

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

ANA CAROLINA CHIACETTI RODRIGUES

**Potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF
em tumores irradiados**

São Paulo
2019

ANA CAROLINA CHIACETTI RODRIGUES

Potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF em tumores irradiados

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Jancar Negro

Coorientador: Dr. Ildefonso Alves da Silva Junior

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Chiacetti, Ana Carolina

Potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF em tumores irradiados / Ana Carolina Chiacetti Rodrigues; orientadora Sonia Jancar; coorientador Ildefonso Alves da Silva Junior. – São Paulo, 2019

77 f + 1 DVD

Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Imunologia) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Versão original

1. Receptor do PAF. 2. Angiogênese. 3. Radioterapia. 4. Repopulação Tumoral. I. Jancar, Sonia, orientadora. II. Silva-Jr, Ildefonso Alves, coorientador. III. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Carolina Chiacetti Rodrigues

Título da Dissertação: Potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF em tumores irradiados

Orientadora: Sonia Jancar Negro

Coorientador: Ildefonso Alves da Silva Junior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF em tumores irradiados", protocolada sob o CEUA nº 8910141117, sob a responsabilidade de **Sonia Jancar Negro e equipe; Ana Carolina Chiacetti Rodrigues; Ildefonso Alves da Silva Junior; Marlise Bonetti Agostinho Montes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 15/12/2017.

We certify that the proposal "Angiogenic potential of PAF receptor ligands in irradiated tumors", utilizing 144 Spontaneous mutant mice (144 males), 144 Isogenics mice (144 males), protocol number CEUA 8910141117, under the responsibility of **Sonia Jancar Negro and team; Ana Carolina Chiacetti Rodrigues; Ildefonso Alves da Silva Junior; Marlise Bonetti Agostinho Montes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 12/15/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: **Biotério de matrizes de Camundongos do ICB**

Espécie: **Camundongo mutante espontâneo**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **4 a 6 semanas**

Linhagem: **Balb/C NUDE**

N amostral: 144

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **4 a 6 semanas**

Linhagem: **Balb/C NUDE**

N amostral: 144

São Paulo, 18 de dezembro de 2018



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Potencial angiogênico de ligantes do receptor do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) em tumores*", registrado sob o protocolo nº **47/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **31/05/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

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

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Ildefonso Alves da Silva Junior (Pós-graduando), Douglas Rene Rocha Silva (Pós-graduando), Marlise Bonetti Agostinho Montes (Especialista em laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Angiogenic Potential of Platelet Activating Factor Receptor (PAFR) Ligands in tumors*", protocol nº **47/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **5/31/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

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

- Team members: *Ildefonso Alves da Silva Junior (Graduate Student), Douglas Rene Rocha Silva (Graduate Student), Marlise Bonetti Agostinho Montes (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

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

São Paulo, 31 de maio de 2016.



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



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br


Decl. CEUA.031.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **047/2016/CEUA**, de 31/05/2016, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "**Potencial angiogênico de ligantes do receptor do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) em tumores**", de responsabilidade da Profa. Dra. **Sônia Jancar**, do Departamento de Imunologia, para continuidade do estudo:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	C57BL/6 WT	Macho	6-8 semanas	2º ano: 30 3º ano: 30
Mus musculus	C57BL/6 PAFR KO	Macho	6-8 semanas	2º ano: 30 3º ano: 30
Mus musculus	C57BL/6 RAG KO	Macho	6-8 semanas	2º ano: 30 3º ano: 30

São Paulo, 07 de março de 2017.


Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora da CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.175.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **47/2016/CEUA**, válido até 31/05/2020, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Sonia Jancar Negro**, do Departamento de **Imunologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Ana Carolina Chiacetti Rodrigues** na equipe do Projeto de Pesquisa "*Potencial angiogênico de ligantes do receptor do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) em tumores*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 13 de novembro de 2018.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, em São Paulo, SP, Brasil, e recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 169726/2017-7), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processos 2017/23041-5, 2017/08904-7 e 2013/15719-0), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

Dedico a realização e os resultados desse trabalho aos pacientes que um dia poderão ser beneficiados com esses achados.

Agradecimento

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas, e ao Departamento de Imunologia pelo espaço concedido para a realização desse trabalho.

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES que financiaram este projeto provendo apoio financeiro de bolsa, auxílio para congressos e em insumos laboratoriais.

À minha orientadora Professora Dra. Sonia Jancar, por ter me aceitado como aluna de mestrado e ter me dado a oportunidade de aprender tanto nesses anos que passei no laboratório realizando esse trabalho, confiando em mim para dar continuidade a uma linha de pesquisa que a tanto anos faz parte da sua história.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Ildfonso Alves da Silva Junior, que foi o motivo por eu estar aqui, desde que me encantei com sua tese de doutorado publicada no jornal da USP quando ainda estava procurando uma linha de pesquisa para seguir na pós-graduação. Alguém que sempre me deu tanto apoio e me ensinou muito com toda a paciência e didática incrível que ele tem.

A todos os professores com quem eu tive a oportunidade de fazer disciplina e que foram de grande importância para minha construção de conhecimento e a minha formação acadêmica.

Ao professor Ricardo G. Correa e colegas de turma, Paola, Marianne, Maria Renata e Camila, com quem eu tive o prazer de publicar uma revisão bibliográfica.

À Elisabeth e ao Heitor, do IPEN, por realizarem todas as irradiações.

À banca julgadora da minha qualificação, Dra. Ana Paula Lepique, Dra. Luciana Andrade e Dr. Adalberto Martins Neto, por todos os conselhos e críticas que ajudaram a engrandecer esse trabalho.

À Marlise, que me ensinou muito sobre protocolos experimentais. E que apesar de sempre puxar a minha orelha pela minha pequenina bagunça e os sais nas bancadas, se tornou uma grande amiga, psicóloga nas horas vagas e uma maravilhosa companhia de viagem, que eu quero ter para sempre.

Aos colegas de laboratório, João Pedro que foi quem me apresentou o bandex da USP e é sempre prestativo para todos ao redor; Nayara que se tornou uma grande amiga, companheira de ônibus, rolês, conversas e devaneios; e Theresa, que mesmo sendo muito ocupada arruma um tempinho pra tirar umas dúvidas e bater uns papos no meio da tarde. E colegas de corredor, principalmente a Flávia, minha parceira de estudos de tumores.

Aos meus amigos, Stéphanie que me acompanha desde a infância, sendo alguém que me dá conselhos, me apoia e que apesar de as vezes não nos falarmos muito, sei que posso contar sempre; Matheus com quem eu crio tantos planos mirabolantes e que sempre está lá para me ouvir e discutir sobre o mercado financeiro, rs. Mayra e Danielle, amigas que a vida me deu e que estão presentes nos momentos bons e nos ruins.

Aos meus pais, por todo o apoio e suporte que me deram para me dedicar aos estudos, estando sempre ao meu lado todos os dias, me ajudando a enfrentar toda e qualquer dificuldade que atravesssei pelo caminho até essa defesa.

À toda minha família, minha irmã, sobrinha, tios, tias, primas e primos, amigas e amigos por torcerem por mim e pelas minhas vitórias.

À minha psicóloga, Kaila, que tem me ajudado nesses últimos meses a organizar meus pensamentos e me propor questionamentos sobre meus tormentos e preocupações.

E por fim, agradeço a mim, por chegar até aqui apesar de toda a angústia e stress que a realização de uma pós-graduação pode proporcionar. Pois nesse momento, fecha-se um ciclo para que outros possam acontecer.

“Acima de tudo, não tema os momentos difíceis. O melhor vem deles.”

- Rita Levi-Montalcini

Resumo

Chiacetti, Ana Carolina. **Potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF em tumores irradiados**. 2019. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Evidências recentes sugerem a participação do mediador lipídico “Fator Ativador de Plaquetas” (PAF) no crescimento de tumores e na resistência à quimio-radioterapia. O PAF atua através de seu receptor (PAFR), expresso em células tumorais e nas células do infiltrado tumoral. A irradiação leva a geração de uma série de fosfolipídios que atuam como ligantes do PAFR em células tumorais, aumentando proliferação e promovendo o fenômeno de repopulação tumoral pós-radioterapia, que consiste em uma proliferação anormal de células tumorais após tratamento. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a contribuição de ligantes de PAFR para a angiogênese no microambiente tumoral irradiado. Na primeira parte do trabalho mostramos que células tumorais que expressam o receptor do PAF (PAFR⁺), quando irradiadas ou tratadas com agonista do receptor (cPAF) apresentam aumento na expressão gênica de fatores angiogênicos (VEGF, TGF- β 1, EGF, FGF2 e PDGFB) e secreção aumentada de TGF- β 1, quando comparadas com as mesma linhagem que não expressa o receptor (PAFR⁻). Estes eventos foram acompanhados pelo aumento da fosforilação de ERK nas células tumorais PAFR⁺, uma das vias mais importantes na produção de fatores angiogênicos. Na segunda parte, mostramos que a injeção subcutânea de uma mistura células tumorais PAFR⁺ irradiadas com uma pequena quantidade de células tumorais viáveis, simulando a repopulação tumoral *in vivo*, geraram tumores significativamente maiores e mais vascularizados do que aqueles tumores formados por células tumorais PAFR⁻, com aumento na expressão de fatores angiogênicos. O tratamento com agonista cPAF aumentou a angiogênese em tumores PAFR⁺, sugerindo a participação do PAF como um fator pró-angiogênico. Na terceira parte, mostramos que a ativação do PAFR, seja pelo PAF sintético ou por lipídeos PAF-like produzidos durante a radioterapia, induz a proliferação de células endoteliais (HUVEC), via indução de fatores angiogênicos produzidos pelas células tumorais. Além disso, observamos que as células endoteliais expressam PAFR e o tratamento com antagonista do PAFR (PCA4288) inibiu a proliferação destas células. Na quarta parte, avaliamos em modelo *in vivo* de carcinoma murino (LLC) que a irradiação das células tumorais na ausência do PAFR no infiltrado do hospedeiro (animais PAFR^{-/-}), tem como consequência a angiogênese e expressão de fatores imunossupressores (TGFB1, IL-10, COX1 e IL-8) inibidas. Em conjunto, nossos resultados mostraram que a ativação de PAFR por ligantes gerados durante a irradiação ativa o PAFR expresso nas células tumorais, aumentando a produção de fatores pró-angiogênicos. Esta condição favorece a repopulação tumoral pós-radioterapia. Assim, sugerimos que o uso de antagonistas do PAFR associados à radioterapia pode ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de tumores sólidos.

Palavras-chave: Receptor de PAF, Angiogênese, Radioterapia, Repopulação tumoral

Abstract

Chiacetti, Ana Carolina. **Angiogenic potential of PAF receptor ligands in irradiated tumors**. 2019. 77p. Thesis (Master's degree in immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Sao Paulo, 2019.

Recent evidences suggest participation of the lipid mediator "Platelet Activating Factor" (PAF) in tumor growth and resistance to chemotherapy and radiotherapy. PAF acts through its receptor (PAFR), expressed on tumor cells and tumor infiltrating cells. Irradiation leads to the generation of a series of phospholipids that act as PAFR ligands in tumor cells, increasing proliferation and promoting the post-radiotherapy tumor repopulation phenomenon, which is an abnormal proliferation of tumor cells after treatment. The aim of our study was to evaluate PAFR ligands contributions to angiogenesis in irradiated tumor microenvironment. First, we show that PAF receptor positive tumor cells (PAFR⁺), when irradiated or treated with receptor agonist (cPAF), show increased gene expression of angiogenic factors (VEGF, TGF- β 1, EGF, FGF2 and PDGFB) and increased TGF- β 1 secretion when compared to the same non-expressing cell (PAFR⁻). Together with these results we observed increased ERK phosphorylation in PAFR⁺ tumor cells, one of the most important signaling pathways to angiogenic factors production. In the second part, we show that subcutaneous injection of irradiated PAFR⁺ tumor cells mixed with a small amount of viable tumor cells, simulating *in vivo* tumor repopulation, generates increased expression of angiogenic factors, larger tumors and higher vascularization than those tumors formed by PAFR⁻ tumor cells. Treatment with cPAF agonist increases angiogenesis in PAFR⁺ tumors, suggesting the participation of PAF as a proangiogenic factor. In the third part, we show that PAFR activation, either by synthetic PAF or PAF-like lipids produced during radiotherapy, induces endothelial cell proliferation (HUVEC) via induction of angiogenic factors produced by tumor cells. In addition, we observed that endothelial cells express PAFR and cell treatment with PAFR antagonist (PCA4288) inhibited endothelial cells proliferation. In the fourth part, we evaluated an *in vivo* model of irradiated murine carcinoma tumor cells (LLC) in absence of PAFR in the host infiltrate (PAFR^{-/-} animals) resulting in an inhibition of angiogenesis and immunosuppressive factors expression (TGFB1, IL-10, IL-8 and COX1). Thus, our results conclude that PAFR ligands generated during irradiation activates PAFR expressed in tumor cells, increasing proangiogenic factors production and consequent tumor neoangiogenesis. This condition favors post-radiotherapy tumor repopulation. Therefore, we suggest that the use of radiotherapy associated with PAFR antagonists may be a promising therapeutic strategy for solid tumors treatment.

Keywords: PAF receptor, Angiogenesis, Radiotherapy, Tumor repopulation.

Lista de Figuras

Figura 1 – Microambiente tumoral.....	23
Figura 2 – Estrutura da molécula de PAF.....	26
Figura 3 – Regulação da produção do PAF pelas vias de remodelamento e <i>de novo</i>	27
Figura 4 – A irradiação aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais.....	43
Figura 5 – A produção de TGF- β 1 está aumentada em células PAFR ⁺ submetidas à irradiação.....	44
Figura 6 – Expressão de fatores de crescimento após tratamento com agonista do receptor de PAF.....	45
Figura 7 – O TGF- β 1 está aumentado nas culturas de células tumorais tratadas com agonista de PAF.....	45
Figura 8 – Fosforilação da via de ERK por ligantes de PAFR durante irradiação.....	47
Figura 9 – Repopulação Tumoral <i>in vivo</i>	49
Figura 10 – Ativação PAFR em tumores <i>in vivo</i>	50
Figura 11 – Expressão gênica de fatores de crescimento celular.....	51
Figura 12 – Angiogênese tumoral após repopulação.....	52
Figura 13 – Expressão gênica de fatores de angiogênicos.....	53
Figura 14 – Quantificação de hemoglobina em inserto de matrigel.....	55
Figura 15 – Expressão PAFR em células endoteliais (HUVEC).....	56
Figura 16 - Proliferação de HUVEC em resposta à agonista e antagonistas de PAFR.....	57
Figura 17 – Proliferação de células endoteliais em co-cultura com células tumorais.....	59
Figura 18 – Proliferação de células endoteliais em co-cultura com células de câncer cervical e queratinócitos na repopulação celular pós radioterapia.....	60
Figura 19 – Proliferação de células endoteliais estimulada por fatores de crescimento produzidos por células tumorais.....	61
Figura 20. A expressão do PAFR nas células endoteliais promove a repopulação tumoral pós-radioterapia.....	63
Figura 21 – A deleção de PAFR diminui a expressão de fatores angiogênicos em tumores irradiados.....	65

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência de Primers.....	35
Tabela 2 – Lista de anticorpos utilizados em Western Blotting.....	37
Tabela 3 – Anticorpos de citometria e imunofluorescência.....	38

Lista de Siglas

AA – Ácido Araquidônico

AAG – 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicerol

BVS – Fator de Von Hippel-Lindau

CaMKs – Proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina

cPAF – Agonista sintético de PAFR

cPLA₂ – Fosfolipase A2

CPT – colinafosfotransferase

DAG – diacilglicerol

EGF – Fator de crescimento epidermal

ERK – *Extracellular signal-regulated kinase* ½

GPCs – Glicerofosfocolinas

GPCR – Receptores acoplados à proteína G

HIF-1α – Fator induzível por hipóxia-1α

HUVEC – Célula endotelial derivada de cordão umbilical humano

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IP₃ – 1,4,5 trifosfato inositol

KBM – célula tumoral de carcinoma epidermoide humano negativa para PAFR

KBP – célula tumoral de carcinoma epidermoide humano positiva para PAFR

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

LLC – célula tumoral derivada de tumor pulmonar murino

LPCAT1 ou LPCAT2 – PAF-acetiltransferase

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos

ox-GPCs – GPCs oxidados

PAF – Platelet Activating Factor

PAFR – Receptor de PAF

PAFR KO – Animais *knockout* para a expressão de PAFR

PCA – Antagonista de PAFR

PDGFA – Fator de crescimento derivado de plaquetas fração A

PDGFB – Fator de crescimento derivado de plaquetas fração B

PGE₂ – Prostaglandina E2

PHD – Prolil-hidroxilases

PIP₂ – fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC – Proteína quinase C

RT – Radioterapia

SBRP – Sociedade Brasileira de Radioterapia

SFB – Soro fetal bovino

TAMs – Macrófagos associados ao tumor

TGF-β1 - Fator de transformação do crescimento β1

UV – Ultravioleta

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

WT – Animais selvagem (*Wild type*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. O Microambiente tumoral.....	22
1.2. Angiogênese tumoral.....	23
1.3. O Papel do PAF no crescimento tumoral.....	25
1.4. PAF, radioterapia e repopulação tumoral.....	29
2. OBJETIVO	33
3. METODOLOGIA	34
3.1. Linhagens celulares.....	34
3.2. Cultivo das linhagens celulares.....	34
3.3. Irradiador.....	34
3.4. Avaliação de expressão gênica.....	35
3.5. Expressão de fatores de crescimento em células tumorais irradiadas.....	35
3.6. Indução de fatores de crescimento por agonistas do receptor do PAF.....	36
3.7. Ativação da via de sinalização em células irradiadas.....	36
3.8. Extração e quantificação de proteínas.....	36
3.9. Western Blotting.....	37
3.10. Animais.....	37
3.11. Avaliação <i>in vivo</i> da repopulação tumoral.....	38
3.12. Crescimento tumoral em base de matrigel.....	39
3.13. Imunofluorescência de células.....	39
3.14. Citometria.....	39
3.15. Curva de crescimento de células endoteliais.....	39
3.16. Proliferação de células endoteliais em co-cultura com células tumorais irradiadas.....	40
3.17. Proliferação de células endoteliais estimulada com sobrenadante de células tumorais tratadas com irradiação.....	40
3.18. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. O PAFR na expressão de fatores de crescimento em células tumorais irradiadas	42
4.1.1. A irradiação aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais que expressam PAFR.....	42

4.1.2. Agonista de PAFR aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais.....	44
4.1.3. Ativação do PAFR e irradiação aumentam fosforilação de ERK nas células tumorais.....	46
4.2. O PAFR na repopulação tumoral e angiogênese após radioterapia em modelo <i>in vivo</i>	48
4.2.1. A expressão de PAFR promove a repopulação tumoral pós irradiação.....	48
4.2.2. A angiogênese tumoral pós irradiação é dependente de PAFR.....	51
4.2.3. O agonista de PAFR aumenta a angiogênese tumoral.....	54
4.3. O PAFR na proliferação de células endoteliais.....	56
4.3.1. Células endoteliais expressam PAFR.....	56
4.3.2. O bloqueio do PAFR inibe a proliferação de células endoteliais.....	57
4.3.3. Células tumorais irradiadas estimulam a proliferação de células endoteliais	58
4.3.4. Sobrenadante de células tumorais irradiadas aumenta proliferação de células endoteliais.....	61
4.4. A angiogênese tumoral na ausência de PAFR.....	62
4.4.1. A ausência do PAFR inibe a angiogênese tumoral pós irradiação.....	62
4.4.2. A ausência do PAFR diminui a expressão de fatores angiogênicos pós irradiação.....	64
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÃO.....	71
7. BIBLIOGRAFIA.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Microambiente tumoral

Na visão mais atual da oncologia, consideramos os tumores como um tecido altamente complexo, onde através de distorções da homeostasia tecidual original, são geradas e recrutadas diferentes populações de células que passam a funcionar sob o comando das células cancerígenas, gerando o que chamamos de microambiente tumoral.

Sabe-se que durante a formação dos tumores sólidos, é primordial que ocorra o estabelecimento de um ambiente tecidual favorável ao crescimento neoplásico, com exacerbada produção de fatores de crescimento, aporte de nutrientes e oxigênio, que atuam de modo a garantir o sucesso da progressão tumoral. Essas condições são fornecidas através da participação direta de fibroblastos, células endoteliais e células do infiltrado inflamatório, que, recebendo os sinais liberados localmente pelas células tumorais, são recrutadas e moduladas para formar uma matriz tecidual de suporte funcional ao tumor (Figura 1)(1).

