

MATHEUS FERRACINI

**PARTICIPAÇÃO DO PAF-R NA FAGOCITOSE DE
CÉLULAS APOPTÓTICAS, NO FENÓTIPO DE
MACRÓFAGOS E NA IMUNOSSUPRESSÃO
CAUSADA POR TERAPIA FOTODINÂMICA**

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

São Paulo
2014

MATHEUS FERRACINI

**PARTICIPAÇÃO DO PAF-R NA FAGOCITOSE DE
CÉLULAS APOPTÓTICAS, NO FENÓTIPO DE
MACRÓFAGOS E NA IMUNOSSUPRESSÃO
CAUSADA POR TERAPIA FOTODINÂMICA**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Jancar Negro

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Ferracini, Matheus.

Participação do PAF-R na fagocitose de células apoptóticas, no fenótipo de macrófagos e na imunossupressão causada por terapia fotodinâmica / Matheus Ferracini. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofarmacologia dos mediadores lipídicos.

Versão do título para o inglês: Participation of PAF-R in the phagocytosis cells, in macrophage phenotype and in the immunosuppression caused by photodynamic therapy.

1. Macrófagos 2. Polarização 3. Fagocitose 4. Receptores 5. Fator de ativação de plaquetas 6. Terapia fotodinâmica I. Negro, Profa. Dra. Sonia Jancar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0131/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Matheus Ferracini.

Título da Tese: Participação do PAF-R na fagocitose de células apoptóticas,
no fenótipo de macrófagos e na imunossupressão causada por
terapia fotodinâmica.

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

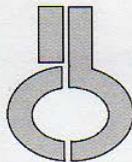
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

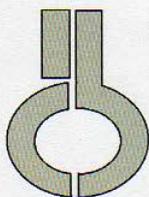
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **31** nas fls. **68** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Sonia Jancar, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **O receptor do PAF na polarização de macrófagos para perfil M1 e M2: localização, interações e vias de sinalização** do qual participou(ar) o(s) alunos **Matheus Ferracini e o pesquisador Francisco José Oliveira Rios**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)* em **26.03.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 30 de março de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

Of.CEUA.012.12

WTL/mcgn

São Paulo, 06 de março de 2012.

REF.: Protocolo nº 31/09.

"O receptor do PAF na polarização de macrófagos para perfil M1 e M2: localização, interações e vias de sinalização"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 26.03.2015..**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

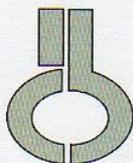
Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa. Dra. SONIA JANCAR NEGRO

Departamento de Imunologia

Instituto de Ciências Biomédicas - USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **005** nas fls. **125** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Sonia Jancar Negro**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O receptor do PAF na polarização de macrófagos para perfil M1 e M2: localização, interações e vias de sinalização*" do qual participam o(s) aluno(s) **Matheus Ferracini e o pesquisador Francisco José de Oliveira Rios**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **08.03.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 12 de março de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

*Dedico esta tese a todas as pessoas que
contribuíram direta ou indiretamente para que a
mesma fosse concluída.*

Muito obrigado!

Esta tese foi desenvolvida no laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2009/03368-3 (bolsa de doutorado no país) e 2006/03982-5 (Projeto Temático), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Parte dos resultados foi obtida na *Indiana University School of Medicine*, Indianapolis - IN/EUA, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2013/00584-2 (bolsa estágio no exterior - BEPE), do *Riley Memorial Association* e do *National Institutes of Health grant R01 HL062996, Veteran's Administration Merit Award 5I01BX000853, ACSIRG 4185607 e Showalter grant*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Prof^a Dr^a Sonia Jancar por ter me acolhido em seu grupo por tantos anos e ter me orientado com tanta paciência, seriedade e motivação. Orgulho-me muito por ter feito parte de um grupo liderado por uma das mais competentes pesquisadoras da área de imunologia e farmacologia no Brasil.

Agradeço o Dr. Francisco José Oliveira Rios pela co-orientação (informal) que teve papel essencial na execução desta tese. Trabalhar e conviver com o Francisco foi enriquecedor. Obrigado, Fran!

Agradeço também todos os outros membros do Laboratório de Imunofarmacologia que conviveram comigo e me aturaram por todos esses anos. Camila, Edson, Ildefonso, Luciano, Mariana Morato, Marianna Koga, Marlise, Mateus, Rachel, Silvana e outros que posso ter esquecido. Obrigado, pessoal!

Além destes, agradeço muito os meus amigos, amigas, colegas e docentes do Departamento de Imunologia, bem como os funcionários, que também foram essenciais e me deram suporte técnico, psicológico, científico, motivacional, etc. Obrigado!

Pelo período que passei nos EUA para realização de estágio em pesquisa, agradeço o Dr. Jeffrey B. Travers por me receber e orientar, também o Dr. Ravi P. Sahu pelos ensinamentos técnico-científicos e pelas conversas durante o “free coffee”. E todas as outras pessoas do grupo e todos os amigos que fiz em Indianápolis. A junção disso tudo resultou nada menos que a maior experiência da minha vida até então. Thanks, guys!

Não tenho palavras para dizer o quanto sou grato por vocês, amigos e familiares, que fizeram com que esta tese ficasse pronta com mais carinho. Vocês são as peças mais importantes deste processo. Obrigado do fundo do meu coração!

Agradeço todos os contribuintes do Estado de São Paulo e demais brasileiros que financiam a formação de tantos profissionais, incluindo a minha, e também o desenvolvimento desta tese. Obrigado!

Por fim, agradeço os órgãos governamentais responsáveis pelo financiamento da formação acadêmica e da pesquisa científica no Estado de São Paulo e no Brasil: a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Ferracini M. Participação do PAF-R na fagocitose de células apoptóticas, no fenótipo de macrófagos e na imunossupressão causada por terapia fotodinâmica. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Os macrófagos produzem o mediador lipídico PAF (*Platelet-Activating Factor*) e expressam seu receptor (PAF-R). Uma das funções primordiais dos macrófagos é a eliminação de células alteradas (eferocitose) e moléculas oxidadas. Um dos receptores responsáveis por esta função é o receptor *scavenger* CD36. Em trabalho anterior, vimos que a internalização de LDL oxidada requer associação do CD36 com o PAF-R. Aqui, investigamos se esta associação também ocorre durante a fagocitose de células apoptóticas (CA). Vimos que o tratamento de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) com antagonistas do PAF-R inibiu a fagocitose em 70%. Neste processo, observamos coimunoprecipitação e colocalização entre PAF-R e CD36. Também observamos coimunoprecipitação destes receptores com a flotilina-1, um marcador de *lipid rafts* (LR). O rompimento dos LR com β CD inibiu a fagocitose de CA. Durante a fagocitose, IL-10 e IL-12p40 foram produzidas e o bloqueio do PAF-R inibiu preferencialmente a IL-10. O mesmo padrão ocorreu em macrófagos estimulados com LPS. A inibição da COX-2 com nimesulida teve efeito similar ao antagonista de PAF-R sobre a produção destas citocinas. Isto sugere que a eferocitose depende da interação do PAF-R com CD36, provavelmente em LR, e que a ativação e a associação destes receptores induz perfil regulador (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) via produção de prostanoídeos. O macrófago tem papel essencial na inflamação imunomediada. Foi proposto que os macrófagos podem adquirir o fenótipo classicamente ativado, alternativamente ativado ou regulador quando estimulados com IFN- γ /LPS, IL-4 ou IgG-SRBC/LPS, respectivamente. Para estudar se o PAF-R participa no estabelecimento destes fenótipos, BMDM foram tratados com antagonista de PAF-R antes dos estímulos acima e feita a análise dos marcadores fenotípicos: MCP-1, TNF- α e iNOS (classicamente ativado), receptor de manose e arginase-1 (alternativamente ativado) e IL-10^{high}/IL-12p40^{low} (regulador). O bloqueio do PAF-R inibiu parcialmente a expressão de marcadores dos três fenótipos, exceto de IL-12p40, sugerindo que estes estímulos induzem PAF que, agindo no PAF-R, modula o fenótipo dos macrófagos na fase efetora da resposta imune. Sabe-se que além do PAF, moléculas PAF-símile são geradas por estímulos ambientais, como a radiação UV, e que a ativação do PAF-R por estas moléculas induz imunossupressão sistêmica. Nós mostramos que a terapia fotodinâmica (PDT), simulada *in vitro* em queratinócitos humanos, gerou PAF e moléculas PAF-símile. A PDT feita em camundongos cinco dias antes da sensibilização com dinitrofluorobenzeno inibiu a reação de hipersensibilidade de contato nos WT, mas não nos PAF-R KO, sugerindo que ligantes de PAF-R gerados durante a PDT tem efeito imunossupressor. Em conjunto, estes resultados mostram que o PAF-R tem papel relevante na remoção de células alteradas e na regulação do processo inflamatório favorecendo a polarização dos macrófagos para fenótipo regulador. A ativação do PAF-R por ligantes gerados durante a PDT contribui para a imunossupressão sistêmica decorrente desta terapia.

Palavras-chave: Macrófago. Fagocitose de células apoptóticas. Fenótipo de macrófagos. Receptor do PAF. Receptor *scavenger* CD36. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Ferracini M. Participation of PAF-R in the phagocytosis of apoptotic cells, in macrophage phenotype and in the immunosuppression caused by photodynamic therapy. [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Macrophages produce the lipid mediator platelet-activating factor (PAF) and express its receptor (PAF-R). Macrophages are responsible for the clearance of altered cells (efferocytosis) and oxidized molecules. One receptor responsible for that function is the scavenger receptor CD36. In previous study, we described that macrophage response to oxidized LDL requires association of CD36 with PAF-R. Here, we evaluated whether this association also occurs during phagocytosis of apoptotic cells (efferocytosis). We showed that treatment of bone marrow-derived macrophages (BMDM) with PAF-R antagonists inhibited the phagocytosis of apoptotic cells (AC) in about 70%. During efferocytosis, coimmunoprecipitation and colocalization of PAF-R with CD36 was observed. Both receptors coimmunoprecipitated with flotillin-1, a lipid rafts (LR) marker. Disruption of LR with β CD inhibited AC phagocytosis. During efferocytosis, IL-10 and IL-12p40 were produced and the blockage of PAF-R reduced preferentially IL-10 production. The same pattern was observed in LPS-stimulated macrophages. Inhibition of COX-2 with nimesulide had similar effects to PAF-R antagonist on the production of these cytokines. These findings suggest that efferocytosis depends on the interaction of PAF-R with CD36, probably in LR, and that this association induces a regulatory phenotype (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) via production of prostanoids. Macrophages have essential role in immune-mediated inflammation. It was proposed that macrophages can acquire distinct phenotypes when stimulated with IFN- γ /LPS, IL-4 or IgG-SRBC/LPS: classically activated, alternatively activated or regulatory phenotype, respectively. Here, we evaluated whether PAF-R is involved in the establishment of these phenotypes. BMDM were treated with PAF-R antagonist before the stimuli and measured the phenotypic markers for classically activated (MCP-1, TNF- α and iNOS); alternatively activated (mannose receptor and arginase-1) and regulatory (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) phenotype. PAF-R blockage reduced the expression of all markers, except IL-12p40. This suggests that these stimuli induce PAF synthesis that engages PAF-R, contributing to the establishment of these phenotypes. It is known that, besides PAF, PAF-like molecules are generated by environmental stimuli, like UV radiation, and that PAF-R engagement by these molecules induces systemic immunosuppression. We showed that photodynamic therapy (PDT), simulated *in vitro* in human keratinocytes, induced PAF and PAF-like species. The PDT administered to the mice five days before sensitization with dinitrofluorobenzene inhibited the contact hypersensitivity reaction in WT, but not PAF-R KO. Altogether, these results show that PAF-R has a relevant role in the clearance of altered cells and regulation of inflammation by favoring macrophages polarization towards regulatory phenotype. Engagement of PAF-R is also involved in the immunosuppression caused by photodynamic therapy.

Keywords: Macrophage. Phagocytosis of apoptotic cells. Macrophage phenotypes. PAF receptor. Scavenger receptor CD36. Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeito do PAF-R e CD36 na fagocitose de células apoptóticas	43
FIGURA 2 - A fagocitose de CA induz imunoprecipitação do PAF-R com o CD36 em macrófagos.....	45
FIGURA 3 - PAF-R e CD36 se colocalizam na membrana de macrófagos durante a fagocitose de células apoptóticas	47
FIGURA 4 - A fagocitose de CA é dependente da integridade dos LR.....	49
Figura 5 - Fagocitose de CA induz interação de marcador de LR (flotilina-1) com PAF-R e CD36.....	50
FIGURA 6 - O bloqueio do PAF-R e CD36 inibe a expressão majoritária de IL-10 sobre IL-12p40 induzida por células apoptóticas em macrófagos	52
FIGURA 7 - A produção de IL-10, e não de IL-12p40, induzida por células apoptóticas e LPS é dependente do PAF-R e do CD36	54
FIGURA 8 - A produção de IL-10 induzida pela fagocitose de CA em macrófagos é via ativação de COX-2	56
FIGURA 9 - Representação esquemática da relação da concentração de IL-10/IL-12p40 (com base nos dados mostrados nas figuras 6, 7 e 8).....	57
FIGURA 10 - Antagonista do PAF-R inibe a expressão de alguns marcadores de macrófagos classicamente ativados.....	59
FIGURA 11 - A expressão de marcadores de macrófagos ativados alternativamente por IL-4 é dependente da ativação do PAF-R.....	60
FIGURA 12 - A expressão de IL-10 por macrófagos reguladores (IL-10 ^{high} /IL-12p40 ^{low}) estimulados por IgG-SRBC/LPS é dependente do PAF-R.....	62
FIGURA 13 - Exemplo de que a produção de IL-8 é dose-dependente de ligante do PAF-R (CPAF) em células KBP que expressam PAF-R	65
FIGURA 14 - PDT induz a formação de ligantes do PAF-R em queratinócitos humanos HaCaT	66
FIGURA 15 - A PDT em células HaCaT resulta em respostas de mobilização de Ca ²⁺ intracelular somente em células KB que expressam PAF-R (KBP)	67

FIGURA 16 - PDT induz a formação de espécies de PAF medidas por espectrometria de massa em linhagem derivada de queratinócitos humanos.....	68
FIGURA 17 - A geração de agonistas do PAF-R pela PDT não é afetada por antioxidantes.....	69
FIGURA 18 - PDT inibe reação de hipersensibilidade de contato ao DNFB de maneira dependente do PAF-R.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 O receptor do PAF e seus ligantes	19
1.2 O macrófago no reconhecimento do <i>self</i> alterado	21
1.3 O espectro de ativação (ou polarização) de macrófagos	22
1.4 O PAF-R na ativação de macrófagos	25
1.5 Ativação do PAF-R em terapias para câncer	27
1.6 Justificativa	28
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material	32
3.2 Animais utilizados	32
3.3 Obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea	33
3.4 Tratamento de macrófagos com antagonistas, inibidores e anticorpo bloqueador	33
3.5 Fagocitose de células apoptóticas	33
3.6 Imunoprecipitação	34
3.7 <i>Imunoblotting</i>	35
3.8 Microscopia confocal	35
3.9 Polarização de macrófagos para ativação clássica e alternativa	36
3.10 Fagocitose de hemácias opsonizadas	36
3.11 Expressão de RNA	37
3.12 Determinação de citocinas por imunoenensaio enzimático	37
3.13 Terapia fotodinâmica <i>in vitro</i>	37

3.14 Bioensaio com células KBP/KBM/KBF (mobilização de Ca²⁺ e produção de IL-8) para detecção de atividade agonista sobre o PAF-R.....	38
3.15 Análise de ligantes do PAF-R por espectrometria de massa.....	39
3.16 Ensaio de hipersensibilidade de contato	40
3.17 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 O PAF-R na fagocitose de células apoptóticas (eferocitose).....	42
<u>4.1.1 A eferocitose é dependente do PAF-R e de CD36.....</u>	<u>42</u>
<u>4.1.2 PAF-R e CD36 interagem e colocalizam na membrana de macrófagos durante a eferocitose.....</u>	<u>43</u>
<u>4.1.3 A eferocitose é dependente da integridade dos <i>lipid rafts</i> e induz a associação do PAF-R e CD36 com um marcador deste microdomínio</u>	<u>48</u>
<u>4.1.4 A eferocitose induz fenótipo regulador em macrófagos (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) de modo dependente da ativação do PAF-R e CD36.....</u>	<u>51</u>
<u>4.1.5 A produção de IL-10 durante a eferocitose depende da ativação da COX-2</u>	<u>55</u>
4.2 O PAF-R no fenótipo de macrófagos polarizados	57
<u>4.2.1 A expressão de marcadores de macrófagos classicamente ativados depende da ativação do PAF-R.....</u>	<u>58</u>
<u>4.2.2 A expressão de marcadores de macrófagos alternativamente ativados depende da ativação do PAF-R.....</u>	<u>59</u>
<u>4.2.3 O estabelecimento do fenótipo regulador depende da ativação do PAF-R</u>	<u>61</u>
4.3 Ligantes de PAF-R são gerados durante terapia fotodinâmica e induzem imunossupressão sistêmica	63
<u>4.3.1 PDT induz a geração de ligantes do PAF-R por queratinócitos humanos</u>	<u>64</u>
<u>4.3.2 PDT induz imunossupressão sistêmica via geração de ligantes do PAF-R</u>	<u>70</u>

5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICES	96
A - Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation	98
B - Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR.....	99
C - Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts	100
D - Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor	101
E - Topical photodynamic therapy induces systemic immunosuppression via generation of platelet-activating factor receptor ligands.....	102
F - Chemotherapeutic agents subvert tumor immunity by generating Platelet-activating Factor agonists.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 O receptor do PAF e seus ligantes

O receptor do fator ativador de plaquetas (PAF-R) pertence à classe dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), contém sete alças transmembrânicas e está presente na membrana plasmática de leucócitos, células endoteliais, plaquetas e outras células. A sinalização do PAF-R se dá pelas subunidades de proteína $G\alpha_q$ ou $G\alpha_i/o$ e sua ativação resulta no aumento dos níveis de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3), Ca^{2+} intracelular e também na diminuição dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Foi mostrado que a adição de toxina pertussis (PTX) — inibidora da $G\alpha_i$ — inibiu totalmente a queda dos níveis de cAMP e parcialmente os níveis de IP_3 após estímulo do PAF-R. Este residual de IP_3 foi anulado com a inibição de subunidade não-sensível a PTX o que, para alguns, sugere que $G\alpha_q$ seria capaz de reconstituir o eixo PAF-R- IP_3 . Isso mostra que as vias de sinalização acionadas pelo PAF-R podem ser distintas de acordo com a subunidade de proteína G envolvida (1, 2).

O PAF-R também foi detectado no envelope nuclear de diversos tipos celulares (3). Ensaio envolvendo núcleos isolados mostraram que o estímulo do PAF-R nuclear pode induzir alterações nos níveis de Ca^{2+} que ativam a via da ERK1/2 (do inglês *Extracellular signal-Regulated Kinases*) e permitem a ligação do fator nuclear- κB (NF- κB) ao DNA para transcrição de genes. Este fenômeno foi inibido pelo uso de PTX, sugerindo que os receptores nucleares estariam acoplados a subunidades da proteína G_i/o (1). Marrache e colegas mostraram que o estímulo do PAF-R nuclear de células endoteliais leva a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) e especulam que a ação do fator ativador de plaquetas (PAF) em receptores da membrana plasmática resultaria em respostas “pró-inflamatórias” imediatas e síntese de PAF no citoplasma que, por sua vez, atuaria em receptores nucleares (4). Estas etapas de ação do PAF em distintos receptores localizados em diferentes compartimentos celulares poderiam ampliar as vias de regulação/mediação da resposta celular a este mediador.

O ligante endógeno do PAF-R primeiramente descoberto foi o PAF (do inglês *Platelet-Activating Factor*). O PAF possui este nome por ter sido primeiramente descrito como indutor da ativação de plaquetas por Henson, Benveniste e Cochrane no início da década de 70. As evidências partiram do fato de que leucócitos de coelhos sensibilizados

quando ativados com o antígeno produziam um mediador solúvel — mais tarde batizado de PAF — que induzia a agregação de plaquetas e liberação de aminas vasoativas (5, 6). Mais tarde, várias outras funções do PAF foram descritas, entre elas a ativação e quimiotaxia de granulócitos, aumento da permeabilidade vascular, contração de músculo liso, broncoespasmo e hipotensão (7).

Assim como a maioria dos mediadores lipídicos, o PAF não existe pré-formado, mas pode ser produzido rapidamente após estímulos celulares específicos. Em células inflamatórias, a ação da fosfolipase A_2 citoplasmática (cPLA₂) gera o ácido araquidônico, que é o precursor dos eicosanoides (prostanoides, leucotrienos, lipoxinas, etc.), e a alquil (ou acil) 2-liso-glicerofosfolina que, sob a ação da PAF-acetiltransferase, origina o PAF. Já a degradação do PAF é feita por dois grupos distintos de PAF acetil-hidrolases (PAF-AH) que são detectáveis pouco tempo após a síntese do mediador, conferindo uma fina regulação da ação do mesmo. Um grupo de PAF-AH tem o PAF especificamente como substrato e é encontrado somente em compartimentos intracelulares. O outro grupo é produzido por monócitos e células de Kupfer, detectado na circulação associado a lipoproteínas e capaz de hidrolisar outros lipídeos similares ao PAF. O PAF é ativo em leucócitos em concentrações da ordem de picomolar (7).

