Mayara D'Auria Jacomassi

**Envolvimento da ativação de PAFR frente à quimioterapia no
fenômeno de repopulação de melanomas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

(Versão corrigida Resolução CoPGr 6018/11, de 13
de outubro de 2011. A versão original está disponível
na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Mayara D'Auria Jacomassi

**Envolvimento da ativação de PAFR frente à quimioterapia no
fenômeno de repopulação de melanomas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

(Versão corrigida Resolução CoPGr 6018/11, de 13
de outubro de 2011. A versão original está disponível
na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Jacomassi, Mayara D'Auria
Envolvimento da sinalização de PAFR frente à
quimioterapia no fenômeno de repopulação de melanomas
/ Mayara D'Auria Jacomassi. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Melanoma 2.Fator de ativação de
plaquetas 3.Hipóxia 4.Quimioterapia 5.Resistência à
medicamentos 6.Recidiva

USP/FM/DBD-344/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico este trabalho a todos aqueles que buscam colocar seus dons a serviço do próximo e sonham em construir um mundo mais justo para todos.

Aos pacientes oncológicos que tanto me motivam a continuar trabalhando e me humanizam de uma maneira inigualável.

A todos aqueles que partilham a vida comigo e tornam minha caminhada mais leve, principalmente aos meus pais, que são minha base e inspiração.

Aos meus padrinhos e avós que, infelizmente, perdi durante o mestrado, mas que até hoje continuam aquecendo meu coração com amor

E a Deus, que é minha luz...

AGRADECIMENTOS

Foi com muito entusiasmo que comecei minha trajetória no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Havia passado pela frente do prédio quando ainda estava na graduação e fiquei sonhando com a possibilidade de um dia trabalhar ali. Eis que as circunstâncias da vida me concederam a honra de viver este sonho. Foi totalmente diferente do que imaginei, mas ao olhar para trás, tudo que sinto é gratidão. Me mudei para São Paulo em agosto de 2010 para iniciar um novo curso de graduação. A princípio, tudo era cinza, frio e amedrontador. Nada se comparava ao interior! Hoje, após exatos oito anos, concluo também meu mestrado nesta cidade que se tornou um grande arco-íris para mim. Foi vivendo nela que percebi a diversidade da vida, e mais do que isso, pude enxergá-la como realmente é, nua e crua. São Paulo rompeu a minha bolha e, como toda quebra, não foi fácil, mas como Hemingway destaca: “We are all broken, that’s how the light gets in”.

De fato, tenho sido muito iluminada em minha trajetória. Tive alguns desencontros e momentos de escuridão também, mas fui agraciada com encontros tão ricos e férteis durante este período, que fizeram com que o grão de trigo pudesse renascer mesmo frente às adversidades. São a estes encontros, particulares em nome, forma, rosto e missão que quero agora retribuir todo o amor que recebi e agradecer do fundo do meu coração. Vale ressaltar que a ordem de agradecimentos seguida aqui nada tem a ver com o valor e a importância de que cada um representa em minha vida.

Agradeço a todos os profissionais do ICESP, a começar pelos profissionais da segurança, da limpeza e das cantinas que sempre foram gentis comigo, favoreceram minhas condições de trabalho, se mostraram preocupados com meu bem-estar e acima de tudo alegraram minha rotina ali. Obrigada por conseguirem demonstrar tanto carinho mesmo em breves intervalos. Aos profissionais do setor administrativo por manterem sua humanidade apesar de toda burocracia e por serem tão pacientes comigo quando o cansaço e estresse já haviam tomado conta, em especial à Cristiane Landim, Maiara, Taynah, Lara e Florentino. Às secretárias da Pós-graduação Débora e Raquel por incansavelmente sanarem minhas dúvidas e trazerem paz em momentos de caos.

Aos companheiros de laboratório de análises clínicas (Val, sinto sua falta) e da patologia, por sempre me contagiarem com boas energias, por fazerem questão de me incluir nos cafés da tarde e por me fazerem companhia durante a madrugada. Agradeço também à Fayola e Renan por facilitarem tanto o meu trabalho ao cuidar dos materiais

e, garantindo muito além do que suporte técnico. Maria José, Miyuki (Biobanco) e Alane por sempre serem tão atenciosas e queridas comigo. Ao Luiz (almojarifado), por estar sempre pronto a fornecer os materiais de uso e partilhar os alimentos saudáveis. À equipe do laboratório de Mediadores Lipídicos por sempre me acolherem na Cidade Universitária, estando sempre disponíveis a compartilhar conhecimento, reagentes necessários e café. Em especial, à Professora Sônia Jancar, Marlise e Ildelfonso. À equipe do INCOR, em especial à Élide, por me auxiliar com os experimentos de hipóxia sem medir esforços. Agathinha, minha linda, sua presença me traz tantas coisas boas, sua energia é incrível e eu aprendo muito com você. Você é inspiração!

Ao Prof. Bryan por toda colaboração, humildade e abertura para dialogar. Mir, muito obrigada por todas as vezes que você foi firme comigo e me levantou, por todos os abraços no meio do corredor e por todo empenho que dedicou em nossas parcerias acadêmicas. Gi, minha conselheira particular, obrigada por me ouvir tantas e tantas vezes, por trazer este olhar sereno, seu sorriso encantador, sua sabedoria e toda a luz que você irradia. Igorrr, obrigada por caminhar comigo e me apoiar desde a iniciação, por toda alegria que você traz e pelas risadas gostosas. Pauluu, muito obrigada por conseguir trazer calma mesmo quando a tempestade invade, pelo acolhimento, pelas partilhas espirituais e por todas as palavras que confortam o coração. Ruan, agradeço por todas as vezes que você me escutou, me estimulou a prosseguir na carreira e acreditou em mim. Você realmente faz falta aqui. Marlous, obrigada por me alegrar tanto com suas gracinhas no meio do corredor e pela paciência em me ensinar um pouco do que sabe sobre vetores.

À Prof. Luisa Villa, por ser exemplo e inspiração. Sua espontaneidade e profissionalismo me contagiam e sou realmente grata por ter tido a chance de aprender tanto com você. À Prof. Laura por todo apoio, encorajamento e por ceder equipamentos tão valiosos para os meus experimentos. À Neide, por sempre me lembrar em quem devo acreditar (basta ela passar com sua camiseta pelos corredores), por ser uma boa ouvinte e pelos sorrisos doces. Ao João, tão querido, sempre compartilhando seu astral, mostrando seu carinho ao perguntar sobre nós e por todo cuidado! Ricardo, obrigada por sua amizade, pelos conselhos e por me trazer tanta paz. Emily, muito obrigada pelas partilhas, por todas as dicas, por sempre estar disposta a colaborar, sem medir esforços e sem esperar nada em troca. Ao trio Mandy, Glau e Li por serem companhias tão maravilhosas e me alegrarem tanto! Mairita, tão doce e sempre pronta a dizer alguma

palavra que aquece o coração. Nath, obrigada por todas as vezes que mesmo de longe você ofereceu suporte e me animou com essa risadinha incrível. Você faz falta! Assim como o Louri, que admiro tanto e sou grata por sempre ter me trazido serenidade e me aproximado de Deus. Tauana, obrigada pelos abraços apertados, por compartilhar sua espiritualidade comigo e por me lembrar sempre de “Em tudo, Amar e Servir”!

À equipe do laboratório de Hipóxia e Angiogênese da Universidade de Oxford, onde realizei o período Sanduíche do Mestrado. “Thank you all for welcoming me and sharing your knowledge with me. Especially to Prof. Adrian Harris. Thank you for being able to understand all the challenges I was passing through that moment. The experience of living a new culture and adapting to a new lab would not be the same without your commitment and sensibility. Thank you for believing me and giving me the chance to learn so much with you. To Prof. James, for all his support regarding mass spec. Thank you for all the scientific discussions, for being so polite and for allowing me to use your lab.” À Elisabete, minha portuguesa, por ser mais que uma grande companheira de trabalho. Obrigada por se dedicar tanto, me ajudar nos experimentos de mass spec, nas análises e por compartilhar tanto conhecimento comigo. E mais do que isso, por ter sido a amiga que foi! A vida foi mais leve contigo lá. Sinto sua falta!

“Koonzito, thank you so much for making my days whilst singing with me that *Jesus and David love us*, for giving me the opportunity to meet your College and your culture. Danielle thank you for your kindness, support and joy. You are a sweet person and made my life easier and happier in Oxford. Your presence helped me to feel less homesick. Anne, thank you for being so nice with me, welcoming me in your plans and for always being open to chat. Ana, muchas gracias por todas las veces que me aconsejastes, me invitastes para los almuerzos y por escucharme hablando portugués. To all the members of the Catholic Chaplaincy (the students, employees, and Jesuits) who were signals of God in my life. Thank you for all the times you all enlightened my path and for making me feel at home. Léa, thank you for sharing so many moments with me, for giving me the chance to know the wonderful girl you are! I’ve learned a lot with you and I am happy to say that I have you as a friend!”

À comunidade católica brasileira em Oxford por ter me integrado e me recebido tão bem. Vocês foram de grande apoio e eu sou eternamente grata pelas vezes que me aproximaram do Pai. Agradeço em especial à Ana, que sempre me ajudou com alegria e disposição, que me encorajou e me ouviu tantas vezes! Á Susy, minha mana, e à sua

família (Joãozito e Lucas) por terem aberto as portas de sua casa para uma desconhecida perdida e desesperada. Por me acolherem, me darem suporte, força e amor. Pelos brasileiros e portugueses da Universidade de Oxford que me fizeram sentir em casa e por sempre serem tão calorosos comigo. À Luiza, por ter me recebido, me dado colo, pelos inúmeros desabafos trocados e pelo suporte técnico! Aos meus queridos portugues, Zezito, Miguelito e Rita, que não mediram esforços para me fazer companhia no meu aniversário, por me abrigarem em suas casas de modo tão especial e por me darem tanta força para continuar em Oxford. Foi realmente imprescindível! Os momentos que estivemos juntos foram, de longe, os melhores finais de semana do meu intercâmbio!

Às minhas amizades de infância/adolescência por serem tão pacientes, não desistirem de mim, mesmo eu tendo me distanciado nos últimos anos, por compreenderem minha loucura, minha correria, por sempre estarem por perto quando eu preciso de colo, por torcerem por mim e por continuarem fazendo com que eu me sinta querida. Pode não parecer, mas carrego vocês em meu coração, em minhas orações. O mestrado contribuiu com minha ausência, não consegui me organizar, mas farei o meu melhor para ser uma amiga mais presente nesse novo ciclo. Muito obrigada por serem quem são! Didi, Ju Naga, Rah, Brendinha, Lah, Denix, Dani, Maiaraum, Ju Bosco, Bibi, Andrew, Dudu, Bedinho, Julinho, Mat, Jeh, Lê, te agradeço em especial por dividir o ap comigo, me encher de amor e cuidado. É muito bom ter você por perto e sou realmente grata por tudo que vivemos juntas e ainda vamos viver! Mari agradeço também pela paciência que tem comigo. Aos meus grandes amigos do CM que sempre me dão força, e entendem meus sumiços. Torço muito pela felicidade de cada um e sinto grande admiração pelas pessoas que são. Aos amigos da Corifeu (GAP), Bru e Vi, que acompanharam minha luta aqui no ICESP desde a IC. Àqueles amigos e parentes especiais - Camila, Carlos, Cleide, Bibi, Vanda, Thaci, Ju, Edmir e Mi – obrigada por todo carinho e apoio!

Aos meus amigos (pacientes e chefes de trabalho) no HC, que souberam compreender a minha necessidade em trabalhar meio período nas últimas semanas, por me estimularem e por compartilharem comigo todo conhecimento que possuem de forma leve e alegre. Em especial à Merci, Bel, Leiloca, Maris, Kamis e Lucas. Ju, muito obrigada pela sua amizade! Você enriquece de modo muito especial a minha vida e me faz crescer profissionalmente e espiritualmente também. Re, muito obrigada por ser sinal de esperança e por lutar por um mundo melhor. Mi, você me passa muita

segurança e calma. Aprendo muito com você e me sinto mais tranquila quando você está por perto.

Aos amigos que ganhei no Anchieta e na Paróquia São Luís. Vocês são incríveis. Obrigada por todos os momentos que me aproximaram de Deus e me fizeram sentir o Teu amor. Cresço muito na fé com todos e sinto que minha caminhada tem mais propósito e força quando estamos juntos. Sinto que não estou só e que podemos construir um mundo mais justo e humano! Carol, Affonso e Renata, muito obrigada por toda a força! Foi um privilégio ter feito Crisma com vocês e sou feliz por saber que se tornaram grandes amigos! Agradeço as minhas madrinhas e amigas, Ana (e seu dom de justiça), Maíra (e seu dom da comunicação), Quellyn (e seu dom do cuidado) e Cláudia (e seu dom da escuta). Vocês são muito importantes para mim! Vocês têm um valor enorme!

Ao Laboratório de Oncologia Experimental por todas as chances de crescimento profissional e pessoal. Vivi os mais diversos momentos neste local, dos mais alegres aos mais difíceis da vida, mas sou grata por todos eles. Obrigada por permitirem que eu me conhecesse melhor, por me tornarem mais forte, por me lembrarem de quem sou e quem quero ser. Agradeço em especial à Renata por ter me passado tantos conhecimentos da bancada de forma tão paciente, pelas discussões científicas e por comemorar comigo todas as vezes que tínhamos bons resultados. Ao Matheus, por acrescentar tanto ao grupo PAF com sua experiência e por me alegrar tanto com sua risada. Ao Tharci, Tuty e Mauro por tantas conversas produtivas, por todo apoio e encorajamento. À Cris que sempre foi sinal de Deus no CTO e traz muito conforto, esclarecimentos, ânimo e coragem para enfrentar os desafios.

Aos grandes amigos da Pós-Graduação que fiz neste Lab - Mari, minha companheira noturna, de sorriso fácil; Sil, minha amiga que tanto faz questão de me integrar, MM, pessoa sensível e forte que tanto torce por mim; Karina, aquela que sabe transmitir tanto carinho só de estar perto; Ana Roberta, guerreira com seu jeito brincalhão que tanto me faz rir; Renatinha, cuja marca é o sorriso e a doçura; Re Cavalcanti que me transmite tanta energia - muito obrigada por tudo! Jamais teria conseguido sem vocês!!! Levarei vocês comigo sempre! Ao Jânio, meu querido, companheiro de madrugada e parceiro de bancada e ao Alexander meu “homi” forte e “despombado”, obrigada por confiarem em mim, me consolarem e animarem. À Carolita pelo carinho, preocupação, apoio, força e zelo. Não tenho palavras para dizer

quão grata sou à ela e tamanha admiração que sinto pela profissional que é. À Liz por sempre estar ao meu lado, me mostrando tantas vezes o caminho e me aproximando de Deus.

Ao meu queridinho, meu melhor amigo, Adalts, Sua presença me enriquece. Sei que posso contar contigo em todos os momentos e não sei o que seria dessa travessia sem você. Obrigada por me levantar tantas vezes, por se fazer presente mesmo quando não podemos estar juntos fisicamente, por sorrir meu riso e chorar meu choro. Você é um ser humano fantástico, cheio de dons! Obrigada por me conceder a honra de ser sua amiga para sempre!

À minha mãe, Maria Luiza e ao meu pai, Marcos, pelas inesgotáveis vezes que apoiaram minhas decisões, me carregaram quando não tinha mais forças, que me encorajaram, zelaram por mim e me livraram das angústias. Vocês são a minha razão de ser, faço tudo por vocês, enfrento o mundo com a coragem e valores que me passaram. Sem vocês, não seria possível! Obrigada!

Aos meus avós maternos, Debbie e Waldemar. Sinto tanta falta deles. Passamos por momentos difíceis nos últimos anos no hospital, mas sou eternamente grata por tê-los vivido. O amor de vocês me transformou. Espero orgulhá-los sempre. Obrigada por terem cumprido tão bem o papel de padrinhos e me aproximado de Deus. Aos meus avós paternos, Alair e Aurélio, por todas as orações e por todo amor.

Ao meu orientador Roger Chammas, cujos ensinamentos sobre Oncologia me encantaram desde início. Eu, inocente, não sabia do peso do seu nome e de tudo que estaria associado ao ser sua aluna. Foi um desafio enriquecedor! Obrigada por abrir as portas do seu laboratório para mim, por ser tão paciente e respeitar meu tempo, pelos votos de confiança, por todo incentivo e por compartilhar comigo todo seu conhecimento e sabedoria de um jeito único.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPESP (processos nº 2015/26262-7 e nº 2016/26255-3, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)) por tornar este projeto realidade e à banca examinadora pelo tempo investido na leitura deste trabalho.

Agradeço, por fim, ao MESTRE DOS MESTRES, pelo dom da vida, por não desistir de mim, por me carregar no colo durante o caminho, por me dar a graça de encontrá-Lo e assim me encontrar, por ter Nele minha fonte de luz, paz e força. Obrigada meu Deus pelo seu inesgotável amor! – *“Dominus Illuminatio Mea”*

“[Patient Trust]...And yet it is the law of all progress that it is made by passing through some stages of instability – and that it take a very long time. And so I think it is with you; your ideas mature gradually – let them grow, let them shape themselves, without undue haste. Don’t try to force them on as though you could be today what time (that is to say; grace and circumstances acting on your own good will) will make of you tomorrow.”

Teilhard de Chardin

RESUMO

Jacomassi MD. *Envolvimento da ativação de PAFR frente à quimioterapia no fenômeno de repopulação de melanomas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Um dos desafios recorrentes na prática clínica da Oncologia é o processo de repopulação, no qual células tumorais resistentes à terapia são capazes de proliferar e reconstituir o tumor. No entanto, os mecanismos envolvidos neste fenômeno ainda foram pouco explorados, sendo necessário melhor compreendê-los para evitar a falha terapêutica. Melanomas são bons modelos para estudar repopulação devido às baixas taxas de sobrevida livre de progressão e às altas taxas de resistência às terapias associadas a este tipo de tumor sólido. Sabe-se que a exposição de células tumorais a condições estressoras do microambiente, como hipóxia e hipóxia/reoxigenação, bem como ao próprio tratamento antitumoral, são pressões seletivas frequentemente encontradas em tumores sólidos que favorecem a resistência às terapias e a repopulação tumoral. Estudos prévios indicam que a sinalização mediada pelo Fator de Ativação de Plaquetas (PAF), um lipídio bioativo relacionado à diversas funções fisiológicas, e de seu receptor, PAFR, está associada com a resistência de células de melanoma aos tratamentos citotóxicos e com crescimento tumoral. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento da sinalização de PAFR frente às condições estressoras descritas acima no fenômeno de repopulação de melanomas. Os resultados de espectrometria de massa indicaram que hipóxia aumentou a geração de PAF nas linhagens de melanoma humano SKmel05 e A375, mas não na A375M, embora este aumento não tenha sido observado após a reoxigenação. Além disso, mostraram que SKmel37 exibiu os maiores níveis basais de PAF, aumentando substancialmente sua geração em diferentes tempos de exposição à hipóxia e hipóxia/reoxigenação. Investigamos também a geração de outros ligantes de PAFR, porém nenhum deles foi encontrado nas amostras. Os resultados de detecção de PAFR por Western Blot e/ou citometria de fluxo revelaram que os níveis proteicos não foram modulados por estas condições em nenhuma das linhagens e que, em termos basais, SKmel37 e SKmel05 apresentaram os maiores níveis. Estas linhagens foram, portanto, submetidas a ensaios de proliferação, os quais evidenciaram que frente ao tratamento com o antagonista de PAFR, WEB2086, em condições de hipóxia e hipóxia/reoxigenação, apenas as células SKmel37 tiveram sua proliferação reduzida e morfologia associada à morte. Ensaios de incorporação de iodeto de propídio indicaram que o tratamento destas células expostas à hipóxia/reoxigenação com WEB2086 levou a acúmulo em SG2M, morte celular e sensibilização à cisplatina. Além disso, imunofluorescência de cortes congelados de tumores induzidos com SKmel37 revelou que houve acúmulo de PAFR em áreas hipóxicas e em seu entorno. Em relação ao modelo de exposição à tratamentos antitumorais, por sua vez, curvas de concentração e tempo com Vemurafenib mostraram que SKmel37 e A375 foram resistentes à droga, ao passo que SKmel05 e UACC62 foram sensíveis. Além disso, WEB2086 potencializou o efeito de morte induzido por Vemurafenib nas linhagens sensíveis, mas não afetou as resistentes. Considerando os aspectos clínicos de resposta inicial com posterior desencadeamento de repopulação, seguimos com as linhagens sensíveis e verificamos por citometria que esta droga

aumentou ROS em ambas as linhagens, mas só aumentou PAFR extracelular na SKmel05. O tratamento combinado potencializou a geração de ROS e levou a ativação de caspase3/7 apenas na SKmel05. Esta linhagem foi então submetida a ensaios clonogênicos cujos resultados mostraram que o tratamento com Vemurafenib reduziu o número de clones e que WEB2086 não potencializou este efeito. Assim, o conjunto de resultados apresentados evidencia que a sinalização de PAFR participa dos desfechos de sobrevivência frente à hipóxia/reoxigenação e/ou tratamentos antitumorais, podendo, de alguma forma, contribuir com a repopulação de melanomas.

Descritores: melanoma; fator de ativação de plaquetas; hipóxia; quimioterapia; resistência à medicamentos; recidiva.