No contexto da progressão tumoral, já foram identificados vários fatores teciduais que atuam localmente como peças essenciais na coordenação do processo neoplásico, formando uma vasta e complexa rede de sinalização entre células tumorais e as células infiltrantes do microambiente tumoral. Dentre os principais fatores, temos aqueles que são responsáveis pelo recrutamento de células do sistema imune; diferentes citocinas, como a Interleucina-10 (IL10) e a interleucina-8 (IL-8), que são responsáveis pela imunossupressão e remodelamento tecidual; fatores com funções de indução da proliferação celular, como o Fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1), o Fator de crescimento derivado de plaqueta fração A (PDGFA) e B (PDGFB), o Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), Fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF2), que atuam coordenando a formação de novos vasos sanguíneos e promovendo a reorganização da matriz extracelular para sustentar, nutrir e favorecer o crescimento tumoral (2).

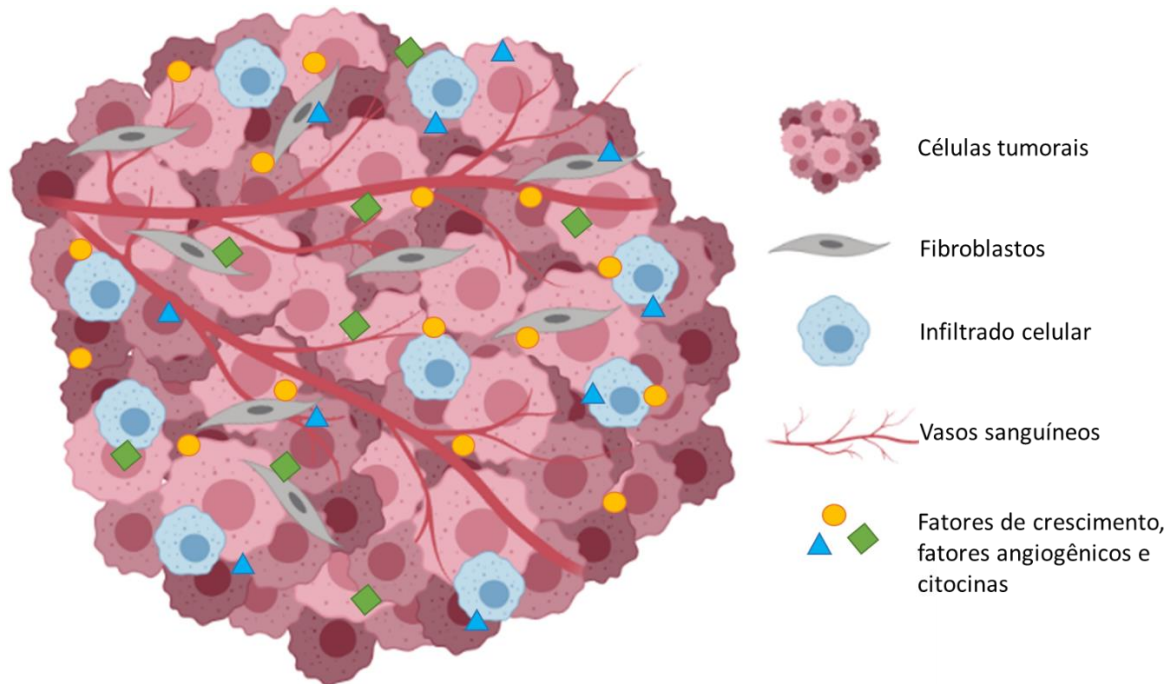


Figura 1- Microambiente tumoral: O tecido tumoral é formado pela participação de várias células, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células do infiltrado inflamatório, que, em conjunto, atuam para fornecer suporte, nutrição e oxigenação ao tumor. Neste contexto, as células tumorais são capazes de produzir uma série de fatores de crescimento, angiogênicos e citocinas que modulam funcionalmente as células infiltrantes da matriz tumoral para promover o crescimento tumoral.

1.2. Angiogênese tumoral

Durante a evolução do crescimento tumoral, uma das principais características observadas é a presença de uma profunda reorganização tecidual precedida por um fenômeno chamado de neoangiogênese. Este processo fisiológico é o responsável pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, e se encontra alterado em diferentes patologias, principalmente no câncer. A angiogênese associada aos tumores sólidos tem a função de aumentar a perfusão de oxigênio e nutrientes no tecido e controlar a remoção de metabólitos tóxicos, permitindo o crescimento do tumor além de 2-3mm. Assim, evidências experimentais demonstram claramente que o crescimento de tumores sólidos é considerado angiogênese-dependente, e por isso, esse processo é alvo de inúmeras terapias (3).

O principal mecanismo para indução da neoangiogênese no tumor é a formação de áreas de hipóxia no centro tumoral, sendo uma região que apresenta baixa pressão de oxigênio e pouca vascularização, submetendo as células tumorais a um intenso estresse metabólico. Tais condições desencadeiam o processo conhecido como “*switch angiogênico*”, que é caracterizado por um desbalanço na produção de fatores anti e pró-angiogênicos no tecido. Células em estado de hipóxia são estimuladas a expressar o fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α), que funciona como um sensor intracelular da presença de oxigênio. Em condições normais de oxigênio (normóxia) a cadeia alfa do HIF sofre hidroxilação pelas prolin-hidroxilases (PHD) dependentes de oxigênio, formando um complexo com o fator de Von Hippel-Lindau (BVS); por sua vez, esse complexo se liga à ubiquitina (Ub) e subsequentemente se degrada no proteossoma. Sob condições de oxigênio reduzido (hipóxia), a atividade das PHD diminui, o que estabiliza o HIF-1 α e o acumula no citoplasma, podendo então ser fosforilado por enzimas da via de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Uma vez fosforilado, o HIF-1 α se transloca para o núcleo e forma complexos com regiões promotoras de vários genes, coordenando a produção de uma série de fatores de crescimento que regulam a formação de novos vasos (4). A sinalização via HIF-1 α também contribui para a progressão tumoral por alterar o fenótipo das células tumorais de um estado de dormência para o estado transformado de displasia aumentando a malignidade(5). Outras células associadas ao tumor, como os fibroblastos e os TAMs (*tumor associated macrophages*) também ajudam no processo de angiogênese, amplificando a produção desses fatores de crescimento (6).

Os novos capilares são formados no estroma tumoral a partir da ativação de células endoteliais do hospedeiro por fatores de crescimento como VEGF, EGF e FGF2, que promovem uma cascata de atividades celulares responsável por gerar a degradação da matriz extracelular, proliferação das células endoteliais, migração e formação do tubo vascular. O processo termina com a deposição de uma nova matriz extracelular, atração de pericitos (células indiferenciadas, de origem mesenquimal) para estabilização dos vasos e um retorno para o fenótipo de célula endotelial quiescente. Outros processos também podem ocorrer em conjunto com a angiogênese, como a vasculogênese (formação de vasos com a participação de células derivadas da medula) e a arteriogênese (fortalecimento da parede dos vasos

por células como pericitos e células musculares, também conhecidas como células murais).

Embora seja reconhecido o papel central destes processos na progressão do tumor primário, os vasos tumorais costumam ser anormais, apresentando algumas fendas, superfícies irregulares, projeções intra-luminais, junções intercelulares frouxas e múltiplas camadas de células no endotélio, ocorrendo vazamentos vasculares, limitando o fluxo sanguíneo e facilitando a metástase tumoral. A incapacidade do tumor de formar vasos “funcionais” se deve principalmente à sinalização aberrante proveniente da produção descontrolada de fatores angiogênicos. Uma das consequências da pobre funcionalidade da vasculatura tumoral é o aparecimento de maiores áreas de hipóxia, com decorrente morte celular no local. Este processo culmina na produção ativa de moléculas inflamatórias que irão aumentar o recrutamento de células do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral e ativar cascatas envolvidas com a regeneração tecidual, que em última instância irá contribuir ainda mais para a progressão do tumor, gerando um processo vicioso e descontrolado de proliferação celular (7).

1.3. O Papel do PAF no crescimento tumoral

A produção exacerbada de fatores de crescimento, angiogênicos e inflamatórios no microambiente tumoral gera o que chamados de tríade de sinalização patológica, que dá origem aos diferentes fenômenos teciduais que promovem a progressão tumoral. Esses sinais são reconhecidos por diferentes receptores, expressos tanto nas células tumorais como nas células do microambiente tumoral. Em nosso laboratório estudamos há alguns anos o papel do receptor do PAF (PAFR) em processos relacionados à progressão tumoral, tais como a angiogênese e a inflamação.

Em seu contexto histórico, o PAF foi descrito na década de 70 por Benveniste *et al* como um fator solúvel liberado por leucócitos de pacientes alérgicos após estímulos celulares, como o alérgeno (8). A partir da caracterização de sua estrutura química (1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina; Figura 2) em 1982 foi mostrado o envolvimento do PAF em diversas condições fisiopatológicas, incluindo seu importante papel na progressão tumoral (9). O PAF tem funções como a ativação

de células polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, aumento da permeabilidade vascular, angiogênese e proliferação de diferentes tipos de células tumorais (10).

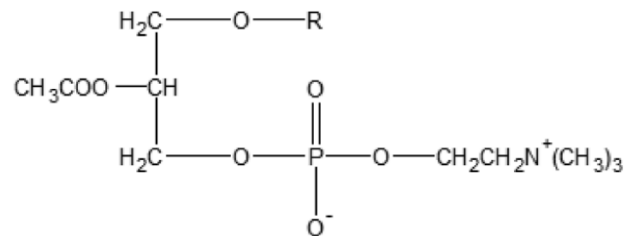


Figura 2 - Estrutura da molécula de PAF: 1-O-alkuil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

A síntese do PAF pelas células pode ser realizada por meio de duas vias enzimáticas independentes: a síntese pelo remodelamento ou a síntese *de novo*. Ambos processos se iniciam a partir da clivagem de fosfolipídeos de membrana após estímulos inflamatórios (11) ou oxidativos (12). A síntese pelo remodelamento foi a primeira via de biossíntese do PAF a ser descrita e se inicia após estímulos inflamatórios que culminam na ativação da enzima citosólica fosfolipase A2 (cPLA₂), que então hidrolisa o grupamento acil dos fosfolipídeos ligados a colina gerando o liso-PAF e o ácido araquidônico (AA). O liso-PAF é então metabolizado pela enzima PAF-acetiltransferase (LPCAT1 ou LPCAT2) resultando no PAF biologicamente ativo. O PAF é regulado na célula por meio da sua degradação, onde a molécula é hidrolisada na posição *sn*-2 pela PAF-acetil hidrolase, sendo revertido a forma de Liso-PAF e então retorna para a membrana na forma de 1-O-alkuil-acil-GPC pela ação da PAF-aciltransferase (13–16) (Figura 3).

Já na via *de novo* da biossíntese do PAF, a enzima colinafosfotransferase (CPT) irá adicionar uma molécula de fosfocolina no sítio *sn*-3 do intermediário da síntese dos fosfolipídeos de membrana, o 1-O-alkuil-2-acetil-*sn*-glicerol (AAG), produzindo, assim, o PAF biologicamente ativo (17) (Figura 3). A via *de novo* é modulada a partir da disponibilidade de substratos, regulados para fins fisiológicos (18). As moléculas de PAF produzidas podem atuar em receptores intracelulares ou serem transportadas para o meio extracelular para atuar nos receptores da membrana externa (19).

Além do PAF gerado a partir dos processos enzimáticos, outras moléculas podem ser reconhecidas pelo receptor, como os análogos 1-acil PAF, fosfolipídeos oxidados derivados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipopolissacarídeos e proteína A. Esses agonistas podem ser produzidos pela ação de agentes oxidantes, em resposta à citocinas, fatores de crescimento, stress oxidativo (incluindo stress induzido por tratamento quimioterápico) e irradiação ultravioleta (UV) e do tipo gama; tais agentes oxidantes interagem com as duplas ligações das moléculas lipídicas insaturadas, ocasionando nessas moléculas a formação de regiões similares ao PAF, capazes de se ligar ao receptor (PAFR) (8,12,20).

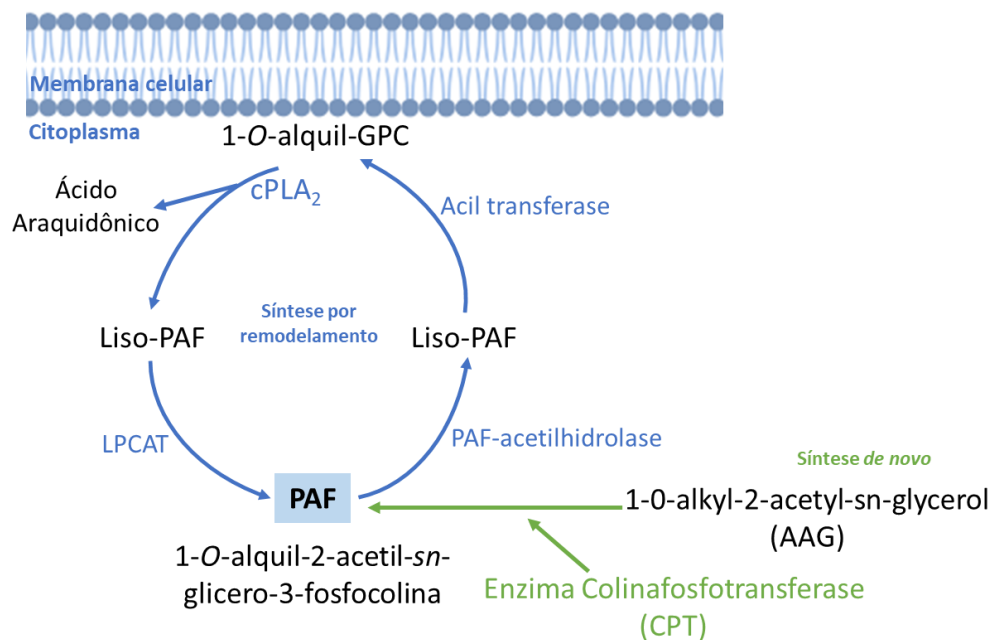


Figura 3 – Regulação da produção do PAF pelas vias de remodelamento e *de novo*: Após estímulo celular, cPLA₂ converte o 1-O-alkyl-GPC presente na membrana celular em Liso-PAF e Ácido Araquidônico, a LPCAT converte o Liso-PAF em PAF. O PAF presente na célula é novamente convertido em Liso-PAF pela PAF-acetilhidrolase e em 1-O-alkyl-GPC pela PAF-aciltransferase. Na via de novo, a enzima colinafosfotransferase (CPT) irá adicionar uma molécula de fosfocolina no sítio sn-3 do intermediário da síntese dos fosfolipídeos de membrana, o 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol (AAG), produzindo, assim, o PAF biologicamente ativo. Adaptado de Honda 2002 (16).

O PAFR pertence ao grupo de receptores que se caracterizam pela presença de sete domínios transmembrânicos de α -hélices e que interagem com proteínas G (GPCR) compostas pelas subunidades α , β e γ , e sendo responsável pela ativação de $G\alpha_q$ e $G\alpha_{i/o}$. O gene que codifica o PAFR está no cromossomo 1 na região p35-p34.3 (21) e possui dois promotores que produzem o mesmo tipo de PAFR, sendo sua transcrição regulada positivamente pela transcrição dos fatores NF- κ B, SP-1 e a citocina TGF- β 2 através dos elementos de consenso do promotor 1, e o promotor 2 sofre ação do estrogênio, ácido retinóico e hormônio tireoidiano T3 (22). O tipo de resposta induzido pela ativação da proteína G é altamente dependente do contexto e tipo celular. O estímulo de proteínas G pela ligação de PAF ao PAFR leva à ativação de fosfolipase A2, C e D. Pela via da fosfolipase C, ocorre a hidrolisação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), gerando diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato inositol (IP₃), o que ativa a proteína quinase C (PKC) e medeia a liberação de cálcio intracelular (16,19,23). O aumento na liberação de cálcio intracelular aciona enzimas que aumentam a contratibilidade celular, promovendo migração e metástase de células tumorais. Outros efeitos incluem a promoção do ciclo celular e resistência a apoptose, por meio da ativação de Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e da família de Proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMKs), as quais também ativam Akt, NF- κ B e ERK; levando à expressão de HIF-1 α e conseqüentemente ao aumento de angiogênese. Outras evidências demonstram que o aumento da sinalização de cálcio dependente de PAFR no tumor também está relacionado à mecanismos de evasão do tumor ao sistema imune (24,25), proporcionando ainda mais vantagens para o desenvolvimento tumoral.

Em trabalhos anteriormente publicados, foi visto que o PAFR está expresso tanto nas células tumorais, quanto nas células endoteliais e células do infiltrado inflamatório, como macrófagos e neutrófilos. Diversos tipos tumorais (como sarcoma de Kaposi, carcinoma epidermóide, carcinoma hepatocelular, entre outros) exibem níveis alterados de expressão de PAFR em relação ao tecido sadio, apresentando-se altamente elevado. Em culturas *in vitro* foi visto que o bloqueio do receptor diminuiu a capacidade de proliferação de diferentes tipos tumorais (como câncer de mama, próstata, sarcoma de Kaposi, entre outros). Além disso, células tumorais produzem PAF em resposta a ativação do receptor de PAF e pelo estímulo

de fatores como VEGF, FGF2, HGF, TNF α e trombina. Ao serem ativados por ligantes do receptor de PAF, macrófagos tumorais tendem a ter um perfil imunossupressor (26), podendo contribuir para a neoangiogênese e remodelamento tecidual, e assim auxiliar na progressão tumoral (9). De modo geral, a ativação do PAFR no tumor é considerada um sinal pró-tumoral (10).

Além dessas interferências, foi demonstrado recentemente que o PAF também atua aumentando a resistência tumoral à morte celular induzida pelo tratamento antineoplásico, tanto na quimioterapia (27) como na radioterapia (28). Estes trabalhos demonstraram que uma associação entre antagonistas do PAFR e a quimio/radioterapia aumentou a eficácia do tratamento, tanto *in vitro* como em camundongos (*in vivo*) em modelos tumorais de carcinoma e melanoma. Atualmente os mecanismos envolvidos neste fenômeno estão sob investigação em diversos centros de pesquisa.

1.4. PAF, radioterapia e repopulação tumoral

Dentre os principais tipos de tratamentos contra o câncer, a radioterapia (RT) é utilizada com a finalidade de erradicar tumores sólidos, provocando a morte da célula tumoral. De acordo com a Sociedade Brasileira de Radioterapia (SBRP) cerca de 130 mil pacientes receberam radioterapia no ano de 2018 no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo estimado que 80% dos pacientes oncológicos utilizam o sistema público no Brasil (29,30). Esse tipo de terapia tem um custo-benefício muito bom em relação a outros tipos de tratamentos existentes, sendo muito utilizada no Brasil e no mundo, e podendo beneficiar muito mais pacientes com o aumento da oferta desse tratamento nos Sistemas de Saúde mundiais (31,32).

A radiação ionizante age localmente causando danos celulares diretos e indiretos. Nos efeitos diretos, a aplicação de altas energias durante a RT levam a quebra de simples ou de dupla fita de DNA, principalmente em células na fase de mitose, assim eliminando células tumorais em proliferação (33). Já os efeitos indiretos da RT, são os danos da irradiação que ocorrem no citoplasma das células, levando à geração descontrolada de espécies reativas de oxigênio, capazes de ocasionar toxicidade celular ao interagir com DNA, proteínas e lipídios, destruindo organelas celulares importantes, como as mitocôndrias e provocando a morte celular por apoptose.

Entretanto, efeitos indesejáveis precoces ou tardios estão entre os principais fatores de limitação desta terapia. Um dos efeitos adversos da radioterapia é a repopulação tumoral, um fenômeno conhecido por provocar a proliferação exacerbada de células tumorais em resposta ao processo de morte das células susceptíveis à terapia, havendo como consequência uma tentativa de regeneração tecidual que leva ao aumento agressivo do tumor e resistência ao tratamento (20,34–36). Em um estudo conduzido por Soraya *et al* foi visto que a adição de células apoptóticas a uma dose sub-tumorigênica de melanoma murino promoveu o crescimento do tumor de forma semelhante ao fenômeno de repopulação tumoral, onde a presença de células mortas induz a proliferação das células tumorais residuais. Neste trabalho foi visto que este fenômeno foi significativamente reduzido quando os animais foram tratados com antagonistas do PAFR, sugerindo a participação do PAF no crescimento tumoral em resposta à apoptose celular (37). Concomitantemente, Huang *et al.*, mostrou que outros lipídios inflamatórios estão relacionados com a repopulação tumoral, em seu trabalho foi observado que células tumorais que recebem irradiação entram em processo de apoptose por meio da ativação de caspase 3, que é capaz de ativar a iPLA₂, liberando ácido araquidônico e Prostaglandina E2 (PGE₂), ambas participam da mesma via de produção de PAF e que são consideradas fatores que promovem a proliferação celular, induzindo a repopulação tumoral (38).