Além do PAF em si, o PAF-R pode ser ativado por moléculas PAF-símile geradas pela oxidação de lipídeos. Isso acontece pela ação de agentes oxidantes, como radicais livres, espécies reativas de oxigênio, etc., que reagem com as ligações duplas das moléculas lipídicas insaturadas gerando nelas porções similares às do PAF que se ligam ao PAF-R. Diferente da biossíntese do PAF por enzimas, a oxidação de lipídeos por agentes oxidantes não é um processo controlado e os produtos gerados são diversos, incluindo isômeros de posição, sendo que cada um pode possuir afinidade distinta pelo PAF-R (8, 9). Além disso, estas moléculas são passíveis de degradação somente por um grupo de acetil-hidrolases, enquanto que o PAF é degradado pelos dois grupos descritos (10). Por possuir diversos ligantes que podem ser gerados descontroladamente, o PAF-R pode ser considerado um componente da fisiopatologia de disfunções causadas por agentes estressores pró-oxidativos (discutido mais adiante).

1.2 O macrófago no reconhecimento do *self* alterado

Os receptores para reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) foram primeiramente descritos para explicar como um número limitado de receptores de fagócitos poderia se ligar a um número bem maior de ligantes de bactérias. Daí, criou-se o conceito de que estes receptores se ligam em porções/motivos padrões estruturalmente comuns encontrados em bactérias, então chamados de PAMPs (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), o que explica como um número limitado de receptores é capaz de reconhecer diversos microrganismos para ativação da imunidade inata (11).

Além dos PAMPs, os PRRs de fagócitos reconhecem também padrões moleculares presentes em células próprias alteradas por estresse oxidativo ou em processo de apoptose que expressam padrões moleculares associados ao dano (12, 13). Assim, analogamente aos PAMPs, foi criado o conceito dos DAMPs (do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*). Foi proposto recentemente (11) que os DAMPs têm epitopos em comum com os PAMPs e que, portanto, a distinção entre eles pode ser apenas de natureza semântica.

Receptores envolvidos no reconhecimento de células/moléculas próprias alteradas foram descritos originalmente como receptores *scavenger*. Dentre os receptores *scavenger*, um dos mais estudados é o CD36, ao qual foi atribuída a capacidade de reconhecer lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas (oxLDL) e outras lipoproteínas oxidadas, além de células mortas (14). Estudos realizados por nosso grupo mostraram que a endocitose de oxLDL por macrófagos era dependente da ativação não só de CD36, mas também do PAF-R. Além disso, mostramos que o estímulo de macrófagos com oxLDL induziu a expressão de interleucina (IL)-10 e TGF- β (do inglês *transforming growth factor- β*) e inibiu citocinas pró-inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeo (LPS), como IL-12p40, e que a produção destas citocinas foi dependente da ativação de ambos CD36 e PAF-R (15, 16). Estes resultados mostram que a associação de um receptor *scavenger* com o PAF-R induz um perfil anti-inflamatório. Já havia sido descrito que PRRs do tipo *toll*, manose e dectina se associam com receptores para leucotrienos, e que esta associação leva o macrófago para um perfil pró-inflamatório e ativa a capacidade microbicida destas células (17, 18). Portanto, PRRs

podem associar-se com GPCRs para mediadores lipídicos, promovendo respostas distintas dos macrófagos.

O CD36 também reconhece células apoptóticas por ligar em porções de fosfatidilserina oxidada (DAMP) na superfície destas células (19-21). Existem evidências que sugerem que o PAF-R também é capaz de reconhecer estas células (22) e que a fagocitose de células apoptóticas induz um perfil anti-inflamatório (23-26). Porém, ainda não se sabe se o PAF-R e o CD36 atuam conjuntamente para a ingestão das CA e ativação dos macrófagos assim como descrito para oxLDL.

1.3 O espectro de ativação (ou polarização) de macrófagos

Os macrófagos são considerados células-chave do sistema imune na resistência a infecções por sua capacidade de reconhecer patógenos, fagocitá-los e eliminá-los, bem como apresentar antígenos para acionamento da imunidade adquirida e consequente amplificação da resposta contra a infecção. Além disso, estas células também atuam na imunidade contra tumores e, de modo tão ou mais importante, participam da homeostasia ao atuarem no *clearance* de células apoptóticas ou senescentes e no remodelamento tecidual e cicatrização (27, 28).

Para atuar nestas diferentes funções, os macrófagos, ao serem ativados, podem se diferenciar em subpopulações heterogêneas, dependendo dos estímulos provenientes do microambiente em que estão inseridos (29, 30). Com isso, diversos estudiosos criaram sistemas de classificação dos macrófagos com base nas características que estas células adquirem em diferentes contextos. Primeiro, criou-se um conceito de classificação bipolarizado de macrófagos, com a ativação clássica e a ativação alternativa. Esta classificação foi inspirada por outra classificação criada por Mosmann, Coffman e colegas que, na época, propuseram a existência de dois subtipos de células T auxiliaadoras — TH1 e TH2 — envolvidas em diferentes padrões de resposta imune (31, 32). De modo geral, as células TH1 — relacionadas com a ativação clássica dos macrófagos — estão envolvidas na resposta imune celular contra patógenos intracelulares e orquestram esta resposta com a produção da citocina interferon- γ (IFN- γ). Já as células TH2 — relacionadas à ativação

alternativa dos macrófagos — são produtoras de IL-4 e estão envolvidas em infecções por parasitas extracelulares e na imunidade humoral (33).

Porém, macrófagos produtores de citocinas relacionadas com a regulação da resposta imune, como IL-10 e TGF- β , não se encaixavam no contexto de classificação de células da ativação clássica ou alternativa. Mantovani e colegas integraram as similaridades e diferenças fenotípicas dos macrófagos agrupando-os ainda em dois estados funcionalmente polarizados (M1 e M2), porém, admitindo-se subdivisões dentro do grupo M2 (34). Nesta classificação, os macrófagos M1, gerados por IFN- γ e LPS ou fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são caracterizados pelo alto potencial microbicida e por produzirem níveis elevados de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). *In vivo*, estes macrófagos estão relacionados com a imunidade contra infecções, principalmente por parasitas intracelulares. As características fenotípicas dessas células contribuem para o controle da fase aguda de infecções, com estabelecimento da inflamação, recrutamento/ativação de neutrófilos e macrófagos, maturação de células dendríticas e apresentação de antígenos para linfócitos T e consequente eliminação dos patógenos (35, 36). Porém, em algumas situações de infecção, a polarização prolongada de macrófagos para M1 pode ser danosa para o hospedeiro e resultar em lesão tecidual, tornando, em alguns casos, a inflamação como a causa de doenças. Além disso, polarização prolongada de macrófagos em M1 foi correlacionada com maior gravidade da inflamação sistêmica na sepse por bactérias gram negativas (37, 38).

Do outro lado estão as células M2 que, nesta classificação, foram subdivididas em três grupos: M2a, M2b e M2c. As células M2a são similares às da ativação alternativa e geradas pelas citocinas IL-4 ou IL-13 características da resposta tipo TH2. Estas células possuem expressão aumentada de receptor de manose, arginase-1 e alguns receptores *scavenger*. Apesar de pertencerem ao contexto de resposta TH2, o papel destas células na imunidade contra helmintos e na hipersensibilidade tipo I ainda é controverso. Porém acredita-se que as mesmas tenham papel importante na cicatrização tecidual por produzirem precursores de matriz extracelular, como colágeno e poliaminas (39, 40).

Os macrófagos M2c são gerados por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e também por hormônios como glicocorticoides. Por produzirem mais IL-10 e TGF- β , estão

relacionadas com imunorregulação e remodelamento tecidual. Em paralelo às células M2a, linfócitos da resposta imune tipo Th2 podem gerar células M2c pela produção de IL-10 e estas atuarem como potentes supressoras da inflamação induzida pela resposta Th1 (41).

Os M2b foram descritos inicialmente pelo grupo de David Mosser que mostrou que macrófagos estimulados com hemácias de carneiro (SRBC) opsonizadas com imunoglobulina G (IgG-SRBC) e LPS apresentavam a expressão de IL-12 bastante reduzida e a expressão de IL-10 consideravelmente alta (fenótipo IL-10^{high}/IL-12^{low}) (42-44). Mais tarde, o mesmo grupo fez um estudo de caracterização bioquímica e funcional de três diferentes populações de macrófagos ativados (45). Neste estudo, os macrófagos classicamente ativados foram gerados por estímulos com IFN- γ /LPS, similar às células M1. Os macrófagos alternativamente ativados foram gerados pelo estímulo com IL-4, similar às células M2a. Por fim, os macrófagos ativados do tipo II foram primados com IFN- γ e depois estimulados com imunocomplexos e LPS. De modo geral, baseando-se na detecção de alguns marcadores gerados *in vitro* e avaliando a atividade dos macrófagos *in vivo*, os autores defendem que macrófagos alternativamente ativados diferem bastante dos macrófagos ativados tipo II, apesar de estarem agrupados dentro da classificação M2 por Mantovani e colegas (34). Além disso, devido ao fato de células M2b e M2c apresentarem fenótipos semelhantes (IL-10^{high}/IL-12^{low}), apesar de estímulos distintos, o mesmo autor propôs em uma revisão simplificar a classificação de ativação de macrófagos em apenas três tipos: classicamente ativados, alternativamente ativados e reguladores, análogos, respectivamente, às células M1, M2a e M2b + M2c (46), conforme esquematizado na ilustração a seguir.

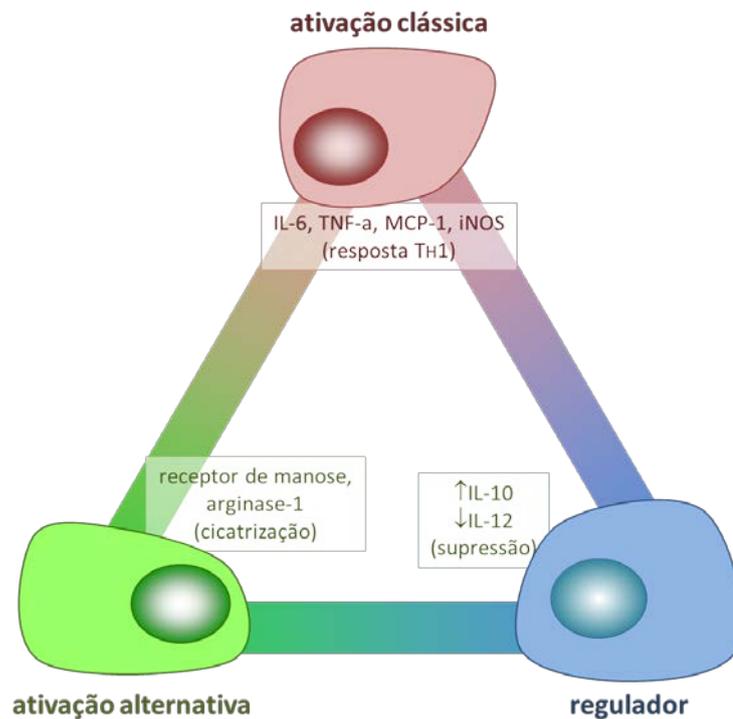


Ilustração simplificada baseada em revisão de Fleming e Mosser (46) mostrando os três principais subtipos de macrófagos e alguns dos seus marcadores que foram utilizados nesta tese para demonstração da modulação da polarização destas células *in vitro*.

1.4 O PAF-R na ativação de macrófagos

Dentre suas diversas funções, o papel do PAF na resistência a infecções de diversas etiologias foi bastante estudado. Pesquisas conduzidas em nosso laboratório mostraram que a adição de PAF a macrófagos peritoneais murinos infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis* inibiu a infecção, e que o bloqueio do PAF-R com antagonista aumentou o número de parasitas. *In vivo*, o PAF endogenamente produzido durante a infecção teve efeito semelhante, visto que o tratamento com antagonista de PAF-R aumentou significativamente o número de parasitas no baço, linfonodo e também nas lesões (47). De modo similar, Aliberti e colegas descreveram que macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* produziam o PAF que aumentava a atividade microbicida destas células via produção de óxido nítrico (NO), visto que o tratamento destas células com antagonista de PAF-R inibia esta função dos macrófagos. Novamente, o bloqueio do PAF-R em camundongos aumentou a parasitemia e mortalidade dos animais infectados com *T. cruzi*

(48). Isto foi confirmado em estudos de Talvani e colegas que mostraram que animais deficientes do PAF-R (PAF-R KO) infectados por *T. cruzi* morriam mais cedo e tinham quantidade maior de parasitas no baço, linfonodo, músculo cardíaco e no sangue (49). Outro estudo envolvendo animais tratados com antagonista de PAF-R ou deficientes do receptor mostrou que estes animais morriam precocemente quando infectados com *Klebsiella pneumoniae* (50). Estes estudos mostram que o PAF potencializa a atividade microbicida de fagócitos, o que é uma característica dos macrófagos classicamente ativados. Além disso, infecções por *Leishmania* e *T. cruzi* são conhecidas por induzirem resposta do tipo TH1 dependentes da expressão de IFN- γ (51, 52). Isto sugere que, em condições de infecção com resposta do tipo TH1, o PAF esteja envolvido com a polarização de macrófagos contribuindo para o estabelecimento de fenótipo de células classicamente ativadas, porém faltam estudos para demonstrar esta hipótese.

O fenótipo regulador de macrófagos não é induzido somente por estímulo via receptor para porção Fc de IgG (Fc γ R). Alguns autores descrevem em revisões que macrófagos associados a tumor (TAM) possuem características IL-10^{high}/IL-12^{low}, e que esta polarização seria promovida por citocinas produzidas por linfócitos T ou pelas próprias células tumorais. Os TAM, além de possuírem baixa citotoxicidade contra células tumorais, contribuem para o crescimento e metástase de tumores por produzir fatores pró-angiogênicos e fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, fatores de crescimento de fibroblastos, TGF- β , fator de crescimento endotelial vascular, quimiocinas, etc.), além de citocinas imunossupressoras (IL-10, etc.) que inibem a diferenciação/maturação de células dendríticas e a inflamação no microambiente tumoral (53-56).

Neste sentido, existem evidências de que o PAF possa modular os macrófagos para um fenótipo regulador. Em estudo realizado em nosso laboratório, Fecchio e colegas mostraram que durante o crescimento do tumor ascítico de Erlich (TAE), os macrófagos peritoneais perdiam as características de células ativadas (capacidade de espriar sobre vidro e de produzir peróxido de hidrogênio), e que o tratamento dos animais com antagonistas de PAF-R reverteu esta supressão e, mais ainda, reduziu o crescimento do tumor (57, 58). Mais recentemente, outros trabalhos mostraram que o antagonista do PAF-R inibiu o crescimento do melanoma murino B16F10 e que sua associação com quimioterápico diminuiu significativamente a mortalidade dos portadores deste tumor. Interessantemente,

foi achado que o antagonista de PAF-R reduziu significativamente o número de células expressando galectina-3, considerada um marcador de células reguladoras dentro da massa tumoral (59-61). Em conjunto, estes estudos sugerem que a ativação do PAF-R contribui para o aumento do tumor por modular a resposta imune contra tumores e sugerem que esta modulação aconteça em macrófagos ao induzir a ativação destas células para fenótipo similar ao regulador ou dos chamados TAM. Porém, ainda não foi mostrado se o PAF-R participa diretamente no estabelecimento do fenótipo regulador de macrófagos ativado por IgG-SRBC/LPS ou por qualquer outro estímulo capaz de induzir o fenótipo IL-10^{high}/IL-12p40^{low}.

1.5 Ativação do PAF-R em terapias para câncer

Conforme descrito anteriormente, agentes estressores pró-oxidativos podem promover a oxidação de lipídeos de modo aleatório e não enzimático. Muitos destes lipídeos oxidados podem atuar como moléculas PAF-símile pela capacidade de ativar o PAF-R (8, 9). Já foram descritos diversos agentes estressores pró-oxidativos, inclusive estressores ambientais, capazes de gerar moléculas PAF-símile, dentre eles combustível de avião (62), luz ultravioleta B (UVB) (63-65) e fumaça de cigarro (66). Em um dos estudos, foi mostrado que camundongos expostos a fumaça de cigarro apresentaram ligantes do PAF-R no sangue e que isto induziu resposta diminuída de reações de hipersensibilidade de contato ao DNFB somente em animais selvagens (WT), mas não em PAF-R KO (66). Outro estudo do mesmo grupo mostrou que a exposição de camundongos a luz UVB, conhecida por induzir oxidação lipídica com formação de ligantes do PAF-R, aumentou o crescimento de melanoma B16F10 em camundongos e que este aumento aconteceu somente em animais WT, mas não em PAF-R KO (65). Estes trabalhos mostram que a geração de ligantes do PAF-R, e consequente ativação deste, culmina em imunossupressão sistêmica, nestes casos demonstrada em reação de hipersensibilidade de contato e em crescimento tumoral. Porém, os mecanismos envolvidos nesta imunossupressão sistêmica ainda não foram totalmente esclarecidos. Um melhor conhecimento destes mecanismos poderia contribuir, por exemplo, para amenização de quadros de imunossupressão decorrentes de tratamentos que induzem morte celular e estresse oxidativo, como tratamentos anticâncer.

1.6 Justificativa

A função primordial dos macrófagos tem a ver com a remoção de células alteradas/senescentes (eferocitose), moléculas oxidadas e tecidos que se tornam obsoletos durante a embriogenese ou metamorfose. Já havia sido relatado por Metchnikoff no século 19 que este processo é “silencioso”, ou seja, os macrófagos não adquirem propriedades pró-inflamatórias (67). Existem evidências de que o PAF-R está envolvido na remoção de moléculas oxidadas quando adquire um fenótipo regulador, como discutido na introdução. Porém, não se sabe se o PAF-R está envolvido na eferocitose e que fenótipo ele adquire nesta situação.

Os macrófagos tem papel fundamental na fase efetora da resposta imune quando sofrem influência de citocinas de linfócitos ou fagocitam complexos imunes via receptor para porção Fc de anticorpos. Nestas situações, podem adquirir fenótipos clássica ou alternativamente ativados ou regulador conforme discutido acima. Não se sabe se o PAF-R contribui para o estabelecimento destes fenótipos.

Além disso, o PAF-R está relacionado à indução de imunossupressão sistêmica provocada por estresse oxidativo (68). Terapias anticâncer, por exemplo, induzem morte das células pela geração de espécies reativas de oxigênio, e é sabido que as mesmas causam imunossupressão sistêmica como efeito colateral (69, 70). É provável que algumas destas terapias induzam a geração de ligantes do PAF-R, o que enquadraria este receptor como componente deste efeito colateral e também candidato a alvo terapêutico para otimização de protocolo de terapias anticâncer.

2 OBJETIVOS

Foram objetivos desta tese estudar a participação do PAF-R:

a) na eferocitose e fenótipo dos macrófagos, além de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na associação do receptor CD36 com o PAF-R;

b) no estabelecimento dos fenótipos classicamente ativado, alternativamente ativado e regulador;

c) na imunossupressão sistêmica causada por terapia fotodinâmica, além de estudar a produção de ligantes do PAF-R por queratinócitos submetidos a esta terapia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Soro fetal bovino (SFB), meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), L-glutamina e HEPES foram obtidos da Gibco (Long Island, EUA); lipopolissacarídeo (LPS), penicilina, estreptomicina, nimesulida, dexametasona, α -ciclodextrina (α CD), metil- β -ciclodextrina (β CD), coquetel inibidor de proteases, IgG anti-IgG de camundongo e coelho conjugada com peroxidase, ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), *Hank's balanced salt solution* (HBSS), albumina sérica bovina (BSA), Pefabloc® SC, vitamina C, N-acetilcisteína, FURA-2-AM, 1-o-Palmitoil-2-(N-metilcarbamil)-sn-glicero-3-fosfocolina (CPAF), N-Formil-Met-Leu-Phe (fMLP), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (DNFB) e histamina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); kit *ECL reagent* e membranas PVDF para *western blotting* da GE Healthcare (Uppsala, Suécia); kit BCA da Thermo-Scientific (Rockford, EUA); WEB2170 (antagonista do PAF-R) gentilmente cedido por Boehringer-Ingelheim (Pharma KG, Alemanha); Interferon- γ e interleucina-4 da Peprotech (Rocky Hill, EUA); WEB2086 (antagonista do PAF-R) da Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido); CV3988 (antagonista do PAF-R) da Enzo Lifesciences (Farmingdale, EUA); IgG anti-Arginase-1, anti-iNOS e anti-PAF-R da Cayman Chemical (Ann Arbor, EUA); IgA monoclonal anti-CD36 (clone CRF D-2712) da BD Biosciences (Franklin Lakes, EUA); Etanol, metanol e diclorometano da Synth (Diadema, Brasil) ou da Merck (Whitehouse Station, EUA).

3.2 Animais utilizados

Os protocolos de estudos envolvendo animais de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais do ICB/USP ou pela *Institutional Animal Care and Use Committee* da *Indiana University School of Medicine*. Os camundongos da linhagem C57BL/6 WT foram obtidos do biotério de camundongos isogênicos do ICB/USP e também da Charles Rivers Laboratories (Wilmington, EUA). Os camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes do PAF-R (PAF-R KO) foram gerados conforme descrito (71) e gentilmente cedidos pelo Prof. Takao Shimizu (Department of Biochemistry, University of Tokyo, Tokyo, Japan). Exceto para obtenção de timos, os animais utilizados tinham cerca oito semanas de vida e foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 h a 23 °C com acesso a comida e água *ad libitum*.

3.3 Obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea

Após remoção das epífises do fêmur, células da medula óssea foram obtidas por jato do canal medular utilizando seringa e agulha 26-G x 1/2" em ambiente estéril. Para obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), células da medula óssea foram incubadas com meio condicionado (DMEM suplementado com 15% de SFB e 20% de sobrenadante de sete dias de cultura de células L929) a 37 °C/5% CO₂. Após três dias, adicionou-se o mesmo volume de meio condicionado fresco às células e incubou-se por mais três dias. No sexto dia, o sobrenadante foi descartado e as células não aderentes removidas por três lavagens com PBS pré-aquecido. Das células aderentes, 96% foram detectadas como duplo-positivas para F4/80 e CD11b. Os macrófagos foram contados, replaqueados e cultivados em DMEM contendo SFB (5%) *overnight* (37 °C/5% CO₂) antes dos estímulos experimentais (adaptado de (72, 73)).