ABSTRACT

Jacomassi MD. *Involvement of PAFR activation during chemotherapy in the melanoma repopulation phenomenon* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

One of the recurrent challenges in the clinical practice of Oncology is the process of repopulation, in which therapy-resistant tumor cells can proliferate and reconstitute the tumor. However, the mechanisms involved in this phenomenon were still little explored. The understanding of these events is, therefore, needed to avoid therapeutic failure. Melanomas are good models for studying repopulation due to the low rates of progression-free survival and the high rates of resistance to therapies associated to this type of solid tumor. It is known that the exposure of tumor cells to microenvironmental stress conditions, such as hypoxia and hypoxia/reoxygenation, as well as the exposure to antitumor treatment itself, are selective pressures frequently found in solid tumors that favor therapy resistance and tumor repopulation. Previous studies have indicated that the signaling mediated by the Platelet Activation Factor (PAF), a bioactive lipid related to various physiological functions, and its receptor, PAFR, is associated with resistance of melanoma cells to cytotoxic treatments and with tumor growth. Therefore, the aim of this study was to investigate the involvement of PAFR signaling upon the adverse conditions described above in the phenomenon of melanoma repopulation. Mass spectrometry results indicated that hypoxia increased the generation of PAF in human melanoma cell lines SKmel05 and A375, but not in A375M, although this increase was not observed after reoxygenation. In addition, they showed that SKmel37 exhibited the highest PAF basal levels, whose generation increased substantially after different times of hypoxia and hypoxia/reoxygenation exposure. We also investigated the generation of other PAFR ligands, but none were found in the samples. The results of PAFR detection by Western Blot and/or flow cytometry revealed that protein levels were not modulated by these conditions in any of the cell lines and that, at baseline, SKmel37 and SKmel05 showed the highest levels. These lines were therefore submitted to proliferation assays, which showed that the treatment with the PAFR antagonist, WEB2086, under conditions of hypoxia and hypoxia/reoxygenation, led to proliferation reduction and death-associated morphology in SKmel37 cells only. Propidium iodide incorporation studies indicated that the treatment of these cells exposed to hypoxia/reoxygenation with WEB2086 led to accumulation in SG2M, cell death and cisplatin sensitization. In addition, immunofluorescence of frozen sections of SKmel37-induced tumors revealed that PAFR was found accumulated in hypoxic areas and its surroundings. Regarding the model of exposure to antitumor treatments, concentration and time curves with Vemurafenib showed that SKmel37 and A375 were resistant to the drug, whereas SKmel05 and UACC62 were sensitive. In addition, WEB2086 potentiated the effect of Vemurafenib-induced death on sensitive cell lines but did not affect the resistant ones. Considering the clinical aspects of initial response with subsequent repopulation triggering, we continued using the sensitive cell lines and we verified by cytometry that this drug increased ROS in both cell lines but only increased extracellular PAFR in SKmel05. The combined treatment potentiated the generation of ROS and led to the activation of caspase3/7 in SKmel05 only. This cell line was then

submitted to clonogenic assays whose results showed that treatment with Vemurafenib reduced the number of clones and that WEB2086 did not potentiate this effect. Thus, the set of results presented highlights that PAFR signaling participates in the survival outcomes upon hypoxia/reoxygenation and/or antitumor treatments, and may, in some way, contribute to the repopulation of melanomas.

Descriptors: melanoma; platelet activating factor; hypoxia, chemotherapy; drug resistance; recurrence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ANOVA	Análise de variância
ATM	Ataxia Telangiectasia mutada
BSA	Albumina do soro bovino
BCL	Linfoma de células B
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CD	Grupo de diferenciação
CIS	Cisplatina
COX-2	Ciclooxigenase-2
CO ₂	Dióxido de carbono
DC	Célula dendrítica
DMEM	Do inglês - <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Do inglês - <i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GFP	Do inglês - <i>Green fluorescent protein</i>
HIF-1	Fator induzido por hipóxia-1
HIP	Hipóxia
HIP/REOX	Hipóxia seguida de reoxigenação
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
NFκB	Fator nuclear kappa B
NOR	Normóxia
NP40	“Nonidet P40”
O ₂	Oxigênio

PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PAF-AH	PAF-Acetilhidrolase
PAFR	Receptor do Fator de Ativação de Plaquetas
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLX	PLX4032 ou Vemurafenib
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	Do inglês - <i>Hydrophobic polyvinylidene difluoride</i>
PC	Fosfatidilcolina
RNA	Ácido ribonucleico
RGP	Fase de crescimento radial
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Tampão Salina Tris
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VGP	Fase de crescimento vertical
WEB	WEB2086 ou Apafant

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Celsius, grau
L	Litro
ml	Mililitros
μl	Microlitros
g	Gramas
mg	Miligramas
μg	Microgramas
ng	Nanogramas
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
nm	Nanômetros
>	Maior que
<	Menor que
±	Mais ou menos
=	Igual a
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
μM	Micromolar
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
cm	Centímetros
mm	Milímetros
μm	Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das etapas de iniciação e progressão de melanomas.

Figura 2. Representação da repopulação tumoral frente ao tratamento com Vemurafenib.

Figura 3. Tipos celulares que expressam PAFR e suas possíveis respostas frente ao estímulo de ligantes de PAFR.

Figura 4. Produção de PAF a partir da ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolipídios da membrana celular.

Figura 5. Níveis proteicos de PAFR em linhagens de melanoma humano.

Figura 6. : Identificação de PAF no SFB por LC-MS.

Figura 7. Identificação de PAF em linhagens de melanoma humano expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação por espectrometria de massa.

Figura 8. Avaliação dos níveis proteicos de PAFR por Western Blot em linhagens de melanoma humano expostas a 24 horas de hipóxia.

Figura 9. Avaliação dos níveis proteicos de PAFR por Western Blot em células SKmel 37 após 48 horas de exposição à hipóxia.

Figura 10. Avaliação de PAFR extracelular e intracelular em células SKmel 37 expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação, na ausência de SFB, por citometria de fluxo.

Figura 11. Efeito do bloqueio de PAFR na proliferação de células SKmel 37 (a, b) e SKmel 05 (c, d) expostas à hipóxia (a, c) e hipóxia/reoxigenação (b, d).

Figura 12. Efeito do bloqueio de PAFR na morte (a) e ciclo (b) de células SKmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação - ($pO_2 = 1\%$).

Figura 13. Efeito do bloqueio de PAFR na morte (a) e ciclo (b) de células SKmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação - ($pO_2 > 1\%$).

Figura 14. Efeito do bloqueio de PAFR na capacidade clonogênica de células Skmel 05 expostas à hipóxia (a) e hipóxia/reoxigenação (b).

Figura 15. Avaliação de morte e ciclo celular frente ao tratamento com cisplatina em condições de hipóxia/reoxigenação por citometria de fluxo.

Figura 16. Efeito do bloqueio de PAFR na sobrevivência celular frente à hipóxia/reoxigenação e/ou cisplatina - ($pO_2 = 1\%$).

Figura 17. Efeito do bloqueio de PAFR na sobrevivência celular frente à hipóxia/reoxigenação e/ou cisplatina – ($pO_2 > 1\%$).

Figura 18. Imunofluorescência de cortes de tumores Skmel 37 congelados (A e B) para avaliação de PAFR (em verde) e de áreas hipóxicas (em vermelho).

Figura 19. Efeito do tratamento com Vemurafenib (PLX4032) na morte celular de linhagens de melanoma humano a partir de curvas de concentração com tempo fixo de 48 horas.

Figura 20. Efeito do tratamento com Vemurafenib (PLX4032) na morte celular de linhagens de melanoma humano a partir de curvas de concentração com tempo fixo de 72 horas.

Figura 21. – Efeito do tratamento com Vemurafenib (PLX4032) no ciclo celular de linhagens de melanoma humano.

Figura 22. Efeito do bloqueio de PAFR na morte celular frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032).

Figura 23. Avaliação por citometria de fluxo de PAFR extracelular nas linhagens SKmel 05 e UACC 62 após tratamento com Vemurafenib (PLX4032).

Figura 24. Efeito do bloqueio de PAFR na geração de ROS frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032).

Figura 25. Efeito do bloqueio de PAFR na ativação de caspase-3/7 frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032).

Figura 26. Efeito do bloqueio de PAFR na capacidade clonogênica de células SKmel 05 frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032).

LISTA DE TABELAS E DE ANEXOS

Tabela 1. Lista de “primers” utilizados.

Tabela 2. Ligantes de PAFR investigados nos extratos lipídicos de células de melanoma por espectrometria de massa.

Anexo 1: Morfologia das células SKmel 37 frente ao tratamento com WEB2086 em condições de hipóxia e hipóxia/reoxigenação.

Anexo 2: Expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese de PAF e à degradação de PAF/ “PAF-like”.

Anexo 3: Imunofluorescência de cortes congelados de tumor UACC 62.

Anexo 4: Ensaios de “feeder” como modelo *in vitro* de repopulação.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 MELANOMA	27
1.2 RESISTÊNCIA ÀS TERAPIAS – UM DESAFIO CLÍNICO ENCONTRADO NO TRATAMENTO DE MELANOMAS	29
1.3 REPOPULAÇÃO TUMORAL	31
A) CONCEITOS	31
B) PRESSÕES SELETIVAS QUE FAVORECEM A RESISTÊNCIA ÀS TERAPIAS E O DESENCADEAMENTO DE REPOPULAÇÃO TUMORAL	32
C) MECANISMOS ASSOCIADOS À REPOPULAÇÃO TUMORAL	35
1.4 PAFR E SEUS LIGANTES	35
1.5 PAFR E CRESCIMENTO TUMORAL	38
A) PAFR E IMUNOSUPRESSÃO	38
B) PAFR E RESPOSTA TUMORAL À QUIMIOTERAPIA	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 LINHAGENS CELULARES	43
4.2 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE HIPÓXIA	43
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE PAFR POR WESTERN BLOT	44
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE PAFR POR CITOMETRIA DE FLUXO	45

4.5. IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES DE PAFR POR ESPECTROMETRIA DE MASSA-----	47
4.6 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR -----	49
4.7 ENSAIOS DE CICLO E MORTE CELULAR -----	50
4.8 ENSAIOS CLONOGÊNICOS -----	51
4.9 AVALIAÇÃO DE ROS POR CITOMETRIA DE FLUXO -----	51
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASE-3/7 POR CITOMETRIA DE FLUXO-----	52
4.11 ENSAIOS DE “FEEDER” COM CÉLULAS KBM E KBP -----	52
4.12 IMUNODLUORESCÊNCIA DE TUMORES CONGELADOS-----	53
4.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR-----	53
4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS -----	55
5. RESULTADOS -----	56
5.1.1 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA VIA DE PAFR FRENTE À HIPÓXIA E/OU HIPÓXIA/REOXIGENAÇÃO-----	56
A) Linhagens de melanoma humano expressam PAFR, cujos níveis proteicos basais são maiores nas linhagens SKmel 37 e SKmel 05--	56
B) Hipóxia aumenta os níveis intracelulares de PAF nas linhagens SKmel 37, SKmel 05 e A375 e hipóxia/reoxigenação também aumenta este fosfolípido nas células SKmel 37. -----	57
C) Os níveis proteicos totais de PAFR não são modulados por hipóxia em nenhuma das linhagens de melanoma humano testadas. -----	61
D) Os níveis proteicos de PAFR intracelular e extracelular das células SKmel 37, na ausência de SFB, não são modulados por hipóxia, tampouco por hipóxia/reoxigenação. -----	63
5.1.2 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DE PAFR NA PROLIFERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR FRENTE À HIPÓXIA E/OU HIPÓXIA/REOXIGENAÇÃO -----	
A) Hipóxia e hipóxia/reoxigenação reduzem a proliferação de células SKmel 37 e o bloqueio do PAFR com WEB2086 potencializa esse efeito. Entretanto, estas condições experimentais não alteram a proliferação de células SKmel 05-----	64
B) Em condições de hipóxia/reoxigenação, o bloqueio da via de PAFR induz morte celular e leva a acúmulo das células Skmel 37 em SG2M. -----	64
C) Apesar de hipóxia e hipóxia/reoxigenação reduzirem o número de clones formados por células Skmel 05, o bloqueio de PAFR não tem impacto sobre a capacidade clonogênica destas células. -----	66
	68

5.1.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE PAFR NA SENSIBILIZAÇÃO À CISPLATINA EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA/REOXIGENAÇÃO-----	70
A) Células Skmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação são mais resistentes à morte celular induzida por cisplatina-----	70
B) Em condições de hipóxia/reoxigenação, o bloqueio de PAFR sensibiliza as células Skmel 37 à morte celular induzida por cisplatina.-----	71
5.1.4 VERIFICAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE PAFR EM CORTES CONGELADOS DE TUMORES --.-----	74
A) PAFR é encontrado acumulado em áreas hipóxicas de tumores Skmel 37 e em seus arredores.-----	74
5.2.1 INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE PAFR NA RESPOSTA DE SOBREVIVÊNCIA FRENTE AO VEMURAFENIB-----	75
A) As linhagens SKmel 37 e A375 são mais resistentes à morte celular induzida por Vemurafenib do que as linhagens SKmel 05 e UACC 62.	75
B) O tratamento com Vemurafenib induz acúmulo celular em G0G1 em todas as linhagens de melanoma, exceto UACC 62-----	78
C) O bloqueio da via de PAFR com WEB2086 potencializa o efeito de morte induzido por Vemurafenib nas linhagens SKmel 05 e UACC 62, mas não afeta as linhagens mais resistentes. -----	80
5.2.2 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS DE PAFR FRENTE AO TRATAMENTO COM VEMURAFENIB-----	81
A) O tratamento com Vemurafenib aumenta os níveis proteicos de PAFR extracelular nas células SKmel 05, mas não nas células UACC 62. -----	81
5.2.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE PAFR NOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE MORTE E NA RESPOSTA DE SOBREVIVÊNCIA A LONGO PRAZO FRENTE AO TRATAMENTO COM VEMURAFENIB-----	82
A) O tratamento com Vemurafenib aumenta os níveis proteicos de PAFR extracelular nas células SKmel 05, mas não nas células UACC 62. -----	82
B) O tratamento com Vemurafenib e WEB2086 leva, ainda que baixa, a ativação de caspase-3/7 apenas nas células SKmel 05-----	84
	85

C) O bloqueio de PAFR não potencializa a redução da capacidade clonogênica induzida pelo tratamento com Vemurafenib-----

6. DISCUSSÃO -----	87
7. CONCLUSÕES -----	106
8. REFERÊNCIAS -----	107
ANEXOS -----	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia melanocítica maligna de baixa incidência, porém de alta letalidade. Todas as neoplasias melanocíticas, tanto as benignas quanto as malignas, são originadas a partir dos melanócitos, os quais são células derivadas da crista neural que, ao longo do desenvolvimento, colonizam a pele, os olhos e as mucosas. Na pele, os melanócitos se encontram na camada basal da epiderme e, infrequentemente, proliferam; são responsáveis pela produção de melanina e pelo fornecimento deste pigmento para os queratinócitos vizinhos. Em resposta ao dano induzido pela radiação ultravioleta (UV), os queratinócitos liberam sinais para que os melanócitos proliferem e produzam melanina. Assim sendo, os melanócitos fazem parte do sistema de defesa contra o dano ao DNA induzido pela radiação UV (1).

De fato, o principal agente etiológico ambiental responsável pelo desenvolvimento de melanomas é a radiação UV. Esta radiação eletromagnética abrange comprimentos de onda de 200nm a 400nm, os quais determinam a classificação da radiação UV em: UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) e UVC (<200nm). A radiação UVC é retida pela camada de ozônio, entretanto, tanto a radiação UVA quanto a radiação UVB podem gerar danos ao DNA. Enquanto a radiação UVB age diretamente no DNA, através da formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) e de fotoprodutos 6,4-pirimidina-pirimidona (6,4PPs), a radiação UVA, por sua vez, age indiretamente no DNA, pois leva a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que então reagem com moléculas como proteínas, lipídios e, inclusive o DNA (2). Outra importante fonte de ROS é a própria produção de melanina (3). Portanto, apesar da

proteção desempenhada por esta macromolécula, a excessiva exposição à radiação UV pode impedir o papel citoprotetor deste pigmento.

Além disso, outros fatores de risco estão associados com o desenvolvimento desta doença. São eles: pele, olhos e cabelos claros, história familiar de melanoma ou outro tipo de câncer de pele, presença de nevos congênitos ou displásicos e acometimento pela doença de Xeroderma Pigmentoso (4).

A iniciação e progressão do melanoma podem ser representadas pela Figura 1, todavia, é importante ressaltar que o surgimento desta doença não necessariamente segue esta ordem e não depende da ocorrência de todas as etapas descritas. Não obstante, 50% dos melanomas seguem os estágios descritos abaixo (5).

Figura 1 – Representação das etapas de iniciação e progressão de melanomas. Adaptado de Zaide, MR. et al. 2008 (5).

Em resposta à radiação UV, uma subpopulação de melanócitos acometida pelo descontrole molecular e celular gerado por alterações genéticas envolvidas em reparo do material genético, apoptose, sobrevivência e proliferação celular, bem como por alterações epigenéticas que modulam estas vias, passa a proliferar de maneira

exacerbada, originando um nevo benigno. Este nevo, geralmente, senesce e não progride. No entanto, eventualmente, alguns melanócitos conseguem ultrapassar esta senescência e progridem para a fase de crescimento radial (RGP), cujo crescimento é confinado ao epitélio. Quando os melanócitos adquirem a capacidade de invadir a derme e proliferar, progridem para a fase de crescimento vertical (VGP), que pode evoluir para a fase metastática, na qual tecidos distantes da lesão primária são colonizados (5).

Conforme citado anteriormente, os melanomas apresentam altas taxas de mortalidade. Isto se deve a alta capacidade metastática e a alta resistência às terapias que possuem.

1.2 RESISTÊNCIA ÀS TERAPIAS – UM DESAFIO CLÍNICO ENCONTRADO NO TRATAMENTO DE MELANOMAS

Melanomas apresentam altas chances de cura se diagnosticados precocemente (fase radial de crescimento), sendo a ressecção cirúrgica o tratamento convencional, neste caso. No entanto, os estadios mais avançados, geralmente associados com o diagnóstico tardio, requerem tratamentos mais agressivos e apresentam pior prognóstico. Nestas formas da doença, dependendo do grau, profundidade e espessura do tumor, pode-se indicar como tratamento a radioterapia, quimioterapia, a utilização de drogas alvo dirigidas e/ou imunoterapia. Todavia, inúmeros são os desafios encontrados no tratamento do melanoma, incluindo as baixas taxas de resposta (os pacientes apresentam, em média, 6 a 9 meses de sobrevida) e as toxicidades (6). Vale ressaltar que os altos custos associados à incorporação de novas drogas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) também fazem parte dos desafios do tratamento a âmbito nacional.

A Dacarbazina foi o primeiro fármaco para o tratamento de melanoma a ser aprovado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) e possui maior eficácia em tumores metastáticos. Esta droga, bem como a análoga, Temozolomida, atuam como agentes alquilantes de DNA e, embora apresentem baixas taxas de resposta quando utilizadas como monoterapia (7) continuam sendo opções de quimioterapia paliativa para os pacientes do SUS.

Além da monoterapia, existem regimes que combinam a dacarbazina com outras drogas alquilantes, como por exemplo, a cisplatina. Esta droga antitumoral se liga covalentemente ao DNA levando a formação de adutos que alteram a estrutura do material genético. Durante o ciclo celular, estes adutos podem ser reconhecidos e reparados, porém o processo de morte celular pode ser induzido caso não seja possível reparar estes danos (8).

Considerando os altos custos associados ao tratamento de tumores, a vantagem da utilização de cisplatina se reflete a nível socioeconômico, já que possui baixo custo. No entanto, infelizmente, além dos diversos efeitos colaterais induzidos pela droga, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, as taxas de resposta ao tratamento são baixas. De fato, os tumores adquirem resistência ao tratamento com cisplatina através de diversos mecanismos (9,10), limitando e inviabilizando a utilização desta droga nas práticas clínicas.

A descoberta da presença de mutações em BRAF na maioria dos pacientes com melanoma metastático possibilitou o desenvolvimento de drogas alvo-dirigidas, como o Vemurafenib (PLX4032), que revolucionou o tratamento de pacientes com este perfil. As mutações em BRAF conferem a ativação constitutiva da via MAPK contribuindo com o descontrole proliferativo, sendo a mutação V600E a mais frequente entre elas (11, 12).

Entretanto, apesar do sucesso inicialmente observado com o uso deste inibidor específico de BRAF, representado pelas significativas e abrangentes taxas de resposta, bem como pela baixa e bem tolerada toxicidade, infelizmente, os tumores adquirem resistência ao tratamento, resultando na progressão da doença em, aproximadamente, seis meses. Assim, invariavelmente, pacientes contendo a mutação apresentarão resistência intrínseca ou adquirida ao tratamento com Vemurafenib, culminando em progressão ou recidiva, conforme exemplificado na Figura 2 (13,14).

Figura 2 –Representação da repopulação tumoral frente ao tratamento com Vemurafenib
Paciente com melanoma metastático antes do tratamento com Vemurafenib (A), após 15 semanas de tratamento (B) e após 23 semanas de tratamento (C). Apesar da resposta inicial, o tratamento com Vemurafenib não impede a repopulação tumoral em longo prazo Adaptado de Wagle N, et al. 2011 (14).

1.3 REPOPULAÇÃO TUMORAL

A) CONCEITOS

Devido aos diversos efeitos colaterais, geralmente, os tratamentos citotóxicos são administrados periodicamente e em múltiplas doses para garantir a recuperação de

tecidos normais durante a janela terapêutica. No entanto, células tumorais refratárias ao tratamento também são capazes de proliferar durante estes intervalos, limitando a eficácia terapêutica e podendo levar a repopulação tumoral (15).

Clinicamente, este fenômeno de repopulação tumoral é conhecido como recidiva e pode ocorrer no mesmo local de origem do tumor primário (recidiva local), em regiões teciduais próximas podendo acometer os linfonodos (recidiva regional) ou em órgãos distantes do tumor original através da disseminação das células tumorais (recidiva metastática) (15).