Dentre os efeitos que ocorrem nas células, a irradiação gera espécies reativas de oxigênio, que interagem com moléculas da célula como as glicerofosfolinas (GPCs), produzindo ligantes do PAFR como o acil PAF e diferentes GPCs oxidados (ox-GPCs), denominados PAF-*like*. A produção de moléculas PAF-*like* e a ativação do PAFR aumentam progressivamente de acordo com a dose de irradiação utilizada, chegando ao limite de ativação na dose de 10Gy, tal estímulo pode ser avaliado pela ativação dos canais de cálcio e pela produção de IL-8 (12).

Em estudos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que a radiação do tipo gama induz efeitos como o aumento da expressão do PAFR, a produção de ligantes de PAFR e PGE₂ em linhagens de células tumorais de carcinoma uterino (C33A, SiHa e HeLa) e carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (SCC90 e SCC78) (28). Para demonstrar o fenômeno de repopulação tumoral, foram utilizadas células

derivadas de carcinoma murinho (TC-1) e um modelo de células de carcinoma epidermóide humano (KBM; PAFR⁻) transduzidas com o PAFR (KBP; PAFR⁺), sendo feita uma co-injeção (*in vivo*) de células viáveis com células irradiadas. A expressão de PAFR e sua ativação aumentaram progressivamente de acordo com o nível da dose de irradiação (4 e 8Gy) e a produção de PGE2 e o fenômeno de repopulação tumoral foram reduzidos com o uso de antagonistas de PAFR (39). Além disso, os ligantes de PAFR produzidos durante a radioterapia possuem um efeito protetor no processo de morte celular, algo que pode ser revertido com o uso de antagonistas de PAFR (10).

Também já foi demonstrado que a irradiação UV (irradiação ionizante do tipo α e β), foi capaz de induzir a produção exacerbada de quimiocinas (CXCL1, CXCL2 e CXCL3) e citocinas (CCL20 e TNF- α) na presença do PAFR, em modelos *in vitro* com células tumorais PAFR⁻ e PAFR⁺ (KBM/KBP) e em animais selvagens e *knockout* para o PAFR (40).

Além dos efeitos de ativação do PAFR nas células tumorais, os ligantes desse receptor também são capazes de estimular outras células do microambiente tumoral, como as células do sistema imune e células endoteliais, modulando o perfil de macrófagos para uma resposta regulatória (41) e induzindo a angiogênese tumoral através da expressão de fatores angiogênicos, migração de células endoteliais e formação de novos vasos (2,42). Existem evidências sobre a produção de PAF em condições de hipóxia em células endoteliais derivadas de cordão umbilical (43) e em células de diferentes linhagens tumorais de forma independente da expressão de HIF1 α e HIF2 α (44). PAF induz a superexpressão de fatores angiogênicos, tais como o VEGF, o FGF e as angiopoietinas, é capaz de estimular diretamente a migração de células endoteliais de forma dependente da dose e tais fenômeno são inibidos por antagonistas do receptor (45–49). Viu-se também a ativação das vias de ERK pelo PAFR sendo responsável pela expressão de fatores angiogênicos como VEGF, TNF- α , IL-1 α e FGF2 (50). Portanto a ativação de PAFR é uma importante via para a angiogênese tumoral.

De acordo com o que foi descrito sobre o PAF, em nosso trabalho procuramos estudar como os ligantes do receptor de PAF induzem o fenômeno de repopulação tumoral pós radioterapia, focando principalmente na formação de novos vasos

sanguíneos, um processo tão importante para o crescimento acelerado dos tumores. Foi o objetivo desse trabalho responder essas questões em modelos de repopulação *in vitro* e *in vivo*. Para isso, na primeira parte do trabalho analisamos *in vitro* a expressão de fatores angiogênicos e ativação de via de sinalização em células tumorais negativas (PAFR⁻; KBM) e positivas (PAFR⁺; KBP) para o PAFR, tratadas com irradiação ou agonista sintético do PAFR. Na segunda parte, analisamos a angiogênese dependente da presença do PAFR nas células tumorais em modelo de repopulação tumoral *in vivo*. Na terceira parte, avaliamos os efeitos da ativação do PAFR sobre a proliferação de células endoteliais em modelo de cocultura com células tumorais irradiadas ou tratadas com o agonista, nesta parte também foi avaliado o bloqueio do PAFR em células endoteliais. E por fim, na última parte do trabalho, avaliamos o impacto da ausência do PAFR no microambiente tumoral sobre a angiogênese, utilizando modelo de repopulação tumoral em animais *knockout* para o PAFR.

2. Objetivo

O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial angiogênico de ligantes do receptor do PAF produzidos em resposta à radioterapia durante a repopulação tumoral. Para isso analisamos:

- a) O efeito da radioterapia e do agonista do PAFR na expressão de fatores de crescimento e angiogênicos em células tumorais negativas e positivas para expressão de PAFR.
- b) A resposta proliferativa de células endoteliais ao agonista ou antagonista do PAFR ou em co-culturas com células tumorais irradiadas.
- c) O crescimento tumoral e a formação de vasos em modelo *in vivo* de repopulação tumoral após a radioterapia e em contexto dependente da presença ou ausência de PAFR na célula tumoral ou no microambiente (animais PAFR KO).

3. Metodologia

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de carcinoma epidermóide oral humano (células KB; ATCC® CCL-17™, cedida pelo Dr. Travelers), cuja expressão do receptor do PAF foi inserida artificialmente por transdução genética de plasmídeo contendo o gene do PAFR. Neste trabalho, as células KB negativas para expressão do receptor do PAF foram chamadas de PAFR⁻ e as células KB positivas para o receptor do PAF foram chamadas de PAFR⁺. Também utilizamos uma linhagem de célula endotelial derivadas de cordão umbilical humano imortalizadas (HUVEC; cedida pelo Dr. Brian Strauss) que expressam a proteína fluorescente vermelha tomato, inserida artificialmente por transdução viral PuRO1Tomato. Linhagens de câncer cervical (C33 e SiHa); células derivadas de carcinoma epidermoide de pulmão de camundongos (LLC, *Lewis Lung Carcioma*, ATCC® CRL-1642™). Todas essas linhagens são certificadas pela ATCC (American Type Culture Colection, Manassas, EUA) e são mantidas em banco de células sediado no laboratório da Dra. Ana Paula Lepique, do Instituto de Ciências Biomédicas.

3.2. Cultivo das linhagens celulares

As células foram cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura de células (Falcon, Becton Dickinson and Company, Franklin Lopes, NJ, USA) contendo meio de cultura DMEM *High-glucose*, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (BovineCalfSera, Gibco™, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada) e Antibiótico/antimicótico (1,000 units/mL penicilina, 1,000 µg/mL of streptomina, e 25 ng/mL of anfotericina) (Gibco/Life Interpraise Brasil, Limeira, São Paulo, Brasil). As células foram incubadas inicialmente em uma concentração de 5×10^4 células / mL a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.3. Irradiador

As células foram irradiadas na potência de 2 / 6 /12Gy em irradiador Gammacell (Atomic Energy of Canada LTD) modelo CC-22C, número de série 142, Certificado AECD número CDN-U-13, de fonte de Cobalto 60 no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) operado pela Engenheira Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari, responsável pelo setor de irradiação.

3.4. Avaliação de expressão gênica

O RNA das amostras foi extraído por método de extração com TRIzol™ Reagent (REF: 15596018, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), conforme protocolo do fabricante. O mRNA foi então quantificado utilizando Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 e a integridade do mRNA testada em gel de agarose. O cDNA foi gerado com a utilização do kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (REF: K1622, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Em seguida a expressão gênica foi avaliada por qPCR para os fatores angiogênicos e de crescimento (hVEGFA, hFGF2, hEGF, hTGF-β1, hPDGFA e hPDGFB) e citocina (hIL-8) para os experimentos com células de origem humana, e o Fator de crescimento mTGF- β1, citocinas (mIL-8 e mIL-10) e fator da via de produção de PGE₂ (mCOX-1) para experimento com célula de origem animal.

Tabela 1 – Sequência de Primers

Gene	Forward	Reverse
hHPRT1	GCG ATG TCA ATA GGA CTC CAG	TTG TTG TAG GAT ATG CCC TTG A
mHPRT1	AAC AAA CTC TGG CCT GTA TCC	CCC CAA AAT GGT TAA GGT TGC
hVEGFA	AGT GGT GAA GTT CAT GGA TGT	GCA CAC AGG ATG GCT TGA AGA
hFGF2	AGA AGA GCG ACC CTC ACA TCA	CGG TTA GCA CAC ACT CCT TTG
hEGF	GCT GCT CAC TCT TAT CAT TCT GTT	TGG TTC CTT CTG TGT CAA TCC TA
hTGF-β1	CGT GCT AAT GGT GGA AAC	GCT CTG ATG TGT TGA AGA AC
mTGF-β1	CTC CCG TGG CTT CTA GTG C	GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G
hPDGFA	GCA AGA CCA GGA CGG TCA TTT	GGC ACT TGA CAC TGC TCG T
hPDGFB	ACA CCA GTC ACC TCG TCT C	ACC ATC TAC AGC CAC CTC AA
hIL-8	ACT GAG AGT GAT TGA GAG TGG AC	AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC
mIL-10	GGA CCA GCT GGA CAA CAT ACT G	ACC AGG TAA AAC TGG ATC ATT TCC
mCOX1	TTC AAC ACA CTC TAT CAC TGG C	AGA AGC GTT TGC GGT ACT CAT

3.5. Expressão de fatores de crescimento em células tumorais irradiadas

As células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas em densidade 5x10⁵ células por poço, incubadas por 12hs em DMEM High-glucose com 10% de SFB. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS aquecido à 37°C e incubadas por 24 hs em DMEM 0,5% de BSA purificado (REF: A7030, Lote: 071M1460V, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Após este período, o meio das células foi renovado e separadas

em 4 grupos para receberem os respectivos tratamentos: irradiadas nas condições: 1) Grupo controle (sem irradiação); 2) irradiadas 2Gy; 3) irradiadas 6Gy; e 4) irradiadas 12Gy. Após 1hr de incubação, o RNA foi extraído para análise de expressão gênica pelo método de qPCR para os seguintes genes: VEGF, TGF- β 1, FGF2, EGF e PDGFB e após 6 e 24 horas o sobrenadante foi coletado para dosagem de fator de crescimento (TGF- β 1; REF: DY240, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

3.6. Indução de fatores de crescimento por agonistas do receptor de PAF:

As células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas em densidade 5×10^5 células por poço, incubadas por 12hs em DMEM High com 10% de SFB. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e foi adicionado DMEM 0,5% de BSA purificado e incubadas por 24hs. As células foram estimuladas com agonistas do receptor de PAF nas condições: 1) veículo (0,1%EtOH); 2) cPAF 10 nM; e 3) cPAF 100 nM. Após 1hr o RNA extraído para análise de expressão gênica e após 6 ou 24 horas foi coletado o sobrenadante para dosagem de fator de crescimento.

3.7. Ativação da via de sinalização em células irradiadas

Foram plaqueadas 10^6 células por poço (PAFR⁻ ou PAFR⁺) em meio DMEM 10% de SFB. Após 12 horas, as células foram incubadas em meio DMEM 0,5% de BSA por 24 horas. As células foram estimuladas nas condições: veículo (EtOH), cPAF 10nM, e PCA 10nM, e em seguida irradiadas (12Gy). Após 30 minutos as amostras foram coletadas.

3.8. Extração e quantificação de proteínas

As células foram lisadas com o seguinte tampão de lise: RIPA: 150mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% NP40; 0,5% deoxicolato de sódio e 0,1% SDS; inibidores de fosfatases: Fluoreto de sódio [] final = 5mM e Ortovanato de sódio [] final = 1mM ; inibidores de proteases (Sigma - P8340 -1:100 ou 1uL para cada 10^6 cel). Os lisados foram centrifugados a 12.500 rpm por 15 min e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. As amostras foram quantificadas com o kit PierceTM BCA Protein Assay Kit (cat. 23225, Thermo Scientific, Rockford, USA) seguindo as recomendações do fabricante e utilizando albumina sérica bovina (BSA) para fazer

uma curva de concentração. Ao final, foi adicionado tampão redutor (250mM de 1M Tris HCL pH6,8, 0,2%SDS, 1% de glicerol, 0,5% 2-mercaptoetanol) às amostras.

3.9. Western blotting

As amostras foram corridas em SDS-PAGE em voltagem controlada. Após a corrida foi feita a transferência para membrana de PVDF (GE Healthcare). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com TBST (Tris-HCl pH7,6 - 20 mM / NaCl 100 mM / Tween 20 0,1%) com 2,5% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi incubada com o anticorpo primário de escolha (Tabela 2) em solução de bloqueio (2,5% BSA em TBST), overnight. Após isso, foi colocado o anticorpo secundário acoplado à peroxidase (Tabela 2) em solução de bloqueio (2,5% BSA em TBST) por 1 hora e a membrana foi revelada com kit de quimioluminescência (SuperSignal West Pico, REF: 34080, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A.)

Tabela 2 – Lista de anticorpos utilizados em Western Blotting

Alvo	Diluição	Catálogo	Marca
Fosfo ERK	1:1000	9196S	Cell Signaling
Laminina	0,1 µg/ml	Ab16048	Abcan
Anti-Rabbit IgG	1:2000	7074	Cell Signaling

3.10. Animais

Utilizamos camundongos machos de 6 a 8 semanas de idade (25-30g) Balb/C NUDE, C57BL/6 e C57BL/6 PAFR KO. A linhagem Balb/C NUDE foi utilizada no modelo tumoral PAFR⁻ e PAFR⁺, pois essas linhagens tumorais são de origem humana e necessitam crescer em animais imunodeficientes. Os animais C57Bl/6 e PAFR KO foram utilizados para o modelo tumoral utilizando a linhagem murina LLC. Os animais foram fornecidos em condições germ-free pelo biotério da FMUSP e do biotério central do ICB, e mantidos durante a experimentação no biotério do departamento de imunologia do ICB/USP, sob temperatura 25 °C, atmosfera de 50-60% de umidade relativa do ar, submetidos a um ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração ad libitum. Todos os protocolos de manipulação dos animais seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal do ICB/USP nos protocolos aprovado nº 8910141117 e 47/2016/CEUA.

3.11. Avaliação *in vivo* da repopulação tumoral

Após anestésiar os animais com solução ketamina (10%) e xilasina (5%) injetadas por via intraperitoneal, os animais foram separados aleatoriamente em 2 grupos (Controle e Repopulação). Foram injetados no dorso de animais Balb/C NUDE, células tumorais PAFR⁻ ou PAFR⁺ nas condições controle sem irradiação (PAFR⁻ CT ou PAFR⁺ CT) (10^5 células/200µl) e co-injeção de células viáveis e células irradiadas (PAFR⁻ IR ou PAFR⁺ IR) (10^5 células viáveis + 10^6 células irradiadas a 12Gy/200µl) para simular o fenômeno de repopulação tumoral. Para os ensaios utilizando animais C57Bl/6 WT e PAFR KO seguimos a mesma metodologia, porem foi injetado uma quantidade menor de uma mistura de 2×10^5 de células tumorais viáveis (LLC e LLC GFP na proporção de 100:1) em animais separados em dois grupos (CT e Repopulação). O volume tumoral “(Diâmetro maior X Diâmetro menor²) X 0,5” foi aferido com o auxílio de um paquímetro a cada 2 dias após o 12º dia, quando os tumores se tornaram palpáveis, até 18 dias (NUDE) e 20 dias (WT e PAFR KO) e, em seguida os animais foram sacrificados. Os tumores foram coletados, medidos e pesados. Uma biopsia foi retirada e congelada em nitrogênio líquido para posterior avaliação da expressão de marcadores tumorais por PCR em tempo real (qPCR). Do restante do tumor foi preparado suspensões celulares após maceração e digestão das amostras com colagenase (1 mg/mL em PBS por 30 min a 37 °C em agitação). As células mantidas no gelo em solução de HANK’s 1X PH 7.4, contendo 5% de SFB e DNase (0,5 U/mL), e a viabilidade, avaliada por exclusão de Trypan Blue. Após esse procedimento, as células provenientes dos tumores foram marcadas com CD31 (marcador de célula endotelial), para avaliarmos a quantidade de células endoteliais nas diferentes condições.

Tabela 3 – Anticorpos de citometria e imunofluorescência

Marcador	Titulação	Clone	Marca	Catálogo	Lote
CD31	1:800	390	Biolegend	102407	B224809
PAFR	1:200	-	Cayman	1800364-98	0412628
Anti-Rabbit FITC Donkey	1:200	Poly4064	Biolegend	406403	B165305

3.12. Crescimento tumoral em base de matrigel

Os animais foram separados em dois grupos (controle e tratados com cPAF), onde foi injetado no mesmo animal 2×10^6 células tumorais PAFR⁻ (flanco esquerdo) e PAFR⁺ (flanco direito) em 200 μ l (100 μ l de células tumorais + 100 μ l de matrigel) no grupo controle, e no grupo tratado foi adicionado 100nM de cPAF à solução. Depois de 7 dias da injeção, os animais foram eutanasiados, os plugs de matrigel foram retirados e processados para quantificação de hemoglobina por ensaio de colorimetria.

3.13. Imunofluorescência de células

Foram plaqueadas células HUVEC em DMEM 10% SFB. Após o período de incubação de 6 dias, os poços contendo as células foram lavados 3 vezes de 1 minuto com PBS, fixadas por 10 minutos em metanol gelado, lavadas 3 vezes de 1 minuto com PBS, foi feito bloqueio por 30 minutos com PBS 5% SFB, foram marcadas com anticorpo primário hPAFR (Tabela 3) na diluição 1:200 (200 uL/poço) e incubado por 20 minutos em T.A., lavadas 3 vezes de 1 minuto com PBS, incubadas em anticorpo secundário (Tabela 3) na diluição 1:200 por 20 minutos à T.A., lavadas 1 vez de 1 minuto com PBS à T.A. e foi adicionado DAPI e incubadas por 10 minutos. As fotos foram feitas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ti-S Inverted Microscope) no aumento de 10x.

3.14. Citometria

Células HUVEC foram marcadas para identificação da presença do PAFR na superfície ou no citoplasma das células. Nas amostras com a condição permeabilizadas foi adicionado 100 uL CytofixCytoPerm por 30 min lavadas com MTH. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo primário hPAFR (Tabela 3) na diluição 1:1000 e incubado por 20 minutos em T.A., incubadas em anticorpo secundário (Tabela 3) na diluição 1:200 por 20 minutos à T.A., lavadas 1 vez de 1 minuto com MTH à T.A.

3.15. Curva de crescimento de células endoteliais (HUVEC)

Foram plaqueadas 5×10^4 células por poço em placa de 6 poços, e incubadas por 12 horas em meio DMEM 10% de SFB. As células foram então lavadas 3 vezes com

PBS e foi adicionado DMEM 2% de SFB e incubadas por 24 horas. As células foram tratadas nas seguintes condições: veículo (etanol), cPAF (100 nM e 10 nM) e PCA (10 μ M). A proliferação celular foi analisada por contagem em câmara de Newbauer até o 10^o dia com intervalos de 2 dias e os estímulos foram trocados no mesmo intervalo. A análise foi realizada em duplicata em 2 experimentos independentes.

3.16. Proliferação de células endoteliais em co-cultura com células tumorais irradiadas

As células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram irradiadas em diferentes doses (2, 6 e 12Gy) e plaqueadas (2×10^5 células por poço) em co-cultura com células HUVEC-*tomato* (10^4 células por poço). Também foi feita co-cultura das células tumorais e HUVEC tratadas com agonista de PAFR (cPAF 10nM), ou sem tratamento (controle). O meio foi trocado a cada 2 dias até o décimo dia de experimento, quando a proliferação celular foi analisada por citometria de fluxo. O mesmo protocolo foi realizado com células C33, SiHa e HaCat e tratadas com cPAF e PCA (10nM).

3.17. Proliferação de células endoteliais estimulada com sobrenadante de células tumorais tratadas com irradiação

Foram plaqueadas 8×10^5 células de PAFR⁻ e PAFR⁺ e 10^4 de HUVEC por poço em placa de 6 poços, e incubadas por 12 horas em meio DMEM 10% de SFB. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e foi adicionado DMEM 0,5% de BSA e incubadas por 24 horas. As células PAFR⁻ e PAFR⁺ receberam estímulos de cPAF 10nM e irradiação (12Gy). O sobrenadante das células PAFR⁻ e PAFR⁺ foi coletado após 24 horas e adicionado sobre as células HUVEC nas condições: meio DMEM 0,5%BSA, sobrenadante de células sem tratamento (0Gy), sobrenadante de células com cPAF 10nM e sobrenadante de células irradiadas (12Gy). A proliferação celular de células HUVEC foi analisada após 72 horas de tratamento com o sobrenadante, em câmara de newbauer coradas com Tripán Blue.