3.4 Tratamento de macrófagos com antagonistas, inibidores e anticorpo bloqueador

Antagonistas do PAF-R foram adicionados aos macrófagos 30 min antes dos estímulos nas seguintes concentrações: WEB2170 a 50 µM, WEB2086 a 50 µM, CV3988 a 10 µM. O receptor *scavenger* CD36 foi bloqueado com anticorpo IgA específico adicionado aos macrófagos a 1 µg/mL por 30 min antes da adição de CA. A nimesulida, droga inibidora seletiva da COX-2, foi adicionada 30 min antes das CA a 10 µM. Metil-β-ciclodextrina (βCD, depleta colesterol de membrana e rompe LR a 1 mM) e α-ciclodextrina (αCD, análogo químico do βCD sem efeito sobre o colesterol a 1 mM) foram adicionados aos macrófagos por 10 min antes da adição de CA. As doses utilizadas aqui foram baseadas em estudos previamente realizados por nosso grupo ou por outros (16, 22, 74, 75). Os grupos descritos como veículo foram tratados com etanol nas mesmas concentrações utilizadas para adição das drogas.

3.5 Fagocitose de células apoptóticas

Timos de camundongos C57BL/6 jovens (entre quatro e seis semanas de vida) foram removidos em ambiente estéril, macerados e passados em peneiras para obtenção de suspensão de células soltas. Suspensão contendo cerca de 10^6 timócitos/mL em DMEM/SFB 10% foi incubada com dexametasona a $1 \mu\text{M}$ por 6 h a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Este protocolo permite a obtenção de 50 a 60% de células positivas para anexina V (76). Após três lavagens das células não aderentes por centrifugação para remoção da dexametasona, as mesmas foram contadas e adicionadas aos BMDM (estes em placas de 96 poços) na proporção de 10 por macrófago e incubados por 24 h. Em alguns experimentos, LPS foi adicionado para concentração final de 10 ng/mL por mais 24 h. Para determinação do índice fagocítico, BMDM plaqueados em lamínulas de vidro dentro de placas de 24 poços foram pré-tratados com antagonistas de PAF-R e anticorpo bloqueador de CD36 e incubados com os timócitos apoptóticos na proporção de 10 para 1 por 90 min. Após lavagem para remoção de células não fagocitadas, as lamínulas foram coradas com hematoxilina e eosina. O índice fagocítico corresponde ao produto da porcentagem de macrófagos que fagocitaram ao menos uma CA pelo número de CA fagocitadas e foi determinado por contagem cega por mais de uma pessoa.

3.6 Imunoprecipitação

BMDM foram tratados com PAF (100 nM) ou timócitos apoptóticos (10 por macrófago) por 20 min. Após lavagem para remoção de células soltas, as aderentes foram lisadas sem agitação em gelo por 30 min com tampão HEPES contendo 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1% triton X-100, coquetel inibidor de proteases e inibidores de fosfatases NaF e Na_3VO_4 (Calbiochem-Merck Chemicals, Nottingham, UK). Os lisados foram incubados *overnight* com anticorpo primário anti-PAF-R feito em coelho (Cayman Chemical, Ann Arbor, EUA) ou IgA monoclonal anti-CD36 (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) a 4°C com leve agitação. Proteína A-Sefarose e proteína G-Sefarose (ambas da GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foram adicionadas às amostras contendo anti-PAF-R ou anti-CD36, respectivamente, e incubadas por 3 h a 4°C com leve agitação. Imunocomplexos ligados a *beads* foram lavados três vezes com tampão HEPES contendo inibidores de proteases sem triton X-100, fervidos em tampão de amostra contendo SDS por 5 min e submetidos a *imunoblotting*.

3.7 Immunoblotting

A concentração de proteínas foi determinada utilizando kit BCA. Quantidades iguais de proteína (30 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida (10%) contendo SDS e transferidas a membrana de PVDF. Após bloqueio dos sítios inespecíficos das membranas com leite em pó desnatado a 5% (Molico-Nestle, São Paulo, Brasil), anticorpos anti-Arginase-1, anti-iNOS, anti-CD36 e anti-flotilina-1 feitos em camundongos e anti-PAF-R feito em coelho foram incubados a 4° C. Após 18 h, foram feitas lavagens e incubação de anticorpo anti-IgG de camundongo (1:1000) ou de coelho (1:2000) conjugados com peroxidase (Cell Signaling Technology, Beverly, EUA) ou anti-IgA conjugado com biotina (1:500) (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) com estreptavidina-peroxidase (1:200) (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A detecção foi feita utilizando agente quimioluminescente ECL (Thermo Scientific, Rockford, EUA). Os autoradiogramas foram analisados com o software AlphaEaseFC® v3.2 beta (Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

3.8 Microscopia confocal

A colocalização do PAF-R com o CD36 induzida por CA foi analisada por microscopia confocal. Os macrófagos foram plaqueados em lâminas de vidro compartimentalizadas com poços (Nunc, Rochester, EUA) e estimulados ou não com PAF ou CA por 20 min. Para a visualização da colocalização, os macrófagos foram fixados com paraformaldeído a 3% por 30 min e bloqueados com 5% SFB em PBS por 1 h para posterior incubação com anticorpos específicos anti-PAF-R (1:100) e IgA anti-CD36 (1:100) ou com controle de isotipo em 1% BSA por 1 h a temperatura ambiente. Anti-IgG de coelho (1:100) conjugado com Alexa Fluor 647 (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e anti-IgA de camundongo conjugado com biotina (1:200) mais estreptavidina conjugada com ficoeritrina (1:200) (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) foram utilizados como anticorpos secundários. Células incubadas somente com os anticorpos secundários foram utilizadas para controle do background de cada fluoróforo. As lâminas foram montadas com reagente Prolong Gold contendo DAPI (Life Technologies, Carlsbad, EUA). As amostras foram observadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 em objetiva de 100x. As imagens confocais foram obtidas com configuração idêntica para permitir comparação de marcações. Seções

confocais únicas das células foram capturadas em *multitrack*. Cada imagem de um dado tratamento é representativa de ao menos vinte células analisadas em três experimentos independentes. A colocalização foi quantificada pela análise de ao menos dez imagens determinando-se o coeficiente de Pearson utilizando o *plugin* JACoP (*Just Another Colocalisation Plugin*) no software ImageJ® 1.46r (NIH, Maryland, EUA), disponível pelo website <http://imagej.nih.gov/ij/> (77). Basicamente, uma equação linear é calculada para descrever a relação entre as intensidades de duas imagens (cores separadas). A inclinação desta aproximação linear fornece o grau de associação de dois fluorocromos, e o coeficiente de Pearson avalia o quão boa é esta aproximação (78).

3.9 Polarização de macrófagos para ativação clássica e alternativa

BMDM foram plaqueados em placas de seis poços, incubados *overnight* em DMEM + SFB 5% e tratados com WEB2170 a 50 μ M por 30 minutos antes da adição de INF- γ a 5 ng/mL e LPS a 50 ng/mL para ativação clássica ou adição de IL-4 a 20 ng/mL para ativação alternativa e incubados a 37 °C/5% CO₂ por 18 h (RT-PCR em tempo real) ou 24 h (ELISA e *immunoblotting*). Os sobrenadantes foram coletados e analisados por ELISA. As células foram lisadas com tampão de lise (1% Nonidet P40, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, SDS 0,1%, pH 8,0) suplementado com coquetel inibidor de protease e inibidores de fosfatase.

3.10 Fagocitose de hemácias opsonizadas

O ensaio de fagocitose via Fc γ R foi realizado conforme descrito anteriormente (79). Resumidamente, hemácias de carneiro (SRBC; bioBoaVista, Valinhos, Brasil) foram lavadas 3 vezes por centrifugação e, em suspensão contendo 10⁹ SRBC, foi adicionada IgG de coelho anti-SRBC (Cappel Organon Teknika, Durham, NC - EUA) em concentração subaglutinante. Após incubação por 30 min a 37 °C, as hemácias opsonizadas com IgG (IgG-SRBC) foram novamente lavadas para remoção de excesso de IgG, adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 e incubadas a 37 °C por 18 h. Em alguns experimentos, LPS foi adicionado para concentração final de 10 ng/mL por mais 24 h.

3.11 Expressão de RNA

Após o estímulo para ativação alternativa com IL-4 por 18 h, o RNA dos BMDM foi isolado utilizando-se TRIzol[®] reagent (Life Technologies, Carlsbad, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para reação em cadeia da polimerase (PCR), o cDNA foi sintetizado utilizando-se *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis[®]* Kit (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canadá) de acordo com as instruções do fabricante. PCR-master mix Power SYBR Green[®] (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) contendo os *primers* específicos (abaixo) foi adicionado às amostras.

Receptor de manose *Forward*: GATATGAAGCCATGTACTCCTTACTGG

Receptor de manose *Reverse*: GGCAGAGGTGCAGTCTGCAT

Arginase-1 *Forward*: TTCTCAAAGGACAGCCTCG

Arginase-1 *Reverse*: AGCTCTTCATTGGCTTTCCC

HPRT *Forward*: CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC

HPRT *Reverse*: GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC

PCR em tempo real foi realizada utilizando o sistema Stratagene Mx3005PTM qPCR Systems[®] (Santa Clara, EUA). Expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito anteriormente (80) utilizando HPRT como *housekeeping*.

3.12 Determinação de citocinas por imunoenensaio enzimático

Após o estímulo com citocinas ou IgG-SRBC ou CA, os sobrenadantes das culturas foram centrifugados para remoção de células não aderentes ou não fagocitadas. A detecção de MCP-1, TNF- α , IL-10 e IL-12p40 foi feita por imunoenensaio enzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (BD OptEIA[®], BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA).

3.13 Terapia fotodinâmica *in vitro*

Células da linhagem de queratinócitos humanos HaCaT foram originalmente obtidas da Dra. Petra Boukamp (Heidelberg, Alemanha) e mantidas em DMEM contendo SFB 10%. As células foram cultivadas até confluência de aproximadamente 90-100% em placas de 10 cm de diâmetro e incubadas (37 °C/5% CO₂) com ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) a 1 mM diluído em meio de cultura (10 mL por placa) por 4 h no escuro. As células foram então lavadas três vezes com HBSS e incubadas com 2 mL de HBSS pré-aquecido contendo BSA livre de ácidos graxos (10 mg/mL) e inibidor de serino-hidrolase Pefabloc® SC (1 µM). Em alguns experimentos, vitamina C (2,5 mM) ou N-acetilcisteína (5 mM) foi adicionada por 60 min. Em seguida, as células na placa foram expostas a fonte de luz azul de 415 nm (Acne 415 Blue Light Therapy 38 LED Bulb, Honkon Technologies Co., Ltd., China) em doses de 10 ou 20 J/cm² (taxa de irradiação de 12 mW/cm²), e incubadas por 0, 30 ou 60 min (37 °C/5% CO₂). Lipídeos totais das células foram obtidos por extração utilizando diclorometano de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (81).

3.14 Bioensaio com células KBP/KBM/KBF (mobilização de Ca²⁺ e produção de IL-8) para detecção de atividade agonista sobre o PAF-R

Células KBP (que expressam PAF-R) e KBM (deficientes de PAF-R) transduzidas com vetor retroviral MSCV2.1, e células KB transduzidas com receptor para formil-peptídeo-1 (KBF) foram desenvolvidas conforme descrito anteriormente (82). Para mobilização de cálcio: células KBP e KBF foram pré-incubadas com indicador fluorescente sensível ao Ca²⁺, Fura-2-AM (4 µM em HBSS), a 37 °C/5% CO₂ por 90 min, lavadas e ressuspensas em HBSS a temperatura ambiente. Extratos lipídicos de células HaCaT expostas ou não a PDT foram adicionados a uma alíquota destas células (1,0 - 1,5 × 10⁶ células em 2 mL) em uma cubeta a 37 °C com agitação constante. Os extratos lipídicos foram normalizados pelo número de células (2,5 × 10⁶ células). CPAF e fMLP dissolvidos em etanol (ajustado para 1 µM) foram utilizados como controles positivos para células KBP e KBF, respectivamente. A fluorescência do Fura-2 foi monitorada por espectrofotômetro Hitachi F-4010 (Tóquio, Japão) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 331 e 410 nm, respectivamente. O influxo de Ca²⁺ nas suspensões foi calculado como descrito e mostrado como porcentagem do pico máximo de influxo de cálcio induzido por CPAF ou fMLP (64, 66, 82, 83). Para produção de IL-

8: células KBP e KBM foram plaqueadas em placas de 12 poços (2×10^5 células em 1 mL/poço) em DMEM contendo SFB 10%. Após 18 h, o meio de cultura foi trocado por meio pré-aquecido sem SFB para se evitar a presença de hidrolases que poderiam degradar os analitos. As células foram estimuladas com os extratos lipídicos das células HaCaT (lipídeos de $2,5 \times 10^6$ células em 1 mL/poço) diluídos em DMEM sem SFB e incubados por 6 h a 37 °C/5% CO₂. Os sobrenadantes foram coletados e quantidades de IL-8 determinadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Como controle positivo da produção de IL-8 por células KBP e KBM, CPAF (100 nM) e PMA (10 nM) foram respectivamente adicionados às células.

3.15 Análise de ligantes do PAF-R por espectrometria de massa

Após a PDT em células HaCaT, os lipídeos foram extraídos de $4 - 6 \times 10^7$ células utilizando o método de Bligh e Dyer (81). Cinco nanogramas de 1-o-hexadecil-2-[2,2,2-²H₃]acetoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (d₃-PAF) foram adicionados durante as extrações como padrões internos bem como cinco nanogramas de cada d₃-PACPC, d₃-18ePAF e d₃-SACPC marcados com deutério para padrão de referência de tempo de retenção. Fosfatidilcolinas oxidadas (ox-GPC) foram isoladas da maioria dos outros lipídeos, como descrito (84, 85). Hidroxitolueno butilado foi adicionado (50 µL of 10 µM) para frações de 4 mL de metanol:água (4:1) para prevenir reações de oxidação durante o transporte das amostras. Estas foram transportadas *overnight* em gelo seco e armazenadas a -70 °C até evaporação total a vácuo no aparelho Savant Speed Vac Plus® modelo SC110A (Thermo-Scientific, Rockford, EUA) em configuração de baixa temperatura. Os resíduos foram transferidos com dois enxagues de 100 µL de metanol para *vials* cônicos de vidro de 1 mL para injeção em HPLC, concentrados novamente e então diluídos em 100 µL de solução aquosa de metanol (20%). 20 µL das amostras foram injetados para análise por HPLC/MS/MS. A separação por HPLC foi realizada com coluna Kinetex C18 (2.6u, 100 A) e com pré-coluna *Guard Security* de 2 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) em HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão) com *autosampler* CTC-PAL®. As amostras foram analisadas pelo espectrômetro de massa com triplo quadrupolo QTRAP® 5500 da AB Sciex (Foster City, EUA).

3.16 Ensaio de hipersensibilidade de contato

Para avaliar se a imunossupressão induzida pela PDT era dependente do PAF-R, ensaio de hipersensibilidade de contato ao 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (DNFB) foi conduzido como descrito anteriormente em camundongos C57BL/6 WT e PAF-R KO (86, 87). Resumidamente, para PDT, 20 mg de 5-ALA diluídos em veículo (etanol:água: isopropanol a 2:1:1, v/v/v + 1% polietilenoglicol) foram distribuídos em 3,0 x 3,0 cm de área do dorso inferior depilado de cada camundongo. Após 4 h no escuro, os animais foram anestesiados e o dorso inferior exposto a fonte de luz azul de 415 nm (Acne 415 Blue Light Therapy 38 LED Bulb, Honkon Technologies Co., Ltd., China) a uma dose de 20 J/cm² (taxa de radiação de 12 mW/cm²). Cinco dias após a PDT, os animais foram anestesiados e sensibilizados com 25 µL de DNFB (0,5% diluído em acetona:óleo de oliva, 4:1, v/v) adicionados ao dorso superior depilado (não tratado), pelo menos a 2 cm da área tratada com PDT. Nove dias depois, a espessura das orelhas foi aferida com um micrômetro e a orelha direita desafiada com 10 µL de DNFB (0,5% diluído em acetona:óleo de oliva, 4:1, v/v). A orelha esquerda foi pintada somente com veículo como controle. Após 24 h, a espessura das orelhas foi aferida novamente. Como controle para imunossupressão sistêmica, um grupo de camundongos foi injetado com agonista do PAF-R, CPAF (250 ng por animal, i.p.), e outro com histamina (250 µg por animal, s.c.) no mesmo dia em que a PDT foi feita (66).

3.17 Análise estatística

Os dados estão apresentados conforme descrito nas respectivas legendas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Prism 5[®] (GraphPad, San Diego, EUA), com comparação por análise de variância (ANOVA) e pós-teste Student-Newman-Keuls para análise de diferenças significantes entre três ou mais grupos. Para diferenças entre dois grupos, foi utilizado teste *t* de estudante bicaudal não pareado. A significância foi assumida com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 O PAF-R na fagocitose de células apoptóticas (eferocitose)

Os macrófagos podem ser ativados via receptores *scavenger* que reconhecem padrões moleculares presentes em células alteradas e em lipídeos oxidados (88). Estes estímulos são conhecidos por induzir alta produção de IL-10 e baixa produção de IL-12p40 em macrófagos, o que sugere que estes estímulos, similar ao descrito para IgG-SRBC/LPS, são indutores de macrófagos reguladores. Sabe-se que o receptor CD36 está envolvido no reconhecimento de células apoptóticas e de oxLDL (20, 89). Nosso grupo mostrou que o PAF-R se associa ao CD36 em macrófagos humanos e murinos para *uptake* ótimo da oxLDL e que esta associação induz fenótipo IL-10^{high}/IL-12^{low} (15). Em função disto, avaliamos se o mesmo acontece em macrófagos durante a fagocitose de células apoptóticas.

4.1.1 A eferocitose é dependente do PAF-R e de CD36

Estudos mostram que, assim como o CD36, o PAF-R pode reconhecer lipídeos oxidados como a oxLDL. O CD36 está presente em macrófagos e faz parte de um sistema de *clearance* de debris celulares e de partículas oxidadas, por exemplo, a oxLDL e células apoptóticas. Assim, foi verificado se PAF-R e CD36 participam da fagocitose de CA e se ambos atuam conjuntamente na ingestão destas células.

Para tanto, macrófagos foram incubados com células apoptóticas na presença de antagonistas do PAF-R (WEB e CV) e anticorpo bloqueador de CD36, e o índice fagocítico determinado após 90 min de fagocitose. A figura 1 mostra que o bloqueio do PAF-R tanto com WEB quanto com CV inibiu significativamente a fagocitose de CA pelos macrófagos em 71% e 79%, respectivamente. Além disso, o bloqueio do CD36 também reduziu a fagocitose de CA em cerca 70%. Mais ainda, o bloqueio de ambos os receptores em conjunto resultou em efeito aditivo na inibição da ingestão das CA, com redução de 90% e 93%, ao se associar o anticorpo bloqueador de CD36 com WEB e com CV, respectivamente. Isto mostra que a fagocitose de CA é dependente da ativação de ambos PAF-R e CD36 e que é provável que exista uma associação entre os receptores induzida por CA em macrófagos.

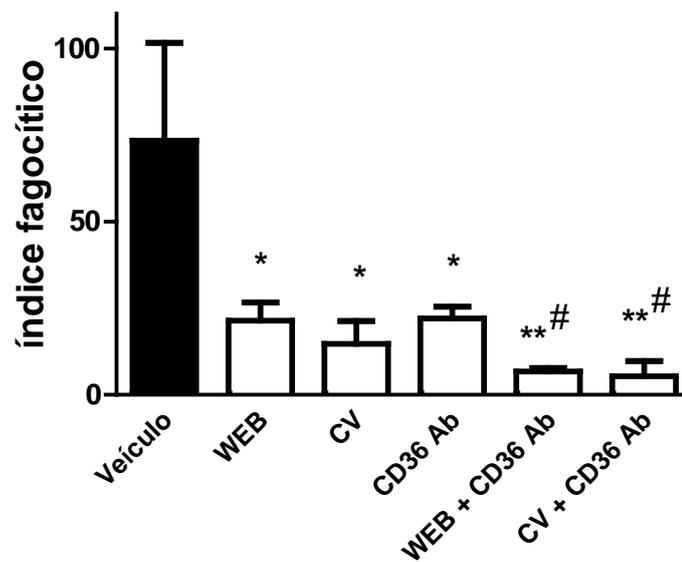


FIGURA 1 - Efeito do PAF-R e CD36 na fagocitose de células apoptóticas

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados com WEB2086 (WEB; 50 μ M), CV3988 (CV; 10 μ M) ou anticorpo bloqueador de CD36 (CD36 Ab; 1 μ g/mL) 30 min antes da adição de CA. Após 90 min de fagocitose, as células foram lavadas para remoção de alvos não ingeridos, coradas com hematoxilina/eosina e o índice fagocítico determinado (produto da porcentagem do número de macrófagos que fagocitaram ao menos uma CA pelo número de CA fagocitadas). Os resultados são expressos pela média \pm EPM de três experimentos independentes. * e # denotam diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao veículo; # $p < 0,05$ em relação a WEB, CV e CD36 Ab).