A repopulação tumoral local, portanto, é o processo em que células refratárias ao tratamento podem proliferar novamente e reconstituir o tumor. Este fenômeno foi primeiramente observado em pacientes tratados com radioterapia, sendo reproduzido em estudos utilizando modelos animais. Porém, pouco se sabe sobre este processo na vigência de quimioterapia (15), tornando-se necessários novos estudos que avaliem suas características essenciais, tais como, resistência/sobrevivência, proliferação e reconstituição tumoral.

Durante a terapia citotóxica contra o câncer, grande parte das células da massa tumoral sofre apoptose e é eliminada por células do sistema imune (16). No entanto, nem todas as células tumorais sucumbem aos efeitos da injúria citotóxica. Estas células sobreviventes possuem ativados alguns mecanismos de sobrevivência que conferem, dentre outras características, resistência às terapias.

B) PRESSÕES SELETIVAS QUE FAVORECEM A RESISTÊNCIA ÀS TERAPIAS E O DESENCADEAMENTO DA REPOPULAÇÃO TUMORAL

Tumores sólidos, como melanomas, são extremamente heterogêneos em sua composição, abrangendo desde células tumorais até células estromais, endoteliais e do

sistema imune. Além desta diversidade encontrada no microambiente tumoral, devido à instabilidade genética e epigenética, as próprias células tumorais também apresentam grande heterogeneidade entre si. Sendo assim, dentro de um tumor, existem diversas subpopulações de células tumorais. No entanto, as monoterapias tratam os tumores como doenças homogêneas, negligenciando as variações (celulares e moleculares) encontradas e a relação de comunidade que possuem. Assim, não é surpreendente esperar que tumores sejam resistentes às terapias. (17)

Esta resistência se dá a nível intrínseco, como resultado da própria diversidade intratumoral, e adquirido, como resultado da exposição a diversas pressões seletivas, como por exemplo, hipóxia, privação de nutrientes (“starvation”) e tratamentos indutores de morte (como no caso do Vemurafenib), que acabam selecionando subpopulações celulares mais resistentes (14,18).

De fato, devido à proliferação descontrolada das células tumorais, que pode superar o suprimento sanguíneo, e à distribuição desigual de oxigênio favorecido pela vascularização defeituosa, algumas áreas de tumores sólidos, inclusive melanoma, são expostas à hipóxia e “starvation” (18).

Embora a hipóxia seja tóxica tanto para células normais quanto para células tumorais, de modo geral, as últimas são contempladas com vantagens adaptativas resultantes de alterações genéticas e epigenéticas que possibilitam sua sobrevivência mesmo nestes ambientes hostis. Diversas são as vias de sinalização ativadas em resposta a diminuição da pressão parcial de oxigênio, destacando-se dentre elas, as vias relacionadas à regulação da proliferação, angiogênese e morte celular (18).

A ativação destas vias também contribui para a resistência adquirida às terapias atuais, especialmente aquelas que dependem da proliferação celular (como quimioterapia com drogas ciclo-ativas) e de oxigênio (como radioterapia) para atuar.

Além disso, a toxicidade e a penetração de drogas também são comprometidas em regiões hipóxicas, limitando ainda mais a efetividade terapêutica (19).

Por exemplo, o desencadeamento de autofagia é um dos mecanismos que favorece a sobrevivência tumoral neste contexto e que também está relacionado à resistência às terapias citotóxicas utilizadas no tratamento de melanomas, como cisplatina e Vemurafenib (20 - 23). De fato, marcadores de autofagia estão co-localizados com áreas hipóxicas tumorais (24) e a indução deste processo em condições de privação de oxigênio possibilita a seleção de células resistentes a apoptose, contribuindo, assim, com a geração de tumores mais agressivos (25).

Assim, hipóxia está frequentemente associada com mau prognóstico clínico (18), sendo importante, portanto, conhecer os elementos pertencentes a vias de resposta à hipóxia para desenvolver novas terapias alvo-dirigidas.

No entanto, vale ressaltar que o tumor é um microambiente dinâmico em que processos de proliferação, migração e morte estão constantemente contribuindo para a redistribuição de células dentro da massa sólida, principalmente quando atrelados à intervenção terapêutica. Consequentemente, além da angiogênese, estes eventos também contribuem para a reoxigenação de células que estavam sob condições de hipóxia. Assim sendo, células que estavam sob hipóxia, as quais tendem a ser mais resistentes às terapias, podem sofrer reoxigenação, recuperar sua capacidade proliferativa e reconstituir o tumor, contribuindo dessa maneira para a falha terapêutica e repopulação tumoral (26).

C) MECANISMOS ASSOCIADOS À REPOPULAÇÃO TUMORAL

Apesar de a repopulação tumoral ser um fenômeno frequente na clínica, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não estão totalmente esclarecidos.

O trabalho de Huang Q et. al (2011) propõe um mecanismo pelo qual a repopulação acontece. De acordo com os autores, (conforme já descrito pelos mesmos para o processo de cicatrização), após radioterapia ou quimioterapia com Vemurafenib, por exemplo, apoptose é deflagrada e as células apoptóticas liberam fatores proliferativos para as demais células em um mecanismo dependente da ativação de caspase 3, denominado de “Phoenix Rising” (27,28).

Neste modelo, ao mesmo tempo em que caspase 3 executa a via de apoptose, leva a ativação de fosfolipase A2 (PLA2). Esta enzima por sua vez, hidrolisa fosfolipídios de membrana e libera ácido araquidônico (AA), que após ação da ciclooxigenase 2 (COX2), gera prostaglandina E2 (PGE2). Este mediador age como fator de proliferação para as células tumorais sobreviventes que então repopulam o tumor.

Em paralelo à geração de AA, a ativação de PLA2 também pode levar ao acúmulo do fator de ativação de plaquetas, PAF, cujo receptor é o PAFR (29).

1.4 PAFR E SEUS LIGANTES

O receptor do fator de ativação de plaquetas (PAFR) é um receptor acoplado à proteína G de sete domínios transmembranares. Dependendo de sua localização celular, pode estar acoplado à subunidade G α q ou G α i da proteína G e, conseqüentemente, sua ativação pode disparar diferentes vias de sinalização. O PAFR expresso na membrana plasmática encontra-se associado com a subunidade G α q e sua ativação resulta na

ativação de MAP quinases, PKC e PLA2. Por sua vez, quando se encontra localizado no envelope nuclear, PAFR está acoplado à subunidade G α i e sua ativação leva a ativação de NF- κ B e MAPK, bem como a expressão gênica de iNOS e COX2 (30). Porém, independente de sua localização, a ativação de PAFR resulta no aumento dos níveis intracelulares de Ca $^{2+}$, 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3), e também na diminuição dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (31, 32).

Este receptor é expresso em leucócitos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, plaquetas e, inclusive, células tumorais. Frente ao estímulo de ligantes de PAFR, estes tipos celulares apresentam diferentes respostas, que se encontram sumarizadas na Figura 3 (33).

Figura 3 - Tipos celulares que expressam PAFR e suas possíveis respostas frente ao estímulo de ligantes de PAFR. Adaptado de Bar-Eli et.al 2007 (33).

PAF (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina) foi o primeiro ligante de PAFR a ser identificado (34). O PAF é um lipídio bioativo que está relacionado com diversas funções fisiológicas, como inflamação, apoptose, angiogênese e cicatrização (35).

Assim como a maioria dos mediadores lipídicos, PAF não se encontra estocado nas células (exceto em plaquetas) e sua síntese depende de estímulos celulares, tais

como fatores de crescimento, irradiação UV e estresse oxidativo (inclusive o induzido por quimioterapia) (36).

Basicamente, a ação da PLA2 sobre fosfolipídios de membrana gera AA (precursor de eicosanóides) e alquil 2-liso-glicerofosfolinas (LysoPAF), o qual pode originar o PAF através da ação de lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT), como representa a Figura 4. A degradação de PAF, por sua vez, se dá, unicamente, através da atividade de PAF acetilhidrolase (PAF-AH), cuja expressão é detectável, normalmente, logo após a síntese do mediador lipídico, conferindo a PAF, uma meia vida curta (37).

Figura 4 - Produção de PAF a partir da ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolipídios da membrana celular. PLA2 remove um ácido graxo insaturado de um fosfolipídio de membrana, formando o precursor de PAF, denominado LysoPAF, e da enzima acetiltransferase, que adiciona uma molécula de acetyl-CoA ao precursor. Acessado em: <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2135>.

Além de PAF, PAFR reconhece análogos de PAF, denominados lipídios “PAF-like”, gerados pela oxidação de fosfolipídios de membrana. A produção destes ligantes de PAFR não depende das enzimas anteriormente citadas e se dá pela ação de agentes oxidantes, como ROS, que reagem com ligações duplas insaturadas presentes nos

fosfolipídios. Assim sendo, a produção dos lipídios “PAF-like” ocorre de forma não controlada, gerando uma gama de ligantes de diferentes graus de afinidade por PAFR (38,39).

Como comentado anteriormente, alguns tipos de tumores também expressam PAFR e a sua ativação tem sido relacionada com o crescimento tumoral.

1.5 PAFR E CRESCIMENTO TUMORAL

A) PAFR E IMUNOSUPRESSÃO

Inúmeros trabalhos têm evidenciado a contribuição de PAFR para o estabelecimento de um microambiente imunossupressor que, por sua vez, favorece o crescimento tumoral. Um evento que participa do quadro de imunossupressão presente no microambiente tumoral é a polarização de macrófagos para um fenótipo supressor ou do tipo M2 (IL-10 “high”/ IL-12 “low”). Diversos estímulos podem induzir a polarização dos macrófagos para este fenótipo, dentre eles a fagocitose de células apoptóticas, (40), que são abundantes no microambiente tumoral, principalmente após tratamentos citotóxicos, como radioterapia e quimioterapia, mas também devido a condições de estresse como hipóxia, hipóxia/reoxigenação e “starvation”. Estudos recentes mostram que a fagocitose destas células apoptóticas depende do receptor “scavenger” CD36 e de PAFR (41), ambos presentes na membrana plasmática destas células fagocíticas. Além disso, estudos demonstram que a partir de uma dose subtumorigênica de células de melanoma, obtém-se crescimento tumoral apenas quando uma grande quantidade de células apoptóticas é concomitantemente injetada (42). No entanto, a utilização do antagonista de PAFR, WEB2170, reverte este efeito,

evidenciando o papel de PAFR na geração de um microambiente imunossupressor que favorece o crescimento tumoral.

Os estudos de Fecchio et al. também evidenciam a participação de PAFR na modulação de macrófagos para um fenótipo regulador. Em experimentos *in vivo*, os macrófagos de camundongos acometidos com tumores ascíticos de Ehrlich perdiam características relacionadas à ativação, como capacidade de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de espreiar sobre placas de cultivo. No entanto, o tratamento dos animais com antagonistas de PAFR reverteu este quadro supressor e reduziu o crescimento dos tumores (43,44).

O fenótipo regulador de células dendríticas (DCs) também é característica do ambiente imunossupressor. A ativação de PAFR nestas células contribui para geração deste fenótipo através da manutenção de altos níveis de IL-10 e PGE2. Sendo assim, a utilização de antagonistas de PAFR em DCs, por sua vez, potencializa a apresentação de antígenos e aumenta a proliferação de linfócitos (45).

Estes dados mostram que a ativação de PAFR em células do sistema imune participa do mecanismo de indução de imunossupressão observado em tumores e evidencia o importante papel deste receptor no estabelecimento desta doença.

B) PAFR E RESPOSTA TUMORAL À QUIMIOTERAPIA

Conforme já citado anteriormente, além de células do sistema imune, alguns tipos de tumores também expressam PAFR.

Em melanoma, estudos demonstram a relação de PAF e quimioterapia, sugerindo que o aumento da regulação de fatores anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xL, induzido por PAF de maneira dependente de NF-κB, pode reduzir os efeitos citotóxicos

provocados pelos agentes quimioterápicos e assim, contribuir com a sobrevivência tumoral (46).

Um trabalho realizado pelo nosso grupo (36) mostrou que o tratamento *in vitro* com cisplatina induziu um aumento na expressão de PAFR em células de melanoma humano (SKmel 37). Além disso, *in vivo*, o tratamento concomitante com cisplatina e antagonista de PAFR (WEB2086) resultou em uma maior redução do volume do tumor e regressão tumoral quando comparado aos tratamentos separados. Estes dados sugerem que a via de PAFR está envolvida em algum mecanismo de proteção ao dano celular gerado por cisplatina e que seu bloqueio favorece a morte induzida por este quimioterápico.

Além disso, sabe-se que o tratamento de células tumorais com quimioterápicos induz a geração de ligantes de PAFR e que estes contribuem para o fenômeno de imunossupressão, favorecendo o crescimento tumoral. No mesmo trabalho, os autores demonstram que células tumorais que expressam PAFR geram duas vezes mais ligantes de PAFR do que células que não expressam. Estes resultados confirmam que, em decorrência ao tratamento, a ativação deste receptor leva a um mecanismo de retroalimentação positiva, o qual, possivelmente, garantiria a manutenção da imunossupressão e da resistência às terapias, facilitando, conseqüentemente, a sobrevivência, crescimento e repopulação tumoral (47).

2. JUSTIFICATIVA

Um dos desafios encontrados no tratamento do câncer é o processo de repopulação tumoral, no qual células resistentes à terapia são capazes de proliferar e reconstituir novamente o tumor. No entanto, apesar de ser recorrente na clínica, contribuindo para a falha terapêutica, os eventos celulares e moleculares envolvidos neste fenômeno ainda foram pouco explorados, sendo necessário melhor compreendê-los para que, futuramente, se possa prevenir o processo e aperfeiçoar o tratamento. Melanomas são bons modelos para estudar repopulação devido às baixas taxas de sobrevida livre de progressão e às altas taxas de resistência às terapias associadas a este tipo de tumor sólido. Sabe-se que a exposição de células tumorais a condições estressoras do microambiente, como hipóxia e hipóxia/reoxigenação, bem como ao próprio tratamento antitumoral, são pressões seletivas frequentemente encontradas em tumores sólidos que favorecem a resistência às terapias e a repopulação tumoral. Estudos prévios indicam que a sinalização mediada pelo Fator de Ativação de Plaquetas (PAF), um lipídio bioativo relacionado a diversas funções fisiológicas, e de seu receptor, PAFR, está associada com a resistência de células de melanoma aos tratamentos citotóxicos e com crescimento tumoral. Portanto, é pertinente investigar o envolvimento da sinalização de PAFR frente a condições estressoras, como hipóxia/reoxigenação e/ou tratamentos citotóxicos, no fenômeno de repopulação de melanomas. A possível participação de PAFR neste processo poderia levar ao enquadramento deste receptor como novo alvo terapêutico, de modo a aumentar a eficácia dos tratamentos antitumorais convencionais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do projeto é avaliar o envolvimento da ativação de PAFR nos desfechos de sobrevivência das células tumorais frente a condições estressoras que favorecem a repopulação tumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Frente a condições estressoras como hipóxia, seguida ou não de reoxigenação, e/ou tratamentos indutores de morte celular, avaliar:

- A modulação da via de PAFR, através da identificação do receptor por Western Blot ou citometria de fluxo e de seus ligantes por espectrometria de massa;
- O envolvimento da via de PAFR na proliferação celular, através de contagem de células;
- O envolvimento da via de PAFR na sobrevivência celular a partir de ensaios de morte e ciclo celular por citometria de fluxo e ensaios clonogênicos;
- Os possíveis mecanismos de morte deflagrados e a participação de PAFR nestes processos, através de ensaios de geração de ROS e ativação de caspase-3/7 por citometria de fluxo.

b) Verificar a distribuição de PAFR em cortes congelados de tumores através de imunofluorescência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens de melanoma humano SKmel 05, A375, A375M e UACC 62, bem como as células de carcinoma epitelial humano KBM e KBP foram cultivadas em “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A linhagem SKmel 37, por sua vez, foi cultivada em “Minimum Essential Medium” (MEM) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todas as linhagens de melanoma utilizadas possuem a mutação V600E em BRAF e são tumorigênicas. Para o cultivo celular, os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e o pH foi mantido entre 7,2-7,4. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, livres da contaminação por micoplasma.

4.2 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE HIPÓXIA

Para estabelecer a condição de hipóxia, câmara de hipóxia (Billpus- rothenberg- Modular Incubator Chamber, Del Mar, Califórnia, EUA) ou fluxo de hipóxia (H35 Hypoxystation, Don Whitley Scientific, UK) foram utilizados. Na câmara, um volume de 20 litros de gás foi injetado por minuto, sendo 19 litros de nitrogênio e 1 litro de CO₂, até que o sensor de oxigênio (O₂) indicasse porcentagem de O₂ referente a 0,7-1%. No fluxo, os níveis de gases foram mantidos e controlados automaticamente a partir de condições pré-estabelecidas, como 1% O₂ e 5% CO₂, e sua atmosfera foi mantida a 37°C com 60% de umidade.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE PAFR POR WESTERN BLOT

a. Extração proteica

As linhagens SKmel 05, A375 e A375M foram expostas ou não a 24 horas de hipóxia, ao passo que a linhagem SKmel 37 foi exposta a 48 horas de hipóxia. Ao final de cada respectivo período, foi realizada extração proteica total. Para isso, tampão de lise celular NP40 “Cell Lysis Buffer” (Invitrogen), contendo 2µg/mL aprotinina, 1mM PMSF foi adicionado e, no gelo, com auxílio de um “scraper”, as células foram removidas da placa e lisadas. A solução ressuspendida no tampão foi incubada no gelo por 30 minutos. Após este período, foi centrifugada a 13000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, de modo a se obter o lisado proteico total, o qual foi armazenado a -20°C. A dosagem de proteínas obtidas foi realizada de acordo com protocolo modificado do Método de Lowry, utilizando o kit Ensaio de Proteína BCA, da BioAgency®, conforme descreve o fabricante, sendo BSA o padrão proteico. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Rad®), utilizando-se filtro de 592nm.

b. Eletroforese em gel de poliacrilamida e blotting

Foram realizadas análises de proteínas separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE). As amostras de extratos proteicos foram separadas em gel de poliacrilamida. O gel de corrida era constituído por 3.95mL H₂O, 2.5mL Lower Buffer (4x), 3.3mL 30% acrilamida/0.8% bisacrilamida, 200µL de Persulfato de Amônio 10% (APS), 3µL TEMED, e o gel de empilhamento por 3.6mL H₂O, 625µL Upper Buffer (4x), 665µL 30%acrilamida/0.8% bisacrilamida, 100µL APS 10%, 3µL TEMED. Em seguida, os extratos proteicos separados foram transferidos para

membrana PVDF (“Hydrophobic polyvinylidene difluoride, Amershan/GEHealthcare”) para realização do “blotting”, o qual foi realizado em tampão de transferência contendo 25mM Tris-base, 192mM glicina, 20% MeOH, em água por 1 hora e 30 minutos a 100 V, no gelo. A membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueados com BSA 5% em TBS-Tween 0.1% e incubada com os anticorpos primários policlonais: rabbit-anti-PAFR 1:3000 (Cayman) e mouse-anti- β -actina 1:4000 (Sigma), em TBS 1% BSA 0,1% Tween, sob agitação a 4°C overnight. Em seguida, após três lavagens de 10 minutos cada com TBS-Tween 0.1%, foi incubada com os anticorpos secundários, anti-mouse e anti-rabbit conjugados à peroxidase (Sigma). Solução ECL foi adicionada e a revelação da membrana foi realizada utilizando-se o “ECL Western Blotting System” da GE. Como controle da reação, um padrão conhecido de peso molecular foi utilizado (Bio-Rad, Kaleidoscope).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE PAFR POR CITOMETRIA DE FLUXO

a) Frente à hipóxia e hipóxia/reoxigenação

Células SKmel 37 foram plaqueadas (1×10^5 células por poço em placas de 6 poços) em meio contendo SFB e após adaptação de aproximadamente 24 horas, o meio foi retirado, as células foram lavadas 2x com PBS para remover qualquer resquício de SFB e meio fresco livre de SFB foi adicionado (2mL por poço). As células foram então expostas à hipóxia por 24 horas e reoxigenadas ou não por 3 horas. Ao final do período, o meio foi descartado, acutase foi adicionada por aproximadamente 30 minutos, as células foram neutralizadas com meio de cultura, contadas e foram separadas 2×10^5 células/ependorff. Nos grupos em que as células seriam permeabilizadas, adicionou-se a solução permeabilizante citofix/citoperm BO (100 μ l/tubo) por 20min no gelo. Em seguida, os tubos foram lavados com solução de lavagem (PBS 2% SFB) e

centrifugados a 200g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o anticorpo primário anti-PAFR (1:100, Cayman Chemical) foi incubado em solução permeabilizante por 20 minutos no gelo. Após este período, outra lavagem foi realizada e as células foram incubadas em solução permeabilizante com o anticorpo secundário anti-rabbit Alexa Fluor 488 feito em goat (Invitrogen- Life Technologies) por 20 minutos no gelo, no escuro. Foram realizadas duas lavagens com solução de lavagem a 200g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS. Como controle secundário, houve um grupo de células incubadas apenas com o anticorpo secundário. Neste controle também foi contemplada a autofluorescência das células como background.

b) Frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032)

As linhagens SKmel 05 e UACC 62 foram plaqueadas (1×10^5 células por poço em placas de 6 poços) em meio contendo SFB e tratadas com 10 μ M de PLX4032 por 48 horas. Ao final do período, o meio foi descartado, adicionou-se PBS e, no gelo, com auxílio de “scraper”, as células foram removidas e posteriormente centrifugadas a 250g por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, o pellet foi ressuspendido em solução de bloqueio (PBS 2% BSA) por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células foram incubadas em solução de marcação (PBS 1% Soro Fetal de Cabra, 0,1% de azida sódica) contendo o anticorpo primário anti-PAFR (1:100, Cayman Chemical) no gelo. Após 30 minutos, as células foram lavadas e ressuspensas em solução de marcação contendo o anticorpo secundário anti-rabbit Alexa Fluor 488 feito em goat (Invitrogen- Life Technologies) por 30 minutos no gelo. Como controle secundário, houve um grupo de células incubadas apenas com o anticorpo secundário. Neste controle também foi contemplada a autofluorescência das células como background.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES DE PAFR POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para extração lipídica, as células foram plaqueadas em placas de 10cm (5.10^5 células/placa; atingindo entre 70% - 80% de confluência ao final do experimento), 4 placas por condição (sendo 3 placas para extração de lipídios e 1 placa para contagem de células) e as células foram adaptadas por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido, as células foram abundantemente lavadas com PBS e DMEM (para SKmel05, A375 e A375M) ou MEM (para SKmel37) apenas (sem SFB) foi adicionado. As células foram então expostas à hipóxia por 24h e reoxigenadas ou não por 3h. Além desse regime, as células SKmel37 também foram expostas à hipóxia por 48h e reoxigenadas ou não por 6h.

a) Extração lipídica

Quando o período estabelecido de exposição à hipóxia terminou, o número de células de cada condição experimental foi avaliado pela contagem do número de células presentes nas placas extras. As outras três placas foram utilizadas para extrações lipídicas, que foram realizadas no gelo. Para isso, o sobrenadante de cada placa foi retirado e mantido em um tubo falcon de 15mL (para posterior análise de espectrometria de massa do conteúdo extracelular). As células foram rapidamente lavadas com PBS gelado uma vez para remover qualquer excesso de meio e após o removê-lo, 500µL de MeOH 100% foi adicionado por placa por 5 minutos (as placas foram suavemente agitadas, assegurando que todas as células fossem cobertas pelo MeOH). Após este período, as células foram soltas com auxílio de “scraper” no gelo e transferidas para um eppendorf. As amostras foram então centrifugadas a 15000 rpm, 4 ° C durante 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf

(mantido no gelo) e os pellets foram descartados. Cada amostra foi normalizada pela adição de um volume de MeOH para assegurar que o volume final fosse equivalente ao número de células presentes (1 milhão de células em 500µL de metanol). Finalmente, pelo menos 500µL de extrato lipídico normalizado foram transferidos para um frasco de auto-amostragem de recuperação total Waters * com tampa PTFE pré-fenda. Os frascos foram congelados a -80°C até a análise por espectrometria de massa. Uma amostra de controle de qualidade (QC) foi feita para monitorar a reprodutibilidade analítica. Este controle contém uma mistura equimolar de todas as amostras em todos os grupos experimentais. Para tal, um volume igual de cada amostra (cerca de 10µL por amostra) foi adicionado a um novo frasco de recuperação total.

b) Espectrometria de massa

Plataforma: sistema de cromatografia C18 acoplado diretamente a Q-Exactive Orbitrap

Método: Método de fase reversa modificado para análise de compostos lipofílicos. “Semi-targeted Full MS” - m / z 500-650, modo de íon positivo.