3.18. Análise Estatística

No geral, os resultados foram expressos pela média \pm EPM (erro padrão da média). A diferença estatística foi considerada com $p < 0.05$ respeitando-se possíveis particularidades de cada metodologia, utilizamos os métodos de análise estatística

Test t Student para gráficos em que houve comparação entre dois grupos experimentais, e One-way ANOVA (análise de variância) para comparação entre mais de dois grupos experimentais de múltiplas comparações, com o programa GraphPadPrism 6 (GraphPad Software). Os dados de qPCR foram normalizados em relação ao gene *housekeeping* (HPRT), de acordo com o método de análise de $\Delta\Delta C_T$ (51) nas condições controle de cada experimento e de forma independente para cada linhagem celular.

4. Resultados

4.1. O PAFR na expressão de fatores de crescimento em células tumorais irradiadas

Células tumorais irradiadas, ao entrar em processo de morte celular, liberam fatores que estimulam o crescimento das células tumorais que sobrevivem à irradiação, provocando assim o surgimento do fenômeno de repopulação tumoral (52). Trabalhos do nosso laboratório mostraram que células tumorais podem expressar PAFR e sua ativação por ligantes deste receptor tem um papel importante no fenômeno de repopulação tumoral pós irradiação (28,39). Na primeira parte deste trabalho, analisamos se a ativação do PAFR modula a expressão de fatores de crescimento e angiogênicos em células tumorais submetidas à irradiação.

4.1.1. A irradiação aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais que expressam PAFR

Para isto utilizamos uma linhagem de carcinoma epidermóide oral humano (KB cells), no qual o receptor do PAF foi inserido artificialmente, por transdução genética de um plasmídeo contendo o gene do PAFR. Assim, obtemos uma linhagem de células KB que tem alta expressão do receptor do PAF (KBP ou PAFR⁺) e outra linhagem que não expressa funcionalmente este receptor, onde foi inserido um plasmídeo vazio (KBM ou PAFR⁻).

Na realização do experimento, células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células por poço e tratadas com doses crescentes de irradiação (2Gy, 6Gy e 12Gy), e após 1 hora, foi coletado o RNA das células tumorais para análise por qPCR da expressão de fatores de indução de vasos, como VEGF, TGF- β 1, EGF e FGF2 (Figura 4A, 4B, 4C e 4D, respectivamente) e fator de crescimento (PDGFB; Figura 4E). Escolhemos o tempo de 1 hora para análise após a radioterapia por ser este o momento de máxima produção dos agonistas de PAFR pelas células tumorais após o estímulo com a radiação (12) e por ainda não ter ocorrido a morte celular devido ao tratamento.

Como apresentado na Figura 4, células PAFR⁺ tratadas com doses crescentes de radioterapia apresentaram maior expressão dos fatores VEGF (4A), TGF- β 1 (4B) e PDGFB (4E) em relação as células PAFR⁻ irradiadas e comparado aos controles que não receberam irradiação. Para os fatores EGF (4C) e FGF2 (4D) a expressão foi aumentada somente nas doses maiores (6Gy ou 12 Gy), comparando-se células PAFR⁺ e PAFR⁻, e ao comparar com o controle PAFR⁺ sem irradiação.

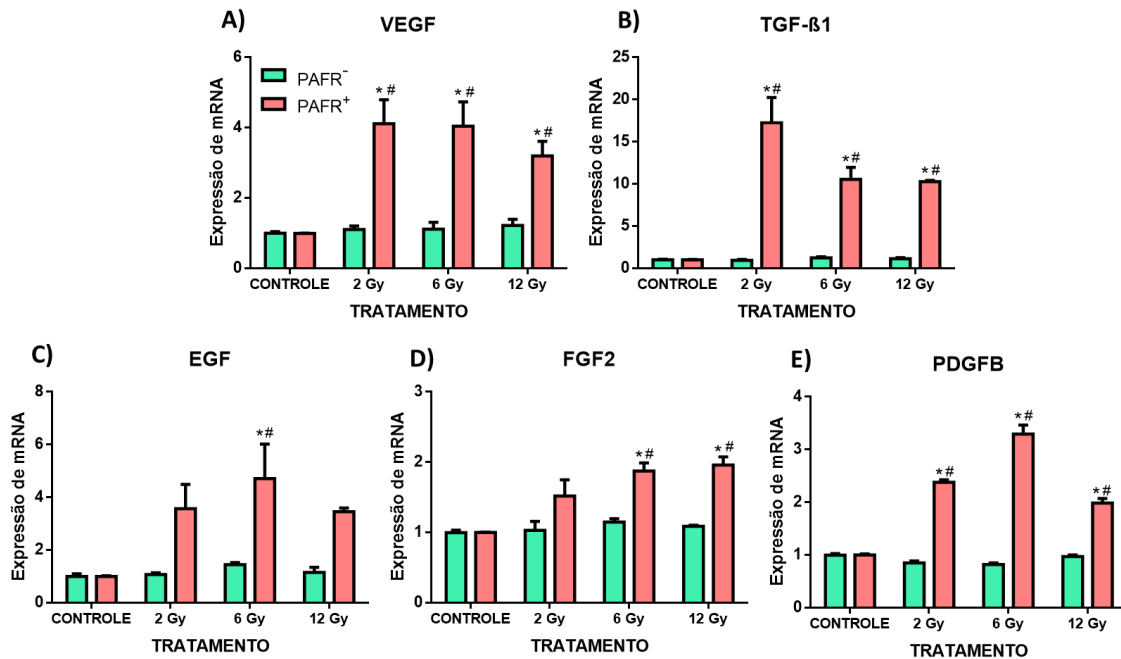


Figura 4 – A irradiação aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais. Células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células por poço e foram submetidas à diferentes doses de irradiação (2Gy, 6Gy e 12Gy), após 1 hora foi analisada a expressão gênica. São mostrados a média \pm EPM do aumento da expressão gênica normalizada em relação ao grupo controle de cada linhagem. **A)** expressão de VEGFA, **B)** TGF- β 1, **C)** EGF, **D)** FGF2 e **E)** PDGFB. N=4. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺; # $p < 0.05$ Controle vs Irradiação.

Devido a expressão gênica aumentada do TGF- β 1 nas culturas irradiadas ter sido a mais expressiva em relação a todos os genes avaliados, resolvemos analisar também a produção e liberação desse fator no sobrenadante dessas culturas. Após 6 (Fig. 5A) ou 24 horas (Fig. 5B) da irradiação foi coletado o sobrenadante das células para dosagem de TGF- β 1 por ELISA. As células PAFR⁺ apresentaram maiores níveis de TGF- β 1 nas condições controle e/ou irradiadas quando comparadas com as células PAFR⁻.

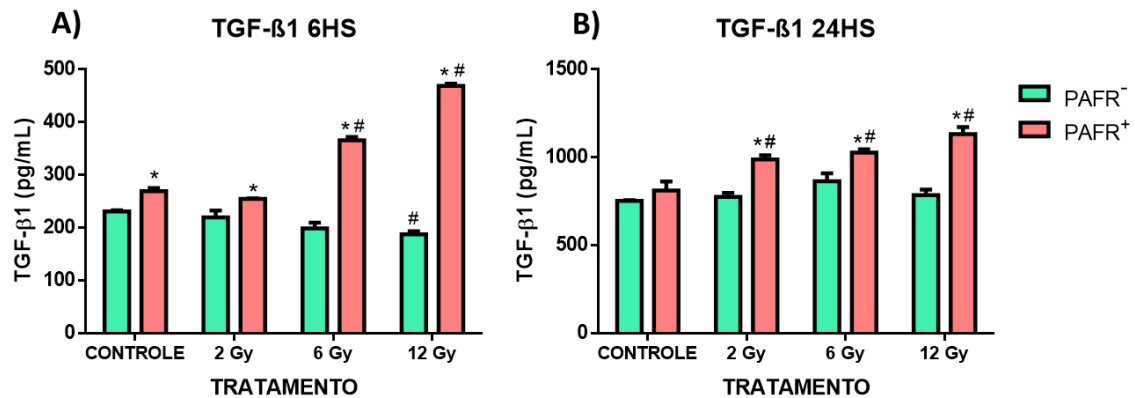


Figura 5 – A produção de TGF-β1 está aumentada em células PAFR⁺ submetidas à irradiação. Células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células por poço e foram tratadas com diferentes doses de irradiação (2Gy, 6Gy e 12Gy). Após 6 e 24hs de tratamento, foi coletado o sobrenadante dessas células e feita a dosagem de TGF-β1 pelo método de Elisa. **A)** quantidade de TGF-β1 no sobrenadante das células tratadas após 6 horas, **B)** após 24 horas. N=3. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺; # $p < 0.05$ Controle vs Irradiado.

4.1.2. Agonista de PAFR aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais

Dados obtidos recentemente mostraram que a radioterapia induz a produção de grandes quantidades de fosfolípidos oxidados que se ligam ao PAFR (moléculas PAF-like) promovendo o fenômeno de repopulação tumoral (38). Resolvemos investigar se a ativação do PAFR pelo seu agonista PAF (alquil-acil-glicero-fosfocolina) teria o mesmo efeito. Para isto utilizamos o agonista estável cPAF nas doses 10 e 100 nM para estimular as células tumorais por 1 hora. Vimos que VEGF, TGF-β1, FGF2 e PDGFB (Figuras 6A, 6B, 6D e 6E, respectivamente) estavam aumentados nas células PAFR⁺ quando tratadas com ambas as doses de cPAF, quando comparadas com as células PAFR⁻. O aumento de EGF (Figura 6C) foi expressivo somente na concentração de 100nM.

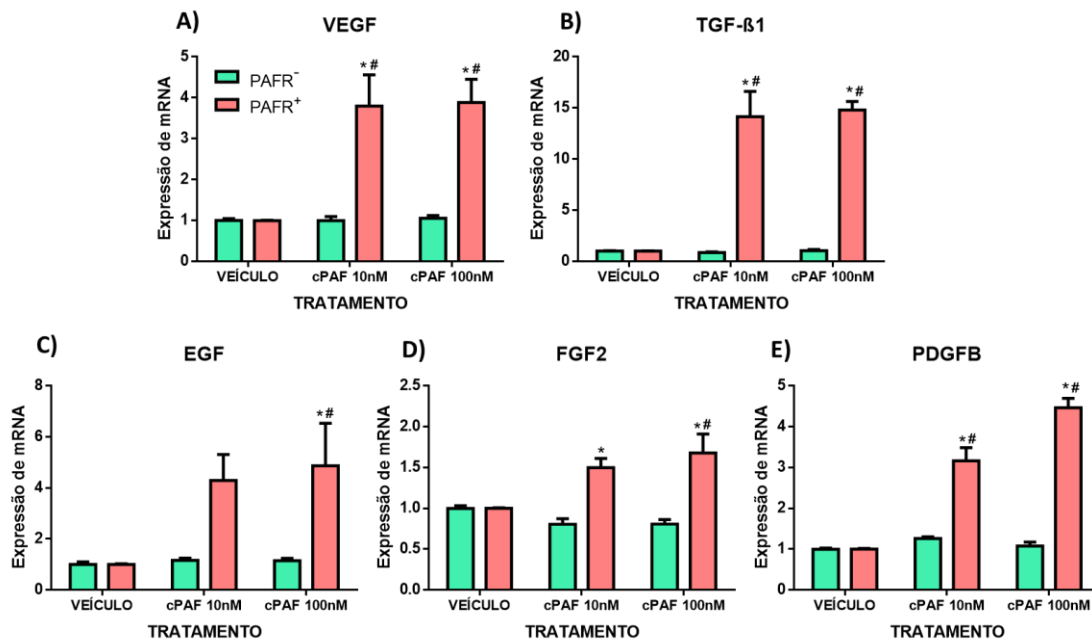


Figura 6 – Expressão de fatores de crescimento após tratamento com agonista do receptor de PAF: Células PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células por poço e tratadas com diferentes doses cPAF (10nM e 100nM), após 1 hora foi analisada a expressão gênica. **A)** VEGFA, **B)** TGF-β1, **C)** EGF, **D)** FGF2 e **E)** PDGFB. N=4. * p < 0.05 PAFR⁻ vs PAFR⁺; # p < 0.05 Veículo vs cPAF.

Também analisamos a expressão proteica de TGF-β1 no sobrenadantes das culturas de células tumorais estimuladas com cPAF. Após 6 (Figura 7A) e 24 horas (Figura 7B) de tratamento, células PAFR⁺ apresentaram maior concentração de TGF-β1 no sobrenadante quando comparadas com as células PAFR⁻ em ambas doses do estímulo.

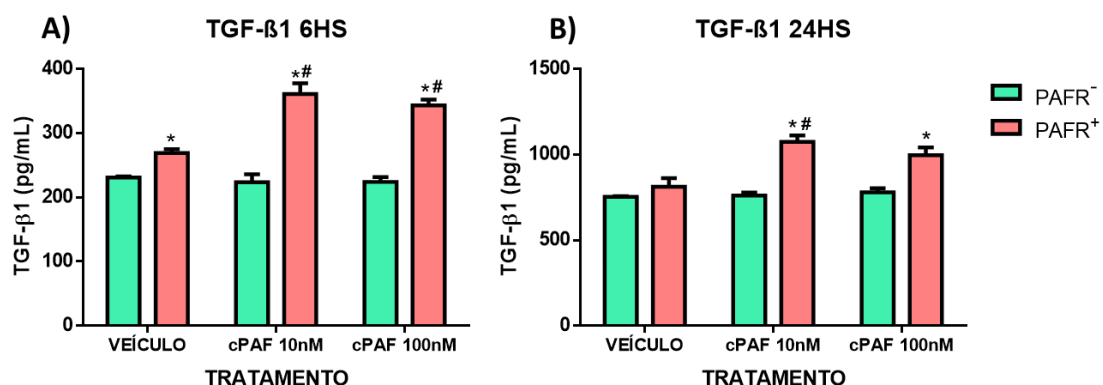


Figura 7 – O TGF-β1 está aumentado nas culturas de células tumorais tratadas com agonista de PAF. Células tumorais PAFR⁻ e PAFR⁺ foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células por poço e tratadas com diferentes doses cPAF (10nM e 100nM), após 6 e 24 horas o sobrenadante foi analisado pelo método de Elisa. **A)** TGF-β1 após 6 horas, **B)** e 24 horas. N=4. * p < 0.05 PAFR⁻ vs PAFR⁺; # p < 0.05 Veículo vs cPAF.

4.1.3. Ativação do PAFR e irradiação aumentam fosforilação de ERK nas células tumorais

A maioria dos efeitos do PAF é mediada pela transdução de sinal efetuada pelo seu receptor transmembranar ligado à proteína G (revisado por Izumi & Shimizu (53)), que pode estar ligado à várias vias *downstream*, incluindo PLA₂, PLC, PLD, proteína quinase ativada por mitogêno, tirosina quinase e adenilato ciclase. A capacidade de um único receptor ativar inúmeras cascatas de transdução de sinal explica a miríade de efeitos atribuídos ao PAF.

Em nosso sistema, estamos interessados em explorar os efeitos da ativação do PAFR sobre a produção de fatores angiogênicos, assim, resolvemos inicialmente explorar a sinalização de PAFR via fosforilação de ERK, que representam um dos principais fatores de transcrição envolvidos na estimulação da angiogênese (54). Assim, células PAFR positivas e negativas foram tratadas previamente com agonista (cPAF) ou antagonista (PCA 4288) do PAFR e adicionalmente tratadas com irradiação. Após 30 minutos do tratamento, as células foram coletadas e a fosforilação de ERK analisada em comparação a expressão de Laminina (controle endógeno). Na Figura 8 podemos observar que houve aumento da fosforilação de ERK nas células PAFR⁺ irradiadas ou tratadas com cPAF em relação ao veículo que não recebeu nenhum tratamento. Esse efeito foi revertido pelo bloqueio do PAFR com a utilização do antagonista PCA.

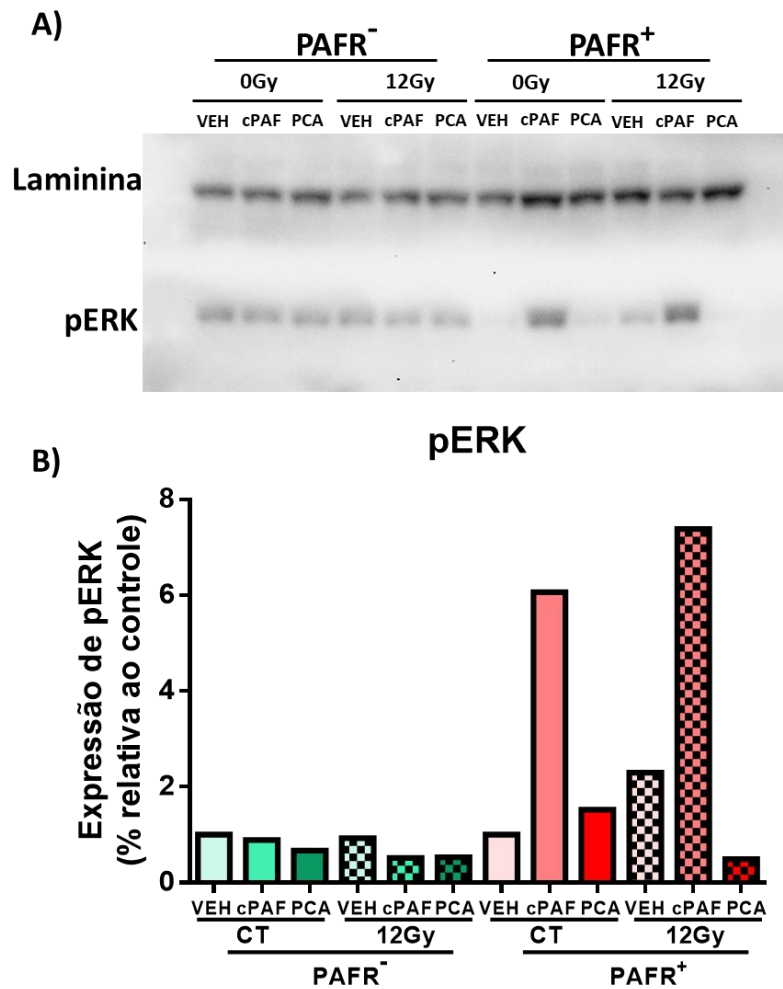


Figura 8 – Fosforilação da via de ERK por ligantes de PAFR durante irradiação:
A) Expressão de pERK e Laminina em células PAFR⁻ e PAFR⁺ irradiadas e tratadas com o agonista (cPAF) ou o antagonista (PCA4288) do PAFR e submetidas à irradiação (12Gy). **B)** Gráfico quantitativo de expressão de pERK em relação à laminina e normalização pelo controle (CT) de tipo celular/tratamento. VEH, Veículo do fármaco.

4.2. O PAFR na repopulação tumoral e angiogênese após radioterapia em modelo *in vivo*

4.2.1. A expressão de PAFR promove a repopulação tumoral pós irradiação.

Com o intuito de avaliar as consequências da expressão exacerbada de fatores de crescimento em células PAFR⁺ irradiadas, resolvemos verificar o crescimento destas células em modelo tumoral ectópico aplicado em animais imunodeficientes. Inicialmente, avaliamos o crescimento tumoral de células PAFR⁻ e PAFR⁺ injetadas em animais Balb/C NUDE, que foram separados em dois grupos. O primeiro grupo (controle ou CT) recebeu 10⁵ células tumorais PAFR⁻ ou PAFR⁺. Já o segundo grupo (Repopulação) recebeu uma dose de células viáveis (10⁵) em conjunto com células tumorais irradiadas (10⁶), simulando o fenômeno de repopulação (Figura 9A). Como pode ser observado na Figura 9B, o crescimento tumoral acompanhado durante 18 dias foi similar entre as linhagens PAFR negativa e positiva no grupo controle. Porém, quando foram injetadas células tumorais irradiadas em conjunto com as células tumorais viáveis, houve um aumento do crescimento tumoral, estimulado pelos sinais da irradiação, sendo que os tumores PAFR⁺ do grupo de Repopulação foram os mais responsivos, apresentando-se significativamente maiores quando comparados aos demais grupos (Figura 9B). No 18^o dia, os animais foram eutanasiados e o volume (Figura 9C) e o massa (Figura 9D) foram mensurados após a coleta, confirmando os achados da curva, o grupo PAFR⁺ Repopulação apresentou volume cerca de 3X maior que PAFR⁻ Repopulação e 11X maior que os grupos controle.