4.1.2 PAF-R e CD36 interagem e colocalizam na membrana de macrófagos durante a eferocitose

O resultado mostrado acima mostra efeito aditivo do bloqueio concomitante de PAF-R e CD36 sobre a inibição da ingestão de CA. Isto sugere que estes receptores possam interagir durante a fagocitose dessas células pelos macrófagos. Para avaliar se o PAF-R e CD36 interagem e se estão localizados nos mesmos compartimentos celulares durante a fagocitose de CA, macrófagos incubados com CA foram submetidos a ensaios de imunoprecipitação e microscopia confocal.

Primeiramente, foi avaliado se estes receptores interagem entre si durante a fagocitose de CA por ensaio de imunoprecipitação. Para tanto, lisados de macrófagos estimulados com PAF ou que estavam em contato com CA por 20 min foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos específicos para CD36 ou PAF-R e então sondados para detecção de PAF-R ou CD36, respectivamente, por *immunoblotting*. Na figura 2A, os resultados mostram que as CA induziram aumento das quantidades de CD36 em amostras nas quais o PAF-R foi imunoprecipitado. O mesmo foi observado para o PAF-R, que estava aumentado em amostras nas quais o CD36 foi imunoprecipitado após incubação dos macrófagos com CA (figura 2B). A adição de PAF aos macrófagos aumentou as quantidades de PAF-R em imunoprecipitados de CD36, porém em menor grau comparado com estímulo com as CA. Estes dados mostram que a fagocitose de CA induz associação entre o PAF-R e o CD36 em macrófagos.

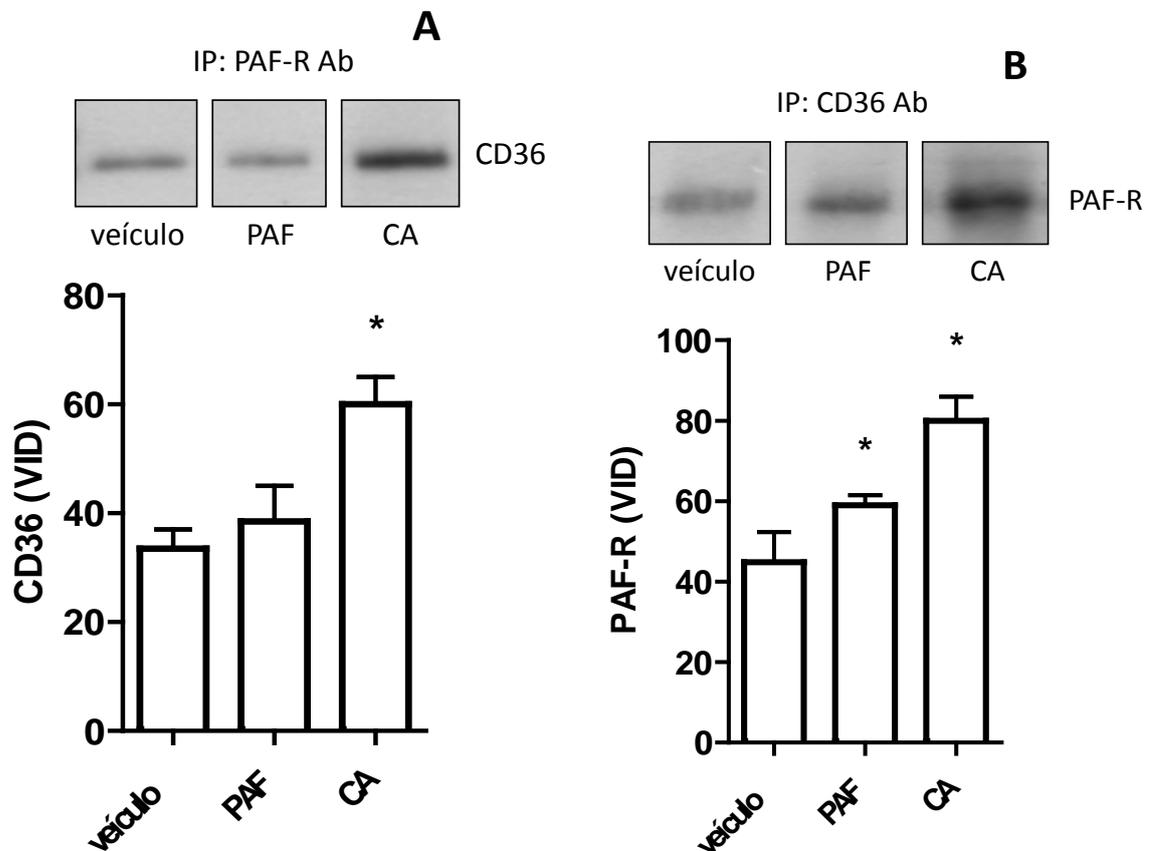


FIGURA 2 - A fagocitose de CA induz imunoprecipitação do PAF-R com o CD36 em macrófagos

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram estimulados com PAF (400 nM) ou incubados com CA por 20 min. Após lavagem, as células foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpos específicos anti-PAF-R e anti-CD36. Os imunoprecipitados foram então submetidos a *immunoblotting* para detecção de CD36 (A) e PAF-R (B), respectivamente. A densidade das bandas foi quantificada pelo software AlphaEaseFC® v3.2 beta (Alpha Innotech). As radiografias mostram um experimento representativo e os valores integrados de densidade (VID) nos gráficos são apresentados como média \pm EPM de três experimentos. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao veículo.

Ainda sobre a interação do PAF-R com o CD36, os dados até aqui sugerem que os receptores interagem entre si para a fagocitose das CA pelos macrófagos. Nesse contexto, sabe-se que ambos os receptores são capazes de reconhecer lipídeos modificados, ou seja, que podem compartilhar seus ligantes (21, 90, 91). Isso poderia promover a colocalização dos mesmos induzida, por exemplo, pelas CA. Então, para avaliar se os receptores estão

colocalizados e presentes em regiões específicas da membrana celular de macrófagos em contato com as CA, foram feitas análises por microscopia confocal de células em momentos iniciais da fagocitose. Os macrófagos foram incubados com CA por 20 min, fixados e marcados para detecção do PAF-R e CD36 utilizando-se anticorpos conjugados com fluoróforos de cores diferentes.

Na foto A da figura 3, observa-se que macrófagos não estimulados apresentam distribuição difusa do PAF-R (verde) e CD36 (vermelho) e pouca colocalização em porções específicas da membrana celular (amarelo). O estímulo com PAF não induziu aumento da colocalização entre estes receptores, apesar de ter induzido uma redistribuição dos receptores CD36 na membrana celular em compartimentos (figura 3B). A adição de CA induziu a colocalização do PAF-R com o CD36 perceptível em regiões da membrana celular adjacentes às CA adicionadas (em amarelo na figura 3C), com aumento de quase duas vezes na colocalização quando comparada com o controle (figura 3D). Estes resultados mostram que existe a interação física por colocalização entre o PAF-R e o CD36 na membrana de macrófagos induzida por CA.

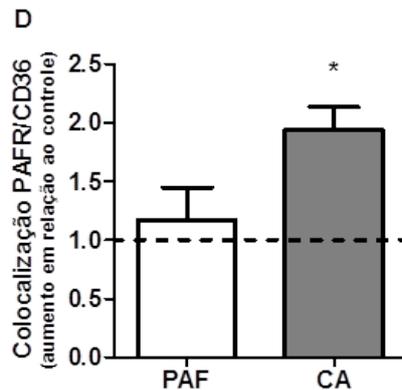
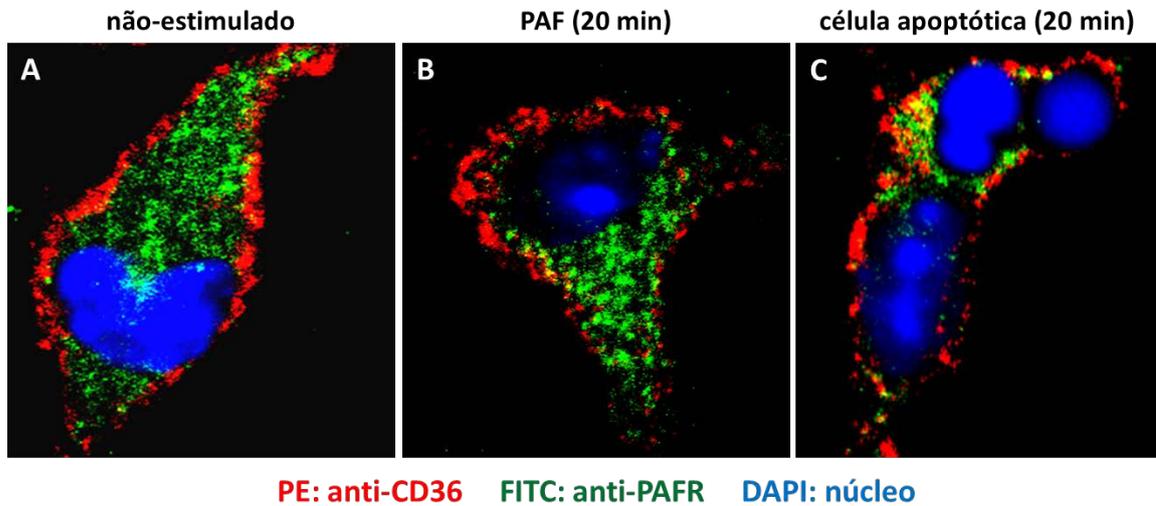


FIGURA 3 - PAF-R e CD36 se colocalizam na membrana de macrófagos durante a fagocitose de células apoptóticas

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram plaqueados em lâminas de vidro e estimulados ou não (A) com PAF (400 nM) (B) ou CA (C) por 20 min. Após serem fixadas, as células foram incubadas com anticorpos específicos para PAF-R e CD36, lavadas e incubadas novamente com anticorpos secundários conjugados com rodamina ou FITC. O núcleo das células foi corado com DAPI. As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss® LSM 510 e com o software de análise de imagem LS 2.5 (Zeiss). Em D, representação semi-quantitativa de colocalização utilizando o coeficiente de Pearson e software JACoP/ImageJ®. Dados apresentados pela média \pm EPM de dez imagens provenientes de três experimentos independentes. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (veículo).

4.1.3 A fagocitose é dependente da integridade dos *lipid rafts* e induz a associação do PAF-R e CD36 com um marcador deste microdomínio

Em algumas condições, os receptores podem interagir fisicamente na superfície das células e isto pode depender de sua colocalização em microdomínios de membrana ricos em colesterol e compostos por glicoesfingolipídeos que servem como plataformas que promovem essa interação (*lipid rafts*, LR) (92). Após os receptores serem recrutados, a associação entre eles promove a fosforilação de quinases componentes de vias de sinalização que culminam na ativação dos macrófagos. O CD36 possui um pequeno domínio citoplasmático, entretanto tem sido demonstrado que ele pode associar-se a diversos outros receptores favorecendo a ligação com o ligante (88). Até o momento, pouco se sabe sobre a associação do CD36 com um receptor acoplado a proteína G, como o PAF-R. Além disso, não é sabido se os microdomínios que promovem essa possível associação são necessários para a fagocitose de células apoptóticas, por exemplo.

Portanto, primeiro avaliamos o papel dos LR na fagocitose de CA por macrófagos tratando-os com um composto que depleta colesterol da membrana celular, β CD, assim dissociando os LR, por 10 minutos antes da adição das CA para fagocitose por 90 min. Como controle, outro composto quimicamente relacionado ao β CD (o α CD), mas sem atividade sobre os LR, foi adicionado em paralelo. A figura 4 mostra que a depleção dos LR em macrófagos diminuiu pela metade a ingestão de CA, sendo este efeito específico do β CD nos LR já que o α CD não causou o mesmo efeito. Isso mostra que a integridade destes microdomínios é necessária para ingestão ótima de CA pelos macrófagos, assim como mostrado para o PAF-R e o CD36.

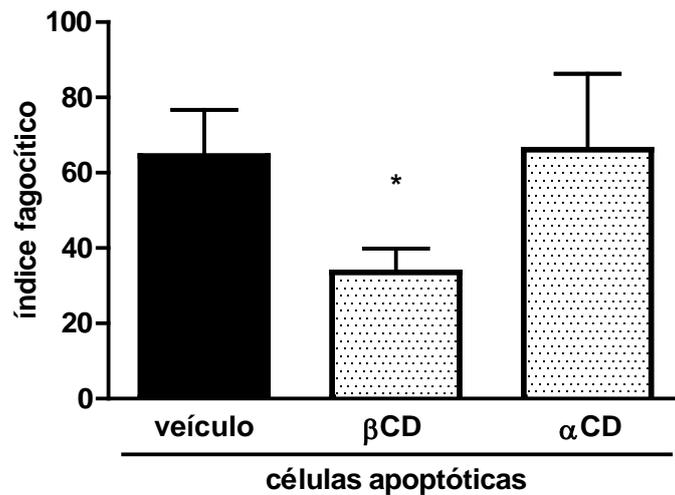


FIGURA 4 - A fagocitose de CA é dependente da integridade dos LR

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados com β CD (1 mM) ou α CD (1 mM) por 10 min antes da adição de CA. Após 90 min de fagocitose, as células foram lavadas para remoção de alvos não ingeridos, coradas com hematoxilina/eosina e o índice fagocítico determinado (produto da porcentagem do número de macrófagos que fagocitaram ao menos uma CA pelo número de CA fagocitadas). Os resultados são expressos pela média \pm EPM de três experimentos independentes. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao veículo.

Os LR podem ser rastreados pela detecção de certas proteínas que são consideradas componentes característicos (marcadores) desses microdomínios. Com isso, é possível avaliar se um receptor está presente em LR detectando-se estas proteínas em amostras após imunoprecipitação do receptor em questão, ou seja, se um receptor se coimunoprecipitar com proteínas marcadoras de LR. Um exemplo é a flotilina-1, que é encontrada tipicamente em LR e utilizada como marcador destes microdomínios (93). Seguindo protocolo de imunoprecipitação similar ao utilizado para mostrar a interação entre CD36 e PAF-R, amostras de lisados de macrófagos em contato com CA foram imunoprecipitadas com anticorpos específicos para CD36 e para PAF-R e quantidades de flotilina-1 detectadas nestes precipitados por *immunoblotting*. A figura 5 mostra que macrófagos que fagocitaram CA possuem quantidades significativamente maiores de flotilina-1 em imunoprecipitados tanto de PAF-R quanto de CD36, ou seja, que ambos os

receptores provavelmente se localizam em LR durante a fagocitose das CA. Somado ao fato de que PAF-R e CD36 interagem fisicamente entre si e se colocalizam durante a fagocitose de CA, estes dados em conjunto sugerem fortemente que esta interação/colocalização/cooperação entre PAF-R e CD36 para a fagocitose de CA aconteça nos LR.

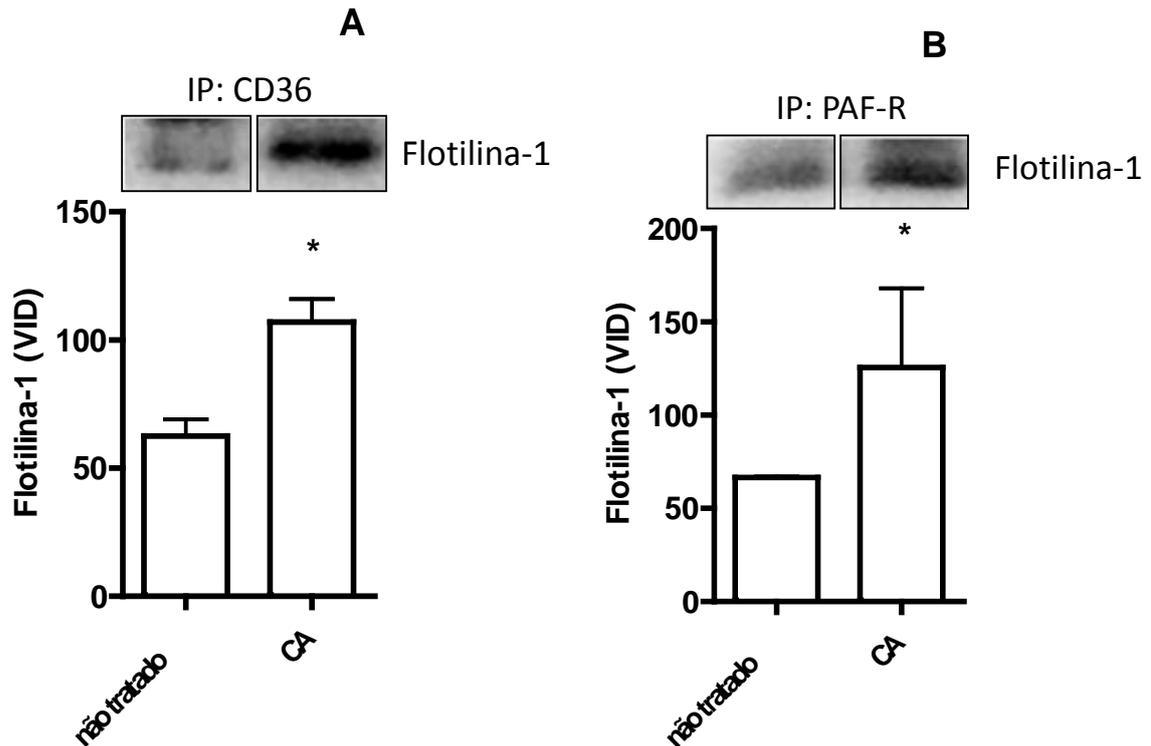


FIGURA 5 - Fagocitose de CA induz interação de marcador de LR (flotilina-1) com PAF-R e CD36

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados com CA por 20 min. Após lavagem, as células foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpos específicos anti-CD36 (A) e anti-PAF-R (B). Os imunoprecipitados foram então submetidos a *immunoblotting* para detecção de flotilina-1. A densidade das bandas foi quantificada pelo software AlphaEaseFC® v3.2 beta (Alpha Innotech). As radiografias mostram um experimento representativo e os valores integrados de densidade (VID) nos gráficos são apresentados como média \pm EPM de três experimentos. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao não tratado.

4.1.4 A eferocitose induz fenótipo regulador em macrófagos (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) de modo dependente da ativação do PAF-R e CD36

Mostramos que a fagocitose de CA pelos macrófagos é dependente da ativação de PAF-R e de CD36 e da integridade de LR. Além disso, mostramos que o PAF-R e CD36 se colocalizam e interagem entre si e com proteína marcadora de LR, sugerindo então que durante a fagocitose de CA, os receptores são recrutados aos LR onde são ativados e promovem a ingestão ótima das CA. Como resultado da fagocitose de CA, foi descrito que os macrófagos expressam altas quantidades de IL-10 e baixas quantidades de IL-12p40 (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}), o que seria fenótipo regulador destas células (40, 94). Dado o importante papel do PAF-R e de CD36 no reconhecimento e fagocitose de CA por macrófagos, bem como a interação entre ambos, acredita-se que estes receptores também participem do estabelecimento do fenótipo IL-10^{high}/IL-12p40^{low} em macrófagos que fagocitam CA.

Para avaliar esta hipótese, macrófagos foram colocados em contato com células apoptóticas na presença dos antagonistas do PAF-R (WEB2086 e CV3988) e de anticorpo bloqueador do CD36, e foi avaliada a produção de duas citocinas relacionadas com o fenótipo ativador e regulador, IL-12p40 e IL-10, respectivamente. A figura 6 mostra que macrófagos expressam mais IL-10 quando comparada com IL-12p40 induzidas por CA. O bloqueio do PAF-R com ambos os antagonistas inibiu a expressão de IL-10 (55% para WEB e 67% para CV) mais que a de IL-12p40 (26% para WEB e 26% para CV). Da mesma forma, o bloqueio do CD36 também inibiu a expressão de IL-10 de modo mais intenso que a de IL-12p40 (74% versus 42%, respectivamente). Diferente do observado para a fagocitose, o bloqueio concomitante do PAF-R e de CD36 não teve efeito aditivo sobre a inibição de IL-10 e IL-12p40 induzida por CA.

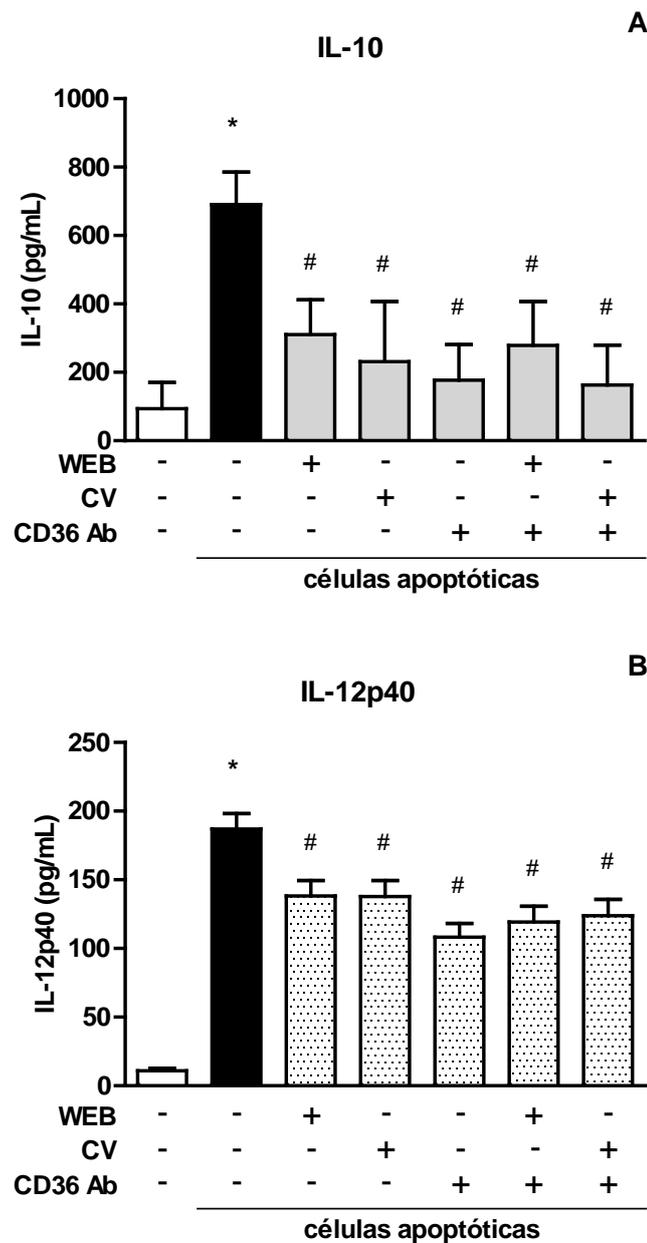


FIGURA 6 - O bloqueio do PAF-R e CD36 inibe a expressão majoritária de IL-10 sobre IL-12p40 induzida por células apoptóticas em macrófagos

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com WEB2086 (WEB, 50 μ M), CV3988 (CV, 10 μ M) e anticorpo bloqueador de CD36 (CD36 Ab, 1 μ g/mL) e incubados por 30 min antes da adição de células apoptóticas. As células foram incubadas por 24 h, o sobrenadante das culturas coletado e centrifugado para remoção de timócitos não fagocitados e analisado por ELISA para determinação de IL-10 (A) e IL-12p40 (B). Os valores correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes. * e # ($p < 0,05$) denotam diferenças estatisticamente significantes (* em relação ao grupo não tratado e # em relação ao tratamento somente com CA).