Detalhes: As análises de metabólitos foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 acoplado diretamente a um espectrômetro de massa Q-Exactive HF Quadrupole-Orbitrap HF com uma fonte de ionização por electropulverização HESI II (Thermo Scientific, San Jose, CA). Uma injeção de loop parcial de 5µL foi usada para todas as análises e a separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna de tamanho de partícula Waters Cortecs T3 2.1 × 100mm, 1.6µm. A taxa de fluxo de LC foi de 0,300mL/min. Os metabólitos foram separados com um gradiente linear de 5-99% de tampão B (acetonitrilo)/tampão A (água a 0,1% de FA) durante 36 minutos. A análise foi realizada

em modo iônico positivo usando uma faixa de varredura de 55-825 e resolução definida para 70.000. Os parâmetros da fonte do arquivo de ajuste foram definidos da seguinte maneira: fluxo de gás de bainha 50; Fluxo de gás auxiliar 13; Tensão de pulverização 3,5; Temperatura capilar 300°C; Valor de RF da lente S 70; Temperatura do aquecedor de 125°C. O alvo do AGC foi definido para 3e6 e o valor do Max IT foi de 250ms. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C durante todo o experimento. Os dados de varredura completa foram adquiridos em modo contínuo em toda a faixa de massa m/z 500-650.

Informações analíticas:

PAF: C₂₆H₅₄NO₇P

[M+H]⁺ = 524.37106

Tempo de Retenção (RT) para o padrão de PAF = 17.67-17.70 min

Tempo de Retenção (RT) para PAF nas amostras = 17.92-17.99 min

4.6 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As linhagens SKmel 37 e SKmel 05 foram plaqueadas em placas de 24 poços (0,2.10⁵ células/poço) e 30 minutos antes da exposição à hipóxia, as células foram tratadas com WEB2086 50μM ou com seu veículo (DMSO 0,5%). Em seguida, as células foram expostas à hipóxia por 48 horas e reoxigenadas ou não por mais 24 horas. No final de cada tratamento, as células foram soltas e contadas através do Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience).

4.7 ENSAIOS DE CICLO E MORTE CELULAR

a) Frente à hipóxia/reoxigenação

No primeiro esquema de tratamento, células SKmel 37 foram plaqueadas ($0,2 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços), tratadas com cisplatina ($10 \mu\text{M}$) e expostas a 48 horas de hipóxia seguida por 6 horas de reoxigenação. No segundo esquema de tratamento, após plaqueamento, trinta minutos antes da exposição à hipóxia, as células foram tratadas com WEB2086 ($50 \mu\text{M}$) e em seguida privadas de oxigênio por 48 horas. Durante a reoxigenação, as células foram tratadas ou não com cisplatina ($10 \mu\text{M}$) por 24 horas.

b) Frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032)

As linhagens de melanoma humano SKmel 37, A375, UACC 62 e SKmel 05 foram tratadas com diferentes concentrações de PLX4032 ($1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ e $25 \mu\text{M}$) por 48 ou 72 horas. Tendo estabelecido as condições experimentais a serem utilizadas nos próximos experimentos, as mesmas linhagens foram tratadas concomitantemente com Vemurafenib ($10 \mu\text{M}$) e com antagonista de PAFR, WEB2086 ($50 \mu\text{M}$) por 48 horas.

c) Incorporação de iodeto de propídio

Após terem sido submetidas aos procedimentos descritos anteriormente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas em etanol 70% e mantidas a -20°C até o momento da análise por citometria de fluxo (Attune, Life Technologies). A avaliação de morte celular foi realizada através da marcação com iodeto de propídio (PI). O PI incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA. Depois de fixadas com etanol 70%, as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de PI contendo 0.01% de Triton X-100,

200µg/mL de RNase A e 20µg/mL de iodeto de propídio por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após o período de incubação as células foram avaliadas no citômetro de fluxo e a porcentagem das células nas diferentes fases do ciclo celular e de células hipodiplóides foi quantificada e os dados foram expressos em gráficos de histogramas através do programa Attune® Cytometer Software | Life Technologies. Este protocolo foi adaptado do “Short Protocols in Molecular Biology, 3th edition, 1995”.

4.8 ENSAIOS CLONOGÊNICOS

As células SKmel 05 foram tratadas exatamente como descrito anteriormente para ensaios de proliferação. Após o tratamento, as células foram colhidas, contadas e ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de SFB. Para cada condição estabelecida, 300 células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços, em triplicata, e mantidas entre 2 e 3 semanas. O meio foi trocado a cada 2-3 dias. Ao final do período, o meio foi removido e as colônias foram fixadas com solução de fixação (ácido acético/metanol 1:7) durante 5 minutos em temperatura ambiente e depois coradas utilizando solução de cristal violeta a 0,5% durante 2 horas. A solução de cristal violeta foi removida, as placas foram abundantemente lavadas com água e deixadas a secar para que as colônias pudessem ser posteriormente contadas.

4.9 AVALIAÇÃO DE ROS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As linhagens SKmel 05 e UACC 62 foram plaqueadas (1×10^5 células por poço em placas de 6 poços) e tratadas com PLX4032 (10µM) e/ou com WEB2086 (50µM) por 48 horas. Ao final deste período, as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em DMEM sem SFB contendo 5µM CM-H2DCFDA (Life

Technologies®) por 30 minutos a 37°C em estufa de 5% CO₂. Após incubação, células foram lavadas com PBS, meio de cultura suplementado com SFB foi adicionado e as células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂ por 30 minutos. A produção de ROS foi então avaliada com o citômetro de fluxo Attune® Cytometer (Life Technologies®).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASE-3/7 POR CITOMETRIA DE FLUXO

As linhagens SKmel 05 e UACC 62 foram plaqueadas ($0,2 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços) e tratadas exatamente como descritas para os ensaios de morte frente ao tratamento com Vemurafenib. Ao final do período, as células foram soltas, centrifugadas e ressuspensas em “CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent” conforme prescreve o fabricante por 1 hora. Em seguida, a ativação de caspase-3/7 foi avaliada por citometria de fluxo Attune® Cytometer (Life Technologies®).

4.11 ENSAIOS DE “FEEDER” COM CÉLULAS KBM E KBP

Células SKmel 37 foram plaqueadas (1×10^5 células por poço em placas de 6 poços) em meio contendo SFB e após adaptação de aproximadamente 24 horas, o meio foi retirado, as células foram lavadas 2x com PBS para remover qualquer resquício de SFB e meio fresco livre de SFB foi adicionado (2mL por poço). As células foram expostas ou não à hipóxia por 24 horas e ao final deste período, células KBM GFP e/ou KBP mCherry, gentilmente cedidas pelo aluno de Pós-Doutorado Ildefonso Júnior, foram plaqueadas em duplicata (270 células por poço, 100µL/poço) em meio livre de SFB sob as células SKmel 37 (consideradas aqui como células “feeder”). As placas foram mantidas por aproximadamente 9 dias, com adição de meio novo, porém sem nunca retirar o meio condicionado ou repicar as células. Ao final, a porcentagem de

células mCherry positivas e GFP positivas foi avaliada por citometria de fluxo. O crescimento das células KBM e KBP também foi acompanhado através do microscópio EVOS.

4.12 IMUNOFLUORESCÊNCIA DE TUMORES CONGELADOS

Tumores congelados de células SKmel 37 e de células UACC 62 (com volume de até 1cm³), gentilmente cedidos pelo aluno de Doutorado Jânio Mororó, foram cortados em criostato e os cortes de 7µm foram dispostos em lâminas, as quais foram fixadas com acetona gelada por 10 minutos. Após três lavagens com PBS, os cortes foram bloqueados com PBS 2% BSA e Fc block (1:50) por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-pimonidazol (1:50) e anti-PAFR (1:50) foram incubados em PBS 1% BSA “overnight” a 4°C. Após três lavagens com PBS 1% BSA os respectivos anticorpos secundários conjugados a Alexa 488 (para detecção de PAFR) (1:300) e a Alexa 633 (para detecção das áreas hipóxicas) (1:300), bem como Hoechst (1:1000 para detecção nuclear) em PBS 1% BSA foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Outra série de lavagens foi realizada e lâminas foram montadas para visualização por microscopia confocal ou através do microscópio EVOS.

4.13 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

a) Extração de RNA

As linhagens SKmel 37 e SKmel 05 foram tratadas exatamente como descrito anteriormente para ensaios de proliferação. Após o tratamento, o sobrenadante foi removido, as células foram rapidamente lavadas com PBS gelado e o reagente TRI foi adicionado. As células foram então soltas com auxílio de “scraper” e transferidas para um tubo eppendorf. O volume apropriado de clorofórmio foi adicionado e incubado

durante 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo e a quantidade apropriada de isopropanol foi adicionada e incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12000g, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi lavado em etanol 70% e centrifugado a 7500g, 4°C por 5 minutos. O etanol foi descartado, o “pellet” seco durante 10 minutos à temperatura ambiente, ressuspendido na quantidade apropriada de água DEPC (Ambion) e as amostras foram aquecidas a 55°C durante 10 minutos.

b) Síntese de cDNA

Após a extração do RNA, quantificou-se a concentração de ácido nucléico utilizando o software nanodrop. A síntese de cDNA foi realizada numa quantidade de 1000ng de RNA utilizando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosciences). O termociclador (GeneAmp, sistema de PCR 9700, Applied Biosystems) foi ajustado a 10 min a 25 ° C, seguido de 2 h a 37 ° C.

c) Real-time qPCR

“Primers” para qPCR foram diluídos em água DEPC em uma concentração final de 100µM. Diluições de trabalho apresentavam uma concentração de 10µM de “primer forward” e “primer reverse”. O Sensimix SYBR Mastermix no-ROX (Bioline) foi usado de acordo com as instruções do fabricante, HRPT1 e HRPL11 foram utilizados como genes “housekeeping”. As informações referentes aos “primers” encontram-se na Tabela 1. A PCR foi realizada utilizando a máquina de PCR Real-Time 7900HT (Thermo Fisher) que foi ajustada no seguinte perfil para todas as reações: “hold phase”

a 95 ° C por 10 min, 45 ciclos (95 ° C por 15 segundos e 60 durante 1 min) e uma “melt phase”(de 95 a 60 durante 15 segundos). Os dados foram apresentados no anexo 4. A expressão relativa de cada gene foi normalizada pelo gene HRPL11, uma vez que exibiu a menor variação entre os tratamentos.

Tabela 1: Lista de “primers” utilizados

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
HRPL11	GCAAACTCTGTTCAACATCTG	CATACTCCCGCACTTTAGAC
HRPT1	CCAGTCAACAGGGGACATAAA	CACAATCAAGACATTCTTTCCAGT
LPCAT1	TCAGACCAGGATTCTCGAG	GAATGCACCAGGTTTGAAGGT
LPCAT2	GTCCTCCTCAGATACCCAAACA	TGGTACTTGAAGTGGCATAAACTCA
LPCAT3	TCCTCATCCTTCGACTAATGGG	CAGCCAAACCAATCAGCTTCAA
LPCAT4	TCAAACCAGGAGCCTTCATCG	TGTGAGCCAGAGGACTTTGAG
PAF-AH II	CTGCCATTACGCCAGGCTAA	GCCTTTGCCACAACAGAGAAGT

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 4.0. Foram realizados testes de One-way ANOVA (a média dos grupos experimentais foi comparada através de análise de variância de um fator) com correção de Bonferroni. Os níveis de significância adotados foram de 5%.

5. RESULTADOS

5.1.1 Avaliação da modulação da via de PAFR frente à hipóxia e/ou

hipóxia/reoxigenação

a) Linhagens de melanoma humano expressam PAFR, cujos níveis proteicos basais são maiores nas linhagens SKmel 37 e SKmel 05.

Primeiramente, avaliamos os níveis proteicos de PAFR nas linhagens de melanoma humano SKmel 37, Skmel 05, A375M e A375 por Western Blot (Figura 5). Os resultados revelaram que todas as linhagens expressam o receptor e que, em termos de níveis basais, SKmel 37 e SKmel 05 exibem os maiores níveis.

Figura 5 - Níveis proteicos de PAFR em linhagens de melanoma humano. As células foram cultivadas e suas proteínas foram extraídas e quantificadas para avaliar PAFR por Western Blot. Células RAJI foram utilizadas como controle positivo da expressão de PAFR. Todas as linhagens expressam o receptor. Experimento representativo de três experimentos independentes.

b) Hipóxia aumenta os níveis intracelulares de PAF nas linhagens SKmel 37, SKmel 05 e A375 e hipóxia/reoxigenação também aumenta este fosfolípídio nas células SKmel 37.

Em seguida, avaliamos a geração de PAF intracelular por células de melanoma expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação. Vale ressaltar que todos os experimentos de identificação de PAF foram realizados sem adição de soro, pois o mesmo exibe altas quantidades de PAF (Figura 6), que poderiam gerar viés nos resultados. Desta forma, garantimos que a fonte exclusiva deste fosfolípídio fosse sua produção por células de melanoma.

Figura 6: Identificação de PAF no SFB por LC-MS. O soro exibe altas quantias de PAF. Setas indicam picos correspondentes ao PAF ($m/z = 524,372$) no cromatograma (painel superior) e no gráfico da espectrometria de massa (painel inferior). O tempo de retenção (RT) observado para PAF nas amostras foi de, aproximadamente, 17.91-17.99 minutos e a área do pico correspondente ao ligante no SFB foi de 8718360959.

Assim, as linhagens de melanoma humano SKmel 37, SKmel 05, A375M e A375 foram expostas a 24 horas de hipóxia, seguidas ou não por 3 horas de reoxigenação, e seus lipídios foram extraídos para posterior análises de espectrometria de massa, as quais estão aqui representadas pela área do pico correspondente ao PAF (Figura 7a – 7e), conforme descrito na seção 4.5. Este período de reoxigenação foi escolhido baseado em informações da literatura que relatam que PAF exibe uma vida útil de curta duração devido à ação de PAF acetil-hidrolases que degradam este lipídio (30).

Como se pode observar, hipóxia aumentou os níveis intracelulares de PAF nas linhagens A375, SKmel 05 e SKmel 37, mas não pôde modular a geração de PAF na linhagem A375M. Dentre as linhagens celulares cuja geração de PAF aumentou em resposta à hipóxia, a linhagem celular que apresentou a maior produção foi a SKmel 37. Esta linhagem também exibiu os maiores níveis basais deste fosfolipídio, seguida pela SKmel 05, as quais foram as linhagens que também exibiram os maiores níveis proteicos basais do receptor PAFR. Os níveis basais de PAF da linhagem A375M (uma variante metastática da linhagem A375) foram maiores do que os observados na linhagem parental.

Além disso, em comparação com condições de normóxia, houve um aumento na geração de PAF induzida por hipóxia/reoxigenação nas células SKmel 37. No entanto, os níveis de PAF nesta condição foram menores do que os obtidos após exposição à hipóxia apenas. Nas demais linhagens celulares, diferenças nos níveis de PAF após hipóxia/reoxigenação não foram detectadas.

Figura 7 a) Identificação de PAF em linhagens de melanoma humano expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação por espectrometria de massa. As linhagens Skmel 37 (b), Skmel 05 (c), A375 (d) e A375M (e) foram expostas a 24 horas de hipóxia seguidas ou não por 3 horas de reoxigenação. A linhagem Skmel 37 (f) também foi exposta a 48 horas de hipóxia seguidas ou não por 6 horas de reoxigenação. Ao final dos respectivos períodos, seus lipídios foram extraídos para posterior identificação por espectrometria de massa. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação. Os níveis intracelulares de PAF são indicados pelas áreas dos picos dos respectivos gráficos de espectrometria de massa. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata e os resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

A linhagem SKmel 37 também foi exposta a 48 horas de hipóxia, seguidas ou não por 6 horas de reoxigenação (Figura 7f). Da mesma forma que o regime anterior (Figura 7b), tanto células expostas à hipóxia quanto à hipóxia/reoxigenação exibiram maiores níveis de PAF do que células mantidas em normóxia. Porém os níveis de PAF após o período de reoxigenação foram menores do que os obtidos imediatamente após hipóxia. Em relação ao regime anterior, células expostas a 48 horas de hipóxia apresentaram níveis menores deste lipídio. Por sua vez, não houve diferenças entre ambos os regimes de reoxigenação.

Além de PAF, PAFR pode ser ativado por outros ligantes, cujos nomes, fórmulas e pesos moleculares encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Ligantes de PAFR investigados nos extratos lipídicos de células de melanoma por espectrometria de massa.

Ligante	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)
Acyl PAF	$C_{26}H_{52}NO_8P$	537.675
Azelaoyl PAF	$C_{33}H_{66}NO_9P$	651.863
Butanoyl PAF	$C_{28}H_{58}NO_7P$	551.746
C18-PAF-acether	$C_{28}H_{58}NO_7P$	551.746
ONPAF	$C_{33}H_{66}NO_8P$	635.852
OVPAF	$C_{29}H_{58}NO_8P$	579.746
PAcPC	$C_{26}H_{52}NO_8P$	537.675
Paz-PC	$C_{33}H_{64}NO_{10}P$	665.846
PHPC	$C_{40}H_{82}NO_7P$	720.070
PONPC	$C_{33}H_{64}NO_9P$	649.847
POVPC	$C_{29}H_{56}NO_9P$	593.739
PBPC	$C_{28}H_{58}NO_8P$	567.735

Assim sendo, avaliamos se estes ligantes estariam presentes nos extratos lipídicos de células de melanoma mantidas em normóxia ou expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação. No entanto, nenhum dos ligantes de PAFR descritos acima foi encontrado nas amostras.

c) Os níveis proteicos totais de PAFR não são modulados por hipóxia em nenhuma das linhagens de melanoma humano testadas.

Considerando que a ativação de vias também pode ser modulada pela expressão de receptores e que, frente à hipóxia, as linhagens SKmel 05 e A375 não tiveram aumento tão significativo nos níveis de PAF quanto a linhagem SKmel 37, avaliamos se esta condição experimental modularia os níveis proteicos de PAFR nas células SKmel 05 e A375. O mesmo foi realizado com a linhagem A375M, a qual não teve a geração de PAF aumentada por hipóxia.

Para isso, as células foram expostas a 24 horas de hipóxia e suas proteínas foram extraídas para posterior identificação do receptor por Western Blot (Figura 8), conforme descrito na seção 4.3. No entanto, como se pode observar, os níveis de PAFR não foram modulados por hipóxia em nenhuma das linhagens.

Figura 8: Avaliação dos níveis proteicos de PAFR por Western Blot em linhagens de melanoma humano expostas a 24 horas de hipóxia. As linhagens de melanoma humano

SKmel 05, A375M e A375 foram expostas à hipóxia e ao final do período suas proteínas foram extraídas para posterior identificação de PAFR por Western Blot. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (24 horas). Experimento representativo de dois experimentos independentes.

Além disso, avaliamos os níveis proteicos de PAFR na linhagem SKmel 37 após 48 horas de exposição à hipóxia, mas também nenhuma alteração foi observada (Figura 9).

