells with a sub-tumorigenic dose of melanoma cells promoted tumor growth. This stimulatory effect of apoptotic cells was reduced *in vivo* by treatment with PAFR antagonists [5]. Moreover, PAFR was shown to be involved in the systemic immunosuppression induced by environmental stressor agents, such as UV radiation and cigarette smoke [6–8]. These results showed that PAFR activation was associated with the establishment of a suppressor phenotype in macrophages.

Dendritic cells (DCs), like macrophages, sense signals from the microenvironment and undergo functional and phenotypic changes. Both cells originate from myeloid precursor cells in the bone marrow and DCs migrate into non-lymphoid tissues, where they remain as resident immature DCs. When sensing damage or pathogen-associated signals, they start the maturation process, cease phagocytosis, express increased levels of co-stimulatory molecules, cytokines and chemokines, and migrate into the lymphoid organs. As DCs mature, they acquire the potential to present antigens to lymphocytes and initiate the adaptive immune response [9,10]. DCs express PAFR [11–13], but the effect of this receptor activation on DC biology is still unknown.

In the present study, we investigated the role of PAFR in DC phenotype and antigen-presenting function. We found that during maturation induced by LPS, activation of PAFR downregulated DC capacity to present antigen to lymphocytes in an *in vitro* proliferation assay. This was not due to changes in DC expression of MHC II or co-stimulatory CD80 and CD86 molecules, but rather to the induction of IL-10 and of sustained and increased PGE₂ synthesis mediated by PAFR.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Eight- to ten-week-old BALB/c male mice were obtained from the Department of Immunology Animal Facility at the University of São Paulo and kept in micro-isolator cages under specific

[☆]Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 7744; fax: +55 11 3091 7224.

E-mail address: sojancar@icb.usp.br (S. Jancar).

¹ FJO Rios and S. Jancar contributed equally to this work.

APÊNDICE D - Rios FJ, Ferracini M, Pecenin M, **Koga MM**, Wang Y, Ketelhuth DF, et al.
Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36
recruitment into the same lipid rafts. PloS one. 2013;8(10):e76893.

Uptake of oxLDL and IL-10 Production by Macrophages Requires PAFR and CD36 Recruitment into the Same Lipid Rafts

Francisco J. O. Rios^{1,2*}, Matheus Ferracini¹, Mateus Pecenin¹, Marianna M. Koga¹, Yajuan Wang³, Daniel F. J. Ketelhuth³, S. Jancar¹

1 Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, **2** BHF-Glasgow Cardiovascular Research Centre, Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom, **3** Center for Molecular Medicine, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract

Macrophage interaction with oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) leads to its differentiation into foam cells and cytokine production, contributing to atherosclerosis development. In a previous study, we showed that CD36 and the receptor for platelet-activating factor (PAFR) are required for oxLDL to activate gene transcription for cytokines and CD36. Here, we investigated the localization and physical interaction of CD36 and PAFR in macrophages stimulated with oxLDL. We found that blocking CD36 or PAFR decreases oxLDL uptake and IL-10 production. OxLDL induces IL-10 mRNA expression only in HEK293T expressing both receptors (PAFR and CD36). OxLDL does not induce IL-12 production. The lipid rafts disruption by treatment with β CD reduces the oxLDL uptake and IL-10 production. OxLDL induces co-immunoprecipitation of PAFR and CD36 with the constitutive raft protein flotillin-1, and colocalization with the lipid raft-marker GM1-ganglioside. Finally, we found colocalization of PAFR and CD36 in macrophages from human atherosclerotic plaques. Our results show that oxLDL induces the recruitment of PAFR and CD36 into the same lipid rafts, which is important for oxLDL uptake and IL-10 production. This study provided new insights into how oxLDL interact with macrophages and contributing to atherosclerosis development.

Citation: Rios FJO, Ferracini M, Pecenin M, Koga MM, Wang Y, et al. (2013) Uptake of oxLDL and IL-10 Production by Macrophages Requires PAFR and CD36 Recruitment into the Same Lipid Rafts. PLoS ONE 8(10): e76893. doi:10.1371/journal.pone.0076893

Editor: Andrea Cignarella, University of Padova, Italy

Received: May 13, 2013; **Accepted:** August 28, 2013; **Published:** October 9, 2013

Copyright: © 2013 Rios et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant 2006/03982-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fjorios@usp.br

Introduction

The oxidation of Low Density Lipoprotein (LDL) is a major pathogenic factor in the development of atherosclerosis. Oxidized LDL (oxLDL) accumulates in the sub-endothelial space of the arterial wall and activates endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages. The resulting chronic inflammatory response contributes to atherosclerotic plaque progression[1]. Although is well accepted that the uptake of oxLDL has pathophysiologic relevance in atherosclerosis development, the molecular mechanisms of its interaction with macrophages are not fully understood.

CD36 is one of the main scavenger receptors involved in the uptake of oxLDL by macrophages and has generally been viewed as essential for foam cell formation[2]. Its deficiency greatly reduced the uptake of oxLDL and atherosclerotic lesions in mice models[3,4]. Monocytes from individuals lacking

CD36, or *in vitro* experiments using functional blockage of this receptor with antibodies, decreased the oxLDL uptake by 50% [3]. However, other studies have found that a deficiency of CD36 did not prevent macrophage foam cell formation *in vivo*[5,6]. These contradictory observations suggest that additional receptor(s) might be involved in macrophage activation by oxLDL and foam cell formation.

The oxidative modification of LDL generates several oxidized phospholipids (oxPL) that share a common unsaturated fatty acid in the *sn*-2 position of the phosphatidylcholine and confer the ability to bind to CD36[7]. These structural characteristics are also responsible for the interaction of some oxPL with the receptor for Platelet Activating Factor (PAFR) [8], which its expression has been found in macrophages from human atherosclerotic plaques[9]. In previous studies we demonstrated that deficiency or antagonism of PAFR reduced the oxLDL uptake by human macrophages and CD36