Em paralelo, LPS foi adicionado às culturas de macrófagos após 24 h de incubação com as células apoptóticas. Isto promoveu a potencialização da produção das citocinas pelos macrófagos após aquisição do perfil estabelecido pelas CA. Como resultado, foi observado que a combinação de LPS com CA dobrou a produção de IL-10 em relação ao estímulo somente com LPS. Porém os níveis de IL-12p40 induzidos por LPS mais CA não foram diferentes dos induzidos apenas por LPS. Mais ainda, o bloqueio do PAF-R e de CD36 inibiu a produção de IL-10 induzida pelas CA e LPS a níveis similares aos induzidos por LPS somente, ou seja, aboliu a participação das CA na potencialização da produção de IL-10, fenômeno não observado para IL-12p40 (figura 7). Estes achados mostram que CA induzem a produção de IL-10 em macrófagos de modo dependente da ativação do PAF-R e de CD36, que a baixa produção de IL-12p40 neste contexto é pouco afetada pelos receptores e que, com isso, os mesmos contribuem para estabelecimento de fenótipo IL-10^{high}/IL-12p40^{low} (regulador) de macrófagos.

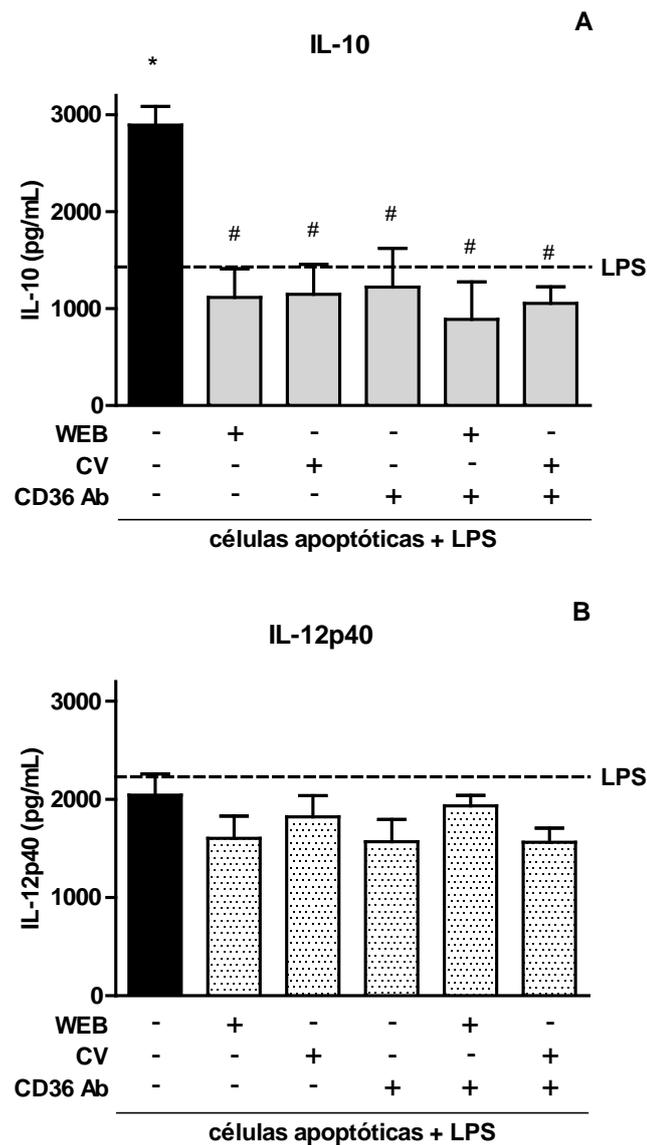


FIGURA 7 - A produção de IL-10, e não de IL-12p40, induzida por células apoptóticas e LPS é dependente do PAF-R e do CD36

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com WEB2086 (WEB, 50 μ M), CV3988 (CV, 10 μ M) e anticorpo bloqueador de CD36 (CD36 Ab, 0,5 μ g/mL) e incubados por 30 min. Após a adição de células apoptóticas, os macrófagos foram incubados por 24 h e estimulados com LPS (concentração final de 10 ng/mL) por mais 24 h depois de fagocitar CA. O sobrenadante das culturas foi centrifugado para remoção de timócitos não fagocitados e analisado por ELISA para determinação de IL-10 (A) e IL-12p40 (B). Os valores correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes. * e # denotam ($p < 0,05$) diferenças estatisticamente significantes (* em relação ao tratamento somente com LPS e # em relação ao grupo células apoptóticas + LPS).

4.1.5 A produção de IL-10 durante a eferocitose depende da ativação da COX-2

Os mecanismos envolvidos na ativação do PAF-R por células apoptóticas que culminam na ativação dos macrófagos para fenótipo regulador (indução de macrófagos IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) ainda não estão totalmente desvendados. Dados da literatura mostram que a produção de IL-10 está relacionada com ativação de ciclooxigenase (COX) e produção de PGE₂ (95-99). Resultados anteriores mostraram que a fagocitose de CA induz a expressão de COX-2 em macrófagos (24), e que a ativação do PAF-R induz COX-2 e PGE₂ (22, 82). Assim, avaliamos se os prostanóides estariam envolvidos na produção de IL-10 induzida por CA assim como mostrado para o PAF-R. Para isto, adicionamos um inibidor seletivo da COX-2 (nimesulida) aos macrófagos antes da adição das CA. As figuras 8A e B mostram, respectivamente, que o bloqueio da COX-2 inibiu a expressão de IL-10 (73%) e parcialmente a de IL-12 (28%) induzidas por CA, semelhante ao efeito do bloqueio do PAF-R sobre estas citocinas. Mais ainda, em células que foram ativadas com LPS 24 h após terem fagocitado as CA, a nimesulida foi capaz de inibir a expressão de IL-10, mas não de IL-12p40, também de modo similar ao bloqueio do PAF-R (figura 8C e D). Estes dados mostram que as CA, além de ativarem o PAF-R, induzem a produção de prostanóides que contribuem para a produção de IL-10 nos macrófagos, e sugerem que a expressão da COX-2 possa ser um passo dependente e da ativação do PAF-R, fazendo parte do mecanismo pelo qual o PAF-R induz fenótipo regulador em macrófagos.

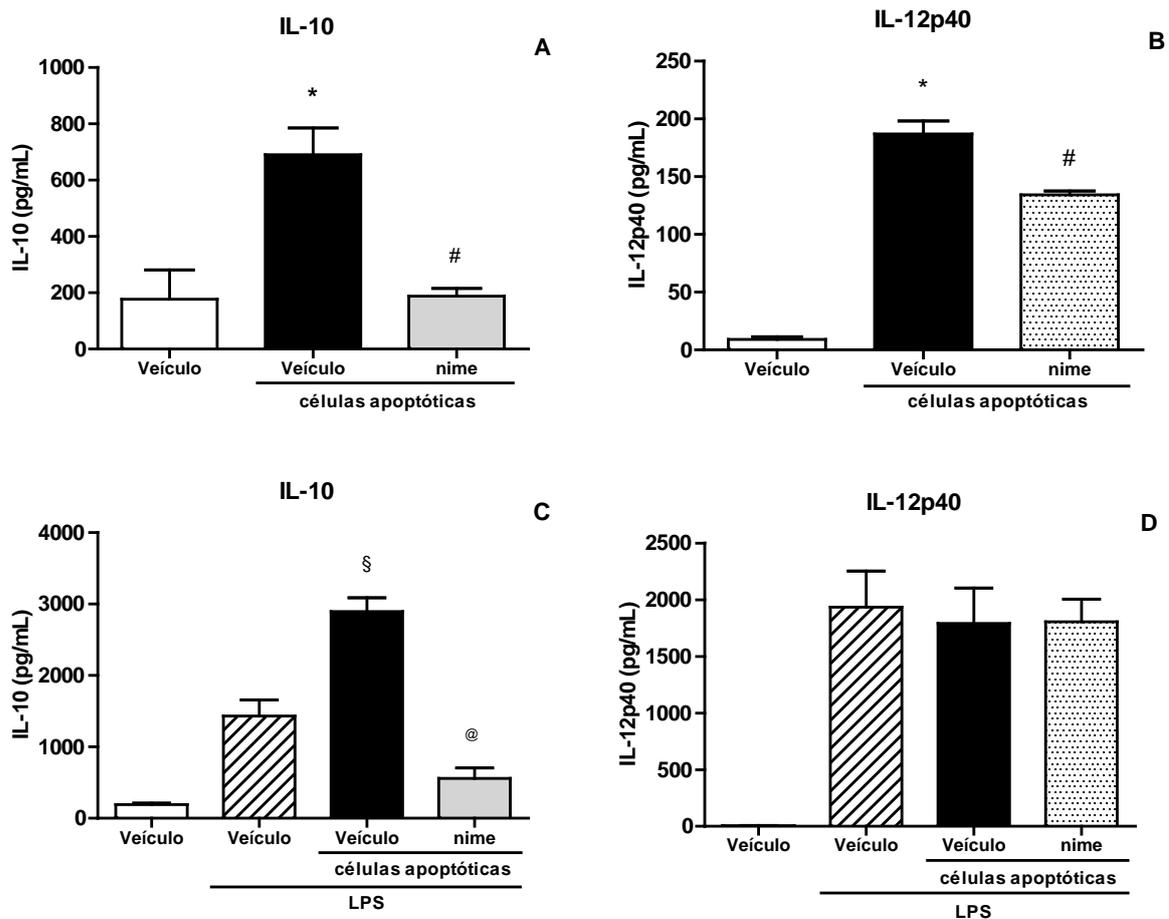


FIGURA 8 - A produção de IL-10 induzida pela fagocitose de CA em macrófagos é via ativação de COX-2

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados com nimesulida (nime, 10 μ M) 30 min antes da adição de CA. Um grupo foi estimulado com LPS (10 ng/mL) por 24 h depois de fagocitar CA por 24 h. O sobrenadante das culturas foi centrifugado para remoção de timócitos não fagocitados e analisado por ELISA para determinação de IL-10 (A sem LPS; C com LPS) e IL-12p40 (B sem LPS e D com LPS). Os resultados estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos independentes. *, #, § e @ denotam ($p < 0,05$) diferenças estatisticamente significantes (* em relação ao não tratado, # em relação ao tratado somente com CA, § em relação ao tratado somente com LPS e @ em relação a CA + LPS).

Na figura 9, os dados relativos à produção de IL-10 e IL-12p40 induzida por CA foram colocados em conjunto. As barras em cinza mostram quantidades de IL-10 e as brancas de IL-12p40. Neste caso, todos os valores foram normalizados em relação à expressão de IL-12p40 induzida por CA e estão plotados dentro das barras. É bastante

perceptível que as quantidades de IL-10 diminuem em mais da metade (sem LPS, em A) ou até três vezes (com LPS, em B) quando o PAF-R é bloqueado ou COX-2 inibida, enquanto que a IL-12p40 sofre mínimas alterações. Por isso, a razão das quantidades de IL-10 para IL-12p40 decresce quando os receptores são bloqueados conforme valores mostrados acima das barras. Ao se considerar que o fenótipo de ativação dos macrófagos é uma medida relativa que, neste caso, leva em conta o balanço entre IL-10 e IL-12p40 produzidas sob o mesmo estímulo, pode-se afirmar, então, que a indução da polarização dos macrófagos para perfil regulador é dependente da ativação do PAF-R e também de produtos derivados da COX-2.

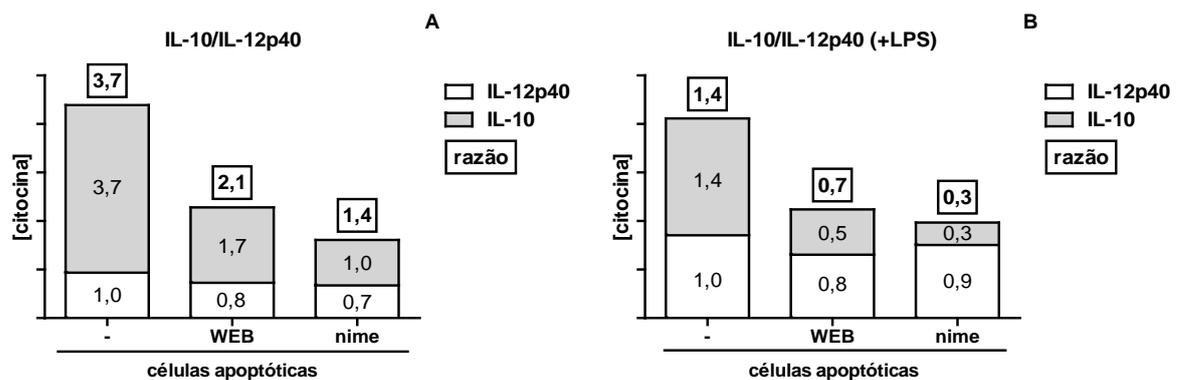


FIGURA 9 - Representação esquemática da relação da concentração de IL-10/IL-12p40 (com base nos dados mostrados nas figuras 6, 7 e 8)

Em A, a relação IL-10/IL-12p40 no sobrenadante de culturas de macrófagos após 24 h de fagocitose de CA. Em B, a mesma relação no sobrenadante de macrófagos que fagocitaram CA, depois de 24 h de ativação com LPS. As quantidades de citocina estão expressas em relação às quantidades de IL-12p40 induzidas por CA (A) ou CA + LPS (B) e estão plotadas dentro das respectivas barras. As razões entre as concentrações de IL-10 para IL-12p40 estão plotadas acima das respectivas barras (dentro de retângulos).

4.2 O PAF-R no fenótipo de macrófagos polarizados

Nesta parte da tese, foi avaliado o papel do PAF-R no fenótipo de macrófagos na fase efetora da resposta imune quando são ativados por citocinas ou via receptor para

porção Fc de anticorpos IgG. Para isto, foi avaliado o efeito do tratamento dos macrófagos com antagonistas de PAF-R (WEB2170 ou WEB2086) na expressão de marcadores fenotípicos em macrófagos polarizados. Os estímulos utilizados foram IFN- γ e LPS para indução da ativação clássica, IL-4 para induzir ativação alternativa e hemácias de carneiro opsonizadas com IgG (IgG-SRBC) mais LPS para induzir macrófagos reguladores.

4.2.1 A expressão de marcadores de macrófagos classicamente ativados depende da ativação do PAF-R

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com WEB2170 (antagonista do PAF-R) por 30 minutos antes da adição dos estímulos para polarização por 24 h e a expressão de marcadores de ativação de macrófagos determinada. A figura 10 mostra que macrófagos estimulados com IFN- γ /LPS produzem TNF- α , MCP-1 e apresentam expressão aumentada de iNOS quando comparados com macrófagos não estimulados. O bloqueio do PAF-R com o antagonista WEB2170 reduziu parcialmente a produção de MCP-1, TNF- α e a expressão de iNOS. Todos estes marcadores não foram expressos em macrófagos estimulados com IL-4.

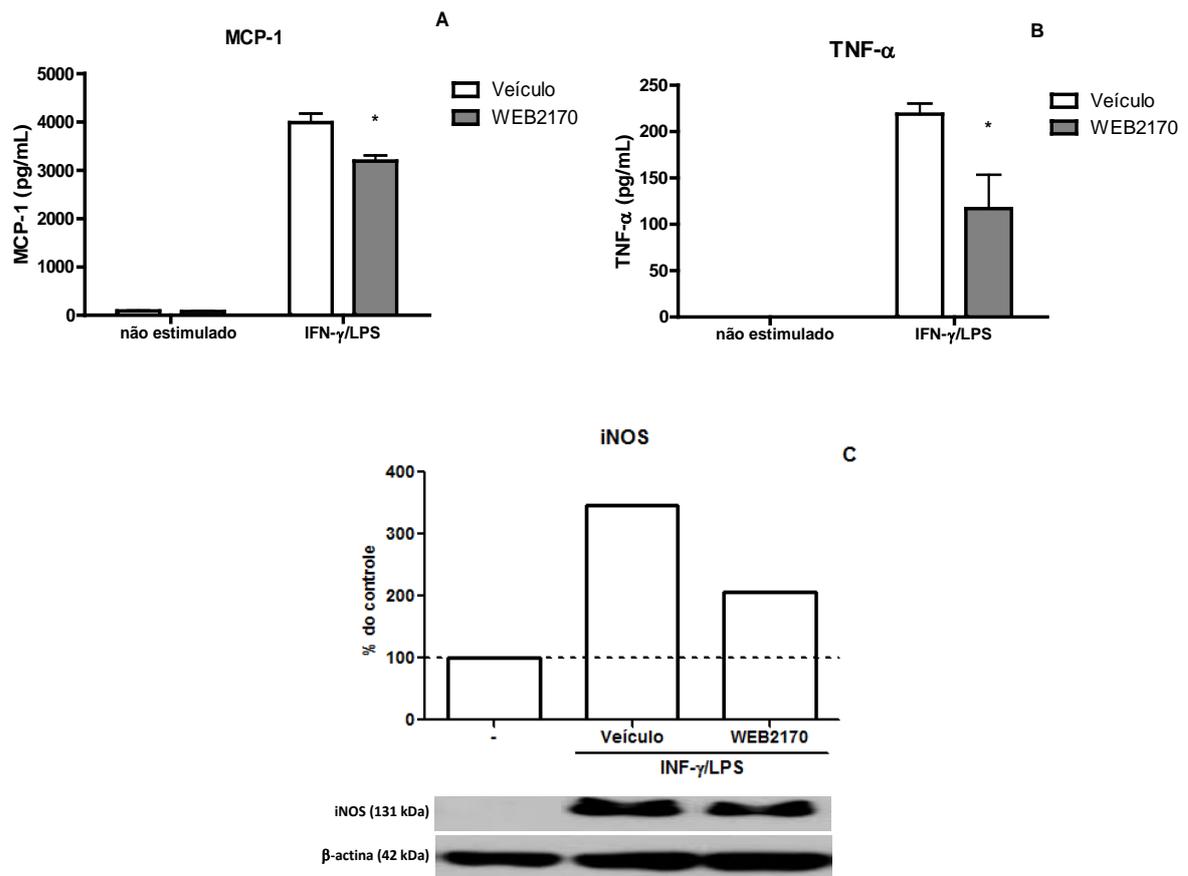


FIGURA 10 - Antagonista do PAF-R inibe a expressão de alguns marcadores de macrófagos classicamente ativados

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com WEB2170 (50 μ M, 30 min) e estimulados com IFN- γ (5 ng/mL) e LPS (50 ng/mL) por 24 h a 37 °C/5% CO₂. O sobrenadante das culturas foi coletado e analisado por ELISA para determinação dos níveis de MCP-1 (A) e TNF- α (B). As células da cultura foram lisadas e submetidas à análise por *imunoblotting* para detecção de iNOS (C). Os valores das figuras A, B e C correspondem à média \pm EPM de ao menos três experimentos independentes. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao veículo. Os dados e radiografias da figura D são representativos de três experimentos independentes.

4.2.2 A expressão de marcadores de macrófagos alternativamente ativados depende da ativação do PAF-R

Da mesma forma como feito para macrófagos classicamente ativados, avaliamos o papel do PAF-R na polarização de macrófagos alternativamente ativados pela

citocina IL-4. A figura 11 mostra que macrófagos estimulados com IL-4 tiveram aumento na expressão de mRNA para receptor de manose e de arginase-1. A figura 11 mostra ainda que o bloqueio do PAF-R com WEB2170 diminuiu a expressão de mRNA do receptor de manose em cerca de 70% e da arginase-1 em 74%. Já a expressão da proteína arginase-1, medida por *imunoblotting*, foi reduzida em 33%. Estes marcadores não foram expressos em macrófagos estimulados com IFN- γ /LPS.