Figura 9: Avaliação dos níveis proteicos de PAFR por Western Blot em células SKmel 37 após 48 horas de exposição à hipóxia. Células SKmel 37 foram expostas à hipóxia e suas proteínas foram extraídas para posterior identificação de PAFR. As células RAJI foram utilizadas como controle positivo. Duas bandas de alturas e intensidades diferentes podem ser visualizadas, sendo a banda da forma não glicosilada de PAFR (com peso molecular de aproximadamente 39 kDa), a de maior intensidade. A banda de maior peso molecular, 48 kDa, corresponde a forma glicosilada do receptor. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (48 horas). Experimento representativo de dois experimentos independentes.

d) Os níveis proteicos de PAFR intracelular e extracelular das células SKmel 37, na ausência de SFB, não são modulados por hipóxia, tampouco por hipóxia/reoxigenação.

Como comentado anteriormente, os experimentos de identificação de PAF foram realizados na ausência de SFB. Considerando os resultados de Western Blot apresentados que mostraram não haver modulação dos níveis de PAFR por hipóxia em nenhuma linhagem de melanoma, decidimos avaliar se nas mesmas condições utilizadas para extração lipídica haveria alguma alteração nos níveis de PAFR da linhagem SKmel 37 e se a reoxigenação seria capaz de modular estes níveis.

Além disso, investigamos tanto os níveis de PAFR intracelular, quanto os níveis de PAFR extracelular, para verificar possíveis diferenças na localização deste receptor frente à hipóxia ou hipóxia/reoxigenação (Figura 10). Para tal, conforme descrito na seção 4.4, na ausência de SFB, células SKmel 37 foram expostas a 24 horas de hipóxia seguidas ou não por 3 horas de reoxigenação e ao final de cada período, foram soltas para identificação de PAFR por citometria de fluxo.

Figura 10: Avaliação de PAFR extracelular e intracelular em células Skmel 37 expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação, na ausência de SFB, por citometria de fluxo. Células Skmel 37, suplementadas apenas com meio de cultura (livre de SFB), foram expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação e ao final do período, avaliou-se a presença de PAFR através de citometria de fluxo. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de

exposição à hipóxia (24 horas) e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação (3 horas). Experimento representativo de dois experimentos independentes em duplicata.

Os resultados de citometria de fluxo para identificação de PAFR evidenciaram que nenhuma das condições experimentais modulou a expressão do receptor, tanto a nível intracelular quanto a nível extracelular. No entanto, revelaram que a localização de PAFR nas células SKmel 37 é mais abundante no conteúdo intracelular do que na membrana plasmática.

5.1.2 Investigação da participação da via de PAFR na proliferação e sobrevivência celular frente à hipóxia e/ou hipóxia/reoxigenação

a) Hipóxia e hipóxia/reoxigenação reduzem a proliferação de células SKmel 37 e o bloqueio do PAFR com WEB2086 potencializa esse efeito. Entretanto, estas condições experimentais não alteram a proliferação de células SKmel 05.

Posteriormente, considerando os níveis basais de PAF e seu receptor, analisamos o papel do PAFR na proliferação das linhagens de melanoma SKmel 37 e SKmel 05 expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação. Para isso, na presença do antagonista do PAFR, WEB2086 50µM, as células foram expostas à hipóxia por 48 horas, seguidas ou não por 24 horas de reoxigenação e a proliferação celular foi avaliada pela contagem de células através do Cellometer Auto T4 conforme descrito na seção 4.6 (Figura 11).

Figura 11: Efeito do bloqueio de PAFR na proliferação de células SKmel 37 (a, b) e Skmel 05 (c, d) expostas à hipóxia (a, c) e hipóxia/reoxigenação (b, d). Na presença do antagonista de PAFR, WEB2086 (50μM), as linhagens Skmel 37 e Skmel 05 foram expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação. Ao final dos respectivos períodos, as células foram soltas e contadas. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (48 horas) e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação (24 horas). Experimento representativo de três experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Observamos que tanto a hipóxia quanto a hipóxia/reoxigenação reduziram a proliferação celular da linhagem Skmel 37 e esse efeito foi ainda maior quando as células foram tratadas concomitantemente com o WEB2086 (Figura 11a e 11b). Entretanto, diferentemente do que observamos com a SKmel 37, nenhuma condição experimental foi capaz de modular a proliferação de SKmel 05 (Figura 11c e 11d). Além disso, células Skmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação e tratadas com

WEB2086 apresentaram características morfológicas associadas à morte celular (Anexo 1), ao passo que células Skmel 05 não apresentaram alterações em sua morfologia.

Ao comparar as Figuras 11a e 11b, podemos observar que, no tratamento com WEB2086, o número de células obtidas após hipóxia/reoxigenação foi muito semelhante ao número de células obtidas após hipóxia. O número de células expostas à hipóxia/reoxigenação que não foram tratadas com WEB2086, por sua vez, foi superior ao número de células expostas à hipóxia. Assim, este resultado, bem como as alterações morfológicas observadas, sugere que sob hipóxia/reoxigenação, WEB2086 leva a um acúmulo de células em fase específica do ciclo celular e/ou induz morte celular.

De modo a tentar identificar possíveis diferenças entre as linhagens que auxiliassem na interpretação dos resultados obtidos de proliferação celular frente à hipóxia e hipóxia/reoxigenação, avaliamos também a expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese de PAF e à degradação de PAF/"PAF-like", na presença ou ausência do antagonista WEB2086 conforme descrito na seção 4.13 (Anexo 2).

b) Em condições de hipóxia/reoxigenação, o bloqueio da via de PAFR induz morte celular e leva a acúmulo das células Skmel 37 em SG2M.

Em seguida, avaliamos o papel da ativação do PAFR na resposta de sobrevivência das células Skmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação. Para isso, as células foram tratadas da mesma forma que os experimentos de proliferação descritos anteriormente e ao final do período de reoxigenação, morte e ciclo celular foram avaliados por incorporação de iodeto de propídio através de citometria de fluxo (Figura 12) conforme descrito nas seções 4.7 (a) e 4.7 (c).

Figura 12: Efeito do bloqueio de PAFR na morte (a) e ciclo (b) de células SKmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação - (pO₂ = 1%). Na presença do antagonista de PAFR, WEB2086 (50μM), as células Skmel 37 foram expostas à hipóxia/reoxigenação e ao final do período, as células foram marcadas com iodeto de propídio para posterior análise de citometria de fluxo. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (48 horas) e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação (24 horas). Experimento representativo de quatro experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

O bloqueio da via de PAFR com o antagonista WEB2086 aumentou significativamente a porcentagem de células hipodiplóides no contexto de hipóxia/reoxigenação. Em relação ao ciclo celular, foi observado que nesta condição experimental, o tratamento com WEB2086 levou a acúmulo celular em SG2M. O bloqueio da via de PAFR, entretanto, não alteram estes parâmetros em normóxia. Estes resultados, portanto, confirmam as hipóteses levantadas a partir dos experimentos de proliferação celular.

No entanto, vale ressaltar que nos experimentos em que a porcentagem de oxigênio obtida no estabelecimento das condições de hipóxia foi maior que 1%, estes resultados não foram observados (Figura 13). Nestas situações, o tratamento com WEB2086 não levou a acúmulo celular em SG2M e não induziu morte celular.

Figura 13: Efeito do bloqueio de PAFR na morte (a) e ciclo (b) de células SKmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação – ($pO_2 > 1\%$). Na presença do antagonista de PAFR, WEB2086 (50 μ M), as células Skmel 37 foram expostas à hipóxia/reoxigenação e ao final do período, as células foram marcadas com iodeto de propídio para posterior análise de citometria de fluxo. A porcentagem de oxigênio foi maior que 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (48 horas) e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação (24 horas). Experimento representativo de dois experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

c) Apesar de hipóxia e hipóxia/reoxigenação reduzirem o número de clones formados por células Skmel 05, o bloqueio de PAFR não tem impacto sobre a capacidade clonogênica destas células.

Como comentado anteriormente, diferentemente do que observamos com as células Skmel 37, o tratamento com WEB2086 não teve impacto na proliferação de células Skmel 05 em nenhuma condição experimental e, tampouco, levou a alterações morfológicas associadas à morte celular. Assim, decidimos investigar se o bloqueio de PAFR teria melhores efeitos na sobrevivência a longo prazo desta linhagem. Para isso, as células foram tratadas como descrito para os experimentos de proliferação e em seguida, de acordo com a seção 4.8, ensaios clonogênicos foram realizados (Figura 14).

Figura 14: Efeito do bloqueio de PAFR na capacidade clonogênica de células Skmel 05 expostas à hipóxia (a) e hipóxia/reoxigenação (b). Células Skmel 05 foram expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação e tratadas ou não com o antagonista WEB2086 (50 μ M). Ao final dos respectivos períodos de tratamento as células foram soltas e plaqueadas para realização de ensaios clonogênicos. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (48 horas) e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação (24 horas). Experimento representativo de três experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Os resultados mostraram que a exposição à hipóxia reduziu significativamente o número de células Skmel 05 que são capazes de formar colônias. Por sua vez, células que foram reoxigenadas após hipóxia, embora tenham formado menos colônias do que as células mantidas em normóxia apresentaram maior capacidade clonogênica do que células expostas apenas à hipóxia. No entanto, o bloqueio de PAFR com WEB2086 não modulou a capacidade clonogênica em nenhuma das condições experimentais.

5.1.3 Avaliação do envolvimento da via de PAFR na sensibilização à cisplatina em condições de hipóxia/reoxigenação

a) Células Skmel 37 expostas à hipóxia/reoxigenação são mais resistentes à morte celular induzida por cisplatina.

De acordo com a literatura, devido à redução da taxa de proliferação, células expostas à hipóxia são mais resistentes à cisplatina do que células em normóxia, e a reoxigenação destas células pode favorecer a repopulação tumoral (26).

Sabendo que a proliferação da linhagem Skmel 37 foi afetada em regimes de hipóxia e hipóxia/reoxigenação, investigamos a sensibilidade à cisplatina destas células. Para isso, células SKmel 37 foram expostas à hipóxia por 48 horas, tratadas ou não com cisplatina (10 μ M) e reoxigenadas por 6 horas. Ao final deste período, morte e ciclo celular foram avaliados por incorporação de iodeto de propídio através de citometria de fluxo (Figura 15), como descrito na seção 4.7 (c).

Figura 15: Avaliação de morte e ciclo celular frente ao tratamento com cisplatina em condições de hipóxia/reoxigenação por citometria de fluxo. Células Skmel 37 foram tratadas com cisplatina (10 μ M), expostas à hipóxia por 48 horas e reoxigenadas por 6 horas. Ao final do período, foram soltas para posterior ensaio de morte e ciclo celular por citometria de fluxo. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação. Experimento representativo de três

experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Os resultados revelaram que as células expostas à hipóxia/reoxigenação apresentaram menores taxas de morte celular induzida por cisplatina do que células mantidas em normóxia. Em relação ao ciclo celular, hipóxia/reoxigenação levou a acúmulo celular em G0G1, ao passo que o tratamento com cisplatina, em ambas as condições experimentais, levou a acúmulo celular em SG2M, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em geral, os resultados demonstraram que células em condições de hipóxia/reoxigenação apresentam maior resistência à morte celular induzida por cisplatina e que este fenômeno não esteja apenas vinculado a alterações no ciclo celular desencadeadas pela droga. Em conjunto com os resultados de identificação de PAF por espectrometria de massa, estes dados nos encorajaram a avaliar o possível envolvimento da ativação de PAFR neste processo de resistência à cisplatina.

b) Em condições de hipóxia/reoxigenação, o bloqueio de PAFR sensibiliza as células Skmel 37 à morte celular induzida por cisplatina.

Em seguida, avaliamos se o bloqueio de PAFR poderia sensibilizar as células à cisplatina no contexto de hipóxia/reoxigenação. Para isso, as células foram tratadas ou não com o antagonista de PAFR, WEB2086 (50 μ M) trinta minutos antes da exposição à hipóxia por 48 horas. Durante a reoxigenação, as células foram tratadas ou não com cisplatina (10 μ M) por 24 horas de modo a mimetizar o que acontece no microambiente tumoral em que a reperusão de áreas hipóxicas favorece o “delivery” de drogas. Ao

final do período, morte celular foi avaliada por incorporação de iodeto de propídio através de citometria de fluxo (Figura 16) como descrito nas seções 4.7 (a) e 4.7 (c).

Figura 16: Efeito do bloqueio de PAFR na sobrevivência celular frente à hipóxia/reoxigenação e/ou cisplatina - (pO₂ = 1%). Na presença do antagonista de PAFR, WEB2086 (50μM), as células Skmel 37 foram expostas a 48 horas de hipóxia. Em seguida foram reoxigenadas e tratadas com cisplatina por 24 horas. Ao final do período, as células foram marcadas com iodeto de propídio para posterior análise de citometria de fluxo. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação. Experimento representativo de quatro experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Apesar do tratamento com cisplatina não induzir morte celular em nenhuma das condições experimentais, a associação deste quimioterápico com WEB2086 em hipóxia/reoxigenação foi aditivo, levando a um aumento ainda maior no desencadeamento de morte celular do que aquele observado com apenas o bloqueio de PAFR. No entanto, estes resultados não ocorreram quando os níveis de oxigênio não foram mantidos em 1% (Figura 17).

Figura 17: Efeito do bloqueio de PAFR na sobrevivência celular frente à hipóxia/reoxigenação e/ou cisplatina – (pO₂ > 1%). Na presença do antagonista de PAFR, WEB2086 (50μM), as células Skmel 37 foram expostas a 48 horas de hipóxia. Em seguida foram reoxigenadas e tratadas com cisplatina por 24 horas. Ao final do período, as células foram marcadas com iodeto de propídio para posterior análise de citometria de fluxo. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação. Experimento representativo de três experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Como se pode observar, nesta situação, em nenhuma das condições experimentais, WEB2086 foi capaz de sensibilizar as células à morte celular. Entretanto, este resultado também reforçou os dados de resistência à cisplatina em condições de hipóxia/reoxigenação, já que esta droga só induziu morte celular na condição de normóxia.

5.1.4 Verificação da distribuição de PAFR em cortes congelados de tumores

a) PAFR é encontrado acumulado em áreas hipóxicas de tumores Skmel 37 e em seus arredores.

Considerando o conjunto de resultados apresentado acima, que mostra que a via de PAFR nas células Skmel 37 é modulada em condições de hipóxia e hipóxia/reoxigenação, estando relacionada com a sobrevivência celular frente a estes agravos e com a sensibilização à morte celular induzida por cisplatina nestas condições experimentais, fomos motivados a avaliar a distribuição do PAFR ao longo dos tumores de células SKmel 37, de modo a verificar a possível relação entre este receptor e áreas tumorais hipóxicas (Figura 18).

Figura 18 – Imunofluorescência de cortes de tumores Skmel 37 congelados para avaliação da distribuição de PAFR ao longo do tecido. Cortes tumorais foram marcados com anti-pimonidazol (“PIMO” – em vermelho) e anti-PAFR (“PAFR – em verde). Núcelos foram detectados com Hoescht (em azul). “A” indica o corte tumoral e “a” indica o zoom de uma área fortemente marcada, a qual é exibida em maior aumento no painel da direita. Cada imunofluorescência e a combinação de todas as marcações (“MERGE”) são exibidas no painel esquerdo. Setas mostram alguns pontos de colocalização entre áreas hipóxicas e PAFR. Imagens representativas de microscopia confocal de tumores de animais portadores de melanoma.

Os resultados de imunofluorescência realizados de acordo com a seção 4.12 mostraram que houve um acúmulo de PAFR em áreas tumorais hipóxicas e em seu entorno. O mesmo resultado foi observado em um tumor de células UACC 62 (Anexo 3).

A partir deste conjunto de resultados, com a pretensão de investigar a influência da via de PAFR na repopulação tumoral, conforme descrito na seção 4.11, foi estabelecido um modelo *in vitro* de repopulação (Ensaio de “Feeder”) contemplando a heterogeneidade tumoral quanto à expressão de PAFR (Anexo 4).

5.2.1 Investigação do envolvimento da via de PAFR na resposta de sobrevivência frente ao Vemurafenib

a) As linhagens SKmel 37 e A375 são mais resistentes à morte celular induzida por Vemurafenib do que as linhagens SKmel 05 e UACC 62.

Como comentado anteriormente, o próprio tratamento com Vemurafenib é uma forma de pressão seletiva que favorece a resistência tumoral a esta terapia e o desencadeamento da repopulação de melanomas. Assim, contemplando os objetivos do projeto, o tratamento com Vemurafenib foi utilizado como o outro modelo experimental para avaliar o possível papel de PAFR na modulação de resposta de sobrevivência decorrente a este tratamento.

Vemurafenib ou PLX4032 possui atividade nos tumores BRAF mutados, abrangendo as isoformas V600E, V600K e V600D. Portanto, para nossos experimentos, escolhemos linhagens de melanoma humano V600E mutadas (SKmel 37, SKmel 05, UACC 62 e A375).

Primeiramente, avaliamos a sensibilidade destas linhagens frente ao tratamento com Vemurafenib. Para tanto, curvas de concentração (1 μ M, 10 μ M e 25 μ M) e de tempo (48h e 72h) foram realizadas conforme descrito na seção 4.7 (b) e (c). Após os tratamentos, morte celular foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 19).

Figura 19 – Efeito do tratamento com Vemurafenib (PLX4032) na morte celular de linhagens de melanoma humano a partir de curvas de concentração com tempo fixo de 48 horas. As linhagens de melanoma humano SKmel 37, SKmel 05, A375 e UACC 62 foram tratadas com diferentes concentrações de PLX4032 (1 μ M, 10 μ M e 50 μ M). Ao final do período de 48 horas, as células foram coletadas para posterior análise de incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo. Na legenda das imagens, PLX4032 foi abreviado para PLX e as concentrações utilizadas estão indicadas ao longo da abscissa. Único experimento, em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Como se pode observar na Figura 15, nos ensaios de 48 horas, o tratamento com Vemurafenib nas linhagens SKmel 37 e A375 só aumentou a porcentagem de células

hipodiplóides na maior concentração de droga utilizada (25 μ M), sendo esta porcentagem relativamente baixa, principalmente quando comparada com a das outras linhagens. Por sua vez, nas linhagens SKmel 05 e UACC 62, o processo de morte celular já foi deflagrado com a concentração de 10 μ M.

Após 72 horas de tratamento (Figura 20), as células SKmel 37 também só tiveram morte celular induzida quando tratadas com a maior concentração da droga (25 μ M). Nas células A375 o processo de morte também foi deflagrado, porém ainda assim, a porcentagem de células hipodiplóides foi muito baixa. Como se pode observar, na maior concentração de Vemurafenib, esta porcentagem foi de apenas 5%, enquanto nas demais linhagens, este valor ultrapassou os 25%. Como no experimento de 48 horas, as linhagens SKmel 05 e UACC 62 tiveram maior acometimento da viabilidade celular, apresentando maiores taxas de morte e sendo, portanto, mais sensíveis ao tratamento do que as demais linhagens. Aliás, podemos considerar as células SKmel 05 como as mais sensíveis, já que com a concentração mais baixa da droga (1 μ M), a porcentagem de células hipodiplóides chegou a, aproximadamente, 30%.

Figura 20 – Efeito do tratamento com Vemurafenib (PLX4032) na morte celular de linhagens de melanoma humano a partir de curvas de concentração com tempo fixo de 72 horas. As linhagens de melanoma humano SKmel 37, SKmel 05, A375 e UACC 62 foram tratadas com diferentes concentrações de PLX4032 (1 μ M, 10 μ M e 50 μ M). Ao final do período de 72 horas, as células foram coletadas para posterior análise de incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo. Único experimento, em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Com estes ensaios, podemos perceber que duas linhagens foram mais resistentes ao Vemurafenib do que as outras. As linhagens SKmel 37 e A375 foram consideradas como resistentes, enquanto as linhagens UACC 62 e SKmel 05, como sensíveis. Para os demais experimentos, seguimos com a concentração de 10 μ M de PLX4032 no tempo de 48 horas, uma vez que esta condição já revelou diferentes perfis de resistência intrínseca/sensibilidade entre as linhagens.

b) O tratamento com Vemurafenib induz acúmulo celular em G0G1 em todas as linhagens de melanoma, exceto UACC 62.

A partir desta condição, avaliamos em seguida as possíveis alterações no ciclo celular desencadeadas pela adição de Vemurafenib. Como se pode observar na Figura 21, houve acúmulo celular em G0G1 decorrente ao tratamento em todas as linhagens de melanoma, exceto na UACC 62.

Figura 21 – Efeito do tratamento com Vemurafenib (PLX4032) no ciclo celular de linhagens de melanoma humano. As linhagens SKmel 37, A375, SKmel 05 e UACC 62 foram tratadas com 10 μ M de PLX4032, que foi abreviado nas legendas para PLX, por 48 horas e ao final do período foram coletadas para posterior análises de incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Além disso, não conseguimos identificar um padrão compartilhado de alterações no ciclo celular que diferenciasse células resistentes de células sensíveis ao Vemurafenib. Isto é, não podemos atribuir os desfechos de sobrevivência celular apenas, ou majoritariamente, às alterações do ciclo celular decorrentes do tratamento, afinal tanto as linhagens resistentes, quanto a linhagem mais sensível (SKmel 05) tiveram acúmulo em G0G1, ao passo que a outra linhagem sensível não apresentou nenhuma modificação em seu ciclo celular.

c) O bloqueio da via de PAFR com WEB2086 potencializa o efeito de morte induzido por Vemurafenib nas linhagens SKmel 05 e UACC 62, mas não afeta as linhagens mais resistentes.

