

**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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sonia Jancar Negro

Co-orientador: Dr. Francisco J. Oliveira Rios

Versão original

São Paulo  
2015

## 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 $\beta$ , IL-10 e PGE<sub>2</sub>. 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 PGE<sub>2</sub>, 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- $\gamma$ . 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<sup>+</sup> 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 E<sub>2</sub>. 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 $\beta$ , 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, methylcarbamil-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- $\gamma$  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<sup>+</sup> 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 E<sub>2</sub>. Interleukin 10. Immunization.

# **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 A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), 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 cPLA<sub>2</sub> 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 cPLA<sub>2</sub> (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 (IP<sub>3</sub>) e Ca<sup>2+</sup> 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- $\kappa$ 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 Reconhecedores 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<sup>-/-</sup>) 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<sup>-/-</sup> 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 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) e mais mediadores anti-inflamatórios TGF- $\beta$  e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). 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<sup>high</sup>/IL-12<sup>low</sup> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 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 PGE<sub>2</sub> e de TGF- $\beta$ , 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- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , 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<sup>+</sup> CD11c<sup>int</sup> GR1<sup>-</sup>), Mo-DCs (B220<sup>-</sup> CD11c<sup>int</sup> GR1<sup>±</sup>), e cDCs (B220<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> GR1<sup>-</sup>), que ainda podem ser divididas em CD8α<sup>+</sup> (CD11c<sup>high</sup>, B220<sup>-</sup> DEC205<sup>+</sup> CD24<sup>high</sup> CD11b<sup>-</sup>) e CD8α<sup>-</sup> (CD11c<sup>high</sup> B220<sup>-</sup> DEC205<sup>-</sup> CD24<sup>low</sup> CD11b<sup>+</sup> CD172<sup>+</sup> CD4<sup>±</sup>), 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<sup>high</sup> B220<sup>-</sup> 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- $\gamma$  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- $\beta$  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- $\beta$ , mesmo após maturação induzida por LPS ou TNF- $\alpha$ , 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- $\beta$  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- $\beta$  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 PGE<sub>2</sub> quando ativadas por LPS e que, a esta PGE<sub>2</sub> induz a produção de IL-10 nestas células. O mesmo grupo também mostrou que além da PGE<sub>2</sub>, as DCs também produziram LTB<sub>4</sub> quando estimuladas por LPS. A síntese do LTB<sub>4</sub>, por sua vez, foi inibida pela IL-10 produzida pela PGE<sub>2</sub> induzida pelo LPS, o que sugere a existência de uma via supressora induzida por PGE<sub>2</sub>/IL-10 (76). Já Alvarez et al. (2011) (77), trataram as DCs com LTC<sub>4</sub> 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 LTC<sub>4</sub>, 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 PGE<sub>2</sub> potencializa a maturação promovida pelos estímulos inflamatórios IL- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , 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- $\gamma$ , por exemplo, polarizam linfócitos T para o fenótipo Th1, enquanto a produção de IL-4 estaria envolvida na polarização Th2. Já combinações como TGF- $\beta$  e IL-10, ou TGF- $\beta$  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/PGE<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> *in vitro*, por mecanismos dependentes de TGF- $\beta$  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<sup>high</sup> CD103<sup>+</sup>, 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- $\beta$ , 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.



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 $\beta$ ), mas reduziu a produção da IL-10, levando a um perfil ativador (IL-12<sup>high</sup>/IL-10<sup>low</sup>);
  - reduziu a produção de PGE<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> *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<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>-Delta Delta C(T)</sup> 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>lo</sup> 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 E<sub>2</sub>. *J Exp Med*. 1994;180(6):2365-70.
99. Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub>. *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.