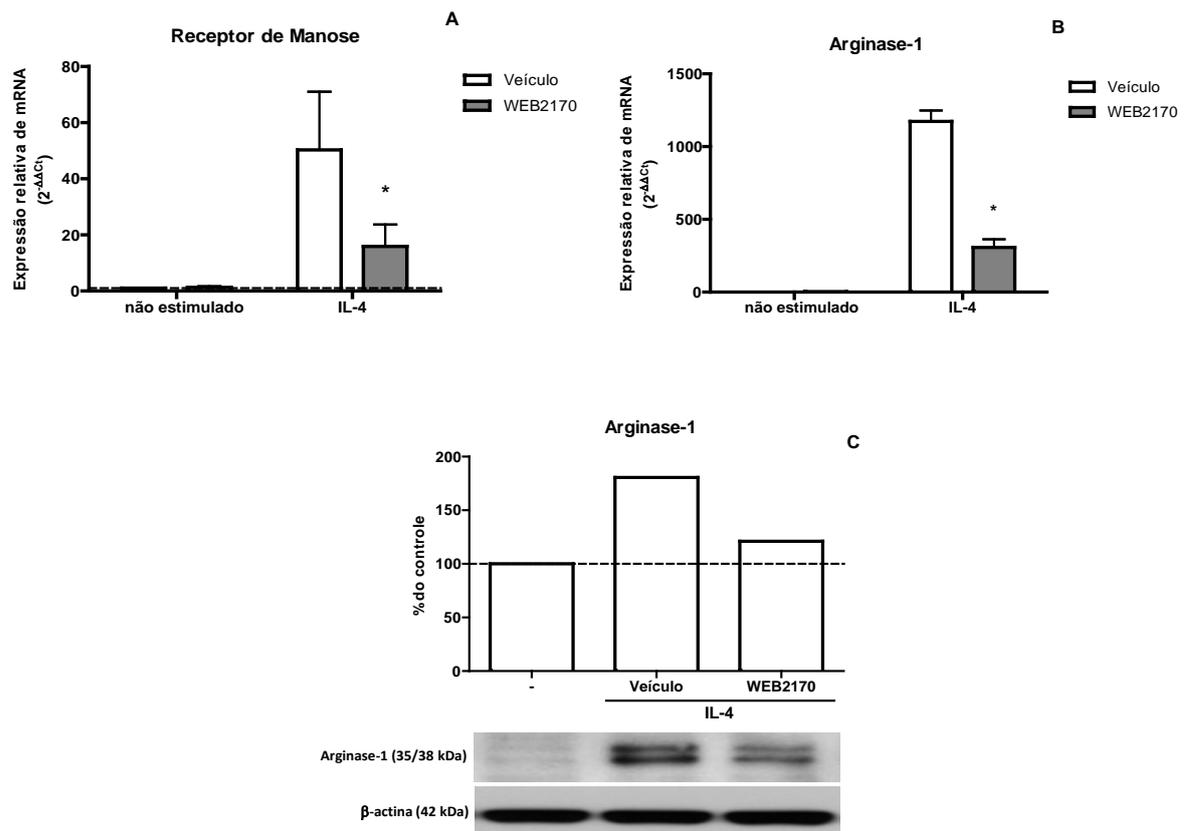


FIGURA 11 - A expressão de marcadores de macrófagos ativados alternativamente por IL-4 é dependente da ativação do PAF-R

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com WEB2170 (50 μ M, 30 min) e estimulados com IL-4 (20 ng/mL) por 18 (PCR) ou 24 h (*imunoblotting*) a 37 °C/5% CO₂. O RNA das células foi extraído com reagente TRIzol® e o cDNA correspondente foi submetido a análise por RT-PCR em tempo real para detecção de sequências de receptor de manose (A) e arginase-1 (B). As células da cultura foram lisadas e submetidas à análise por *imunoblotting* para detecção de arginase-1 (C). Os valores das figuras A e B correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao veículo. Os dados e radiografias da figura C são representativos de três experimentos independentes.

4.2.3 O estabelecimento do fenótipo regulador depende da ativação do PAF-R

Em seguida, avaliamos se o PAF-R estava envolvido com a ativação dos macrófagos para perfil regulador (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) induzido por imunocomplexo e LPS. Para tanto, hemácias de carneiro opsonizadas com IgG em doses subaglutinantes (IgG-SRBC) foram adicionadas aos macrófagos na presença de antagonistas do PAF-R e concentrações de IL-10 e IL-12p40 determinadas. Estas citocinas atuam pleiotropicamente e autocrinamente e possuem funções antagônicas sobre células do sistema imune, sendo a IL-12p40 classificada como ativadora de leucócitos para resposta imune contra infecções, por exemplo, e a IL-10 como citocina anti-inflamatória e supressora da resposta imune. Por isso, alguns autores sugerem que o balanço na produção destas citocinas também caracterize o fenótipo de ativação de macrófagos (25, 40, 94). Nas figuras 12A e B, observa-se que a adição de IgG-SRBC aos macrófagos por 18 h induziu expressão de IL-10, mas não de IL-12p40, e que esta indução foi dependente da ativação do PAF-R. Em paralelo, LPS foi adicionado às células após a adição das IgG-SRBC e as citocinas determinadas. Em C, a adição de LPS aos macrófagos estimulados com IgG-SRBC potencializou a produção de IL-10 em cerca de 20% quando comparado com células estimuladas somente com LPS, e esta potencialização foi revertida pelo bloqueio do PAF-R. Na figura 12D, macrófagos que foram tratados com IgG-SRBC e LPS produziram quantidades de IL-12p40 bastante reduzidas quando comparadas com macrófagos tratados somente com LPS, reproduzindo dados da literatura que mostram que o estímulo via FcγR é inibitório sobre a expressão desta citocina (44). Além disso, o bloqueio do PAF-R não teve efeito sobre este fenômeno.

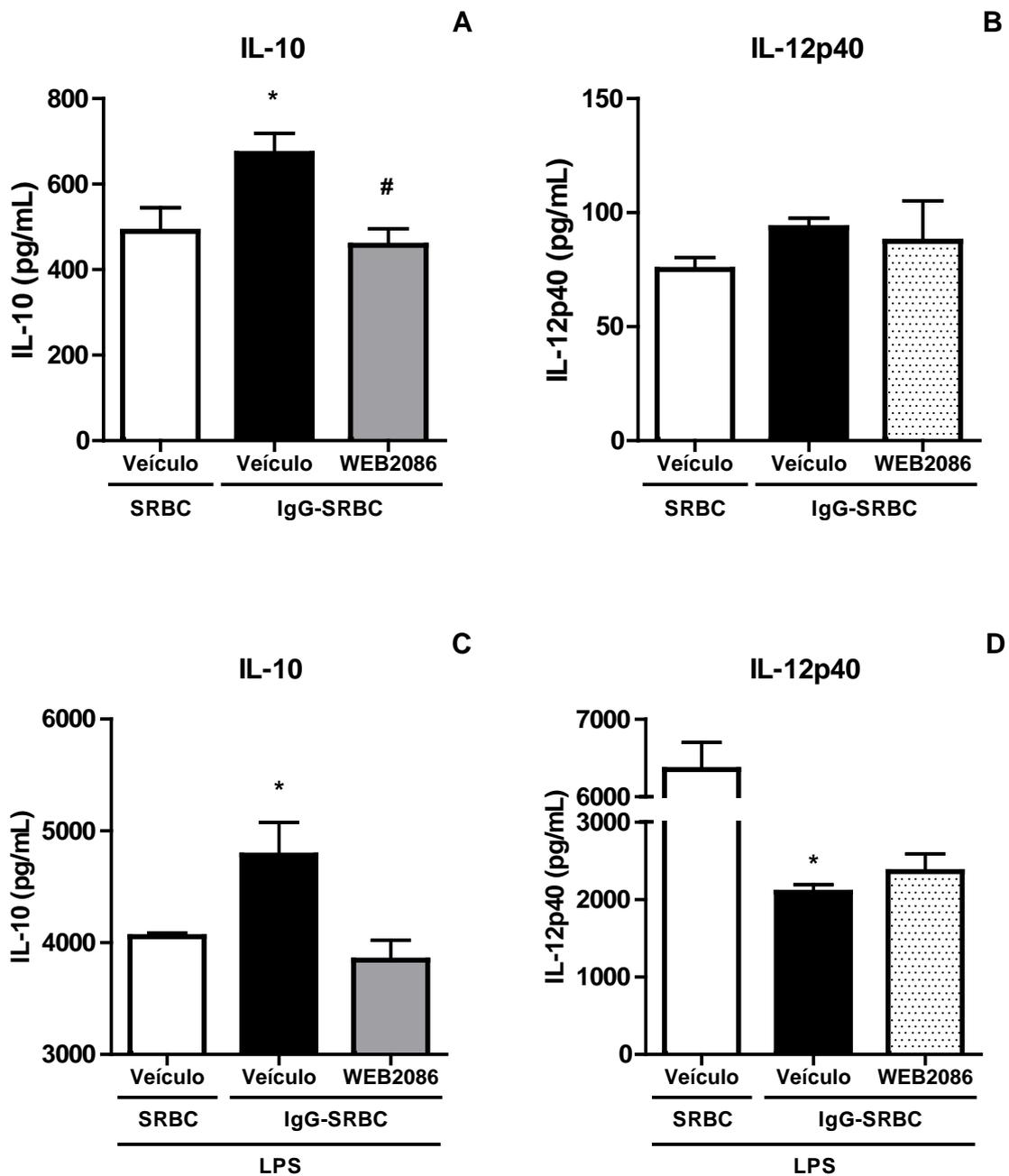


FIGURA 12 - A expressão de IL-10 por macrófagos reguladores ($IL-10^{high}/IL-12p40^{low}$) estimulados por IgG-SRBC/LPS é dependente do PAF-R

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com WEB2086 (50 μ M, 30 min) e incubados com hemácia de carneiro opsonizada com IgG (IgG-SRBC) por 18 h a 37 °C/5% CO₂. Em paralelo, LPS (10 ng/mL) foi adicionado a um grupo de células por mais 24 h e quantidades de IL-10 (A sem LPS e C com LPS) e IL-12p40 (B sem LPS e D com LPS) determinadas por ELISA. Os valores correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a SRBC (A e B) ou LPS (C e D). # denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao veículo.

Os dados descritos acima e sumarizados na tabela 1 mostram que o bloqueio do PAF-R inibe em até 50% a expressão de marcadores da polarização dos macrófagos ativados classicamente (IFN- γ /LPS) e em mais de 50% os marcadores dos macrófagos ativados alternativamente (IL-4). Além disso, o aumento da expressão de IL-10 para o estabelecimento do fenótipo IL-10^{high}/IL-12p40^{low} de macrófagos por IgG-SRBC/LPS foi dependente da ativação do PAF-R, o que mostra que a polarização destas células para fenótipo regulador é dependente deste receptor.

TABELA 1 - O PAF-R participa da polarização de macrófagos para ativação clássica, alternativa e perfil regulador.

	MCP-1 (ELISA)	TNF- α (ELISA)	iNOS (WB)	MR (PCR)	Arg-1 (PCR)	Arg-1 (WB)	IL-10 (ELISA)	IL-12 (ELISA)
Efeito do bloqueio do PAF-R	↓	↓	↓	↓↓	↓↓	↓	↓	-
	Classicamente ativado (IFN- γ + LPS)			Alternativamente ativado (IL-4)		Regulador (IgG-SRBC + LPS)		

Resumo do efeito do bloqueio do PAF-R sobre a expressão de marcadores de polarização de macrófagos classicamente ativados, alternativamente ativados e perfil regulador. Uma seta (↓) indica inibição de até 50% e duas setas (↓↓) indicam inibição de mais de 50% na expressão dos marcadores em relação ao veículo. O sinal (-) indica que não houve alteração significativa da expressão pelo bloqueio do PAF-R.

4.3 Ligantes de PAF-R são gerados durante terapia fotodinâmica e induzem imunossupressão sistêmica

Até aqui, foi mostrado que o bloqueio do PAF-R inibe a expressão de marcadores de macrófagos clássica e alternativamente ativados e de macrófagos com perfil regulador. Além disso, demonstramos que o reconhecimento, fagocitose e ativação de macrófagos por células apoptóticas para perfil regulador (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) é dependente do PAF-R. Vale notar que, para a geração de perfil regulador, tanto por IgG-SRBC/LPS quanto por CA, o PAF-R pareceu estar envolvido diretamente com a expressão da citocina IL-10. Visto que esta é uma potente citocina capaz de suprimir a resposta de diversas células, incluindo fagócitos e linfócitos, pode-se hipotetizar que este receptor faça parte de um

mecanismo regulador da ativação de leucócitos e que, com isso, sua ativação tenha efeitos sobre imunidade inata e adquirida. Durante a quimioterapia para tratamento de câncer, as células apoptóticas e necróticas induziriam um fenótipo regulador em macrófagos infiltrados no tumor reduzindo sua atividade microbicida. Nesta situação, a associação da quimioterapia com antagonista de PAF-R poderia ser benéfica. Além disso, trabalho recente do nosso laboratório mostrou que as células dendríticas expressam PAF-R e sua ativação induz alta produção de IL-10 e reduz a função apresentadora de antígeno destas células. Dessa forma, PAF e moléculas PAF-símile poderiam suprimir a resposta imune adquirida. A terapia fotodinâmica (PDT) é um procedimento utilizado para tratamento de câncer superficial de pele do tipo não melanoma (como doença de Bowen e carcinoma de célula basal), além de lesões pré-câncer (queratose actínica) (100). A PDT é baseada na aplicação tópica de um agente fotossensível (ou seu precursor) seguida pela exposição a uma fonte de luz de comprimento de onda específico, o que promove a geração de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando, enfim, na morte das células que captaram o agente fotossensível (101). Por induzir a geração de oxigênio singlete e outras ROS, levantamos a hipótese de que ligantes do PAF-R (células apoptóticas, lipídeos oxidados e PAF), seriam gerados durante este procedimento e que isso resultaria em supressão da resposta imune dos animais submetidos a PDT.

4.3.1 PDT induz a geração de ligantes do PAF-R por queratinócitos humanos

Para avaliar se a PDT induz a geração de espécies capazes de ativar o PAF-R, a PDT foi simulada *in vitro* em uma linhagem celular derivada de queratinócitos humanos (HaCaT) ao incubar as células com ácido 5-aminolevulínico (5-ALA, precursor de composto fotossensível) por 4 h e expô-las a fonte de luz azul (415 nm) em doses de 10 ou 20 J/cm². A quantificação da atividade do extrato lipídico total destas células sobre o PAF-R foi feita utilizando células da linhagem humana KB transduzidas com o gene do PAF-R (KBP) e que produzem a quimiocina IL-8 ou têm níveis de Ca²⁺ intracelular aumentados quando o receptor é ativado (*readouts* para a ativação do PAF-R; veja figura 13) (82). Células KBP e KBF (estas negativas para PAF-R e utilizadas como controle) foram expostas por 6 h aos extratos lipídicos totais das células HaCaT tratadas com 5-ALA e expostas a luz (PDT) e os níveis de IL-

8 medidos. Para este estudo, a produção de IL-8 induzida pelos extratos lipídicos foi expressa como % da resposta de IL-8 induzida por 100 nM de CPAF (ligante sintético estável do PAF-R) em células KBP. Como mostrado na Figura 14A, o tratamento das HaCaT com 5-ALA seguido de exposição a luz (PDT) gerou níveis significativos de ligantes do PAF-R (IL-8 aumentada), sem efeito significativo do tratamento somente com 5-ALA ou somente luz (10 ou 20 J/cm²). Além disso, os níveis de ligantes do PAF-R permaneceram elevados em células incubadas por pelo menos uma hora após a PDT (figura 14B).

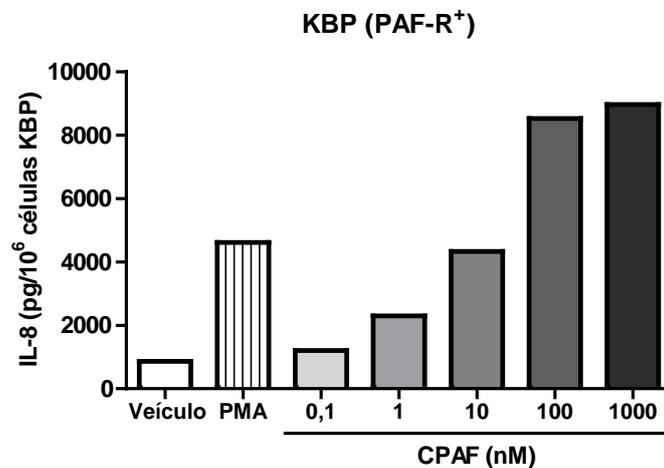


FIGURA 13 - Exemplo de que a produção de IL-8 é dose-dependente de ligante do PAF-R (CPAF) em células KBP que expressam PAF-R

Células KBP foram tratadas com várias doses de CPAF (agonista do PAF-R), 0,5% de etanol (veículo) ou 10 nM de PMA. Seis horas depois, os sobrenadantes foram removidos e a proteína imunorreativa IL-8 medida por ELISA. Os dados são a média dos níveis de IL-8 produzidos por 10⁶ células KBP provenientes de um experimento típico usando amostras em duplicata.

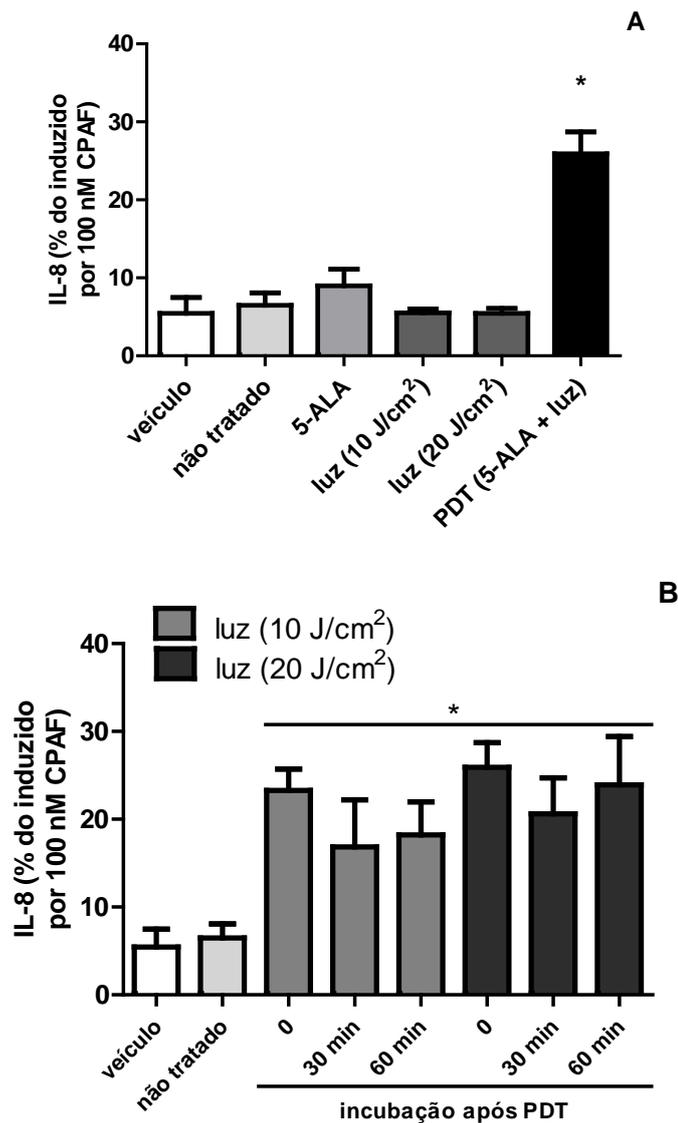


FIGURA 14 - PDT induz a formação de ligantes do PAF-R em queratinócitos humanos HaCaT

Em (A), células HaCaT foram incubadas com 5-ALA (1 mM) por 4 h ou expostas a fonte de luz (415 nm, 10 ou 20 J/cm² a 20 mW/cm²) ou ambos (5-ALA + luz = PDT). Extratos lipídicos foram obtidos imediatamente após o tratamento, normalizados para o número de células ($2,5 \times 10^6$ células) e então adicionado às células KBP. Após 6 h, IL-8 foi quantificada por ELISA como medida da atividade agonista sobre o PAF-R. Um grupo de células KBP foi tratado com CPAF (100 nM) como controle positivo e outro grupo com 0,5% de etanol (veículo). Em (B), para análise de tempo-resposta da formação de ligantes do PAF-R gerados pela PDT, após a terapia (10 ou 20 J/cm²), as células foram incubadas por 0, 30 ou 60 min a 37 °C, os extratos lipídicos obtidos e os níveis de IL-8 comparados com as células não tratadas. Os resultados em (A) e (B) são expressos como porcentagem de IL-8 relativa às quantidades induzidas por CPAF (100 nM). Os dados são a média \pm EPM de ao menos três experimentos independentes. * denota diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) em relação ao veículo e ao não tratado.

Mais ainda, extratos lipídicos de células HaCaT tratadas com PDT também induziram respostas de mobilização de Ca^{2+} intracelular (outro *readout* para a ativação do PAF-R) em células KBP carregadas com fluoróforo sensível ao cálcio (Fura-2 AM), enquanto que extratos de células que não sofreram PDT resultaram em resposta insignificante (figura 15A). Para avaliar a especificidade de indução de IL-8 via PAF-R, células KBF (que não expressam o PAF-R) foram estimuladas com extratos lipídicos de células HaCaT tratadas com PDT e, como resultado, não foram detectados níveis significantes de IL-8 (dado não mostrado) e não houve resposta de mobilização de cálcio intracelular (figura 15B), mostrando que a IL-8 induzida por extratos lipídicos em células KBP é especificamente via ativação do PAF-R.