Considerando os resultados anteriores, averiguamos se a ativação de PAFR estaria de alguma forma envolvida na resposta de sobrevivência frente ao tratamento com Vemurafenib. Para isso, as linhagens foram tratadas concomitantemente com o inibidor de BRAF (10 μ M) e com o antagonista de PAFR, WEB2086 (50 μ M) por 48 horas e ao final do período morte celular foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 22) conforme descrito na seção 4.7 (b) e (c).

Figura 22 – Efeito do bloqueio de PAFR na morte celular frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032). As linhagens SKmel 37, A375, SKmel 05 e UACC 62 foram tratadas concomitantemente com 10 μ M de PLX4032 (abreviado nas legendas para PLX) e com 50 μ M de WEB2086 (abreviado para WEB) por 48 horas. Ao final do período as células foram coletadas para posterior análises de incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

A figura 22 reforça que, de fato, as linhagens SKmel 37 e A375 não sucumbiram à morte celular frente ao tratamento com PLX4032, ao passo que a taxa de morte celular das linhagens SKmel 05 e UACC 62 aumentou significativamente após tratamento com a droga. A adição do antagonista de PAFR, por sua vez, sensibilizou ainda mais as linhagens SKmel 05 e UACC 62, potencializando o efeito de morte celular obtido a partir do tratamento com PLX4032. Entretanto, o tratamento combinado não foi capaz de alterar a morte celular das linhagens SKmel 37 e A375.

Considerando que na prática clínica, a princípio, os pacientes apresentam boa resposta ao Vemurafenib, desenvolvendo, posteriormente, resistência à droga alvo dirigida que culmina na recidiva tumoral (14), escolhemos as linhagens SKmel 05 e UACC 62 para melhor avaliá-las quanto a modulação de PAFR frente ao tratamento com PLX4032, os possíveis mecanismos de morte deflagrados por esta droga, os desfechos de sobrevivência a longo prazo e a influência de PAFR nestes processos.

5.2.2 Avaliação da modulação dos níveis proteicos de PAFR frente ao tratamento com Vemurafenib

a) O tratamento com Vemurafenib aumenta os níveis proteicos de PAFR extracelular nas células SKmel 05, mas não nas células UACC 62.

Após tratamento das células com PLX4032 (10 μ M) por 48 horas, avaliamos por citometria de fluxo a porcentagem de células positivas para PAFR extracelular conforme descrito na seção 4.4b. Como se pode verificar na Figura 23, apesar das baixas porcentagens encontradas, houve um aumento decorrente ao uso de Vemurafenib

no número de células SKmel 05 que expressam PAFR na superfície extracelular. A linhagem UACC 62, entretanto, não teve os níveis de PAFR modulados pela droga.

Figura 23 – Avaliação por citometria de fluxo de PAFR extracelular nas linhagens SKmel 05 e UACC 62 após tratamento com Vemurafenib (PLX4032). As linhagens SKmel 05 e UACC 62 foram tratadas com 10 μ M de PLX4032, que foi abreviado nas legendas para PLX, por 48 horas e ao final do período foram coletadas para posterior análises de identificação de PAFR por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, em duplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

5.2.3 Avaliação do envolvimento de PAFR nos possíveis mecanismos de morte e na sobrevivência a longo prazo frente ao tratamento com Vemurafenib

a) O tratamento com Vemurafenib aumenta a geração de ROS em ambas as linhagens e sua combinação com WEB2086 potencializa este efeito apenas nas células SKmel 05.

Como comentado anteriormente, sabe-se que o tratamento com Vemurafenib pode levar a um aumento dos níveis celulares de ROS e que este desbalanço pode desencadear morte celular (48). Portanto, conforme descrito na seção 4.9, avaliamos a

geração de ROS em nossas condições experimentais através de citometria de fluxo utilizando o indicador de estresse oxidativo geral CM-H2DCFDA (Figura 24).

Figura 24 – Efeito do bloqueio de PAFR na geração de ROS frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032). As linhagens SKmel 05 e UACC 62 foram tratadas concomitantemente com 10 μ M de PLX4032 (abreviado nas legendas para PLX) e com 50 μ M de WEB2086 (abreviado para WEB) por 48 horas. Ao final do período as células foram coletadas para posterior análises de geração de ROS por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, em duplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

Apesar dos baixos níveis de ROS encontrados em todas as condições experimentais, ao comparar ambas as linhagens, notamos que os níveis basais de ROS foram maiores nas células SKmel 05. O tratamento com PLX4032 aumentou a geração de ROS tanto na linhagem SKmel 05 quanto na UACC 62. No entanto, apesar de WEB2086, por si só, não alterar os níveis de ROS em nenhuma das linhagens, o tratamento combinado levou a um aumento destas moléculas nas células SKmel 05. Nas células UACC62, por sua vez, apesar de os níveis de ROS obtidos com o tratamento combinado serem maiores do que os da condição controle, em comparação com a monoterapia utilizando Vemurafenib, nenhuma diferença pôde ser observada.

b) O tratamento combinado com Vemurafenib e WEB2086 leva, ainda que baixa, a ativação de caspase-3/7 apenas nas células SKmel05.

Outro mecanismo de morte celular deflagrado perante o tratamento com Vemurafenib é apoptose (28), a qual pode ser inferida pela ativação de caspase-3/7. De modo a investigar se este mecanismo de morte era induzido por nossas condições experimentais, conforme descrito na seção 4.10, avaliamos a porcentagem de células com caspase-3/7 ativadas através de citometria de fluxo (Figura 25).

Figura 25 – Efeito do bloqueio de PAFR na ativação de caspase-3/7 frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032). As linhagens SKmel 05 e UACC 62 foram tratadas concomitantemente com 10 μ M de PLX4032 (abreviado nas legendas para PLX) e com 50 μ M de WEB2086 (abreviado para WEB) por 48 horas. Ao final do período as células foram coletadas para posterior análises de ativação de caspase-3/7 por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, em duplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Conforme podemos observar nos gráficos, a porcentagem de células que apresentaram atividade de caspase-3/7 foi muito baixa em ambas as linhagens, independentemente da condição experimental utilizada. O tratamento com Vemurafenib ou WEB2086 não alterou a ativação destas proteínas em nenhuma das linhagens, porém

o tratamento combinado aumentou a porcentagem de células SKmel 05 com caspase 3/7 ativadas.

c) O bloqueio de PAFR não potencializa a redução da capacidade clonogênica induzida pelo tratamento com Vemurafenib.

Em seguida, considerando a importância da capacidade em sobreviver a longo prazo e reconstituir o tumor a partir de poucas células no fenômeno da repopulação, escolhemos a linhagem SKmel 05, por ser a linhagem mais sensível frente aos tratamentos, para avaliar estas características através de ensaios clonogênicos (Figura 26), conforme descrito na seção 4.8.

Figura 26 – Efeito do bloqueio de PAFR na capacidade clonogênica de células SKmel 05 frente ao tratamento com Vemurafenib (PLX4032). Células SKmel 05 foram tratadas concomitantemente com 10 μ M de PLX4032 (abreviado nas legendas para PLX) e com 50 μ M de WEB2086 (abreviado para WEB) por 48 horas. Ao final do período as células foram soltas e plaqueadas em baixa densidade para realização de ensaios clonogênicos. Experimento representativo de três experimentos independentes, em duplicata. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Os resultados apresentados na Figura 26 revelaram que, em comparação à situação controle, tanto o tratamento com Vemurafenib quanto o tratamento combinado

resultaram em um menor número de clones, ao passo que o tratamento com WEB2086 não levou a alterações neste valor. Além disso, diferenças entre o grupo tratado com Vemurafenib e o grupo que recebeu a combinação de ambos os tratamentos não foram observadas.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos por espectrometria de massa que, em comparação com as condições normóxicas, todas as linhagens celulares, excluindo A375M, acumulam mais PAF no compartimento intracelular quando expostas a 24 horas de hipóxia. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que avalia a geração de PAF por linhagens de melanoma submetidas à privação de oxigênio, revelando que nossos resultados são condizentes com estudos realizados em outros tipos celulares, como por exemplo, células endoteliais e células de carcinoma colorretal. (49,50).

Algumas evidências apresentadas pela literatura podem explicar nossos achados. Sabe-se que hipóxia induz o remodelamento de membrana, o que favorece a liberação de fosfolipídios, principalmente fosfatidilcolina (PC) (51) e que esta enzima pode originar PAF a partir da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) (37). Além disso, o estudo de Harris et al. mostra que os níveis proteicos de fosfolipase D, enzima que transforma o precursor de PAF, LysoPAF, em colina e ácido fosfatídico, são reduzidos em hipóxia, contribuindo assim para o acúmulo deste precursor, que por sua vez, pode ser transformado em PAF pela ação das LPCATs. Além disso, em hipóxia, pode-se observar a redução da atividade da enzima monooxigenase (MO), que oxida o motivo O-alquil de LysoPAF na presença de condições normais de pressão parcial de oxigênio. Assim, a redução da atividade de MO também poderia contribuir para o acúmulo do precursor de PAF (50).

Também avaliamos a geração de PAF na condição de 24 horas de hipóxia seguida por 3 horas de reoxigenação. Este regime, por sua vez, apenas aumenta os níveis intracelulares de PAF nas células SKmel 37. No entanto, como os níveis desse fosfolipídio são mais altos em condições hipóxicas, é provável que a degradação de

PAF esteja ocorrendo durante o período de reoxigenação. Portanto, estendendo a hipótese de que o PAF é degradado sob reoxigenação para as outras linhagens celulares e considerando que os níveis de PAF na hipóxia não são tão altos quanto aqueles observados nas células SKmel 37, isso nos dá uma possível explicação para o fato de não haver diferença entre os níveis de PAF observados em condições de normóxia e hipóxia/reoxigenação nas células SKmel 05 e A375.

Ao investigarmos a geração de PAF após 48 horas de hipóxia seguida ou não de 6 horas de reoxigenação em células SKmel 37 observamos que as células expostas à estas condições experimentais apresentaram níveis mais elevados deste lipídio do que as células mantidas em normóxia. No entanto, comparando este regime com o anteriormente descrito (24 horas de hipóxia), pudemos observar que a quantidade de PAF após 48 horas de hipóxia foi reduzida, indicando que o PAF provavelmente foi degradado nas 24 horas adicionais de hipóxia. Além disso, como ocorreu ao longo do período de 3 horas de reoxigenação descrito acima, as células que foram reoxigenadas durante 6 horas exibiram quantidades menores de PAF do que as células expostas apenas a 48 horas de hipóxia. Ao comparar os dois regimes de hipóxia/reoxigenação, percebemos que os níveis de PAF resultantes foram muito semelhantes entre si, sugerindo que, possivelmente, sua degradação seja maior nas primeiras 3 horas de reoxigenação, mantendo-se estável no tempo restante, ou que períodos mais longos de hipóxia estejam associados, de alguma forma, a taxas mais lentas de degradação do PAF durante a reoxigenação.

Interessantemente, as mesmas linhagens celulares que exibiram os níveis proteicos basais mais elevados de PAFR (SKmel 37 e SKmel 05), também apresentam os níveis basais de PAF mais elevados. Sabe-se que a ativação de PAFR pode levar a síntese de PAF através da ativação de PLA2, a qual age nos fosfolipídios de membrana

e, conseqüentemente, gera PAF (30). Estes resultados também nos levam a pensar que a ativação do PAFR leva a sua autorregulação por um mecanismo de “feedback” positivo, no qual altos níveis de PAF mantêm alta expressão de PAFR. Além disso, comparando a linhagem A375M com a parental A375, observamos que os níveis basais de PAF são maiores nas células A375M, que possui mais propriedades invasivas e metastáticas que as células A375. A literatura traz que PAF desempenha importante papel na indução de metástase em melanoma (33). Portanto, é razoável pensar que o potencial metastático de A375M possa ser parcialmente atribuído ao PAF. Além disso, as linhagens SKmel 37 e SKmel 05 também são derivadas de foco metastático, reforçando a possibilidade de PAF exercer função no potencial metastático destas células.

Os estudos de Colin Goding et al. mostram que a privação de nutrientes é um potente impulsionador da disseminação metastática do melanoma, sendo considerado um sinal de “get out of here” (52). Sabemos também que, frequentemente, a privação de nutrientes (“starvation”) é acompanhada por áreas hipóxicas no microambiente do tumor, o qual é abundantemente inflamado (53). Nossos resultados mostram que hipóxia aumenta o lipídio pró-inflamatório, PAF. Assim, considerando o potencial metastático das linhagens de melanoma humano testadas, bem como os resultados descritos anteriormente e os apresentados pela literatura, somos encorajados a pensar que a hipóxia também pode ser um sinal do tipo “get out of here” que favorece a indução de metástase e que PAF pode estar envolvido de alguma forma neste processo.

Em relação aos níveis proteicos de PAFR, nenhuma das linhagens celulares testadas apresentou alterações decorrentes da exposição à hipóxia ou hipóxia/reoxigenação. Na linhagem SKmel 37, observamos por citometria de fluxo que ambas as condições experimentais, na ausência de SFB, também não alteraram a localização do receptor. Seria interessante confirmar este dado através de

imunofluorescência e avaliar este aspecto nas demais linhagens frente às outras condições experimentais, afinal, como comentado na introdução, dependendo da localização celular, PAFR pode estar acoplado a diferentes subunidades da proteína G, refletindo, conseqüentemente, no disparo de diferentes vias de sinalização, que por sua vez, poderiam explicar, parcialmente, as diferenças encontradas a nível de proliferação entre as linhagens SKmel 05 e SKmel 37 (30).

De fato, nossos resultados de proliferação mostraram que tanto hipóxia quanto hipóxia/reoxigenação impactaram negativamente a proliferação de células SKmel 37, mas não alteraram a proliferação das células SKmel 05, indicando que SKmel 37 é mais suscetível a uma possível injúria imediata desencadeada por hipóxia e hipóxia/reoxigenação do que a linhagem SKmel 05. O bloqueio de PAFR em ambos os regimes potencializou a diminuição da proliferação de células SKmel 37, mas não afetou o crescimento de SKmel 05, tampouco sua capacidade clonogênica, o que sugere que a concentração de PAF, que é maior em SKmel 37 nestes cenários, desempenha papel importante no desencadeamento da proliferação celular após a ativação do receptor.

Na tentativa de elucidar possíveis diferenças entre as linhagens, avaliamos a expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese de PAF e à degradação de PAF/“PAF-like” nas mesmas condições experimentais, mas não encontramos diferenças entre os grupos controle e tratado das respectivas linhagens. A nível basal, observou-se uma tendência das células SKmel 05 a terem maior expressão gênica de LPCAT 1 e 2 do que as células SKmel 37, que por sua vez, apresentaram tendência a terem maior expressão gênica de LPCAT 3 e 4, e PAF-AHII. No entanto, tratam-se apenas de tendências e não podemos associar estes resultados à produção de PAF por não termos medido a atividade destas enzimas.

Além disso, percebemos que apenas as células que tiveram sua proliferação afetada por hipóxia e hipóxia/reoxigenação, apresentaram aspectos morfológicos associados à morte celular quando tratadas com WEB2086. No contexto de hipóxia/reoxigenação, confirmamos que o bloqueio de PAFR na linhagem SKmel 37 de fato induz morte celular. Consequentemente, esse conjunto de resultados indicam que a ativação do PAFR é importante frente a condições microambientais estressoras sendo recrutada como parte de uma resposta imediata de sobrevivência. Assim como foi feito para a linhagem SKmel 05 através de ensaios clonogênicos, seria interessante avaliar o envolvimento da via de PAFR na sobrevivência a longo prazo de células SKmel 37 de modo a distinguir se esta via é recrutada tanto imediatamente após injúria quanto em respostas de sobrevivência mais prolongadas.

De fato, a literatura vem revelando que no âmbito tumoral, a ativação de PAFR tem influência sobre a sobrevivência celular, podendo levar ao desencadeamento de respostas opostas. Ora, a ativação desta via contribui para a indução de morte celular, ora favorece a proteção contra este processo.

Travers et. al, ao avaliar o envolvimento desta via na indução de morte celular desencadeada por quimioterapia (mais especificamente, mitomicina C e etoposídeo) em células de carcinoma humano, demonstrou que a presença do receptor PAFR foi suficiente para aumentar a apoptose. No mesmo estudo, relacionou este efeito com o estresse oxidativo e com a via de NF-kB, a qual é sabidamente relacionada com o aumento da expressão de p53 e Bax (54).

No entanto, vale ressaltar que, em diversos tipos celulares, a via de NF-kB pode tanto promover como proteger contra a apoptose e os mecanismos que direcionam os possíveis desfechos ainda não foram esclarecidos. Os mesmos autores, por exemplo, mostraram em outro estudo que a ativação de NF-kB desencadeada pela ativação de

PAFR protegeu as células epiteliais da apoptose induzida por TRAIL e TNF-alfa (55). A adição de PAF na linhagem de melanoma murino B16F10, por sua vez, aumentou de maneira dependente de NF-kB, a expressão gênica e os níveis de proteína dos fatores anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL (46).

Assim, em relação à sobrevivência celular, pode-se observar diferentes desfechos resultantes da translocação de NF-kB mediada pela ativação de PAFR, os quais parecem ser dependentes da natureza do estímulo pró-apoptótico. De fato, este fator de transcrição é muito importante na resposta celular frente ao estresse e também é ativado por hipóxia e hipóxia/reoxigenação através de mecanismos ainda não completamente elucidados (56,57). O envolvimento de PAFR na ativação de NF-kB nestas condições microambientais ainda não foram estudadas, mas à luz dos nossos resultados e dos apresentados na literatura acima, seria interessante avaliar se NF-kB estaria envolvido nos desfechos de sobrevivência observados em nosso trabalho.

No entanto, vale ressaltar que estes resultados de sensibilização à morte no contexto de hipóxia/reoxigenação só foram observados quando alterações no ciclo celular decorrentes do tratamento com WEB2086 também foram, paralelamente, desencadeadas, levando a acúmulo celular em SG2M e ocorrendo somente em condições de 1% de oxigênio e não em pressões parciais maiores. Além disso, observamos que quando hipóxia/reoxigenação, por si só, foi capaz de alterar o perfil do ciclo em comparação à normóxia (levando a acúmulo em SG2M), maiores taxas de morte celular associadas ao uso de WEB2086 foram observadas. Estes dados indicam que os níveis de oxigênio tenham influência direta no ciclo celular e nos desfechos de sobrevivência regulados durante este processo, sendo cruciais na modulação de vias envolvidas, inclusive na via de PAFR.

De fato, geralmente, frente a estímulos estressores que podem levar a apoptose das células tumorais, alterações no ciclo celular também são observadas. Afinal, é durante o ciclo celular, através dos checkpoints, que muitas das decisões relacionadas à sobrevivência são tomadas (58). Além dos danos genotóxicos causados pelos tratamentos antitumorais, fatores microambientais como disponibilidade de oxigênio e nutrientes também modulam o ciclo celular, pois este processo possui uma alta demanda energética e seu controle deve monitorar condições externas que influenciam a proliferação. Assim, em condições hipóxicas, células tumorais podem ter sua proliferação afetada, resultando, majoritariamente, na diminuição da porcentagem de células na fase S e no aumento da porcentagem de células em G1 (59). Ao passo que a reoxigenação de áreas hipóxicas, por sua vez, leva a um acúmulo celular em G2 (60). Nossos resultados foram, portanto, congruentes com a literatura neste sentido.

Além disso, apesar de não termos investigado dano ao DNA, a literatura evidencia que mesmo na ausência de dano mensurável ao material genético, hipóxia pode levar a estresse replicativo, bem como ativação de proteínas envolvidas em vias de reparo, enquanto que hipóxia/reoxigenação, de fato, induz dano ao DNA (através da ação de ROS) e leva a fosforilação de p53 e H2AX (de modo dependente de ATM), para assim evitar que as células proliferem antes do dano ser reparado (61).

Apesar de não termos avaliado a relação entre a via de PAFR e as vias envolvidas no reparo ao dano e controle do ciclo celular, estudos prévios evidenciam o papel de PAF nestes processos. Os dados mostram que em mastócitos, o fosfolípido em questão desempenha papel importante na indução da imunossupressão desencadeada pela luz ultravioleta e afeta o reparo ao dano ao DNA. Os estudos subsequentes indicam que, através da diminuição da expressão de ciclina B1 e aumento da expressão de p21, PAF leva a parada do ciclo celular em G2M. No entanto, ao mesmo tempo em que exerce

esta atividade de supressor tumoral, PAF também atua como promotor tumoral ao diminuir e alterar a localização de elementos de resposta ao dano ao DNA. (62). Além disso, outras pesquisas recentes evidenciaram que lipídios modulados durante o ciclo celular têm controle sobre este processo, tanto em organismos metazoários quanto em eucarióticos (63,64).

Ao contrário, nossos resultados de proliferação, ciclo e morte, mostraram que o bloqueio da via (e não sua ativação) em hipóxia/reoxigenação induziu redução da proliferação, acúmulo em G2M e morte celular. No entanto, sabendo que a atividade e estabilização de p21 variam de modo dependente da extensão da lesão genotóxica, podendo culminar em desfechos pró ou anti-apoptóticos e, considerando que hipóxia/reoxigenação não possui o mesmo grau de genotoxicidade que radioterapia, seria interessante avaliar nos próximos estudos a fosforilação de H2AX e a participação de p21 em nosso modelo. (65).