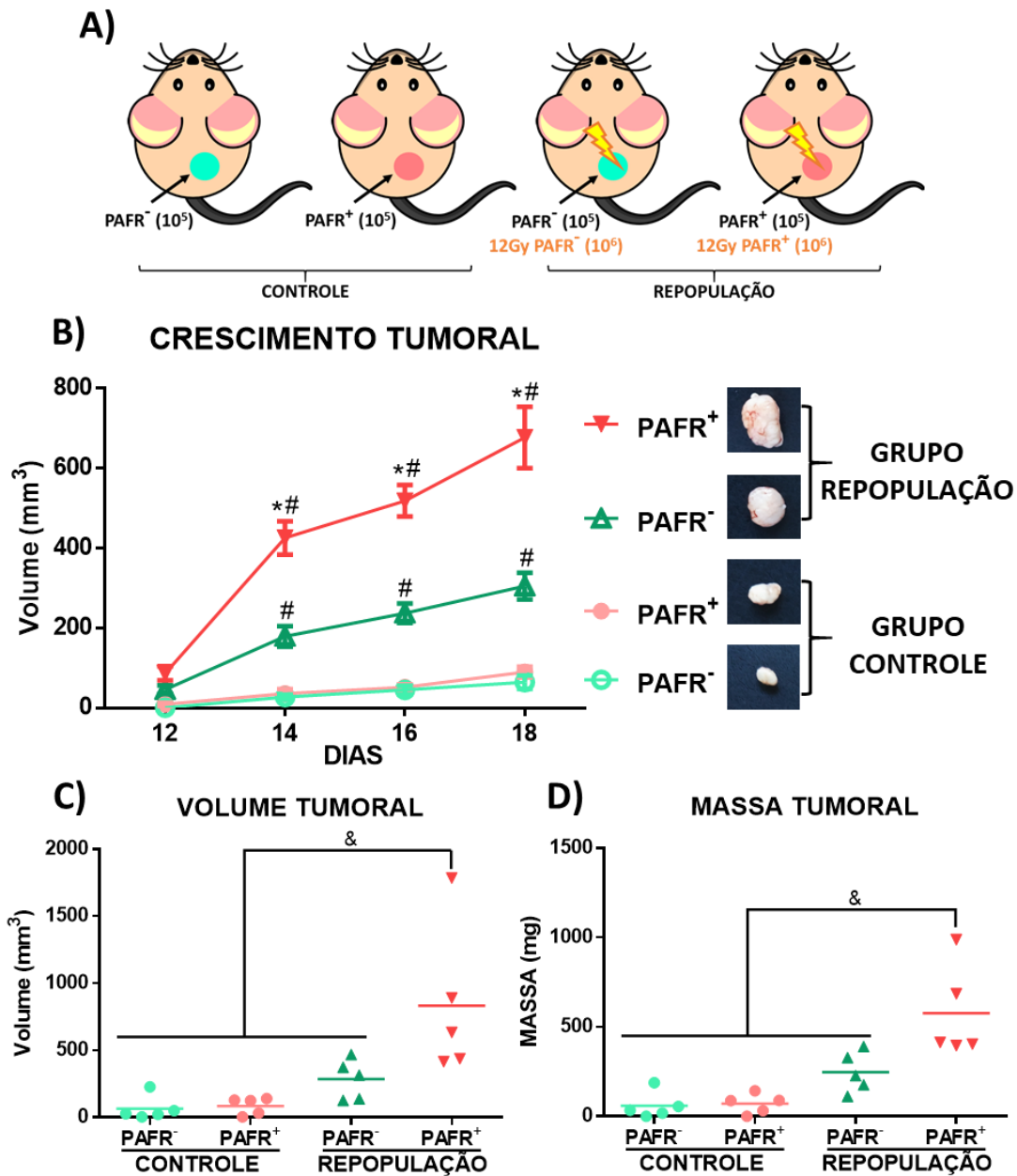


Figura 9 – Repopulação Tumoral *in vivo*: Animais Balb/C NUDE foram separados em dois grupos. No grupo controle (CT) foram inoculadas 10^5 células PAFR⁻ ou PAFR⁺ e no grupo Repopulação 10^5 células viáveis mais 10^6 células irradiadas (12 Gy) PAFR⁻ ou PAFR⁺. **A)** Esquema do experimento. **B)** média±EPM do volume tumoral de cada grupo mensurado com o auxílio de um paquímetro. As medidas foram realizadas a cada dois dias a partir do 12º dia (tumores se tornaram palpáveis) até o 18º dia, no painel à direita são mostradas fotos dos tumores após a eutanásia dos animais (um exemplo de cada grupo). **C)** volumes tumorais individuais e a média por grupo calculado após a coleta dos tumores. **D)** Massa individual dos tumores (mg) e a média. N=5. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺; # $p < 0.05$ Controle vs Repopulação; & $p < 0.05$ PAFR⁺ Repopulação vs PAFR⁻ Repopulação e controles sem irradiação.

Para confirmar a ativação do receptor de PAF por ligantes presentes no microambiente tumoral, a expressão de IL-8 foi avaliada nos tumores, pois em trabalhos anteriores foi demonstrado que existe uma correlação direta entre a expressão de IL-8 e ativação de PAF em células tumorais PAFR⁺, sendo a IL-8 considerada uma citocina *read-out* da ativação de PAFR (12). Em nosso trabalho, observamos que os tumores PAFR⁺ do grupo Repopulação apresentaram aumento na expressão de IL-8 quando comparados com os tumores PAFR⁻ do grupo de Repopulação e aos controles sem irradiação (Figura 10).

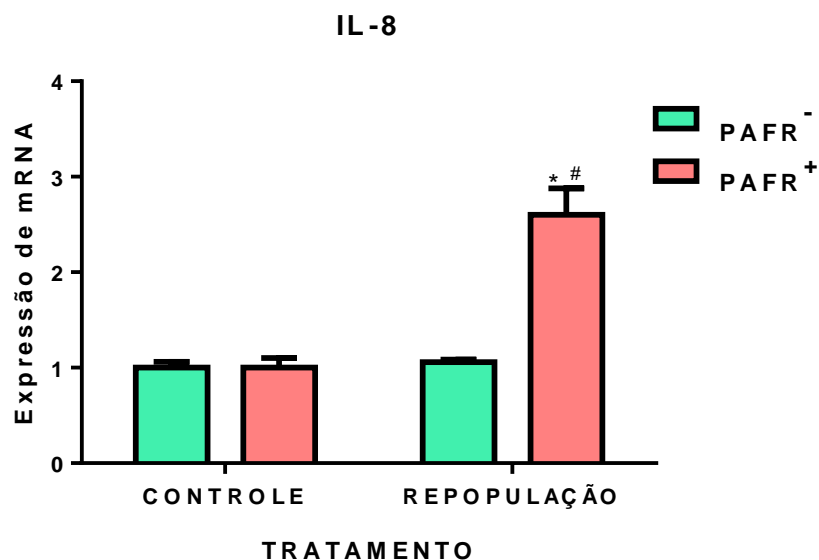


Figura 10 – Ativação PAFR em tumores *in vivo*: No 18^o dia do crescimento tumoral em animais Balb/C Nude foram realizadas a coleta de biopsias onde foi analisada a expressão de IL-8 foi utilizada como um *read-out* da ativação de PAFR nos tumores. São mostradas a média±DP da expressão relativa comparado aos grupos controle. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺; # $p < 0.05$ Controle vs Repopulação.

Em relação aos fatores de crescimento envolvidos no fenômeno de repopulação tumoral, que poderiam estar envolvidos no crescimento exacerbado dos tumores com irradiação, analisamos a expressão de PDGFA e PDGFB. Como pode ser visto na Figura 11, os tumores do grupo de repopulação apresentaram maior expressão da isoforma PDGFA ao serem comparados com os tumores do grupo controle (sem irradiação), sendo que aqueles tumores do grupo de repopulação formados por células PAFR⁺ apresentaram expressão maior deste fator do que os tumores PAFR⁻

(Figura 11A). Em relação ao PDGFB, houve diminuição significativa da expressão em ambos os tumores com irradiação, de forma independente da presença de PAFR (Figura 11B).

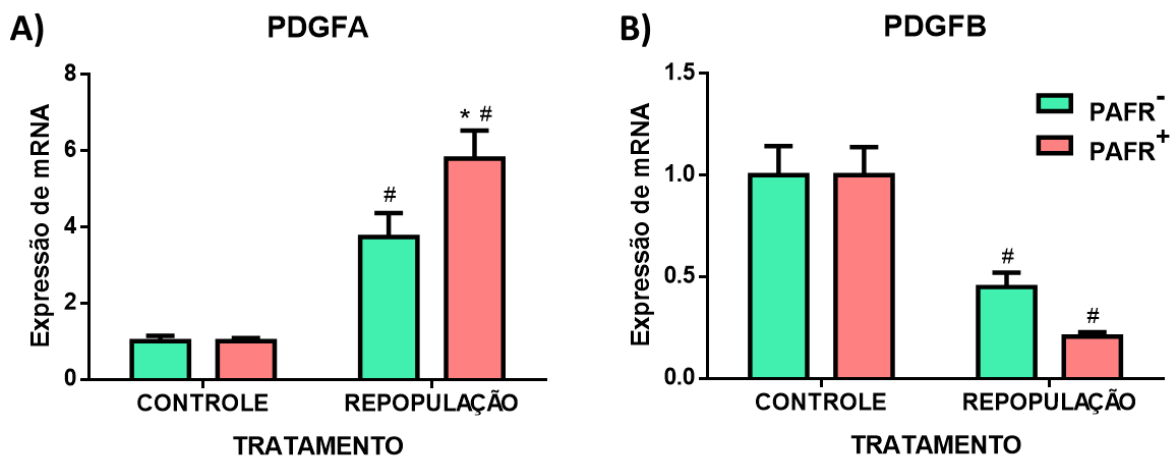


Figura 11 – Expressão gênica de fatores de crescimento celular: No 18^o dia do crescimento tumoral em animais Balb/C Nude foram realizados a coleta de biopsias onde foi analisada a expressão de fatores de crescimento celular por qPCR. São mostrados a média±DP da expressão relativa comparado aos grupos controle. **A)** Expressão de PDGFA. **B)** Expressão de PDGFB. N=3 em duplicata. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺; # $p < 0.05$ Controle vs Repopulação.

4.2.2. A angiogênese tumoral pós irradiação é dependente de PAFR

Durante a eutanásia dos animais na realização do experimento de repopulação tumoral, observou-se que os tumores PAFR⁺ irradiados apresentavam uma maior quantidade de vasos adjacentes que os tumores provenientes de animais que foram injetadas com células PAFR negativas (Figura 12A). Estes vasos também estavam presentes sobre a cápsula dos tumores, envolvendo-os e dando-lhes uma coloração mais avermelhada, indicando macroscopicamente a presença do fenômeno de angiogênese pós irradiação. Para confirmar esses achados, os tumores foram coletados e analisados por citometria de fluxo, onde foi quantificado o número de células endoteliais presentes no tecido através da marcação de células CD31⁺. Como mostrado na Figura 12B, os tumores PAFR⁺ do grupo repopulação apresentaram maior porcentagens de células CD31⁺ que os tumores PAFR⁻ irradiados ou do grupo controle.

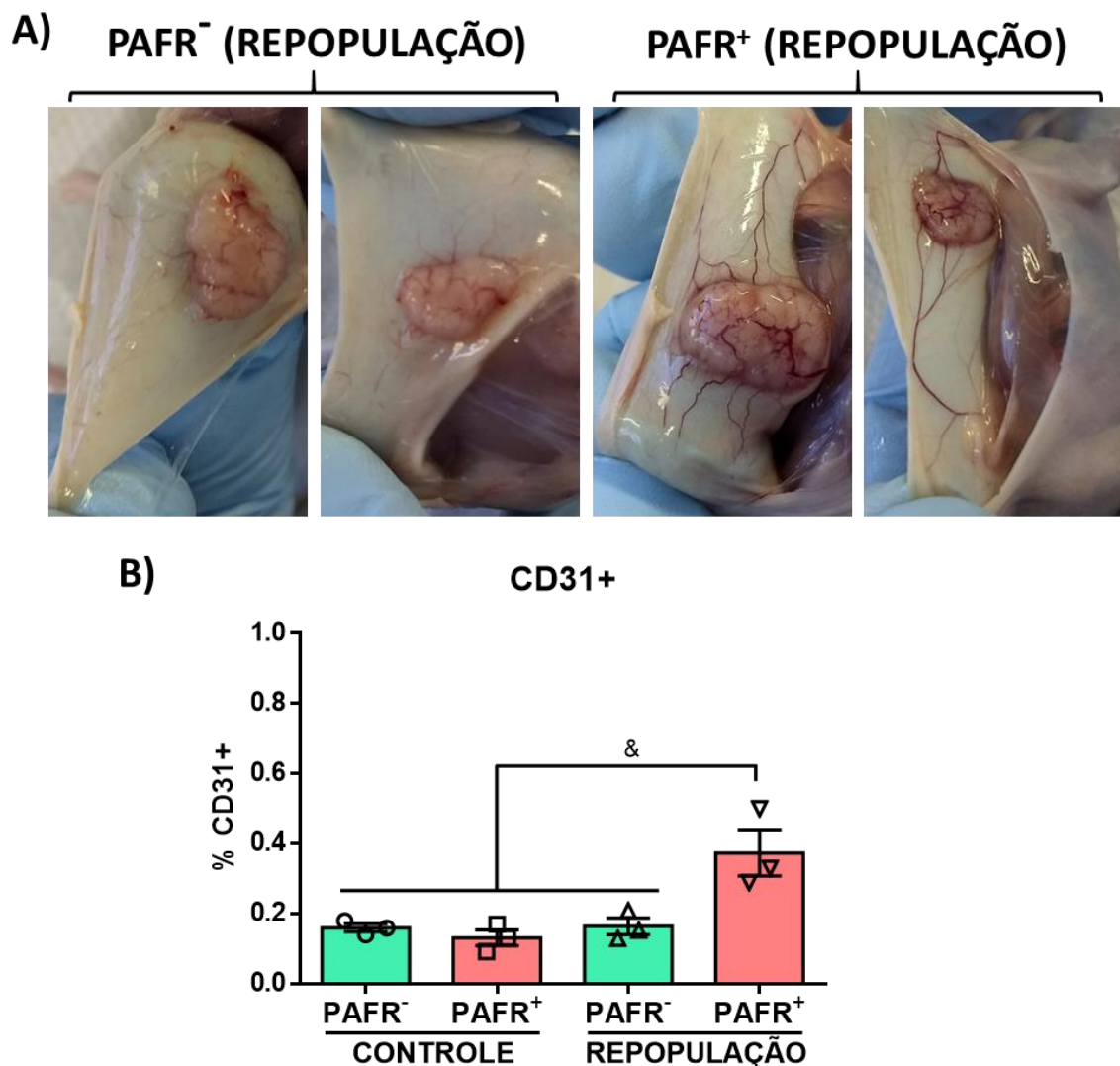


Figura 12 – Angiogênese tumoral após repopulação. Em **A)** são mostradas fotos dos tumores subcutâneos do grupo repopulação formados por células PAFR⁻ ou PAFR⁺, podendo-se observar os vasos adjacentes ao tumor. Em **B)** é mostrado uma quantificação das células endoteliais presentes nos tumores por citometria de fluxo. São mostrados a média da % de células CD31⁺. N=3. p < 0.05.

Como houve uma maior presença de vasos em tumores PAFR⁺ do grupo irradiado, resolvemos investigar quais sinais poderiam estar estimulando a angiogênese nestes tumores. Assim, após extração de uma biópsia de cada tumor, foi realizada a análise de expressão gênica dos principais fatores indutores da angiogênese tumoral (VEGFA, TGFb1, EGF e FGF2). Como pode ser visto na Figura 13A, os tumores do grupo repopulação (irradiados) apresentaram aumento significativo na expressão de VEGF quando comparados ao grupo controle, sendo que aqueles

tumores irradiados formados por células PAFR⁺ apresentaram expressão maior deste fator do que os tumores PAFR⁻ com irradiação. Em relação a expressão gênica de TGF- β 1 encontramos um aumento na expressão deste fator em tumores PAFR⁺ repopulação ao serem comparados ao grupo PAFR⁻ repopulação e ao grupo controle (Figura 13B). Da mesma forma, a expressão de EGF apresentou um aumento de mais de 30x em relação aos grupos controles e PAFR⁻ irradiado (Figura 13C). Somente a expressão de FGF2 estava menor nos tumores irradiados, independente da expressão do receptor, quando comparados aos tumores controles (Figura 13D).

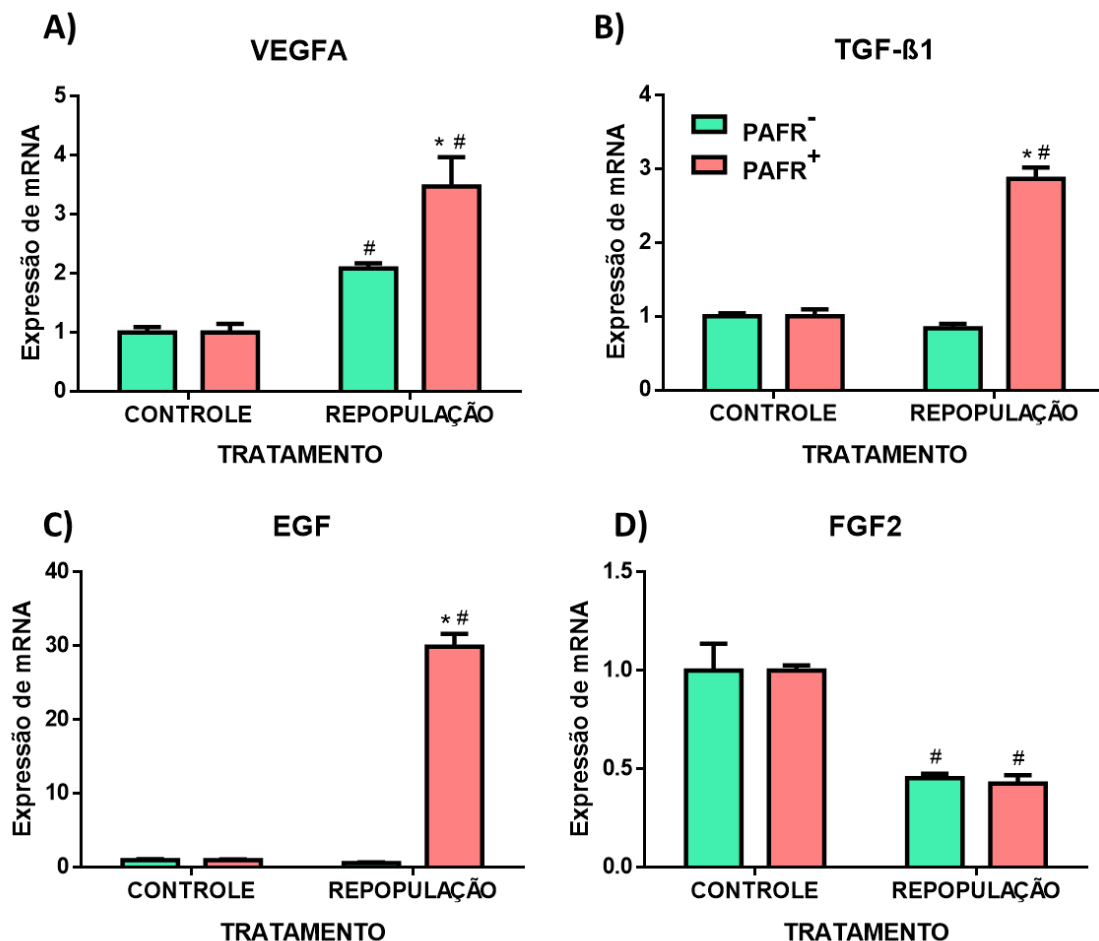


Figura 13 – Expressão gênica de fatores de angiogênicos: No 18^o dia do crescimento tumoral em animais Balb/C Nude foram realizadas a coleta de biopsias onde foi analisada a expressão de fatores de indutores de vasos por qPCR. São mostrados a média \pm DP da expressão relativa ao grupos controle. **A)** Expressão de VEGF. **B)** Expressão de TGF- β 1; **C)** Expressão de EGF; e **D)** Expressão de FGF2. N=3 em duplicata. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺; # $p < 0.05$ Controle vs Repopulação.