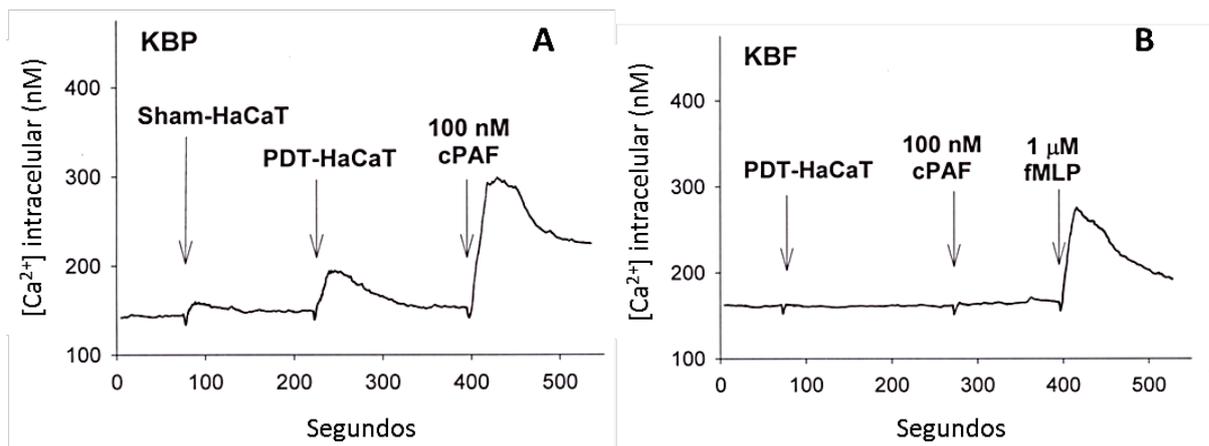


FIGURA 15 - A PDT em células HaCaT resulta em respostas de mobilização de Ca^{2+} intracelular somente em células KB que expressam PAF-R (KBP)

Células HaCaT foram incubadas com 5-ALA (1 mM) por 4 h e então expostas a luz (415 nm, 20 J/cm² a 20 mW/cm²) (PDT-HaCaT) ou não tratadas (Sham-HaCaT). Imediatamente após a exposição a luz, os lipídeos foram extraídos e normalizados pelo número de células HaCaT. Células KB transduzidas com o PAF-R (KBP) ou receptor para Formilpeptídeo 1 (KBF) foram carregadas com corante fluorescente sensível ao cálcio (Fura-2 AM) e tratadas com o extrato lipídico derivado de $2,5 \times 10^6$ células HaCaT em etanol ou CPAF (100 nM) ou fMLP (1 μM). Níveis de Ca^{2+} intracelular foram monitorados com o tempo. Os resultados mostrados são típicos de dois experimentos independentes.

Para definir com maior exatidão quais compostos são gerados pela PDT que podem se ligar ao PAF-R, amostras de células HaCaT que sofreram ou não PDT foram submetidas a espectrometria de massa utilizando-se padrões internos marcados com deutério conforme descrito anteriormente (102). A figura 16 mostra um aumento de aproximadamente três vezes na quantidade de espécies de PAF *sn-1* C-16 (16e 2:0) e C-18 (18e 2:0) em extratos lipídicos de células que sofreram PDT quando comparados aos de células não tratadas. Contudo, diferente do observado para outros estressores pró-oxidativos clássicos, como a UVB, a PDT não induziu aumento de lipídeos oxidados (ox-GPC) que possuem atividade sobre o PAF-R (102). Esses achados sugerem que os ligantes do PAF-R gerados pela PDT são produzidos enzimaticamente, e não por processos não-enzimáticos mediados por ROS.

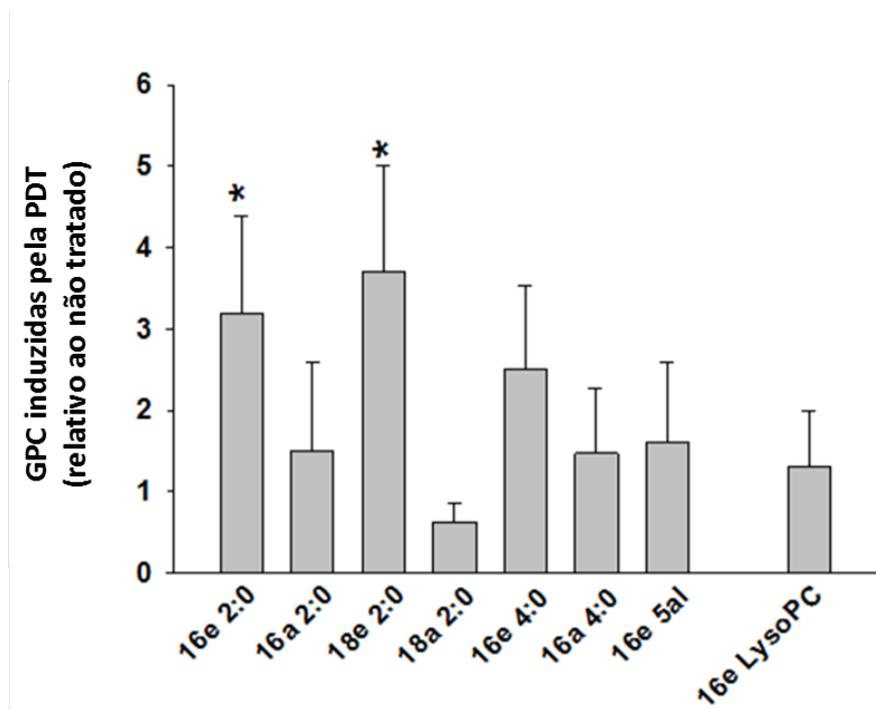


FIGURA 16 - PDT induz a formação de espécies de PAF medidas por espectrometria de massa em linhagem derivada de queratinócitos humanos

Células HaCaT foram incubadas com 5-ALA (1 mM) por 4 h seguida pela exposição a fonte de luz (415 nm, 20 J/cm² a 20 mW/cm²) (PDT) ou deixadas sem tratamento. Extratos lipídicos foram obtidos imediatamente após o tratamento, normalizados em relação ao número de células e analisados por cromatografia líquida - espectrometria de massa. Os dados são expressos como média ± EPM de três experimentos independentes. * denota diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo não tratado.

Isto é corroborado pelo resultado obtido quando células HaCaT foram incubadas com os antioxidantes vitamina C e N-acetilcisteína em doses que atenuam a geração de ligantes do PAF-R induzidos pela UVB (processos não enzimáticos) (102). Na figura 17, é mostrado que a incubação dos antioxidantes por uma hora antes da exposição das células a luz não bloqueou a atividade agonista do PAF-R gerada pela PDT medida pelo sistema KBP/IL-8, ou seja, a geração de ligantes do PAF-R pela PDT não se dá por ação de reativos de oxigênio que poderiam ser bloqueados por antioxidantes.

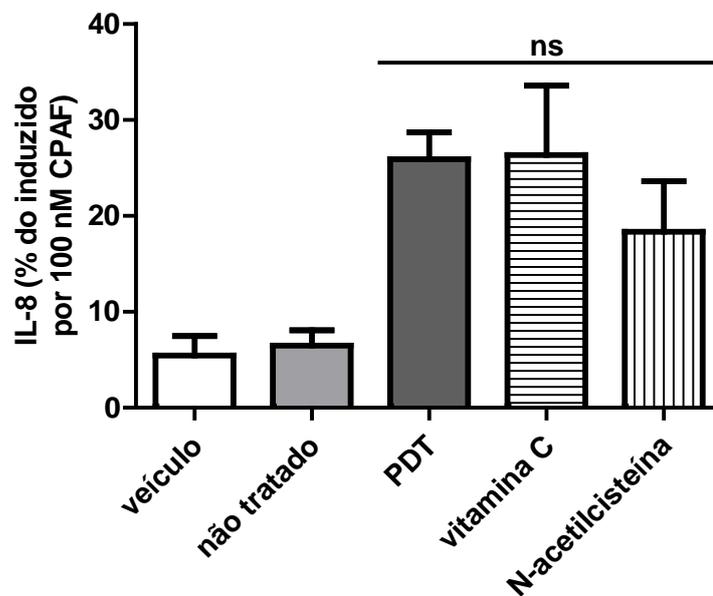


FIGURA 17 - A geração de agonistas do PAF-R pela PDT não é afetada por antioxidantes

Células HaCaT foram incubadas com 5-ALA (1 mM) por 4 h e tratadas com vitamina C (2,5 mM) ou N-acetilcisteína (5 mM) por uma hora antes da exposição à luz (415 nm, 20 J/ cm² a 20 mW/cm²). Imediatamente após a exposição à luz, as células HaCaT foram submetidas a extração lipídica e quantidades correspondentes a 2,5 x 10⁶ HaCaT foram incubadas com células KBP por 6 h e IL-8 medida no sobrenadante como indicador da formação de agonistas do PAF-R. Os resultados são mostrados como média ± EPM da porcentagem de IL-8 relativa a quantidades induzidas por CPAF (100 nM) de ao menos 3 experimentos independentes. *ns* denota nenhuma diferença estatisticamente significante entre os grupos.

4.3.2 PDT induz imunossupressão sistêmica via geração de ligantes do PAF-R

Estudos têm mostrado que a geração de agonistas do PAF-R por agentes estressores pró-oxidativos induz imunossupressão sistêmica medida tanto por taxa de crescimento tumoral quanto por ensaios de hipersensibilidade de contato (CHS) (65, 66). Mais ainda, estudos utilizando este último ensaio mostraram que PDT em camundongos induz diminuição da resposta imunológica ao DNFB (103). Foi mostrado aqui que a PDT induz ligantes do PAF-R em cultura de células (*in vitro*). Com base nisso, avaliamos se esta terapia induz a imunossupressão sistêmica via ativação do PAF-R. Para tanto, a PDT foi realizada em camundongos C57BL/6 que expressam o PAF-R (WT) ou são geneticamente deficientes do PAF-R (PAF-R KO). Os animais receberam 5-ALA topicamente (20 mg por animal) na parte inferior do dorso e após 4 h foram expostos a luz (20 J/cm²). Cinco dias após a PDT, foi feita a sensibilização com DNFB no dorso superior dos animais em região diferente da PDT (para que fosse medida resposta imune sistêmica). Após nove dias, os animais foram desafiados com DNFB na orelha e após 24 h a mudança na espessura das mesmas foi determinada como *readout* da resposta imune (hipersensibilidade) ao DNFB. A figura 18 mostra que a PDT inibiu significativamente as reações de hipersensibilidade em WT, mas não em camundongos deficientes do PAF-R. A injeção intraperitoneal de CPAF cinco dias antes da sensibilização teve o mesmo efeito que a PDT, induzindo imunossupressão somente nos animais WT. Similar ao observado *in vitro*, somente 5-ALA ou somente luz não foi capaz de inibir reações de CHS em camundongos WT como o observado para PDT (5-ALA + luz) (dado não mostrado). A histamina foi injetada como controle positivo de imunossupressão para ambas as linhagens de camundongo (WT e PAF-R KO). Estes dados mostram que a PDT induz imunossupressão sistêmica de modo dependente do PAF-R em camundongos, provavelmente por induzir a formação de espécies de PAF conforme mostrado em experimentos *in vitro*.

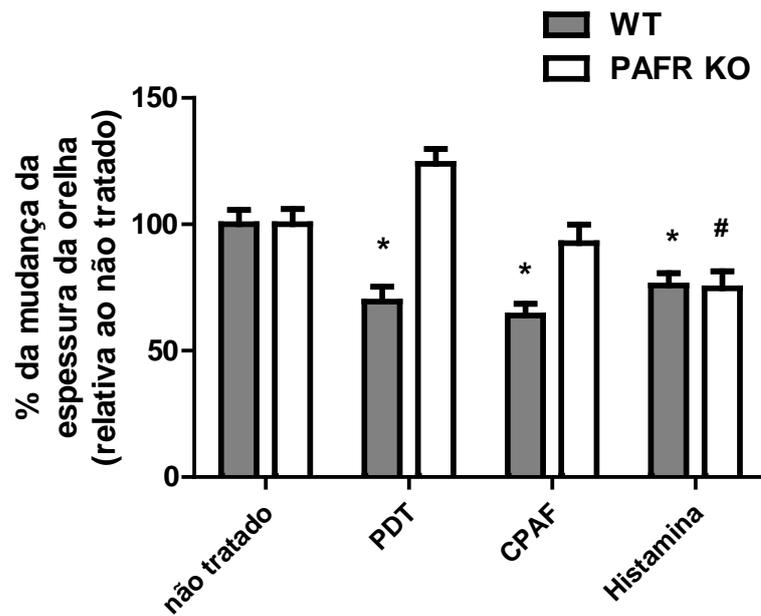


FIGURA 18 - PDT inibe reação de hipersensibilidade de contato ao DNFB de maneira dependente do PAF-R

Para o tratamento dos animais com PDT, grupos de cinco a oito camundongos (C57BL/6) WT e PAF-R KO foram tratados topicamente com 5-ALA no dorso inferior depilado. Após 4 h, a área contendo 5-ALA foi exposta a luz azul (415 nm, 20 J/cm² a 20 mW/cm²). Outro grupo de animais foi injetado com CPAF (250 ng/animal, i.p.) ou histamina (250 µg/animais, s.c.). Cinco dias após o tratamento, o dorso superior de todos os animais foi depilado e pintado com DNFB. Após nove dias, a espessura das orelhas foi medida, uma orelha tratada com DNFB, a outra com veículo, e a espessura medida novamente após 24 h. Os resultados representam a média ± EPM da porcentagem da mudança da espessura da orelha relativa ao grupo não tratado de três experimentos separados usando um mínimo de cinco animais por grupo experimental. * e # denotam diferenças estatisticamente significativas (p < 0.05) do grupo não tratado (* para WT e # para PAF-R KO).

5 DISCUSSÃO

O PAF e alguns fosfolipídeos modificados por oxidação (ox-GPC) podem ser reconhecidos pelo PAF-R que é constitutivamente expresso por macrófagos. O fato de organismos eucariotos dependerem de energia proveniente de reações de oxidação implica na geração de grande número de moléculas oxidadas que são removidas por macrófagos sem causar inflamação. Células alteradas também são eliminadas por macrófagos, fenômeno conhecido como eferocitose o qual também não causa inflamação. Nós mostramos aqui que durante a eferocitose, os macrófagos desenvolvem um perfil IL-10^{high}/IL-12p40^{low}, que se encaixa na definição de fenótipo regulador, e que isto é dependente de CD36 e PAF-R. Estudos anteriores já implicaram o receptor *scavenger* CD36 na fagocitose de CA (19, 20). Contudo, a interação do CD36 com o PAF-R só foi demonstrada recentemente em artigos do nosso grupo. Em um deles, mostramos que o *uptake* de oxLDL foi dependente do PAF-R, o qual contribuiu para o aumento da expressão do CD36. Além disso, a produção de IL-8 por macrófagos/monócitos humanos quando estimulados com oxLDL foi dependente de ambos os receptores (104).

Também observamos que o PAF-R e CD36 se associam e colocalizam na membrana dos macrófagos em regiões adjacentes às CA durante a fagocitose. Mais ainda, mostramos por imunoprecipitação que ambos PAF-R e CD36, além de associarem entre si, também se associam com a flotilina-1, uma proteína constitutiva de LR (93), em macrófagos que fagocitam CA. O contato e/ou comunicação entre diferentes receptores e moléculas de sinalização podem ser promovidos por LR, que são microdomínios que funcionam como plataformas na membrana plasmática ricos em esfingolipídeos e colesterol (92). Utilizando uma droga que depleta o colesterol da membrana e rompe os LR, mostramos também que estes microdomínios são necessários para a fagocitose das CA. Já foi descrito que o CD36 pode ser recrutado aos LR de maneira dependente de ligantes (105, 106). Além disso, outro estudo mostra que o PAF-R possui um motivo de ligação para uma proteína constitutiva de LR (caveolina-1) (107). Esses resultados sugerem que a interação PAF-R com CD36 acontece ao nível dos receptores, e não em níveis *downstream* de cascatas de sinalização geradas separadamente por cada um. Mais ainda, pelo fato de ambos os receptores reconhecerem lipídeos, não se pode descartar a hipótese de que um auxilie ou estabilize a interação ligante-receptor para ativação do outro — como uma molécula adaptadora —, o que poderia, de alguma forma, otimizar a transdução de sinais para a fagocitose ótima das CA.

Esta hipótese é sustentada pelo fato do CD36 possuir uma cauda intracitoplasmática curta, o que dificulta a sua sinalização intracelular (88). Em suma, estes dados sugerem que a fagocitose de CA é dependente de sinais provenientes da formação de LR e da interação entre o PAF-R e CD36, e que provavelmente a interação destes receptores seja promovida e aconteça nos LR.

Como resultado da eferocitose, mostramos aqui que os macrófagos produzem quantidades maiores de IL-10 do que de IL-12p40, corroborando dados da literatura (23). IL-10 é uma potente citocina com atividade supressora sobre quase todas as células tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida, e sua importância na regulação da resposta imune pode ser comprovada em animais que não expressam a IL-10 e desenvolvem espontaneamente doenças inflamatórias crônicas (108). A subunidade p40 faz parte da citocina IL-12 e é também compartilhada com a citocina IL-23. Ambas as citocinas estão ligadas a indução de processos inflamatórios e contribuem para geração de resposta imune do tipo TH1 e TH17, respectivamente, e a importância delas no fenótipo de ativação de células é descrita por estudos que mostram que animais deficientes de IL-12p40 possuem macrófagos produtores de citocina supressora (TGF- β) e menos responsivos a citocinas TH1 (IFN- γ) (109, 110). Pelo fato de a IL-10 e IL-12p40 serem produzidas pelos macrófagos e terem ações antagônicas sobre a inflamação e resposta imune, o balanço da produção das mesmas pode ser tomado como indicador do tipo de ativação que os macrófagos podem adquirir (25, 34, 94). Assim, determinamos o fenótipo dos macrófagos estimulados com CA na presença ou ausência de bloqueadores do PAF-R e CD36. Foi observado que tanto o bloqueio do PAF-R utilizando dois antagonistas distintos quanto do CD36 reduziu a expressão de IL-10 e de IL-12p40, esta em menor grau, induzida por CA. Porém, os níveis de ambas as citocinas, apesar de detectáveis, foram relativamente baixos, principalmente os de IL-12p40. Por isso, conduzimos protocolo no qual os macrófagos eram polarizados previamente com as CA por 24 h antes de se adicionar LPS, que é um estímulo por si capaz de induzir ambas as citocinas nestas células. Observamos que houve efeito aditivo na produção de IL-10, mas não de IL-12p40, quando macrófagos foram estimulados com LPS após fagocitar CA, e que este efeito foi inibido quando o PAF-R e o CD36 foram bloqueados.

Este fenômeno é semelhante ao observado em estudos realizados paralelamente que avaliaram o papel do PAF-R e CD36 na polarização de macrófagos por

oxLDL. Os resultados mostram que a oxLDL aumentou preferencialmente a expressão de mediadores anti-inflamatórios induzidos por LPS em macrófagos e que ambos os receptores estavam envolvidos nesse efeito (16). Além disso, a ingestão de oxLDL e expressão de IL-10 também foram dependentes de PAF-R e CD36 que colocalizavam com marcador de LR durante o estímulo com a oxLDL. Estes achados corroboram os descritos aqui e reforçam o papel do PAF-R na modulação da ativação de macrófagos para perfil regulador.

Conforme descrito anteriormente, a ativação por DAMPs e PAMPs pode gerar distintas respostas de acordo com o ligante e PRRs envolvidos. Grosso modo, o reconhecimento de PAMPs por macrófagos parece induzir preferencialmente produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12p40, e a ativação por DAMPs parece favorecer a produção de citocinas supressoras, como IL-10. Alguns estudos descreveram a capacidade de PRRs se associarem. Levando-se em conta as características dos PRRs em relação à amplitude de ligantes e o compartilhamento dos mesmos, especula-se que em algumas associações, os receptores funcionem como co-receptores os quais um deles é necessário, porém não suficiente para gerar a transdução de sinal pelo ligante. Um exemplo de associação descrita é do CD36 com receptores do tipo *toll* (TLR2, TLR4 e TLR6), o que, neste caso, resulta em produção de mediadores pró-inflamatórios (14). Neste sentido, mostramos que o PAF-R se associa com o PRR CD36 quando estimulados por DAMPs (CA e oxLDL) e que esta associação resultou em produção elevada de IL-10 (fenótipo regulador). Apesar de o PAF-R não ser considerado um PRR propriamente dito, isto sugere que DAMPs e PAMPs podem até ativar receptores em comum, porém as distintas respostas induzidas dependem dos PRRs envolvidos. Paralelamente, está descrito que o PAF-R, além de ter um ligante endógeno cuja ação é bem regulada por enzimas, também possui ligantes que são lipídeos oxidados que, na verdade, se enquadram no conceito de DAMPs gerados por estresse oxidativo. Com base nisto, levanta-se a questão sobre o enquadramento do PAF-R como um PRR capaz de reconhecer moléculas e/ou partículas que são compostas por moléculas oxidadas que apresentam determinado padrão, aqui comparado ao padrão reconhecido pelo CD36.

As etapas resultantes da ativação e interação entre o PAF-R e CD36 induzidas por CA ainda não foram completamente descritas. Nosso grupo mostrou anteriormente que a fagocitose de CA induz a expressão de COX-2 e que isso era inibido pelo bloqueio do PAF-R

(22). Além disso, a PGE₂, um dos produtos da COX-2, aumenta a produção de IL-10 via AMPc e do fator de transcrição CREB (95). Aqui, mostramos que a inibição de COX-2 com nimesulida teve efeito bastante similar ou até mais intenso que o bloqueio do PAF-R e CD36 sobre a produção de IL-10. Isto mostra que a PGE₂ faz parte da via de indução de IL-10 nestas condições. Visto que tanto o PAF-R como o CD36 podem reconhecer CA e que a expressão de IL-10 também depende dos dois receptores, é bastante provável que a expressão de COX-2 seja um passo *downstream* e dependente da ativação destes receptores.