Portanto, através da literatura apresentada anteriormente, é plausível pensar que PAF possa regular tanto a progressão do ciclo celular nestas condições experimentais quanto os desfechos de sobrevivência frente a estes agravos. Na verdade, podemos sugerir que PAF, de alguma maneira, interfira na transição de G1 para S, refletindo no acúmulo de células em G0G1 em condições de hipóxia. Durante o período de reoxigenação que, pela literatura, é acompanhado por aumento da injúria celular, a degradação de PAF levaria a retomada do ciclo. A ativação do receptor neste contexto, por sua vez, poderia ser importante na resposta de sobrevivência frente a esta injúria, sendo decisiva, portanto, na transição de G2 para M. Ao bloquearmos a via de PAFR, teríamos concomitantemente, morte celular e acúmulo em G2M, assim como demonstram nossos resultados. Caso a hipótese acima vier a ser testada, podemos

avaliar a participação de algumas das vias citadas anteriormente, como por exemplo, NF- κ B, p53, p21 e ATM em nossos modelos.

Além disso, sabendo que células acumuladas na fase G2M possuem maior conteúdo mitocondrial e maiores níveis de estresse oxidativo do que células em G1 ou S, é razoável imaginar que haja maior oxidação de proteínas e lipídios nas células acumuladas em G2M (66). Nossos resultados indicam, entretanto, que além de PAF, outros fosfolipídios oxidados com atividade “PAF-like” não estão presentes no compartimento intracelular de nenhuma das linhagens celulares expostas à hipóxia ou hipóxia/reoxigenação. Uma das possíveis razões para tal é a indução de respostas antioxidantes que as células possuem, como por exemplo a indução de autofagia. Este processo catabólico é responsável pela remoção de organelas e moléculas alteradas, inclusive lipídios, e é sabidamente deflagrado em condições de privação de oxigênio, sendo importante na resposta de sobrevivência e no desencadeamento de quimiorresistência nesta condição experimental. O estudo de Gruber et al., aliás, mostrou que autofagia é induzida por lipídios oxidados provenientes de células tratadas com radiação UVA, sendo responsável pela regulação dos níveis destes lipídios em queratinócitos (67, 68). Assim, é pertinente pensar que a sinalização de PAFR e autofagia estejam de alguma forma relacionados, participando da resposta de sobrevivência frente à hipóxia e hipóxia/reoxigenação.

Alguns dados da literatura reforçam esta hipótese. Por exemplo, sabe-se que a ativação de PAFR regula negativamente cAMP (69). Como altos níveis de cAMP inibem autofagia, a regulação negativa desta molécula favorece a indução deste processo catabólico (70). Logo, a ativação de PAFR poderia regular indiretamente a autofagia. Sabe-se também que CD36 está envolvido na indução de autofagia em macrófagos e que a fagocitose de células apoptóticas por estas células depende tanto

deste receptor “scavenger” quanto de PAFR, os quais se associam em experimentos de imunoprecipitação, sugerindo que haja comunicação direta entre estas proteínas e não a nível “downstream” das respectivas vias de sinalização. Como CD36 possui uma cauda intracitoplasmática curta, dificultando sua sinalização intracelular, provavelmente CD36 dependa de PAFR para otimizar a transdução de sinais ou até mesmo para estabilizar a interação com ligantes (71,41). Assim, é razoável pensar que PAFR também esteja envolvido na indução de autofagia.

Vale ressaltar que as vias descritas acima (autofagia, reparo de DNA, controle do ciclo celular, morte celular e estresse oxidativo), as quais estão fortemente relacionadas entre si, têm sido associadas também com a resistência às terapias antitumorais (72,73) e a literatura vem elucidando que a associação de antagonistas de PAFR com quimioterapia ou radioterapia melhora a eficácia destes tratamentos convencionais. Os estudos de Travers et al. revelam que o estresse oxidativo gerado por quimioterapia local (com etoposídeo, melfalano, cisplatina e dacarbazina) e sistêmica (com etoposídeo), bem como radioterapia, geram ligantes de PAFR através de reações não controladas de oxidação de glicerofosfocolinas e que estes agonistas de PAFR, por sua vez, influenciam o crescimento de melanomas através do desencadeamento de imunossupressão (74-76).

Nossos resultados indicaram que o tratamento de células SKmel 37 com WEB2086 no contexto de hipóxia/reoxigenação sensibiliza as células à morte induzida por cisplatina (apenas quando $pO_2 = 1\%$). Este dado nos permite sugerir que a morte celular pode resultar do acúmulo de injúria frente ao tratamento combinado e/ou da sensibilização de células resistentes à cisplatina através do bloqueio da via de PAFR. Afinal, também mostramos que frente a 48 horas de hipóxia seguida de 6 horas de reoxigenação, células SKmel 37 são mais resistentes à morte celular induzida por

cisplatina e que este efeito esteja vinculado a outros mecanismos que não somente alterações no ciclo celular resultantes do uso desta droga. Além disso, considerando que o tempo de duplicação destas células é muito superior ao tempo de reoxigenação utilizado, podemos inferir que grande parte das células não ciclou neste período e que os resultados observados de morte sejam, majoritariamente, reflexos de algum mecanismo de resistência à cisplatina já desencadeado durante a hipóxia. Aliás, os resultados de ciclo celular nestas condições experimentais (48 horas de hipóxia seguidas por 6 horas de reoxigenação) exibem um perfil (acúmulo em G0G1) mais comumente encontrado em células expostas à hipóxia do que à hipóxia/reoxigenação.

Sabe-se, por exemplo, que células tumorais podem se tornar resistentes às terapias através da superexpressão de transportadores ABC induzida por HIF1 α em ambientes com pressão parcial de oxigênio reduzida e/ou ricos em ROS. De modo particular, HIF1 α aumenta a expressão da glicoproteína MDR1, que é um tipo de transportador ABC que bombeia drogas lipofílicas para fora das células e também pode transportar análogos de lipídios de membrana com cadeias “acyl” curtas, como PAF (77,78). Além disso, alterações na composição e nas propriedades da membrana plasmática, como viscosidade e fluidez, também podem induzir resistência às terapias, inclusive à cisplatina (79). A scramblase PLSCR1, que é uma proteína responsável pela translocação de fosfolipídios entre as monocamadas da membrana plasmática, tem sido associada com crescimento tumoral e com a translocação de PAF. Sua expressão e atividade, inclusive, se mostraram aumentadas em hipóxia e hipóxia/reoxigenação (80 - 82). Assim sendo, considerando nossos dados, seria interessante investigar o envolvimento de PAFR na seleção de células mais resistentes à cisplatina no contexto de hipóxia e hipóxia/reoxigenação, avaliando também sua possível relação com MDR1 e/ou scramblase.

Além disso, vale ressaltar que, em congruência com a literatura, cisplatina levou a acúmulo celular em G2M mesmo nas células expostas à hipóxia/reoxigenação. Considerando os dados levantados anteriormente sobre a participação de PAFR em vias desencadeadas durante este “checkpoint”, podemos sugerir que a associação de cisplatina com WEB2086 *in vitro* potencialize a morte por interferir no ciclo celular.

Como previamente comentado, nosso grupo mostrou através de experimentos *in vivo* que o tratamento combinado entre cisplatina e WEB2086 também potencializa a redução do crescimento de tumores Skmel 37. Contudo, como o bloqueio de PAFR, por si só, também afetou o crescimento dos tumores (36), decidimos investigar se, *in vivo*, existiria alguma relação entre PAFR e hipóxia e/ou hipóxia/reoxigenação, assim como os resultados dos experimentos *in vitro* evidenciaram.

Através das imunofluorescências de tumores congelados, mostramos que em tumores de células SKmel 37, houve acúmulo de PAFR em áreas hipóxicas e em seu entorno. No entanto, a origem celular do PAFR, que pode ser expresso por diversos tipos celulares, ainda não foi elucidada. Sabe-se que hipóxia pode modular o perfil fenotípico de macrófagos no sentido imunossupressor, que favorece o desenvolvimento tumoral (83). Além disso, vários estudos têm evidenciado a contribuição do PAFR na polarização de macrófagos em direção a este fenótipo (41,43). Logo, seria interessante investigar se assim como acontece com as células SKmel 37 sob hipóxia e hipóxia/reoxigenação, a sobrevivência dos macrófagos (e talvez seus fenótipos) também poderia ser modulada pela ativação do PAFR.

Sabendo que este fosfolípido exerce tanto efeitos parácrinos quanto autócrinos, podendo modular respostas nos diversos tipos celulares presentes no microambiente (33), realizamos os ensaios de “feeder” com células KBM e KBP como modelo *in vitro* para avaliação da repopulação, contemplando a heterogeneidade tumoral quanto à

expressão de PAFR. Percebemos já de início que a fluorescência das células GFP positivas não estava forte o suficiente para identificar estas células no microscópio, mas mesmo assim, prosseguimos com os experimentos para posterior avaliação da intensidade de fluorescência verde e vermelha por citometria de fluxo. No entanto, muito provavelmente devido a falta de SFB no meio, o crescimento das células KBM e KBP foi comprometido e, infelizmente, nossos resultados foram inconclusivos, já que não conseguimos intensidade de fluorescência suficiente que distinguisse estas células transduzidas da autofluorescência das células SKmel 37.

De qualquer maneira, o trabalho de Ildefonso et. al, que investigou o papel de PAFR frente à radioterapia na repopulação de carcinomas, demonstrou que moléculas “PAF-like” são geradas e a ativação de PAFR contribui para este fenômeno protegendo as células tumorais da morte celular induzida pela terapia e favorecendo o perfil imunossupressor de macrófagos (84). Da mesma forma, podemos pensar que a sinalização de PAFR frente à hipóxia/reoxigenação também possa contribuir para a repopulação de melanomas modulando as respostas de sobrevivência, a sensibilização à cisplatina e, possivelmente, modulando o perfil de macrófagos.

Nós também avaliamos o envolvimento de PAFR frente à terapia antitumoral. Considerando a necessidade de âmbito translacional em se compreender padrões de sensibilidade e resistência ao Vemurafenib para evitar a repopulação de melanomas o próprio tratamento com esta droga foi um dos modelos utilizados neste trabalho para avaliar o envolvimento de PAFR no desfecho de sobrevivência frente a este agravo.

A partir de curvas de concentração e tempo, observamos que duas linhagens (SKmel 05 e UACC 62) eram mais sensíveis à morte celular induzida pela droga, enquanto as duas outras (SKmel 37 e A375) apresentavam maior resistência intrínseca. Ao combinar este tratamento com WEB2086, verificamos que o efeito de morte celular

observado nas linhagens SKmel 05 e UACC 62 foi potencializado, ao passo que as linhagens SKmel 37 e A375 não foram sensibilizadas ao PLX4032. Estes resultados, em congruência com os resultados de hipóxia/reoxigenação, reforçam o possível papel da ativação de PAFR na resposta de sobrevivência frente a condições adversas. Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, as linhagens SKmel 37 e A375 não sucumbiram aos efeitos citotóxicos do Vemurafenib e tampouco foram afetadas com o bloqueio da via de PAFR, porém, caso concentrações ou tempos maiores de exposição ao PLX4032 fossem utilizados, a sinalização de PAFR poderia, possivelmente, compor a resposta de sobrevivência celular e, conseqüentemente, seu bloqueio impactaria o desfecho do tratamento.

Nossos resultados de ciclo celular, em congruência com os da literatura, indicaram que o tratamento com Vemurafenib leva ao acúmulo celular em G0G1 em todas as linhagens, exceto na UACC 62. Além disso, outro estudo revela que frente à utilização desta droga, uma assinatura gênica relacionada ao ciclo celular está associada com piores taxas de sobrevida livre de progressão e propõe que o aumento da expressão de genes que regulam os “checkpoints” subsequentes possa contribuir para a sobrevivência e contínua proliferação de células que escapam do acúmulo inicial em G0G1 induzido por PLX4032 (85,86).

Ainda não foi possível avaliar a geração de ligantes de PAF pelas linhagens de melanoma tratadas com Vemurafenib, tampouco o escape do acúmulo em G0G1 a longo prazo das linhagens resistentes, porém com base na literatura sobre ciclo celular apresentada acima, assim como propusemos anteriormente ao discutir os resultados obtidos no modelo de hipóxia/reoxigenação, sugerimos que avaliar a participação da via de PARF na progressão do ciclo celular frente ao PLX4032 seja importante.

As análises de citometria de fluxo para identificação de PAFR extracelular nas linhagens SKmel 05 e UACC 62 tratadas com PLX4032 revelam que apesar de a porcentagem de células PAFR positivas ser baixa em ambas as linhagens, Vemurafenib induziu um aumento na porcentagem de células Skmel 05 que expressavam PAFR extracelular, mas não teve efeito sobre as células UACC 62. Vale ressaltar que dentre as quatro linhagens de melanoma humano testadas, Skmel 05 foi a linhagem que apresentou maiores taxas de morte celular induzida pelo tratamento combinado com o antagonista de PAFR. O bloqueio de PAFR na linhagem UACC 62 também sensibilizou as células ao Vemurafenib, porém em menores proporções. Este resultado pode estar possivelmente, relacionado com a modulação da expressão do receptor na superfície extracelular das células Skmel 05 desencadeada por PLX4032.

Considerando os resultados obtidos quanto à geração de ROS, podemos sugerir que este aumento da expressão de PAFR extracelular na linhagem Skmel 05 se deva, em partes, ao aumento de ROS induzido pelo tratamento com Vemurafenib, uma vez que a oxidação dos fosfolipídios de membrana pode levar a geração de ligante de PAFR, cuja ativação poderia regular seus próprios níveis proteicos (69).

Como se pode observar, em decorrência ao tratamento com PLX4032, a geração de ROS é aumentada em ambas as linhagens, sendo este aumento mais proeminente na linhagem Skmel 05. Nossos resultados, portanto, nesse aspecto, são congruentes com os achados apresentados na literatura (48). O bloqueio da via de PAFR, por sua vez, quando utilizado como monoterapia, não leva a alterações nos níveis de ROS em nenhuma das linhagens, entretanto, quando combinado com Vemurafenib, potencializa a geração destas moléculas na linhagem Skmel 05. Estes dados sugerem que a via de PAFR esteja, de alguma maneira, envolvida no balanço celular de ROS frente a

condições de estresse nesta linhagem, afinal o bloqueio da via leva a um aumento dos níveis destas moléculas apenas quando PLX4032 é utilizado concomitantemente.

A influência de PAFR sobre os níveis de ROS induzido por drogas é evidenciado no trabalho de Sahu et al., em que células de melanoma murino, B16F10, que expressam PAFR, apresentam maiores níveis de ROS quando tratadas com BTIC do que células B16F10 negativas para este receptor, reforçando, portanto, a possível participação de PAFR em processos relacionados a regulação dos níveis de ROS frente a condições adversas. (87).

Sabe-se que em condições homeostáticas, em paralelo à geração de ROS, as células mantêm mecanismos antioxidantes ativos que garantem o equilíbrio. De fato, a manutenção de baixos níveis de ROS é essencial para a regulação de diversos processos fisiológicos e o aumento excessivo destas moléculas (conhecido como estresse oxidativo) implica no extenso dano aos componentes celulares, que pode resultar na ativação de processos de morte, inclusive apoptose mediada pela mitocôndria, por receptores de morte e por estresse de retículo (88). Assim é plausível pensar que, apesar dos níveis de ROS induzidos por PLX4032 terem sido muito baixos em nossos experimentos, estresse oxidativo pode ter sido gerado levando ao desencadeamento de morte celular observada nas linhagens e que, frente ao tratamento combinado, a linhagem Skmel 05 apresente porcentagens maiores de hipodiploidia devido a um maior desbalanço dos níveis celulares de ROS. Para testar o envolvimento do estresse oxidativo na indução de morte nestas condições experimentais, seria importante realizar os mesmos experimentos na presença de antioxidantes, como por exemplo, vitamina C.

Além disso, alguns estudos mostram que um dos processos de morte celular deflagrado pelo tratamento com Vemurafenib é a apoptose (28,89). Assim, avaliamos a ativação de caspase 3/7 em nossas condições experimentais e observamos que apenas o

tratamento combinado na linhagem SKmel 05 foi capaz de aumentar a porcentagem de células com caspase 3/7 ativadas e ainda assim, este valor foi muito baixo. Na linhagem UACC 62, por sua vez, nenhuma condição experimental alterou a ativação destas proteínas efectoras. Assim, outros ensaios são necessários para concluir se, de fato, apoptose é desencadeada ou se outros mecanismos de morte são majoritariamente ativados.

Considerando o cenário clínico em que, a princípio, o tratamento com Vemurafenib induz regressão tumoral, atingindo boas respostas, mas que, posteriormente, se observa recidiva, à luz do conjunto de resultados apresentados e discutidos acima, fomos motivados a avaliar a sobrevivência a longo prazo da linhagem mais sensível aos tratamentos e a influência do bloqueio de PAFR neste processo. O tratamento com Vemurafenib, por si só, foi capaz de alterar a capacidade clonogênica das células, porém ao contrário dos resultados obtidos nos ensaios de morte a curto prazo, o tratamento combinado não foi capaz de potencializar o efeito do inibidor de BRAF. Ou seja, o bloqueio inicial de PAFR não consegue impedir a formação de clones pelas células que resistem ao tratamento combinado.

Nestas células, conforme já evidenciado, o tratamento combinado induz leve aumento da geração de ROS e de ativação de caspase 3/7. Ambos os efeitos podem favorecer a geração de ligantes de PAFR. Assim, apesar de não termos avaliado se Vemurafenib e/ou o tratamento combinado poderiam modular os níveis destes ligantes, seria interessante averiguar se a utilização contínua do antagonista WEB2086 seria capaz de reduzir a capacidade clonogênica das células inicialmente tratadas com PLX4032.

De modo geral, tanto frente à hipóxia/reoxigenação quanto ao tratamento com Vemurafenib, nossos resultados revelaram que a via de PAFR é modulada e está

envolvida na resposta de sobrevivência a estes agravos. Estes modelos compartilham alguns mecanismos que podem estar associados a estes resultados.

Por exemplo, no contexto da sinalização de BRAF-MEK-ERK, quando há mutação em BRAF, a atividade glicolítica das células é estimulada, ao passo que a fosforilação oxidativa é inibida. Em pressões parciais de oxigênio baixas, como no caso de hipóxia, as mesmas alterações metabólicas acontecem. Nestas situações, menores níveis de ROS são gerados. No entanto, a reoxigenação ou o bloqueio da via de BRAF com Vemurafenib poderiam retomar a fosforilação oxidativa aumentando os níveis de ROS. Estas moléculas, por sua vez têm sido implicadas na ativação de diversas vias de sinalização e fatores de transcrição relacionados à sobrevivência celular, sendo alguns deles também regulados pela ativação de PAFR, como por exemplo a via de PI3K, de MAPK e o fator NF-kB (90,91).

Além disso, a via de sinalização de BRAF mutado também está relacionada com o aumento da expressão de HIF-1 α , que é um dos maiores reguladores de transcrição gênica em hipóxia, compondo a resposta de sobrevivência nesta condição microambiental. Apesar da relação entre este fator de transcrição e PAFR não ter sido explorada em tumores, sabe-se que células do intestino submetidas à hipóxia têm a expressão de PAFR regulada de modo dependente de HIF-1 α (93). Assim, tanto o tratamento com Vemurafenib quanto a reoxigenação de áreas em hipóxia, ao degradar HIF-1 α , poderiam ter efeito nas vias de sobrevivência disparadas por este fator e caso PAFR seja uma delas, seu bloqueio teria impacto neste desfecho.

Por fim, a literatura traz que os níveis de caspase-3 são aumentados durante a reoxigenação de células que estavam em hipóxia e que o tratamento com Vemurafenib também promove este aumento. Sabe-se que a ativação desta proteína, inicialmente caracterizada como estritamente pró-apoptótica, também pode favorecer desfechos de

sobrevivência ao promover a produção de PGE2 a partir de PLA2 e COX-2. A sinalização de PAFR, por sua vez, poderia ter influência sobre este resultado, pois PAF, que também é subproduto de PLA2, ao ativar seu receptor pode atuar sobre o fator de transcrição NF-kB, modulando indiretamente a regulação de COX-2, induzir a ativação de PLA2 e até mesmo a ativação de caspase-3. Logo o bloqueio da via de PAFR também poderia modificar o desfecho de sobrevivência ao interferir neste eixo de sinalização descrito acima. (46, 93, 94).

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados de espectrometria de massa, Western Blot e citometria de fluxo, pudemos concluir que, frente à hipóxia e hipóxia/reoxigenação, a geração de PAF é modulada, enquanto que o seu receptor, PAFR, não é alterado por nenhuma condição experimental. Os ensaios de proliferação e sobrevivência nos permitiram concluir que células sensíveis à injúria por hipóxia e/ou hipóxia/reoxigenação tem sua proliferação ainda mais reduzida e apresentam morfologia associada à morte com o bloqueio da via de PAFR nestas condições. Frente à hipóxia/reoxigenação, o tratamento com WEB2086 induz morte celular e sensibiliza estas células à cisplatina, quando alterações no ciclo (mais precisamente acúmulo em G2M) também são observadas, ocorrendo apenas em $pO_2 = 1\%$. A partir dos dados de imunofluorescência que mostram acúmulo de PAFR em regiões hipóxicas e em seus arredores, podemos concluir que esta via também é importante no contexto *in vivo*.

Da mesma forma, os ensaios de sobrevivência frente ao tratamento com Vemurafenib mostram que em células sensíveis à droga, o bloqueio da via de PAFR potencializa o efeito de morte celular induzida por PLX4032, estando possivelmente relacionado com modulação da expressão de PAFR extracelular, dos níveis de ROS e de caspase-3/7 ativadas.

Assim, o conjunto de resultados apresentados evidencia que a sinalização de PAFR é importante frente a um contexto de injúria e participa dos desfechos de sobrevivência frente à hipóxia/reoxigenação e/ou tratamentos antitumorais, podendo, de alguma forma, contribuir com a repopulação de melanomas.