4.2.3. O agonista de PAFR aumenta a angiogênese tumoral

Para que pudéssemos avaliar os efeitos diretos da presença de agonistas do PAFR na formação de vasos nos tumores, resolvemos ensaiar o crescimento *in vivo* dos tumores utilizando uma base de biomaterial que pudesse conter o PAF e as células tumorais juntos no local do crescimento tumoral. Para isso, injetamos nos animais uma mistura contendo as células tumorais tratadas ou não com agonista (cPAF) em conjunto com um matrigel contendo baixas quantidades de fatores de crescimento (Growth Factor Reduced Matrigel) para formar um tumor solido que permitisse medir a formação dos vasos na presença ou não de PAF.

Conforme ilustrado na Figura 14A, injetamos 2×10^6 células tumorais (PAFR⁻ ou PAFR⁺) em uma matriz de matrigel contendo o agonista cPAF (100nM) em camundongos. Após 7 dias da injeção, extraímos os insertos (Figura 14B) e quantificamos a quantidade de hemoglobina existente em cada tumor para obter uma medida direta da presença de vasos tumorais. Como pode ser observado na Figura 14C, a quantidade de hemoglobina presente nos tumores do grupo PAFR⁺ tratados com o agonista cPAF foi maior quando comparada à condição sem o tratamento com o agonista e quando os tumores eram formados por células PAFR⁻.

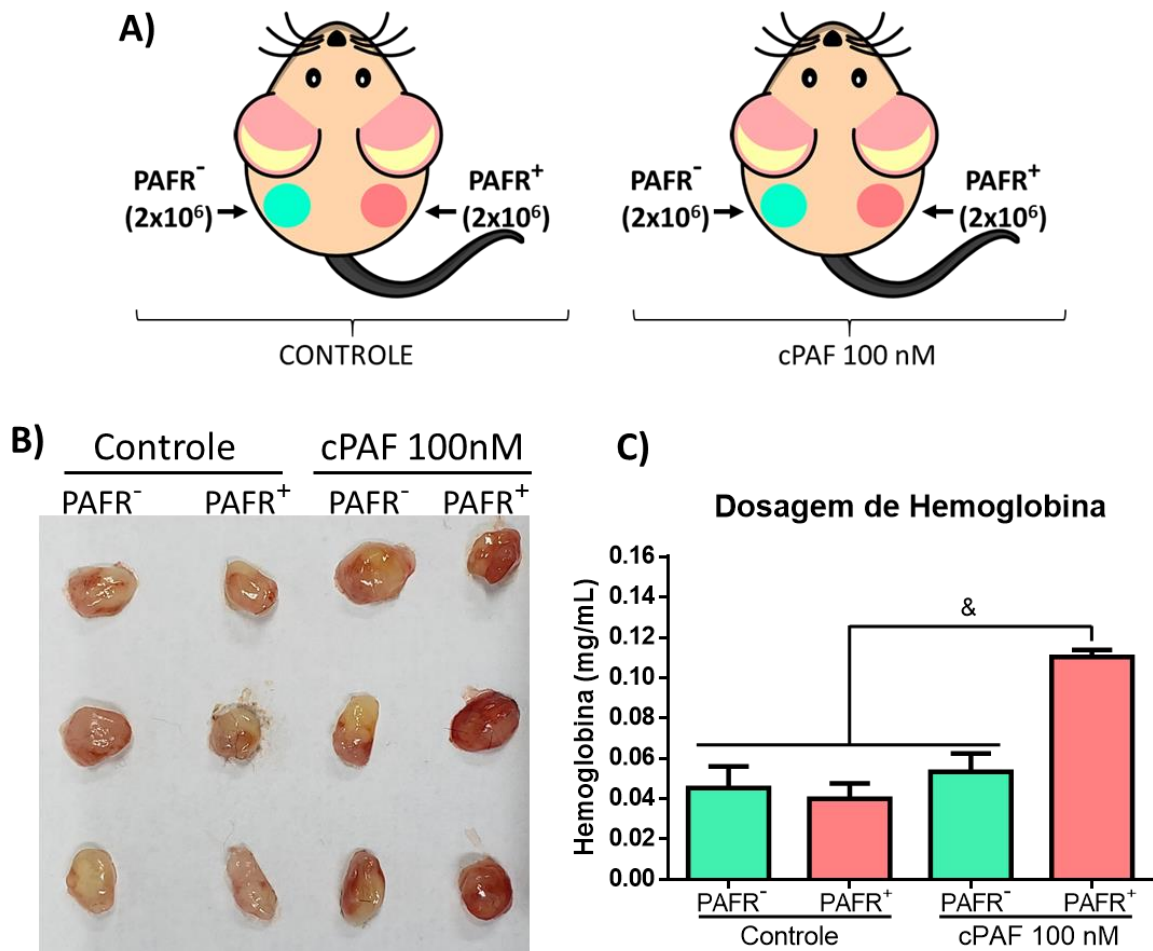


Figura 14 – Quantificação de hemoglobina em inserto de matrigel: **A)** Esquema células PAFR⁻ e PAFR⁺ injetadas nos animais em conjunto ou não com cPAF (100nM) em base matrigel. **B)** Fotos dos plugs de matrigel retirados após 7 dias da injeção. **C)** quantificação de hemoglobina por ensaio colorimétrico. N=3, p < 0.05

4.3. O PAFR na proliferação de células endoteliais

4.3.1. Células endoteliais expressam PAFR

Como o efeito de acelerar a crescimento de vasos foi dependente da ativação do PAFR nas células tumorais após a irradiação ou quando tratadas com o agonista cPAF, resolvemos avaliar se também poderia haver um efeito direto da ativação do PAFR nas células endoteliais.

Assim, primeiramente realizamos um ensaio de imunofluorescência para detectar a presença do PAFR em células endoteliais humanas derivadas da linhagem imortalizada chamada HUVEC (*Human umbilical vein endotelial cells*). Como pode ser visto na Figura 15, as células HUVEC mostraram forte marcação para o receptor do PAF, que se achava principalmente localizado na parte intracelular (verde, Figura 15A), adicionalmente realizamos uma análise da expressão do PAFR por citometria (Figura 15B), onde marcamos o PAFR na superfície ou em condições onde as células foram permeabilizadas, sendo mostrado claramente que as células HUVEC expressam o PAFR apenas no citoplasma (Figura 15B)

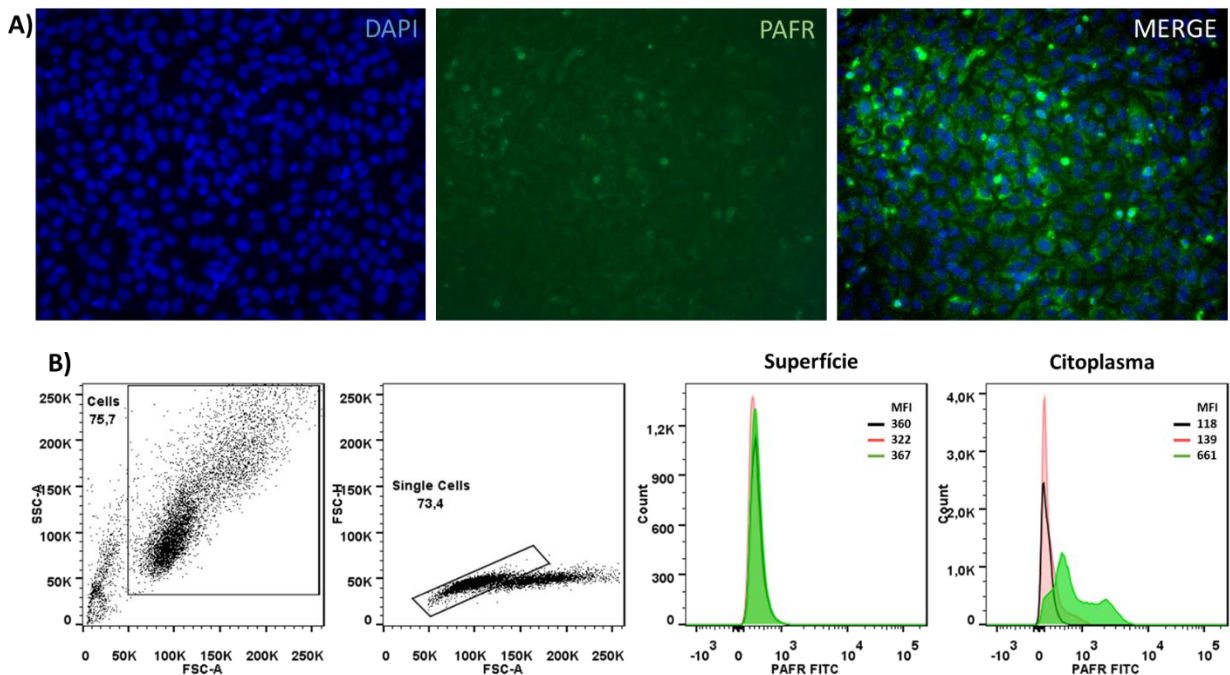


Figura 15 – Expressão PAFR em células endoteliais (HUVEC). **A)** imunofluorescência de células endoteliais HUVEC mostrando o núcleo (DAPI, azul) e PAFR (verde). **B)** Citometria de células HUVEC mostrando a análise da expressão de PAFR na superfície celular ou no citoplasma (*intracell* – fixação seguido de permeabilização) após exclusão de *singlets*.

4.3.2. O bloqueio do PAFR inibe a proliferação de células endoteliais:

Para avaliar o papel do PAFR expresso nas células HUVEC sobre seu crescimento, cultivamos uma pequena quantidade de células HUVEC (5×10^4) durante 10 dias, onde a cada 2 dias as células eram tratadas ou não com agonista (cPAF; 100nM e 10nM) ou antagonista do PAFR (PCA 10nM). A proliferação celular foi analisada por contagem de células em câmara de newbauer e como pode ser visto na Figura 16A, o estímulo das células HUVEC com o cPAF (10 e 100nM) não alterou seu perfil de crescimento. Porém, quando o receptor foi bloqueado na cultura, pela utilização do antagonista PCA4288 (Figura 16B), houve uma diminuição na proliferação das células HUVEC a partir do 6º dia e continuou assim até o 10º dia de tratamento, mostrando que a via endógena do PAF é importante para o crescimento destas células endoteliais. Não houve alteração na viabilidade das células em nenhum dos tratamentos (Figura 16C e 16D).

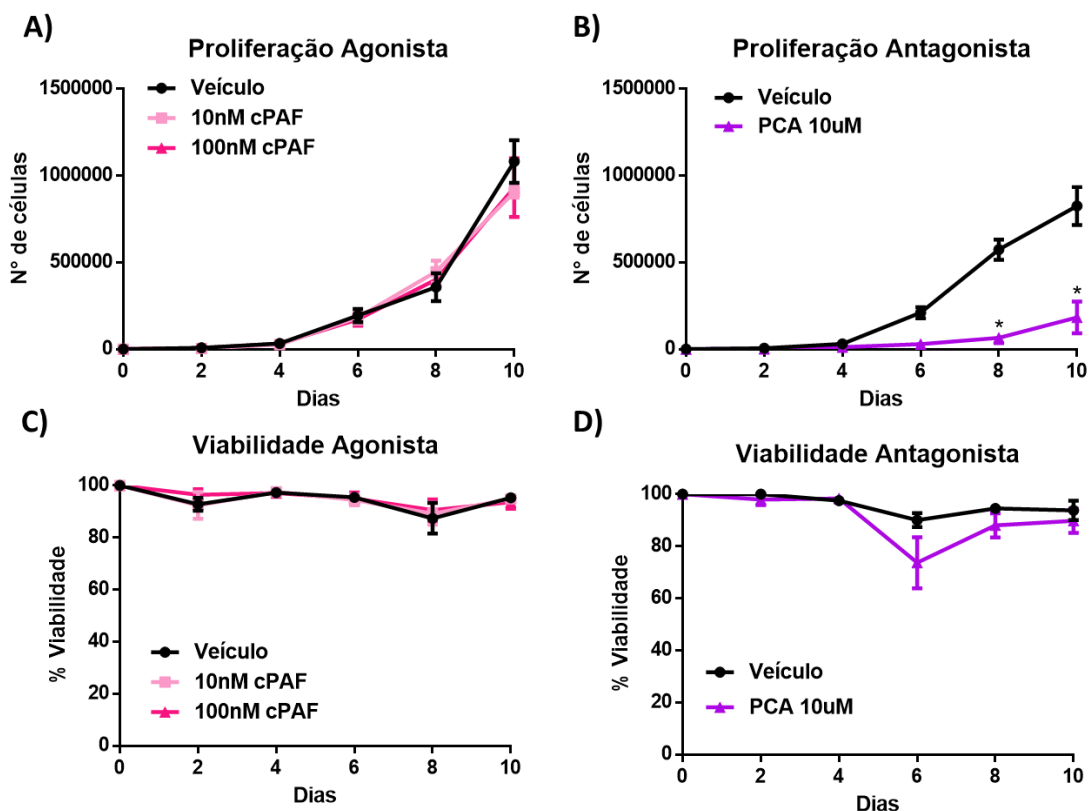


Figura 16 - Proliferação de HUVEC em resposta à agonista e antagonistas de PAFR: **A)** número absoluto de células HUVEC tratadas por 10 dias com cPAF em diferentes concentrações (10 e 100nM) **B)** número absoluto de células HUVEC tratadas por 10 dias com inibidor de PAFR, PCA (10 μ M). **C)** viabilidade celular de células tratadas com cPAF e **D)** viabilidade celular de células tratadas com inibidor. N=4

4.3.3. Células tumorais irradiadas estimulam a proliferação de células endoteliais

Como foi observado nos tumores *in vivo* que a irradiação aumentou a expressão de fatores de crescimento em tumores PAFR⁺ com conseqüente aumento da angiogênese tumoral, resolvemos avaliar as conseqüências da repopulação tumoral sobre o crescimento das células endoteliais. Para determinar a capacidade pró-angiogênica das células tumorais irradiadas, estabelecemos o seguinte modelo de co-cultura *in vitro*: Um pequeno número de células endoteliais HUVECs (10³) que expressam a proteína vermelha fluorescente (Tomato) foram co-cultivadas sob um *feeder* de células tumorais PAFR⁻ ou PAFR⁺ (2X10⁵) tratadas ou não com doses crescentes de radiação. A proliferação de células HUVEC-tomato foi quantificada após 6 dias de co-cultura por citometria de fluxo (Figura 17A).

Nossos resultados demonstraram que ambas as células tumorais que receberam irradiação em dose mais alta (12 Gy) promoveram significativamente a proliferação das células HUVEC-tomato quando comparadas aos controles (não irradiados), sendo que nas co-culturas com células PAFR⁺ irradiadas, a proliferação da HUVEC-tomato foi 3x maior, quando comparada as células PAFR⁻ (Figura 17B). O tratamento com o agonista cPAF produziu o mesmo fenômeno da radiação, aumentando a proliferação das células HUVEC-tomato cerca de 10x mais naquelas cultivadas em conjunto com células PAFR⁺ (Figura 17C). Como demonstração adicional, confirmamos o efeito estimulador da proliferação de células irradiadas sobre as células HUVEC-Tomato usando microscopia confocal. Na Figura 17D são mostradas fotografias representativas da co-cultura de células HUVEC-tomato com células tumorais PAFR⁻ e PAFR⁺ irradiadas (12 Gy), podendo ser observado maior densidade de células endoteliais fluorescentes na cultura com células PAFR⁺.

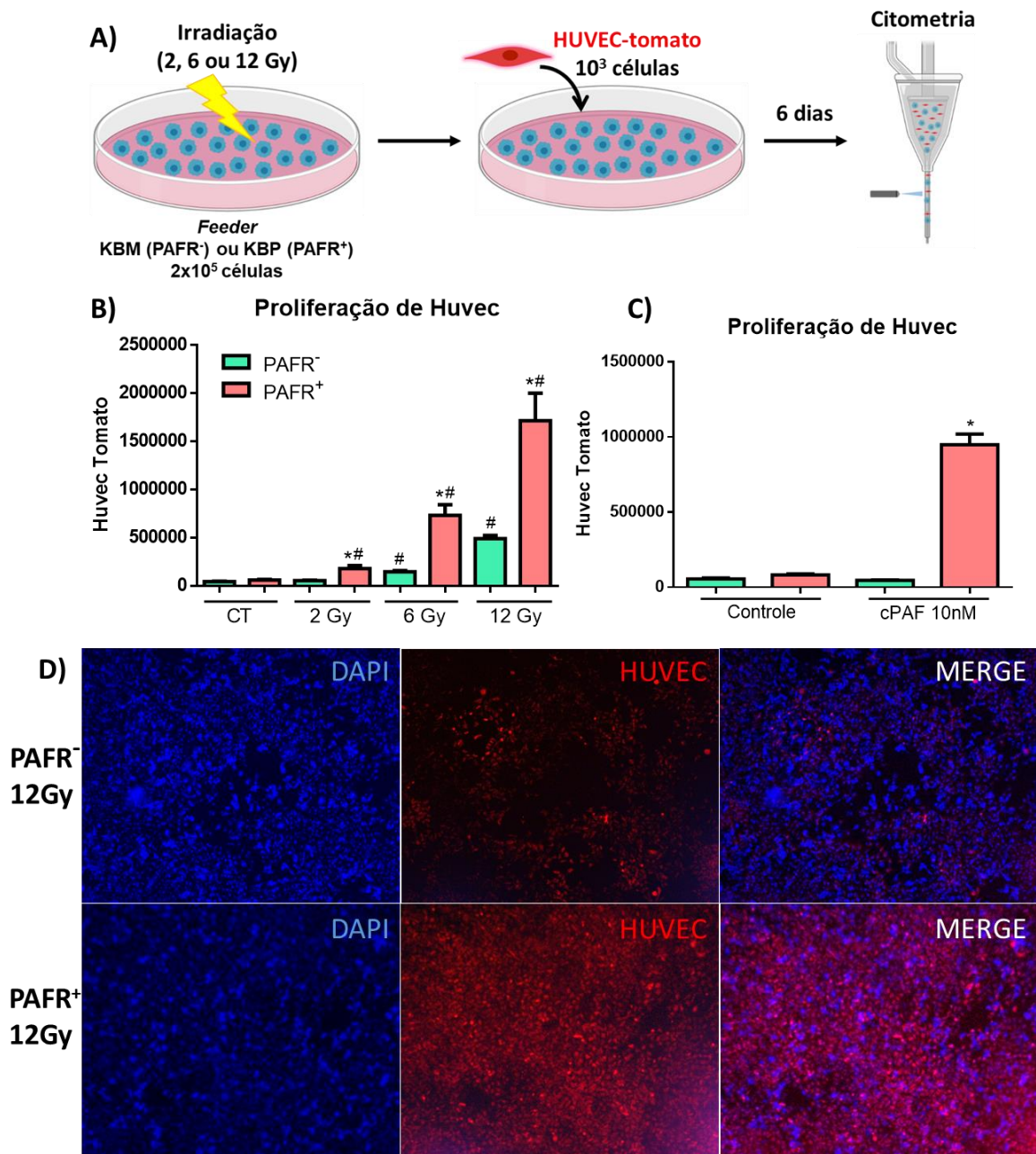


Figura 17 – Proliferação de células endoteliais em co-cultura com células tumorais: **A)** Um Feeder de 2x10⁵ células PAFR⁻ ou PAFR⁺ foram irradiadas (2, 6 ou 12Gy) e co-cultivadas com 10³ células HUVEC-tomato, depois de 6 dias foi feita a contagem de células HUVEC-tomato por citometria **B)** número absoluto de células HUVEC em modelo de repopulação, co-cultivadas com células PAFR⁻ e PAFR⁺ irradiadas em diferentes doses (2, 6 e 12Gy). **C)** número absoluto de células HUVEC co-cultivadas com células PAFR⁻ e PAFR⁺ tratadas com cPAF 10nM. **D)** imunofluorescência de células em co-cultura, mostrando o núcleo (DAPI) e em vermelho as células HUVEC TOMATO. * p < 0.05 PAFR⁻ vs PAFR⁺; # p < 0.05 Controle/Veículo vs Irradiação/cPAF

Adicionalmente, realizamos o ensaio de repopulação tumoral utilizando outras duas linhagens tumorais que naturalmente expressam grandes quantidades do PAFR (28). C33A e SiHa são linhagens de câncer cervical, sendo C33A negativa para HPV e SiHa positiva para HPV. Ambas foram irradiadas e/ou tratadas com o agonista cPAF (10 nM) e co-cultivadas com as células HUVEC-tomato. Como visto na Figura 18, tanto a irradiação, quanto o tratamento com agonista de PAFR aumentou a proliferação das células HUVEC-tomato, sendo que o bloqueio do receptor do PAF (PCA4288) foi capaz de inibir o efeito *feeder* das células tumorais irradiadas.

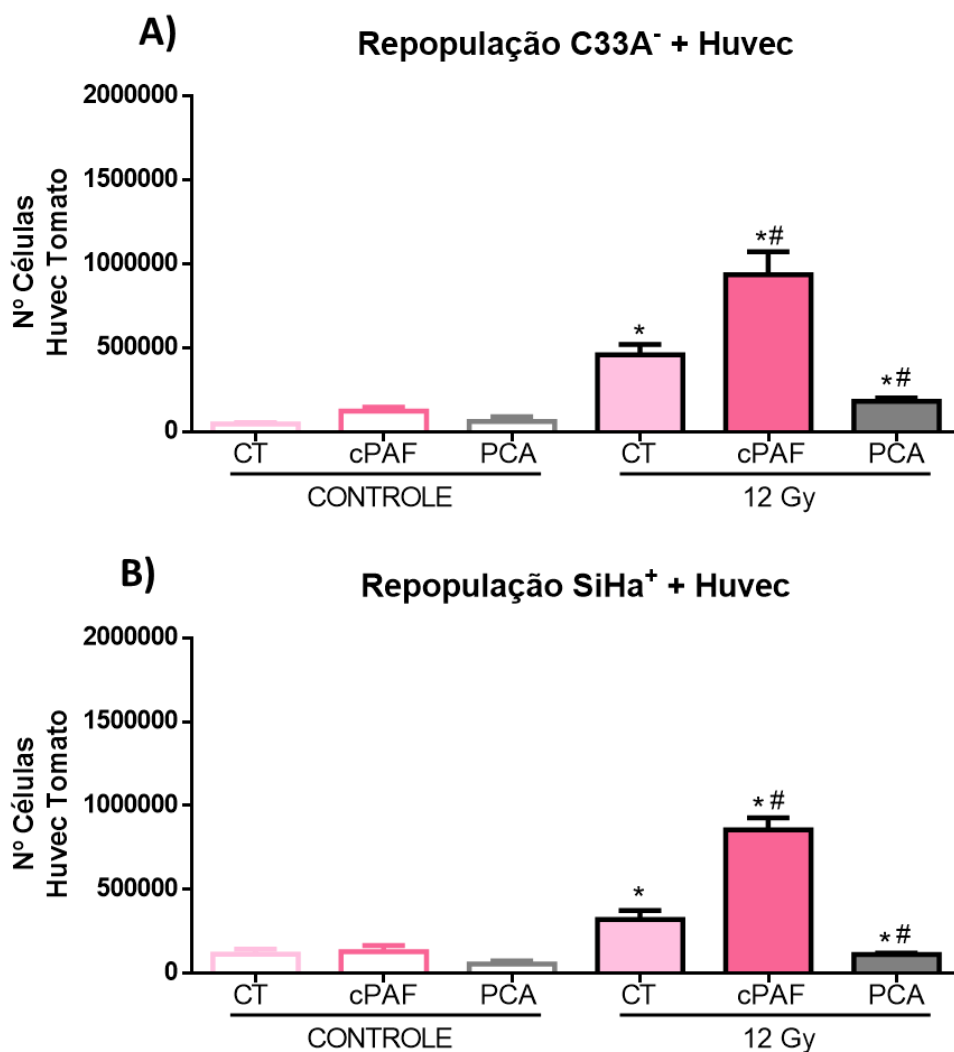


Figura 18 – Proliferação de células endoteliais em co-cultura com células de câncer cervical e queratinócitos na repopulação celular pós radioterapia: Foram plaqueadas 10^4 células HUVEC em co-cultura com 2×10^5 células **A)** C33A e **B)** SiHa tratadas com irradiação, cPAF ou PCA. Após 6 dias de tratamento, as células HUVEC-tomato foram quantificadas por citometria de fluxo. N=4. * $p < 0.05$ Controle vs 12Gy; # $p < 0.05$ Controle vs Tratamento (cPAF ou PCA)

4.3.4. Sobrenadante de células tumorais irradiadas aumenta proliferação de células endoteliais

Além da grande capacidade das células tumorais irradiadas em promover a proliferação das células HUVEC, também estudamos se este efeito se daria por meio de fatores solúveis secretados no sobrenadante das culturas, ou seja, sem necessidade de contato célula-célula. Assim, o sobrenadante coletado a partir de células PAFR⁺ expostas à irradiação (12 Gy) ou tratadas com cPAF apresentou propriedades muito mais fortes para promover a proliferação das células HUVEC, em comparação com o sobrenadante proveniente das células PAFR⁻ irradiadas ou em relação aos controles (não irradiados) (Figura 19). Assim, estes resultados indicam que células tumorais irradiadas estimulam a proliferação das células endoteliais, nas quais fatores solúveis liberados a partir de células tumorais irradiadas podem estar envolvidos.

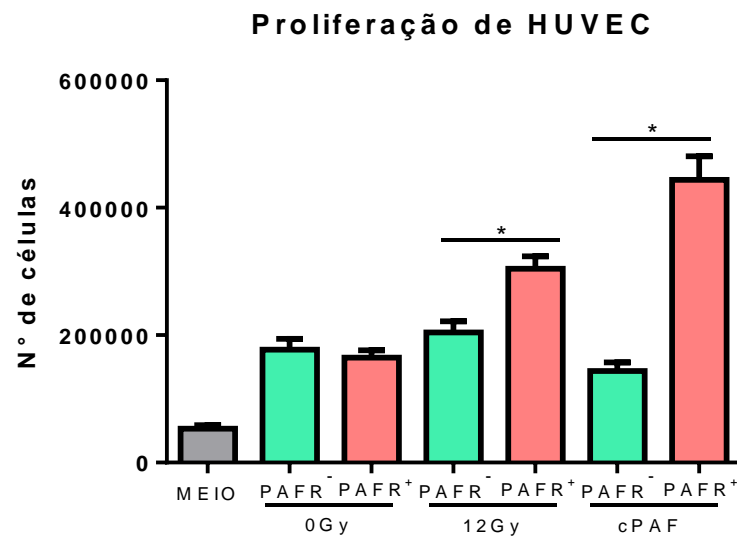


Figura 19 – Proliferação de células endoteliais estimulada por fatores de crescimento produzidos por células tumorais: Foram plaqueadas 10^4 células HUVEC, e após 24 h essas culturas foram tratadas ou não com o sobrenadante proveniente de células tumorais PAFR⁻ e PAFR⁺ tratadas com irradiação ou cPAF. Após 72 horas de tratamento, o número de células endoteliais HUVEC foram quantificadas em câmara de newbauer com tripan blue. N=6. * $p < 0.05$ PAFR⁻ vs PAFR⁺

4.4. A angiogênese tumoral na ausência de PAFR

4.4.1. A ausência do PAFR inibe a angiogênese tumoral pós irradiação

Para investigar o papel do receptor do PAF nas células endoteliais durante a repopulação induzida pela radioterapia, nós utilizamos um modelo de células tumorais de carcinoma murino (Lewis Lung Carcinoma - LLC) em conjunto com um modelo animal cujo gene para o receptor do PAF foi deletado no hospedeiro (PAFR KO). Desta forma, podemos comparar a angiogênese durante o fenômeno da repopulação tumoral na ausência de PAFR no microambiente tumoral.

Para avaliarmos o fenômeno de repopulação in vivo, separamos os animais selvagens (WT) e *knockout* para o PAFR (PAFR KO) em dois grupos. Conforme ilustrado na Figura 20A, o primeiro grupo (Controle) recebeu 2×10^5 de células tumorais viáveis (LLC e LLC EGFP na proporção de 100:1). Já o segundo grupo (Repopulação) recebeu uma mistura de células LLC irradiadas (12 Gy) com células LLC EGFP viáveis (na mesma proporção do grupo controle). A pequena quantidade de células tumorais LLC GFP inoculadas servem como um marcador do fenômeno de repopulação tumoral, pois assim é possível quantificar o quanto a irradiação do *feeder* de células tumorais sem fluorescência estimulou o crescimento das células EGFP que não foram tratadas pela irradiação. Neste modelo, o crescimento tumoral foi acompanhado por 20 dias e ao final da curva de crescimento os animais foram eutanasiados para avaliação da angiogênese tumoral e expressão de citocinas.

Os resultados mostraram que não houve diferenças no crescimento tumoral do grupo controle entre os animais WT e PAFR KO, porém, no grupo que recebeu radioterapia, tanto o volume (Figura 20B) quanto a massa dos tumores (Figura 20C) foram maiores nos animais WT em relação ao PAFR KO. No grupo tratado com a radiação houve um aumento de células LLC-EGFP+ nos tumores, comprovando a repopulação tumoral, sendo este aumento foi mais significativo nos animais WT (Figura 20D). Estes resultados sugerem uma participação direta do PAFR expresso nas células do infiltrado tumoral para a promoção da repopulação tumoral induzida pela radioterapia. Ao retirar os tumores dos animais, pudemos observar maior formação de vasos nos animais WT em comparação ao PAFR KO do grupo de

repopulação (Figura 20E). Quando analisamos a angiogênese nestes tumores, houve um aumento significativo de células endoteliais (CD31+) nos tumores irradiados provenientes de animais WT em comparação com os animais PAFR KO (Figura 20F).

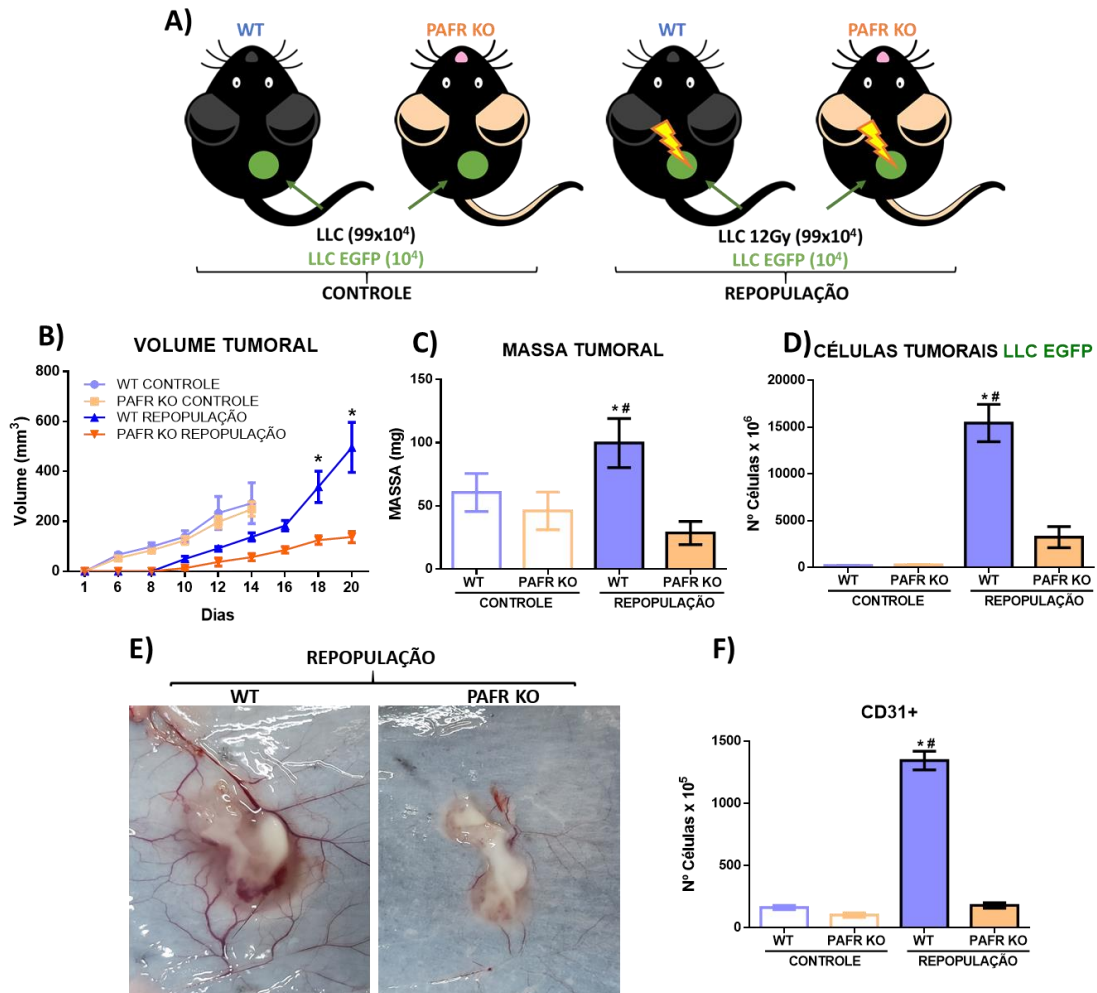


Figura 20. A expressão do PAFR nas células endoteliais promove a repopulação tumoral pós-radioterapia: **A)** Animais C57BL/6 WT ou PAFR KO foram injetados no dorso com uma mistura de células tumorais LLC/LLC EGFP previamente tratadas ou não com irradiação. **B)** Média±EPM do volume tumoral de cada grupo mensurado com o auxílio de um paquímetro durante a curva de crescimento dos tumores. As medidas foram realizadas a cada dois dias a partir do 6º dia (tumores se tornaram palpáveis) até o 14º dia (grupo controle) ou 20º dia (grupo repopulação). **C)** são mostrados a média por grupo da massa dos tumores (em mg) mensurado após a eutanásia dos animais. **D)** Estes tumores foram processados e analisados por citometria de fluxo, onde são mostrados a média + EPM do número de células LLC EGFP+, **E)** Imagem demonstrando a formação de vasos nos tumores do grupo de repopulação em animais WT e PAFR KO, **F)** CD31+. n=4 animais por grupo de 2 experimentos independentes. * p < 0.05 WT vs PAFR KO; # p < 0.05 Grupo Controle vs Repopulação.

4.4.2. A ausência do PAFR diminui a expressão de fatores angiogênicos pós irradiação

O próximo passo foi avaliar a expressão de fatores de crescimento e citocinas nestes tumores, com a finalidade de relacionarmos com os dados encontrado em relação à diferença do crescimento tumoral. Houve uma elevada expressão de IL-10, IL-8 e TGF- β 1 nos tumores provenientes de animais WT Repopulação em relação aos animais PAFR KO e ao grupo controle (Figura 21 A-C, respectivamente), confirmando a hipótese de que o PAF promove um perfil imunossupressor e de reparo nos tumores, promovendo a formação de vasos tumorais.

Além disso, dados publicados anteriormente mostravam que a COX tem papel primordial na promoção da repopulação tumoral. Em nosso modelo observamos um aumento na expressão de COX1 nos tumores irradiados provenientes de animais WT quando comparados com os animais PAFR KO (Figura 21E), que atua promovendo a repopulação tumoral nestes animais. No geral, na ausência do receptor do PAF no microambiente tumoral ocasionou uma diminuição significativa da repopulação tumoral e da angiogênese.

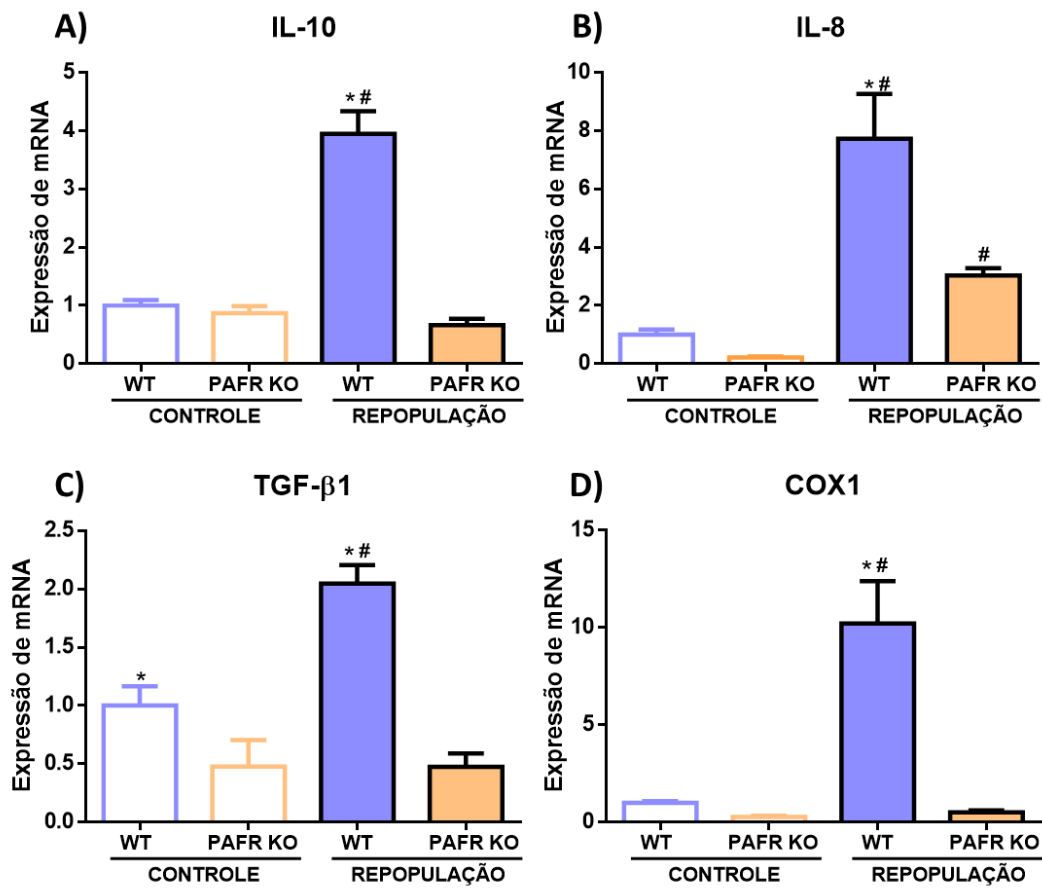


Figura 21 – A deleção de PAFR diminui a expressão de fatores angiogênicos em tumores irradiados: Animais C57BL/6 WT ou PAFR KO foram injetados no dorso com uma mistura de células tumorais LLC/LLC EGFP previamente tratadas ou não com irradiação. Foram realizadas a coleta de biopsias ao final da curva de crescimento onde foi analisada a expressão de fatores inflamatórios e angiogênicos por qPCR das citocinas **A)** IL-10, **B)** IL-8, **C)** TGF- β 1 e de **D)** COX1. São mostrados a média \pm DP da expressão relativa em relação ao grupo controle WT. n=4 animais por grupo de 2 experimentos independentes. * p < 0.05 WT vs PAFR KO; # p < 0.05 Grupo Controle vs Repopulação.

5. Discussão

Em tumores sólidos, as células tumorais crescem em um estroma formado por tecido conectivo (fibroblastos e matriz extracelular), vasos neoformados (células endoteliais e pericitos) e alguns tipos celulares recrutados da corrente sanguínea que constituem o infiltrado inflamatório tumoral. Essas células estabelecem uma rede de sinais controlados pelas células tumorais com o objetivo de promover o crescimento neoplásico. Nesse contexto, foi objetivo desse trabalho avaliar o papel do PAFR no microambiente tumoral como promotor do crescimento tumoral, angiogênese e repopulação tumoral após radioterapia.

Inicialmente, observamos que ligantes do receptor do PAF atuam na célula tumoral para promover a expressão de fatores de crescimento e angiogênicos. Verificamos que em células PAFR⁺ tratadas com o agonista sintético (cPAF) ou com lipídeos alterados (PAF-*like*) gerados pela radioterapia, aumentava a expressão de VEGF, TGF- β 1, EGF, FGF2 e PDGFB, fatores estes relacionados à angiogênese tumoral (2). Outros autores também encontraram resultados semelhantes, por exemplo, Sahu *et al.*, mostrou que o tratamento com radiação UV (radiação do tipo alfa e beta) foi capaz de alterar a expressão de diversos genes de citocinas e fatores de crescimento, incluindo IL-8 e TGF- β 1, em células tumorais que expressam PAFR (40). Já é bem estabelecido que o TGF- β 1 presente em tumores está associado a progressão tumoral e tem um papel importante na angiogênese (55) e estudos mostraram que irradiação gama aumentou a produção de TGF- β 1 em tumores de carcinoma pulmonar e em tecidos normais (56–58). PAF também induziu a expressão gênica e produção de TGF- β 1 em doenças renais (59). A irradiação também induz efeitos indiretos na célula tumoral, como aumento da produção de radicais livres, e foi demonstrado que espécies reativas de oxigênio foram capazes de ativar a forma latente de TGF- β 1, aumentando sua ação pró-tumorigênica (58).