8. REFERÊNCIAS

1. **Shain AH, Bastian BC.** *From melanocytes to melanomas.* Nat Rev Cancer. 2016 Jun;16(6):345-58.
2. **Matsumura Y, Ananthaswamy HN.** *Molecular mechanisms of photocarcinogenesis.* Front Biosci. 2002 Apr 1;7:d765-83.
3. **Kvam E, Tyrrell RM.** *The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells.* J Invest Dermatol. 1999 Aug;113(2):209-13.
4. **Gonçalves FT, Francisco G, de Souza SP, Luiz OC, Festa-Neto C, Sanches JA, Chammas R, Gattas GJ, Eluf-Neto J.** *European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes modify the risk of melanoma: a case-control study in a high UV index region in Brazil.* J Dermatol Sci. 2011 Oct;64(1):59-66.
5. **Zaidi MR, Day CP, Merlino G.** *From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse.* J Invest Dermatol. 2008 Oct;128(10):2381-91.
6. **Menzies AM, Long GV.** *Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond.* Eur J Cancer. 2013 Oct;49(15):3229-41.
7. **Velho TR.** *Metastatic melanoma - a review of current and future drugs.* Drugs Context. 2012 Nov 19;2012:212242.
8. **Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM.** *Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity.* Anticancer Agents Med Chem. 2007 Jan;7(1):3-18.
9. **Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G.** *Molecular mechanisms of cisplatin resistance.* Oncogene. 2012 Apr;31(15):1869-83.
10. **Martinez-Cardús A, Vizoso M, Moran S, Manzano JL.** *Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance.* Ann Transl Med. 2015 Sep;3(15):209.
11. **Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M.** *Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond.* Nat Rev Cancer. 2014 Jul;14(7):455-67.
12. **Davies H et. al.,** *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Nature 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

13. **Swaiika A, Crozier JA, Joseph RW.** Vemurafenib: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther.* 2014 Jun 16;8:775-87.

14. **Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, Kehoe SM, Johannessen CM, Macconail LE, Hahn WC, Meyerson M, Garraway LA.** *Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling.* *J Clin Oncol.* 2011 Aug 1;29(22):3085-96.

15. **Kim JJ, Tannock IF.** *Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure.* *Nat Rev Cancer.* 2005 Jul;5(7):516-25.

16. **Gregory CD, Pound JD.** *Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues.* *J Pathol.* 2011 Jan;223(2):177-94.

17. **Sun X, Yu Q.** *Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment.* *Acta Pharmacologica Sinica.* 2015 36(10):1219-1227.

18. **Harris AL.** *Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth.* *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38-47.

19. **Saggar JK, Yu M, Tan Q, Tannock IF.** *The tumor microenvironment and strategies to improve drug distribution.* *Front Oncol.* 2013 Jun 10;3:154.

20. **Wang J, Wu GS.** *Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells.* *J Biol Chem.* 2014 Jun 13;289(24):17163-73.

21. **Wu HM, Jiang ZF, Ding PS, Shao LJ, Liu RY.** *Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells.* *Sci Rep.* 2015 Jul 23;5:12291.

22. **Martin S, Dudek-Perić AM, Maes H, Garg AD, Gabrysiak M, Demirsoy S, Swinnen JV, Agostinis P.** *Concurrent MEK and autophagy inhibition is required to restore cell death associated danger-signalling in Vemurafenib-resistant melanoma cells.* *Biochem Pharmacol.* 2015 Feb 1;93(3):290-304.

23. **Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, Hart LS, Levi S, Hu J, Zhang G, Lazova R, Klump V, Pawelek JM, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Davies MA, Herlyn M, Winkler J, Koumenis C, Amaravadi RK.** *Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma.* *J Clin Invest.* 2014 Mar;124(3):1406-17.

24. **Høyer-Hansen M, Jäättelä M.** *Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium.* *Cell Death Differ.* 2007 Sep;14(9):1576-82.

25. **Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E.** *Autophagy promotes tumor cell*

survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006 Jul;10(1):51-64.

26. **Saggar JK, Tannock IF.** *Chemotherapy Rescues Hypoxic Tumor Cells and Induces Their Reoxygenation and Repopulation-An Effect That Is Inhibited by the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302.* *Clin Cancer Res*. 2015 May 1;21(9):2107-14.

27. **Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O'Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, Zhou L, Shen J, Han G, Wang XJ, Thorburn J, Thorburn A, Jimeno A, Raben D, Bedford JS, Li CY.** *Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy.* *Nat Med*. 2011 Jul 3;17(7):860-6.

28. **Donato AL, Huang Q, Liu X, Li F, Zimmerman MA, Li CY.** *Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy.* *J Invest Dermatol*. 2014 Jun;134(6):1686-92.

29. **Melnikova VO, Villares GJ, Bar-Eli M.** *Emerging roles of PAR-1 and PAFR in melanoma metastasis.* *Cancer Microenviron*. 2008 Dec;1(1):103-11.

30. **Jancar S, Chammas R.** *PAF receptor and tumor growth.* *Curr Drug Targets*. 2014;15(10):982-7.

31. **Brown SL, Jala VR, Raghuwanshi SK, Nasser MW, Haribabu B, Richardson RM.** *Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals.* *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3242-9.

32. **Honda Z, Ishii S, Shimizu T.** *Platelet-activating factor receptor.* *J Biochem*. 2002 Jun;131(6):773-9.

33. **Melnikova V, Bar-Eli M.** *Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor.* *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec;26(3-4):359-71

34. **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 Oct 10;254(19):9355-8.

35. **Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** *Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes.* *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003 Dec;40(6):643-72.

36. **Onuchic AC, Machado CM, Saito RF, Rios FJ, Jancar S, Chammas R.** *Expression of PAFR as part of a prosurvival response to chemotherapy: a novel target for combination therapy in melanoma.* *Mediators Inflamm*. 2012;2012:175408.

37. **Snyder F.** *Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes.* Biochem J. 1995 Feb 1;305 (Pt 3):689-705.
38. **Murphy RC.** *Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products.* Adv Exp Med Biol. 1996;416:51-8.
39. **Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM.** *Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide.* J Biol Chem. 1992 Jul 25;267(21):15168-75.
40. **Fadok VA, Bratton DL, Henson PM.** *Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences.* J Clin Invest. 2001 Oct;108(7):957-62.
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. **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.
43. **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.
44. **Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S.** *Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity.* Inflammation. 1990 Feb;14(1):125-32.
45. **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 Oct;89(5):319-26.
46. **Heon Seo K, Ko HM, Kim HA, Choi JH, Jun Park S, Kim KJ, Lee HK, Im SY.** *Platelet-activating factor induces up-regulation of antiapoptotic factors in a melanoma cell line through nuclear factor-kappaB activation.* Cancer Res. 2006 May 1;66(9):4681-6.
47. **Ferracini M, Sahu RP, Harrison KA, Waeiss RA, Murphy RC, Jancar S, Konger RL, Travers JB.** *Topical photodynamic therapy induces systemic immunosuppression via generation of platelet-activating factor receptor ligands.* J Invest Dermatol. 2015 Jan;135(1):321-3.
48. **Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, André F, Jonneaux A, Scalbert C, Garçon G, Malet-Martino M, Balayssac S, Rocchi S, Savina A, Formstecher P, Mortier L, Kluza J, Marchetti P.** *Mitochondrial oxidative stress is the Achilles's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor.* Oncotarget. 2013 Nov;4(11):1986-98.

49. **Arnould T, Michiels C, Remacle J.** *Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1.* Am J Physiol. 1993 May;264(5 Pt 1):C1102-10.

50. **Valli A, Rodriguez M, Moutsianas L, Fischer R, Fedele V, Huang HL, Van Stiphout R, Jones D, McCarthy M, Vinaxia M, Igarashi K, Sato M, Soga T, Buffa F, Mccullagh J, Yanes O, Harris A, Kessler B.** *Hypoxia induces a lipogenic cancer cell phenotype via HIF1 α -dependent and -independent pathways.* Oncotarget. 2015 Feb 10;6(4):1920-41.

51. **Sarri E, Garcia-Dorado D, Abellan A, Soler-Soler J.** *Effects of hypoxia, glucose deprivation and acidosis on phosphatidylcholine synthesis in HL-1 cardiomyocytes. CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity correlates with sarcolemmal disruption.* Biochem J. 2006 Feb 15;394(Pt 1):325-34.

52. **Falletta P, Sanchez-Del-Campo L, Chauhan J et al.,** *Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma.* Genes Dev. 2017 Jan 1;31(1):18-33.

53. **Bensaad K, Harris AL.** *Hypoxia and metabolism in cancer.* Adv Exp Med Biol.2014;772:1-39.

54. **Li T, Southall MD, Yi Q, Pei Y, Lewis D, Al-Hassani M, Spandau D, Travers JB.** *The epidermal platelet-activating factor receptor augments chemotherapy-induced apoptosis in human carcinoma cell lines.* J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):16614-21.

55. **Southall MD, Isenberg JS, Nakshatri H, Yi Q, Pei Y, Spandau DF, Travers JB.** *The platelet-activating factor receptor protects epidermal cells from tumor necrosis factor (TNF) alpha and TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis through an NF-kappa B-dependent process.* J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):45548-54.

56. **Ryan S, McNicholas WT, Taylor CT.** *A critical role for p38 map kinase in NF-kappaB signaling during intermittent hypoxia/reoxygenation.* Biochem Biophys Res Commun. 2007 Apr 13;355(3):728-33

57. **D'Ignazio L, Rocha S.** *Hypoxia Induced NF- κ B.* Cells. 2016 Mar 8;5(1). pii: E10.doi: 10.3390/cells5010010. Review.

58. **Pucci B, Kasten M, Giordano A.** *Cell cycle and apoptosis.* Neoplasia. 2000 Jul-Aug;2(4):291-9. Review.

59. **Ortmann B, Druker J, Rocha S.** *Cell cycle progression in response to oxygen levels.* Cell Mol Life Sci. 2014 Sep;71(18):3569-82. doi 10.1007/s00018-014-1645-9. Epub 2014 May 25. Review.

60. **Freiberg RA, Krieg AJ, Giaccia AJ, Hammond EM.** *Checking in on hypoxia/reoxygenation.* Cell Cycle. 2006 Jun;5(12):1304-7. Epub 2006 Jun 15. Review
61. **Riffle S, Pandey RN, Albert M, Hegde RS.** *Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids.* BMC Cancer. 2017 May 18;17(1):338
62. **Puebla-Osorio N, Damiani E, Bover L, Ullrich SE.** Platelet-activating factor induces cell cycle arrest and disrupts the DNA damage response in mast cells. Cell Death Dis. 2015 May 7;6:e1745.
63. **Sanchez-Alvarez M, Zhang Q, Finger F, Wakelam MJ, Bakal C.** *Cell cycle progression is an essential regulatory component of phospholipid metabolism and membrane homeostasis.* Open Biol. 2015 Sep;5(9):150093. doi: 10.1098/rsob.150093.
64. **Furse S, Shearman GC.** *Do lipids shape the eukaryotic cell cycle?* Biochim Biophys Acta. 2018 Jan;1863(1):9-19. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.09.010. Epub 2017 Sep 28. Review
65. **Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E.** *Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response.* Mutat Res. 2010 Apr-Jun;704(1-3):12-20. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.009. Epub 2010 Jan 22. Review.
66. **Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura Y, Nakamura H, Inanami O.** *Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint.* Free Radic Biol Med. 2012 Jul 15;53(2):260-70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033. Epub 2012 May 8.
67. **Weismann D, Binder CJ.** *The innate immune response to products of phospholipid peroxidation.* Biochim Biophys Acta. 2012 Oct;1818(10):2465-75.
68. **Zhao Y, Zhang CF, Rossiter H, Eckhart L, König U, Karner S, Mildner M, Bochkov VN, Tschachler E, Gruber F.** *Autophagy is induced by UVA and promotes removal of oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratinocytes.* J Invest Dermatol. 2013 Jun;133(6):1629-37.
69. **Shukla SD.** *Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms.* FASEB J. 1992 Mar;6(6):2296-301.
70. **He C, Klionsky DJ.** *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy.* Annu Rev Genet. 2009;43:67-93.
71. **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.
72. **Liu Y, Li Q, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang H, Huang C, Lei Y.** *Cancer drug resistance: redox resetting renders a way.* Oncotarget. 2016 Jul 5;7(27):42740-42761. Review.

73. **Gottesman MM.** *Mechanisms of cancer drug resistance.* Annu Ver Med. 2002;53:615-27. Review
74. **Sahu RP, Ocana JA, Harrison KA, Ferracini M, Touloukian CE, Al Hassani M, Sun L, Loesch M, Murphy RC, Althouse SK, Perkins SM, Speicher PJ, Tyler DS, Konger RL, Travers JB.** *Chemotherapeutic agents subvert tumor immunity by generating agonists of platelet-activating factor.* Cancer Res. 2014 Dec 1;74(23):7069-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2043. Epub 2014 Oct 10.
75. **Sahu RP, Ferracini M, Travers JB.** *Systemic chemotherapy is modulated by platelet-activating factor-receptor agonists.* Mediators Inflamm. 2015;2015:820543. doi: 10.1155/2015/820543. Epub 2015 Apr 2
76. **Sahu RP, Harrison KA, Weyerbacher J, Murphy RC, Konger RL, Garrett JE, Chin-Sinex HJ, Johnston ME 2nd, Dynlacht JR, Mendonca M, McMullen K, Li G, Spandau DF, Travers JB.** *Radiation therapy generates platelet-activating factor agonists.* Oncotarget. 2016 Apr 12;7(15):20788-800
77. **Tafari M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, Fini M, Russo MA.** *The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression.* Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:3907147. doi: 10.1155/2016/3907147. Epub 2015 Dec 20. Review.
78. **Raggers RJ, Vogels I, van Meer G.** *Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor.* Biochem J. 2001 Aug 1;357(Pt 3):859-65
79. **Baritaki S, Apostolakis S, Kanellou P, Dimanche-Boitrel MT, Spandidos DA, Bonavida B.** *Reversal of tumor resistance to apoptotic stimuli by alteration of membrane fluidity: therapeutic implications.* Adv Cancer Res. 2007;98:149-90. Review.
80. **Slone EA, Pope MR, Fleming SD.** *Phospholipid scramblase 1 is required for β 2-glycoprotein I binding in hypoxia and reoxygenation-induced endothelial inflammation.* J Leukoc Biol. 2015 Nov;98(5):791-804. doi: 10.1189/jlb.3A1014-480R. Epub 2015 Jul 27.
81. **Frasch SC, Henson PM, Nagaosa K, Fessler MB, Borregaard N, Bratton DL.** *Phospholipid flip-flop and phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) co-localize to uropod rafts in formylated Met-Leu-Phe-stimulated neutrophils.* J Biol Chem. 2004 Apr 23;279(17):17625-33. Epub 2004 Feb 6.
82. **Buart S, Terry S, Noman MZ, Lanoy E, Boutros C, Fogel P, Dessen P, Meurice G, Gaston-Mathé Y, Vielh P, Roy S, Routier E, Marty V, Ferlicot S, Lègrès L, Bouchtaoui ME, Kamsu-Kom N, Muret J, Deutsch E, Eggermont A, Soria JC, Robert C, Chouaib S.** *Transcriptional response to hypoxic stress in melanoma and prognostic potential of GBE1 and BNIP3.* Oncotarget. 2017 Oct 30;8(65):108786-108801.
83. **Henze AT, Mazzone M.** *The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages.* J Clin Invest. 2016 Oct 3;126(10):3672-3679.

84. **da Silva IA Jr, Chammas R, Lepique AP, Jancar S.** *Platelet-activating factor (PAF) receptor as a promising target for cancer cell repopulation after radiotherapy.* *Oncogenesis.* 2017 Jan 30;6(1):e296. doi: 10.1038/oncsis.2016.90.
85. **Wongchenko MJ, McArthur GA, Dréno B, Larkin J, Ascierto PA, Sosman J, Andries L, Kockx M, Hurst SD, Caro I, Rooney I, Hegde PS, Molinero L, Yue H, Chang I, Amler L, Yan Y, Ribas A.** *Gene Expression Profiling in BRAF-Mutated Melanoma Reveals Patient Subgroups with Poor Outcomes to Vemurafenib That May Be Overcome by Cobimetinib Plus Vemurafenib.* *Clin Cancer Res.* 2017 Sep 1;23(17):5238-5245
86. **Haferkamp S, Borst A, Adam C, Becker TM, Motschenbacher S, Windhövel S, Hufnagel AL, Houben R, Meierjohann S.** *Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells.* *J Invest Dermatol.* 2013 Jun;133(6):1601-9.
87. **Sahu RP.** *Expression of the platelet-activating factor receptor enhances benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in murine and human melanoma cells.* *Mol Med Rep.* 2015 Jul;12(1):394-400.
88. **Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA.** *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species.* *Biochim Biophys Acta.* 2016 Dec;1863(12):2977-2992.
89. **Beck D, Niessner H, Smalley KS, Flaherty K, Paraiso KH, Busch C, Sinnberg T, Vasseur S, Iovanna JL, Drießen S, Stork B, Wesselborg S, Schaller M, Biedermann T, Bauer J, Lasithiotakis K, Weide B, Eberle J, Schitteck B, Schadendorf D, Garbe C, Kulms D, Meier F.** *Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells.* *Sci Signal.* 2013 Jan 29;6(260):ra7.
90. **Delgado-Goni T, Miniotis MF, Wantuch S, Parkes HG, Marais R, Workman P, Leach MO, Beloueche-Babari M.** *The BRAF Inhibitor Vemurafenib Activates Mitochondrial Metabolism and Inhibits Hyperpolarized Pyruvate-Lactate Exchange in BRAF-Mutant Human Melanoma Cells.* *Mol Cancer Ther.* 2016 Dec;15(12):2987-2999.
91. **Bensaad K, Harris AL.** *Hypoxia and metabolism in cancer.* *Adv Exp Med Biol.* 2014;772:1-39. doi: 10.1007/978-1-4614-5915-6_1. Review.
92. **Keely S, Glover LE, Weissmueller T, MacManus CF, Fillon S, Fennimore B, Colgan SP.** *Hypoxia-inducible factor-dependent regulation of platelet-activating factor receptor as a route for gram-positive bacterial translocation across epithelia.* *Mol Biol Cell.* 2010 Feb 15;21(4):538-46.
93. **Ho FY, Tsang WP, Kong SK, Kwok TT.** *The critical role of caspases activation in hypoxia/reoxygenation induced apoptosis.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 7;345(3):1131-7.
94. **Esquenazi S, Bazan HE.** *Role of platelet-activating factor in cell death signaling in the cornea: A review.* *Mol Neurobiol.* 2010 Aug;42(1):32-8.

ANEXOS

Anexo 1 – Morfologia das células SKmel 37 frente ao tratamento com WEB2086 em condições de hipóxia e hipóxia/reoxigenação

Na presença do antagonista de PAFR, WEB2086 (50 μ M), as células Skmel 37 foram expostas à hipóxia e hipóxia/reoxigenação. Ao final dos respectivos períodos, a morfologia das células foi observada ao microscópio e fotografias foram tiradas. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante o tempo de exposição à hipóxia (48 horas) e se manteve em 21% durante o período de reoxigenação (24 horas).

Anexo 2 – Expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese de PAF e à degradação de PAF/ “PAF-like”

Skmel 05

Expressão gênica das enzimas LPCAT 1, LPCAT 2, LPCAT 3, LPCAT 4 e PAF-AH II em células SKmel 05 tratadas com WEB2086 (50 μ M) em condições de hipóxia (1%, 48 horas) através de qPCR.. Análises foram feitas a partir da expressão relativa ao endógeno HRPL11. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

Skmel 37

Expressão gênica das enzimas LPCAT 1, LPCAT 2, LPCAT 3, LPCAT 4 e PAF-AH II em células SKmel 37 tratadas com WEB2086 (50 μ M) em condições de hipóxia (1%, 48 horas) através de qPCR.. Análises foram feitas a partir da expressão relativa ao endógeno HRPL11. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

Skmel 05

Expressão gênica das enzimas LPCAT 1, LPCAT 2, LPCAT 3, LPCAT 4 e PAF-AH II em células SKmel 05 tratadas com WEB2086 (50 μ M) em condições de hipóxia/reoxigenação, através de qPCR.. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante a hipóxia (48 horas) e em 21% durante a reoxigenação (21%). Análises foram feitas a partir da expressão relativa ao endógeno HRPL11. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

Skmel 37

Expressão gênica das enzimas LPCAT 1, LPCAT 2, LPCAT 3, LPCAT 4 e PAF-AH II em células SKmel 37 tratadas com WEB2086 (50 μ M) em condições de hipóxia/reoxigenação, através de qPCR.. A porcentagem de oxigênio foi mantida em 1% durante a hipóxia (48 horas) e em 21% durante a reoxigenação (21%). Análises foram feitas a partir da expressão relativa ao endógeno HRPL11. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata

Anexo 3 – Imunofluorescência de cortes congelados de tumor UACC 62

Imunofluorescência de cortes congelados de um tumor de células UACC 62 foi realizada para verificar áreas hipóxicas (em vermelho – Alexa 633) e PAFR (em verde – Alexa 488). Assim como descrito para tumores de células SKmel 37, PAFR encontrou-se acumulado em áreas hipóxicas e em seus arredores. O último conjunto de imagens refere-se ao controle secundário, confirmando a especificidade e efetividade da marcação.

Anexo 4 – Ensaios de “feeder” como modelo *in vitro* de repopulação

Células Skmel 37 mantidas em normóxia como feeder para células KBM

Células Skmel 37 mantidas em normóxia como feeder para células KBP

Células Skmel 37 expostas a hipóxia como feeder para células KBM

Células Skmel 37 expostas a hipóxia como feeder para células KBP

Ensaio de feeder com células KBM e KBP. Histogramas referentes à fluorescência verde (KBM) detectada pelo canal BL1 (“gate” verde - KBM) e fluorescência vermelha (KBP) detectada pelo canal BL3 (“gate” vermelho – KBP), revelam que não foi possível identificar as células KBM, nem as células KBP, em nenhuma das condições experimentais. Experimento representativo de dois experimentos independentes em duplicata.