A radioterapia também exerce efeito direto de estimular a produção de PAF e moléculas PAFR-*like* pelas células tumorais. Essa produção exacerbada de ligantes do PAFR, por sua vez, atuando sobre as células radio-resistentes foi capaz de estimular a proliferação destas células, acelerando o crescimento tumoral (39). Em nosso modelo, a radiação aumentou a expressão de fatores de crescimento, que poderiam ser os responsáveis pelo aumento do crescimento tumoral e consequente

aumento da angiogênese tumoral, estabelecendo um ciclo vicioso entre produção de PAF e fatores de crescimento. De fato, existem evidências de que alguns fatores de crescimento podem estimular a produção de PAF, por exemplo, Camussi *et al* viram que o Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF) estimulou a produção de PAF e que por sua vez induziu a formação de vasos no fígado pela produção do fator de crescimento VEGF (60), assim como a administração direta de PAF foi capaz de induzir a produção de VEGF no cérebro de ratos (61). Ainda, foi mostrado que o PAF é capaz de aumentar a expressão de VEGF e FGF2, pela ativação da via de NF- κ B em células endoteliais primárias derivadas de cordão umbilical (HUVEC) e em macrófagos (62,63).

Em nossos resultados tivemos algumas diferenças na expressão do FGF2 entre os modelos *in vivo* e *in vitro*. No modelo *in vitro* houve aumento do FGF2 nas células PAFR⁺ submetidas a irradiação ou tratadas com o agonista. Em contrapartida, no modelo *in vivo*, a expressão de FGF2 foi suprimida. Apesar do FGF2 ser importante para a angiogênese tumoral, Camussi *et al*, demonstraram que o efeito angiogênico do PAF não é dependente de FGF2, pois ao tratar animais com anticorpo que inibe FGF2 não observaram diferenças na angiogênese em carcinomas de fígado tratados com o agonista de PAFR (49). Outro fator cuja expressão difere nos modelos *in vivo* e *in vitro* foi o PDGF. Nós analisamos a expressão de duas isoformas pertencentes a essa família (PDGFA e PDGFB), sendo que somente a isoforma PDGFB estava aumentada em células PAFR⁺ que receberam estímulo com agonista de PAFR nas condições *in vitro* e não no modelo *in vivo*. Este é um fator envolvido com a proliferação celular (principalmente fibroblastos) e recrutamento de células murais para o fortalecimento da parede dos vasos sanguíneos e acreditamos que a discrepância na expressão do resultado *in vivo* se deva principalmente a presença de células não tumorais (principalmente fibroblastos) que podem interferir com a expressão deste fator pelas células tumorais (64).

Em vários tipos celulares, a ativação de PAFR induz hidrólise de fosfatidilinositol, liberação de ácido araquidônico e inibição do acúmulo de cAMP. A ativação da cascata da MAP quinase pode explicar alguns dos mecanismos subjacentes aos sinais diferenciadores e proliferativos desencadeados pelo PAF nas células

tumorais. Em nosso trabalho, avaliamos se o receptor do PAF era capaz de ativar a cascata de MAPKs, pois essa via desempenha um papel fundamental na transmissão de sinais mitogênicos e diferenciadores para o crescimento tumoral. Nossos resultados mostraram que o receptor do PAF ativado durante a radioterapia ou pelo tratamento com o seu agonista, aciona potentemente a ativação de ERK, o que é importante para as ações pró-angiogênicas e inflamatórias do PAF (50,54).

A potencial ação pró-tumoral do PAF na progressão da doença foi também abordada em um modelo experimental de melanoma, onde foi visto que a produção de PAF está correlacionada com a formação de metástase pulmonar via produção de TNF- α e IL-1 β (65). Em outro trabalho conduzido por Bussolati *et al*, foi visto o PAF é detectável nos extratos lipídicos de amostras de carcinomas invasivos primários de mama, e que a quantidade de PAF se correlacionava com o volume de vasos intratumorais. Quando o PAF foi extraído destes carcinomas da mama e injetado em camundongos, promoveu maior angiogênese (42). Em nosso trabalho, observamos que a injeção de um inserto de matrigel contendo cPAF e células tumorais PAFR⁺ aumentou a angiogênese tumoral, como demonstrado pelo aumento de hemoglobina detectado nos extratos dos tumores, concordando com os resultados observados por esses diferentes autores.

No modelo de repopulação tumoral *in vivo*, observamos uma diferença de crescimento dos tumores PAFR negativos e positivos, com e sem irradiação, e obtivemos resultados concordantes com trabalhos publicados anteriormente pelo nosso grupo (39), onde tumores PAFR⁺ irradiados apresentaram crescimento exacerbado ao serem comparados com tumores PAFR⁻ irradiados e também com os tumores que não receberam irradiação. Sendo assim, o crescimento de tumores submetidos a irradiação foi dependente da presença do receptor de PAF nas células tumorais. Outros trabalhos demonstraram que o crescimento tumoral pode ser dependente da presença do receptor do PAF no microambiente tumoral. Sahu *et al*, demonstrou que a injeção de dois tumores de melanoma no mesmo animal, onde um deles recebeu irradiação, promoveu o crescimento do outro tumor não irradiado. Quando os tumores estavam presentes em animais PAFR KO, este efeito não foi observado (12). Além disso a administração sistêmica de agonistas do receptor de

PAF induziu a progressão de tumores de pulmão em camundongos C57BL/6 WT, o que não ocorreu em animais PAFR KO (66).

Também investigamos o papel da ativação do receptor de PAF presente nas células tumorais sobre a proliferação de células endoteliais no contexto de repopulação. Como mostrado no presente trabalho, houve maior proliferação de células endoteliais (HUVEC) quando essas foram cultivadas em co-cultura com células tumorais PAFR⁺ irradiadas ou em co-cultura com linhagens celulares de carcinoma uterino. Quando as células endoteliais foram tratadas com um antagonista do PAF (PCA4288) houve diminuição da proliferação destas células. Também observamos um aumento na porcentagem de células CD31⁺ (marcador de célula endotelial) nos tumores irradiados formados pelas células PAFR⁺, sugerindo um aumento na angiogênese tumoral durante a repopulação. Outros autores discutem a existência de um fenômeno chamado PIA (*post-irradiation angiogenesis*) que estaria envolvido no crescimento tumoral após a irradiação. Feng *et al* demonstraram que a injeção concomitante de células tumorais apoptóticas (HT29) e células HUVEC em animais Balb/C NUDE promoveu o crescimento acelerado das células endoteliais, possivelmente mediando a radiorresistência tumoral e o retorno do crescimento do tumor (67). Já sabemos que células em apoptose são capazes de sinalizar via receptor do PAF promovendo a proliferação das células tumorais (28). Montrucchio também demonstrou uma correlação positiva entre a densidade vascular, mensurada pela marcação de células positivas para CD31 e CD34 (marcadores de células endoteliais) e a quantidade de PAF presente em amostras de pacientes com carcinoma mamário (46).

Portanto, a ativação do PAFR, seja pelo PAF sintético ou por lipídeos PAF-*like* produzidos durante a radioterapia, induz indiretamente a proliferação de células endoteliais. Alternativamente, estes lipídeos ativariam as células tumorais que expressam PAFR e estas produziriam fatores angiogênicos. Em nosso estudo, mostramos que a proliferação das células endoteliais ocorreu a partir de fatores solúveis produzidos por células tumorais irradiadas, possivelmente pela presença de maiores quantidades de fatores angiogênicos nas culturas de células PAFR⁺ tratadas com cPAF ou irradiadas. De fato, tem sido sugerido que o uso de anticorpos com função de bloquear fatores pró-angiogênicos solúveis no microambiente

tumoral (ex. bevacizumabe; anti-VEGF) representam uma modalidade terapêutica promissora para controlar o crescimento tumoral (68). De qualquer forma estas duas alternativas podem atuar concomitantemente em nosso modelo, mas o que fica bem claro neste estudo é o papel central do PAFR na angiogênese e repopulação tumoral subsequentes a radioterapia. Sugerimos que o uso de antagonistas associados à radioterapia poderá ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de tumores sólidos.

6. Conclusão

Neste trabalho concluímos que:

- A irradiação aumenta a expressão de fatores de crescimento em células tumorais que expressam PAFR, assim como o agonista do receptor. O que pode estar ocorrendo devido à ativação do PAFR por agonista e irradiação aumentarem a ativação da via de ERK;
- A expressão de PAFR nas células tumorais promove a repopulação tumoral e está fortemente relacionada à angiogênese tumoral pós irradiação; sendo tal fenômeno confirmado pelo uso do agonista de PAFR, também sendo capaz de aumentar a angiogênese tumoral;
- Células endoteliais expressam PAFR e o bloqueio do mesmo inibe a proliferação dessas células.
- Células tumorais irradiadas estimulam a proliferação de células endoteliais em condições de co-cultura ou com os fatores solúveis presentes no meio
- A ausência do PAFR no infiltrado tumoral inibe a expressão de fatores angiogênicos e consequente angiogênese pós irradiação.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que a ativação de PAFR por moléculas PAF-*like* geradas durante a irradiação ou agonistas sintéticos promovem um aumento na expressão de fatores pró-angiogênicos no microambiente tumoral, o que favorece a repopulação e a angiogênese pós radioterapia

7. Bibliografia

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
2. Robert EG, Hunt JD. Lipid Messengers as Targets for Antiangiogenic Therapy. 2001;(2):1615–26.
3. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182–6.
4. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;94(15):8104–9.
5. Kazerounian S, Lawler J. Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(1):171–9.
6. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2756–65.
7. De Palma M, Biziato D, Petrova T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017;17(8):457–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.51>
8. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. LEUKOCYTE-DEPENDENT HISTAMINE RELEASE FROM RABBIT PLATELETS. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med*. 1972;136:1356–77.
9. Jancar S, Chammas R. PAF receptor and tumor growth. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2014;15(10):982–7. Available from: <http://www.eurekaselect.com/124337/article>
10. da Silva-Junior IA, Andrade LN de S, Jancar S, Chammas R. Platelet activating factor receptor antagonists improve the efficacy of experimental chemo- and radiotherapy. *Clinics*. 2018;(16):1–6.
11. BONNET J, LOISEAU A., ORVOEN M, BESSIN P. Platelet-activating factor receptor (PAF-receptor) involvement in acute inflammatory and pain processes. 1981;11:559–62.
12. Sahu RP, Harrison KA, Weyerbacher J, Murphy RC, Konger RL, Garrett JE, et al. Radiation therapy generates platelet-activating factor agonists. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(15). Available from: [http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=7878&pubmed-linkout=1](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=7878&pubmed-linkout=1)
13. Harayama T, Shindou H, Shimizu T. Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. *J Lipid Res*. 2009 Sep;50(9):1824–31.

14. Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C. Human Lysophosphatidylcholine Acyltransferases 1 and 2 Are Located in Lipid Droplets Where They Catalyze the Formation of Phosphatidylcholine. *J Biol Chem*. 2011 Jun;286(24):21330–9.
15. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. The Potential Role of Dietary Platelet-Activating Factor Inhibitors in Cancer Prevention and Treatment. 2019;(5):148–64.
16. Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-Activating Factor Receptor. *J Biochem [Internet]*. 2002;131(6):773–9. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/131/6/131_6_773/_article
17. Blank ML, Lee YJ, Cress EA, Snyder F. Stimulation of the de novo pathway for the biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) via cytidyltransferase activation in cells with minimal endogenous PAF production. *J Biol Chem*. 1988;263(12):5656–61.
18. McManus LM, Pinckard RN. PAF, a putative mediator of oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):240–58.
19. 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;40(6):643–72.
20. Zimmerman MA, Huang Q, Li F, Liu X, Li CY. Cell Death-Stimulated Cell Proliferation: A Tissue Regeneration Mechanism Usurped by Tumors During Radiotherapy. *Semin Radiat Oncol [Internet]*. 2013;23(4):288–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2013.05.003>
21. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;69:599–609.
22. Mutoh H, Bito H, Minami M, Nakamura M, Honda Z, Izumi T, et al. Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett*. 1993;322(2):129–34.
23. Ishizuka EK, Filgueiras LR, Rios FJ, Serezani CH, Jancar S. PAFR activation of NF- κ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory responses during TLR activation in murine macrophages. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6(August):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32092>
24. Xu MM, Seas A, Kiyani M, Ji KSY, Bell HN. A temporal examination of calcium signaling in cancer- from tumorigenesis, to immune evasion, and metastasis. *Cell Biosci [Internet]*. 2018;8(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0223-5>
25. Chen YF, Chen YT, Chiu WT, Shen MR. Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):1–10.
26. Ferracini M, Rios FJO, 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.
27. Onuchic AC, MacHado CML, Saito RF, Rios FJ, Jancar S, Chammas R. Expression of PAFR as part of a prosurvival response to chemotherapy: A novel target for combination therapy in melanoma. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:10–5.
 28. da Silva-Junior IA, Dalmaso B, Herbster S, Lepique AP, Jancar S. Platelet-Activating Factor Receptor Ligands Protect Tumor Cells from Radiation-Induced Cell Death. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8(February):10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29459885>
 29. Weltman E. Radiotherapy in Brazil. In 2017. Available from: <https://alatro2017.grupoaran.com/ponencias/5-noviembre/4-radiotherapy-in-brazil-08.11.17.pdf>
 30. Rosa AA. Status da Radioterapia Nacional. In: Seminário de políticas públicas para o câncer de cabeça e pescoço [Internet]. 2019. Available from: <https://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/arquivos-de-eventos/seminarios-e-outros-eventos-2019/apresentacao-felipe-11-07-19-seminario-politicas-publicas-para-o-cancer-de-cabeca-e-pescoco>
 31. Yap ML, Zubizarreta E, Bray F, Ferlay J, Barton M. Global Access to Radiotherapy Services: Have We Made Progress During the Past Decade? *J Glob Oncol.* 2016;2(4):207–15.
 32. Atun R, Jaffray DA, Barton MB, Bray F, Baumann M, Vikram B, et al. Expanding global access to radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2015;16(10):1153–86.
 33. Hubenak JR, Zhang Q, Branch CD, Kronowitz SJ. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(1):49e-56e.
 34. Lumniczky K, Sáfrány G. The impact of radiation therapy on the antitumor immunity: Local effects and systemic consequences. *Cancer Lett* [Internet]. 2013;356(1):114–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.024>
 35. Ebner DK, Tinganelli W, Helm A, Bisio A, Yamada S, Kamada T, et al. The immunoregulatory potential of particle radiation in cancer therapy. *Front Immunol.* 2017;8(FEB):1–8.
 36. Deloch L, Derer A, Hartmann J, Frey B, Fietkau R, Gaipl US. Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation. *Front Oncol* [Internet]. 2016;6(June):1–16. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2016.00141/abstract>
 37. Bachi ALL, Dos Santos LC, Nonogaki S, Jancar S, Jasiulionis MG. Apoptotic cells contribute to melanoma progression and this effect is partially mediated by the platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:7–12.

38. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* [Internet]. 2011;17(7):860–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2385>
39. Da Silva IA, Chammas R, Lepique AP, Jancar S. Platelet-activating factor (PAF) receptor as a promising target for cancer cell repopulation after radiotherapy. *Oncogenesis* [Internet]. 2017;6(1):e296-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2016.90>
40. Travers JB, Edenberg HJ, Zhang Q, Al-Hassani M, Yi Q, Baskaran S, et al. Augmentation of UVB Radiation-Mediated Early Gene Expression by the Epidermal Platelet-Activating Factor Receptor. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2007;128(2):455–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701083>
41. Silva-Jr IA, Stone SC, Rossetti RM, Jancar S, Lepique AP. Modulation of Tumor-Associated Macrophages (TAM) Phenotype by Platelet-Activating Factor (PAF) Receptor. 2017;2017.
42. Bussolati B, Biancone L, Cassoni P, Russo S, Rola-Pleszczynski M, Montrucchio G, et al. PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *AmJPathol*. 2000;157(5):1713–25.
43. Caplan MS, Adler L, Kelly A, Hsueh W. Hypoxia increases stimulus-induced PAF production and release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1992;1128(2–3):205–10.
44. Valli A, Rodriguez M, Moutsianas L, Fischer R, Fedele V, Huang H-L, et al. Hypoxia induces a lipogenic cancer cell phenotype via HIF1 α - dependent and -independent pathways. *Oncotarget*. 2014;6(4).
45. Deo DD, Axelrad TW, Robert EG, Marcheselli V, Bazan NG, Hunt JD. Phosphorylation of STAT-3 in Response to Basic Fibroblast Growth Factor Occurs through a Mechanism Involving Platelet-activating Factor, JAK-2, and Src in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21237–45.
46. Montrucchio G, Sapino A, Bussolati B, Ghisolfi G, Rizea-savu S, Silvestro L, et al. Potential Angiogenic Role of Platelet-Activating Factor in Human Breast Cancer. 1998;153(5):1589–96.
47. Jackson JR, Bolognese B, Mangar CA, Hubbard WC, Marshall LA, Winkler JD. The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab*. 1998;1392(1):145–52.
48. de Oliveira SI, Andrade LNS, Onuchic AC, Nonogaki S, Fernandes PD, Pinheiro MC, et al. Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;10:200.
49. Camussi G, Montrucchio G, Lupia E, De MA, Perona L, Arese M, et al.

- Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism. *J Immunol.* 1995;154(12):6492–501.
50. Honda ZI, Takano T, Gotoh Y, Nishida E, Ito K, Shimizu T. Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1994;269(3):2307–15.
 51. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
 52. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med.* 2011;17(7):860–6.
 53. Izumi T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1995;1259(3):317–33.
 54. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: Potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003;17(7):1263–93.
 55. Massagué J. TGF β in cancer. *Cell [Internet].* 2008;134(2):215–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
 56. Barcellos-Hoff MH. Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland. *Cancer Res [Internet].* 1993;53(17):3880–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8358713
 57. Becker KA, Lu S, Dickinson ES, Dunphy KA, Mathews L, Schneider SS, et al. Estrogen and progesterone regulate radiation-induced p53 activity in mammary epithelium through TGF- β -dependent pathways. *Oncogene.* 2005;24(42):6345–53.
 58. Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT, Jurukovski V, Erickson AC, Walian PJ, et al. Isoform-Specific Activation of Latent Transforming Growth Factor β (LTGF- β) by Reactive Oxygen Species. *Radiat Res [Internet].* 2006;166(6):839–48. Available from: <http://www.bioone.org/doi/10.1667/RR0695.1>
 59. Ruiz-Ortega M, Largo R, Bustos C, Gómez-Garre D, Egido J. Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol JASN [Internet].* 1997;8(8):1266–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259353>
 60. Camussi G, Montrucchio G, Lupia E, Soldi R, Comoglio PM, Bussolino F.

- Angiogenesis induced in vivo by hepatocyte growth factor is mediated by platelet-activating factor synthesis from macrophages. *J Immunol* [Internet]. 1997;158(3):1302–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013973>
61. Tran KC, Ryu JK, McLarnon JG. Induction of angiogenesis by platelet-activating factor in the rat striatum. *Neuroreport* [Internet]. 2005;16(14):1579–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16148749
 62. Ko H-M, Seo KH, Han S-J, Ahn KY, Choi I-H, Koh GY, et al. Nuclear factor (kappa)B dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis. *Cancer Res* [Internet]. 2002;62(6):1809–14. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L34408507%5Cnhttp://elvis.ubvu.vu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=00085472&id=doi:&atitle=Nuclear+factor+kB+dependency+of+platelet-activating+factor-induced+angiogenesis&stitle=Cancer>
 63. Seo KH, Ko H-M, Choi JH, Jung HH, Chun YH, Choi I-W, et al. Essential role for platelet-activating factor-induced NF- κ B activation in macrophage-derived angiogenesis. *Eur J Immunol*. 2004;34(8):2129–37.
 64. Kocabayoglu P, Piras-Straub K, Gerken G, Paul A, Herzer K. Expression of fibrogenic markers in tumor and tumor-surrounding tissue at time of transplantation correlates with recurrence of hepatocellular carcinoma in patients undergoing liver transplantation. *Ann Transplant*. 2017;22:446–54.
 65. Im SY, Ko HM, Ko YS, Kim JW, Lee HK, Ha TY, et al. Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. *Cancer Res*. 1996;56(11):2662–5.
 66. Hackler PC, Reuss S, Konger RL, Travers JB, Sahu RP. Systemic Platelet-activating Factor Receptor Activation Augments Experimental Lung Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Growth Metastasis*. 2014;7:CGM.S14501.
 67. Feng X, Tian L, Zhang Z, Yu Y, Cheng J, Gong Y, et al. Caspase 3 in dying tumor cells mediates post-irradiation angiogenesis. *Oncotarget*. 2015;6(32):32353–67.
 68. Brown JM. Vasculogenesis: A crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *Br J Radiol*. 2014;87(1035).