Os mecanismos pelos quais o PAF-R modula o crescimento tumoral ainda não foram totalmente esclarecidos, porém resultados obtidos por nosso grupo e por outros sugerem a participação de CA neste fenômeno. Primeiro, Correa e colegas mostraram que a coinjeção de CA com uma dose sub-tumorigênica de células de melanoma promoveu o crescimento do tumor (111). Mais tarde, foi mostrado que este efeito pró-tumorigênico das CA era abolido pelo bloqueio do PAF-R (112). Em paralelo, outro estudo mostrou que a inoculação de CA antes do implante do TAE na cavidade peritoneal de camundongos aumentou o crescimento do tumor e que este fenômeno foi revertido com tratamento dos animais com antagonista de PAF-R (59). Estes achados mostram que a presença de CA no sítio tumoral pode modular a resposta imune contra tumores. Visto que no microambiente tumoral existe a presença de grande número de células mortas e o predomínio de citocinas imunossupressoras, como a IL-10, os resultados descritos aqui de que a indução de macrófagos reguladores por CA se dá via PAF-R explicam o efeito do bloqueio deste receptor sobre o crescimento tumoral. Mais ainda, conforme descrito anteriormente, macrófagos presentes no tumor (TAM) apresentam fenótipo de células reguladoras por produzirem altas quantidades de IL-10 e baixas quantidades de IL-12p40. Isso sugere que CA podem contribuir para o desenvolvimento dos TAM e que isso depende do PAF-R.

Até esta parte da tese, nós estudamos o papel do PAF-R no fenótipo de macrófagos que estão exercendo uma função natural, ou seja, que eles não estão ativados por citocinas. Na sequência, nós estudamos o papel do PAF-R em macrófagos na fase efetora da resposta imune, isto é, quando estimulados por citocinas de linfócitos ou via receptor para porção Fc de anticorpos IgG. Mostramos que nesta situação o bloqueio do PAF-R foi capaz de inibir parcialmente a expressão de marcadores de macrófagos ativados

classicamente, induzidos por IFN- γ e LPS, tais como MCP-1, TNF- α e iNOS. Além disso, mostramos que o bloqueio do PAF-R inibiu também a expressão de receptor de manose e arginase-1, ambos marcadores de macrófagos ativados alternativamente (induzidos por IL-4). Vimos também que o antagonista do PAF-R foi capaz de inibir a expressão de IL-10, mas não de IL-12p40, em macrófagos induzida por IgG-SRBC e LPS e, assim, inibindo o estabelecimento do perfil regulador. Estes resultados sugerem que a polarização de macrófagos com citocinas (classicamente e alternativamente ativados) ou com IgG-SRBC/LPS (reguladores) induz a produção de PAF ou moléculas PAF-símile endógenas que, ao ativar o PAF-R, contribui com a polarização dos macrófagos.

Citocinas, quimiocinas e enzimas são largamente utilizadas como marcadoras de polarização de macrófagos, porém, recentemente tem-se discutido que a função destas células deveria ser considerada como melhor marcador de polarização (41). Nesse sentido, os nossos resultados mostrando que o bloqueio do PAF-R inibe alguns marcadores do fenótipo classicamente ativado estão de acordo com as observações feitas em modelos de infecção onde o bloqueio do PAF-R diminuiu a atividade microbicida de macrófagos e aumento a infecção destas células *in vitro* por *Leishmania amazonensis* (47) e *Trypanosoma cruzi* (48). De modo semelhante, o bloqueio ou ausência do PAF-R em camundongos também aumentou a taxa infecção por *Leishmania* e *Trypanosoma* medida pelo aumento do número de parasitas no baço, linfonodo e nas lesões. Infecções por *Leishmania* e *Trypanosoma* são conhecidas por induzir respostas imunes do tipo TH1 que tem como característica a produção de IFN- γ e consequente ativação de macrófagos para eliminação dos parasitas (51, 52). Isto sugere que o bloqueio do PAF-R também inibe a imunidade adaptativa. De modo similar, macrófagos ativados alternativamente, que são induzidos por IL-4, podem ser encontrados em resposta imune do tipo TH2, como infecção por vermes e também em reações de hipersensibilidade do tipo 1 mediadas por IgE. É sabido que o PAF-R contribui com algumas características observadas nestas respostas, como na inflamação alérgica (113), porém, não se sabe se macrófagos têm papel importante neste contexto e muito menos se o PAF-R destas células contribui com estas respostas.

Esta parte do trabalho simula a ativação de macrófagos que atuam na fase efetora da resposta imune contra infecções por patógenos intracelulares (classicamente ativados) ou como alternativamente ativados (helmintos ou hipersensibilidade tipo 1). Estes

resultados sugerem que nestes dois contextos a estimulação induziu a produção de PAF que ao atuar no PAF-R modifica o seu fenótipo. Este contexto é bastante diferente de quando macrófagos *naive* são estimulados na resposta imune inata cuja ativação depende de receptores que reconhecem padrões moleculares, por exemplo, TLR, NLR, receptores *scavengers*.

Ainda analisando o papel do PAF-R sobre a polarização dos macrófagos, observamos o efeito do bloqueio do PAF-R sobre a produção de IL-10 e IL-12p40 — duas citocinas com funções antagônicas na resposta imune — induzida por IgG-SRBC e LPS. Vimos que o antagonista do PAF-R inibiu somente a produção de IL-10 e não teve efeito sobre a produção de IL-12p40 em macrófagos estimulados com IgG-SRBC/LPS. Os mecanismos pelos quais imunocomplexos e LPS induzem a produção de IL-10 envolvem a ativação de ERK (do inglês *Extracellular signal-regulated kinases*). Ainda, este estímulo pode induzir processos de metilação/acetilação de histonas (epigenética) que facilitam a transcrição do gene para IL-10 induzida pelo LPS (44, 114). Já a baixa expressão de IL-12p40 neste contexto parece ser dependente do influxo de Ca^{2+} extracelular derivado da ativação do $Fc\gamma R$ (115). Contudo, ainda não se sabe sobre os mecanismos pelos quais o PAF-R contribui para a expressão de IL-10 induzida por IgG-SRBC/LPS. É provável que a ativação deste receptor potencialize as vias de sinalização ativadas via IgG-SRBC, como a ERK, por exemplo, ou que a ligação do imunocomplexo com o $Fc\gamma R$ seja estabilizada pelo PAF-R, já que este receptor se mostrou capaz de interagir com o CD36 no caso das células apoptóticas e oxLDL, por exemplo.

Ligantes do PAF-R também são gerados em situações de estressores pró-oxidativos tais como luz UV (63-65), fumaça de cigarro (66), combustível de avião (62), etc. Aqui, mostramos que a terapia fotodinâmica induziu a geração de ligantes do PAF-R em queratinócitos humanos. A detecção das espécies ligantes do PAF-R foi feita utilizando ensaio biológico que mede a capacidade de ativação do receptor em células transfectadas com o PAF-R, ou seja, por um bioensaio funcional. Além deste, analisamos a estrutura dos lipídeos das amostras por espectrometria de massa e detectamos que a PDT induziu majoritariamente espécies de PAF que podem ser geradas enzimaticamente. Está descrito que estímulos pró-oxidativos podem gerar ligantes do PAF-R também de modo não enzimático via geração de espécies reativas de oxigênio, e que este evento pode ser bloqueado pela presença de agentes antioxidantes. No caso da PDT, os antioxidantes

adicionados não bloquearam a geração de ligantes do PAF-R, o que reforça a tese de que as espécies de PAF detectadas foram biossintetizadas enzimaticamente. Além disso, realizamos a PDT em camundongos e detectamos que esta terapia induziu imunossupressão sistêmica de modo dependente do PAF-R. Já era descrito que este tipo de terapia induz imunossupressão tanto em camundongos quanto em humanos (103, 116), porém este é o primeiro estudo que mostra que o PAF-R faz parte dos mecanismos pelos quais isto acontece. De modo similar, ainda em terapias anticâncer, utilizando um modelo em que o mesmo camundongo era injetado com células tumorais em dois pontos diferentes (melanoma B16F10, uma injeção subcutânea em cada flanco), mostramos que quimioterapia intratumoral em um dos tumores aumentou a taxa de crescimento do outro tumor de modo dependente do PAF-R. Neste mesmo estudo, mostramos que esta imunossupressão induzida por quimioterapia foi dependente de COX-2 e da geração de células T reguladoras. Porém, diferente da PDT, os quimioterápicos induziram ligantes do PAF-R por via não enzimática que foi bloqueada pela presença de vitamina C ou n-acetilcisteína (agentes antioxidantes) presentes na dieta dos animais (APENDICES).

A indução de imunossupressão sistêmica pela ativação do PAF-R já foi descrita em vários outros estudos e mostra a relevância deste receptor na modulação da resposta imune adquirida, porém os mecanismos envolvidos nesta modulação ainda não foram totalmente esclarecidos. Sahu e colegas mostraram que UVB promoveu aumento do crescimento tumoral em animais WT, mas não em PAF-R KO, e que a depleção de células T reguladoras ou de IL-10 — ambas aumentadas — bloqueou o efeito da UVB sobre o aumento do crescimento tumoral (65). Em outro estudo, Sahu e colegas mostraram que fumaça de cigarro inibiu resposta ao DNFB em modelo de hipersensibilidade de contato em camundongos via geração de ligantes do PAF-R. O bloqueio da COX-2 e depleção das células T reguladoras anulou o efeito da fumaça de inibir a CHS, mostrando que ambas fazem parte do mecanismo de indução de imunossupressão sistêmica via PAF-R (66). Já foi descrito que a PDT induz morte celular por apoptose e necrose em células que captam o agente fotossensível e são expostas a luz (117, 118). É bastante provável que, além do PAF (mostrado aqui em modelo de PDT *in vitro*), células apoptóticas também atuem como ligantes do PAF-R em animais que sofreram PDT, e que isso também contribui para a indução da imunossupressão sistêmica detectada via PAF-R.

No protocolo de CHS utilizado para mostrar a indução de imunossupressão sistêmica, o estímulo gerador de ligantes do PAF-R (PDT ou mesmo fumaça de cigarro testada por Sahu et al) foi realizado dias antes da sensibilização dos animais com DNFB para indução de imunidade específica ao antígeno/hapteno. Contudo, um experimento realizado em 1986 mostrou que a PDT perdia a capacidade de induzir imunossupressão sistêmica se fosse realizada após a sensibilização dos camundongos com antígeno/hapteno (119). Este achado sugere que o efeito do PAF-R sobre a resposta imune aconteça ao nível da imunidade inata, ou seja, que após os eventos de apresentação de antígenos e ativação de linfócitos (sensibilização), a ativação do PAF-R não altera as características de polarização da imunidade adquirida. Uma das grandes questões acerca do mecanismo pelo qual agentes estressores pró-oxidativos indutores de ligantes do PAF-R como PDT, quimioterápicos, UVB e fumaça de cigarro induzem imunossupressão sistêmica é em quais células o PAF-R é ativado. Não podemos descartar o papel dos macrófagos nas fases da imunidade inata atuando neste contexto, visto que mostramos aqui o envolvimento da COX-2 na produção de IL-10 induzida por células apoptóticas via PAF-R. Assim, hipotetizamos que a PDT gera PAF e células apoptóticas que ativam o PAF-R de macrófagos residentes da pele (células de Langerhans, por exemplo) e que isto culmina na expressão de IL-10 provavelmente dependente da produção de prostanóides. Este quadro, então, favoreceria a geração de células T reguladoras que inibiriam a resposta de CHS ao DNFB. Neste sentido, outro trabalho do nosso grupo mostrou que o bloqueio do PAF-R em células dendríticas derivadas de medula óssea aumentou a taxa de proliferação de linfócitos *in vitro* e sugeriu então que a ativação do PAF-R nestas células induzia células dendríticas reguladoras, o que reforça a hipótese de que a ativação do PAF-R na fase inata da resposta imune é capaz de modular a resposta imune adquirida (120).

A descoberta de que o PAF-R modula a ativação de macrófagos que fagocitam CA abre perspectivas para o uso deste receptor como alvo terapêutico em situações nas quais não é desejável o estabelecimento de células reguladoras/supressoras em ambientes nos quais este receptor pode ser ativado. Exemplo disso é o efeito do bloqueio deste receptor que é capaz de reduzir por si só a taxa de crescimento tumoral em modelos experimentais de melanoma (59, 61). Além disso, estes estudos mostram que a administração de antagonistas do PAF-R com quimioterápicos aumenta a eficácia da

quimioterapia. Este achado leva em conta a participação do PAF-R tanto em leucócitos — e modulação da imunidade contra tumores — quanto a ativação deste receptor em alguns tipos de melanomas. Primeiro, conforme mostrado aqui, a ativação do PAF-R por CA — que estão presentes em abundância no microambiente tumoral — induz a polarização de macrófagos para perfil regulador (produção de IL-10). Segundo, conforme citado anteriormente, agentes quimioterápicos são capazes de induzir ligantes do PAF-R e isto contribui para diminuição da resposta imune contra tumores. Em terceiro, estudos mostram que alguns tumores expressam o PAF-R e que a ativação deste receptor contribui para aumento na resistência dos tumores a ação citotóxica de quimioterápicos. Deste modo, estudos que avaliarão o bloqueio do PAF-R durante a quimioterapia antitumoral serão de grande importância para otimização do tratamento de pacientes com câncer.

Contudo, a ação do PAF-R também se mostrou importante para a ingestão de CA pelos macrófagos, o que é fenômeno essencial para a manutenção da homeostase. Foi descrito que o *clearance* desregulado de CA estava associado com algumas doenças autoimunes e crônicas, como o lúpus eritematoso sistêmico, diabetes tipo 1, doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças cardiovasculares (26). Seria preciso, neste caso, avaliar se o bloqueio do PAF-R reduz a ingestão de CA *in vivo* e, mais adiante, se o uso de drogas bloqueadoras do PAF-R contribui com o desenvolvimento de doenças crônicas derivadas da falta de eliminação de células apoptóticas.

Por outro lado, devido à ativação do PAF-R levar macrófagos ao fenótipo regulador, agonistas deste receptor poderiam ser úteis em situações nas quais doenças crônicas inflamatórias, como algumas doenças autoimunes, tivessem de ser atenuadas. De fato, a importância dos macrófagos reguladores é corroborada por estudos que mostram que diferenças no FcγR em humanos levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e esclerose múltipla (121). Um exemplo do uso de macrófagos reguladores como potenciais agentes terapêuticos foi mostrado por estudos com macrófagos estimulados com imunocomplexos e LPS. Simulando modelo de inflamação aguda, foi mostrado que a injeção de um milhão de macrófagos reguladores (tratados com imunocomplexos e LPS) em camundongos antes da injeção de dose letal de LPS foi capaz de reduzir drasticamente a mortalidade e sintomas da injeção da endotoxina (122). Além disso, o mesmo autor relata que a administração de droga que induz

macrófagos reguladores foi capaz de reverter o quadro de paralisia em camundongos nos quais foi induzido modelo de encefalomielite autoimune experimental, porém esta droga não é conhecida e estes dados ainda não foram publicados (46). De modo semelhante, outro grupo mostrou que a injeção de IgG-SRBC antes de se iniciar o protocolo de indução de encefalomielite autoimune experimental em camundongos retardou o estabelecimento da doença e amenizou os sintomas causados pela mesma. Segundo os autores, este efeito foi devido a indução de resposta TH2 pelas IgG-SRBC que antagonizou a resposta TH1 causadora da doença (123). Visto que o PAF-R participa do estabelecimento de macrófagos reguladores por aumentar a expressão de IL-10, podemos acreditar que a adição de ligantes do PAF-R potencializaria a capacidade destas células de reverter ou amenizar doenças inflamatórias crônicas como algumas doenças autoimunes e do trato gastrointestinal.

Os achados mostrados aqui contribuem para o entendimento do papel do PAF-R na resposta imune através de sua ativação em macrófagos. A importância destas células tanto nas fases iniciais de reconhecimento e inflamação quanto na fase efetora da resposta imune (inflamação imunomediada) se dá pelo fato de as mesmas apresentarem um espectro de ativação o qual é didaticamente dividido e classificado como polarização. Neste sentido, o papel do PAF-R mostrou-se importante na fisiologia da ativação dos macrófagos por diferentes citocinas da imunidade adquirida que orquestram respostas contra infecções intracelulares, parasitárias e alergias, por exemplo, e também na ativação por ligantes que induzem macrófagos que suprimem a resposta imune, mostrando, enfim, que o PAF-R tem papel relevante dentro do espectro de ativação destas células. O importante papel dos macrófagos na homeostase foi aqui melhor estudado ao se colocar estas células em contato com células apoptóticas e avaliando o papel do PAF-R juntamente com CD36, receptor cuja participação da homeostase já estava mais bem descrita. Os resultados mostram que não só a ativação dos macrófagos para perfil regulador, mas também o processo de reconhecimento e ingestão das CA é dependente do PAF-R e de sua associação com o CD36. Mais ainda, a participação da PAF-R na resposta imune foi demonstrada pela indução de imunossupressão sistêmica pela PDT, que foi via geração de ligantes do PAF-R. Além disso, este é um exemplo que mostra a participação deste receptor como componente de efeitos colaterais de terapias anticâncer realizadas em humanos. Em conjunto, os dados mostrados aqui demonstram a relevância do PAF-R em processos imunológicos e, com isso, suportam a

ideia de se utilizar tanto a ativação quanto o bloqueio deste receptor como ferramenta terapêutica para modulação da resposta imune ou otimização de protocolos de terapia anticâncer.

6 CONCLUSÕES

Em macrófagos, células apoptóticas induzem a associação e colocalização de PAF-R com CD36 em *lipid rafts* e a ativação de ambos os receptores culmina na fagocitose ótima destas células.

A associação do PAF-R com CD36 durante a fagocitose de células apoptóticas induz o perfil regulador de macrófagos (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}) de modo dependente da produção de prostanóides.

No contexto de imunidade adquirida, durante ativação de macrófagos por IFN- γ /LPS e por IL-4, o PAF-R contribui para a expressão dos marcadores de fenótipo de ativação clássica e alternativa, respectivamente. Quando macrófagos são estimulados via Fc γ R e LPS, o PAF-R contribui para a produção de IL-10 e não afeta IL-12p40, induzindo o fenótipo regulador (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}).

A terapia fotodinâmica induz a geração de ligantes do PAF-R, resultando em imunossupressão sistêmica. Este efeito do PAF-R acontece provavelmente durante a imunidade inata (macrófagos e células dendríticas) que culmina na modulação da resposta imune adquirida.

Em conjunto, estes achados mostram a relevância do PAF-R na ativação de macrófagos e na modulação da resposta imune, ressalta seu importante papel na homeostase e seu potencial uso como alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Brown SL, Jala VR, Raghuwanshi SK, Nasser MW, Haribabu B, Richardson RM. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J Immunol.* 2006;177(5):3242-9.
2. Honda Z, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *J Biochem.* 2002;131(6):773-9.
3. Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, et al. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(3-4):287-97.
4. Marrache AM, Gobeil F, Jr., Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, et al. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol.* 2002;169(11):6474-81.
5. Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. *J Exp Med.* 1970;131(2):287-306.
6. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med.* 1972;136(6):1356-77.
7. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:419-45.
8. Murphy RC. Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products. *Adv Exp Med Biol.* 1996;416:51-8.
9. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem.* 1992;267(21):15168-75.
10. McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S255-9.
11. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res.* 2011;108(2):235-48.
12. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
13. Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity.* 2009;30(6):766-75.

*De acordo com:

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

14. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(9):621-34.
15. Rios FJ, Ferracini M, Pecenin M, Koga MM, Wang Y, Ketelhuth DF, et al. Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts. *PLoS One*. 2013;8(10):e76893.
16. Rios FJ, Koga MM, Pecenin M, Ferracini M, Gidlund M, Jancar S. Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:198193.
17. Morato-Marques M, Campos MR, Kane S, Rangel AP, Lewis C, Ballinger MN, et al. Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity. *J Biol Chem*. 2011;286(33):28902-13.
18. Serezani CH, Kane S, Collins L, Morato-Marques M, Osterholzer JJ, Peters-Golden M. Macrophage Dectin-1 Expression Is Controlled by Leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 Axis. *J Immunol*. 2012;189(2):906-15.
19. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor ($\alpha v \beta 3$). *J Immunol*. 1998;161(11):6250-7.
20. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2006;203(12):2613-25.
21. Sambrano GR, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(5):1396-400.
22. de Oliveira SI, Fernandes PD, Amarante Mendes JG, Jancar S. Phagocytosis of apoptotic and necrotic thymocytes is inhibited by PAF-receptor antagonists and affects LPS-induced COX-2 expression in murine macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2006;80(1-2):62-73.
23. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*. 2001;108(7):957-62.
24. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest*. 1998;101(4):890-8.
25. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, et al. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol*. 2010;185(4):2044-50.

26. Korns D, Frasn SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol.* 2011;2:57.
27. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-95.
28. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-55.
29. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-64.
30. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-9.
31. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-73.
32. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.
33. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol.* 1994;6(3):458-66.
34. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.
35. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008;181(6):3733-9.
36. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303-11.
37. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007;11(2):R49.
38. Mehta A, Brewington R, Chatterji M, Zoubine M, Kinasevitz GT, Peer GT, et al. Infection-induced modulation of m1 and m2 phenotypes in circulating monocytes: role in immune monitoring and early prognosis of sepsis. *Shock.* 2004;22(5):423-30.
39. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
40. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.

41. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
42. Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002;72(1):101-6.
43. Anderson CF, Mosser DM. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* 2002;168(8):3697-701.
44. Gerber JS, Mosser DM. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fc gamma receptors. *Microbes Infect.* 2001;3(2):131-9.
45. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1298-307.
46. Fleming BD, Mosser DM. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2498-502.
47. Lonardoni MV, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.* 2000;68(11):6355-61.
48. Aliberti JC, Machado FS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Silva JS. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect Immun.* 1999;67(6):2810-4.
49. Talvani A, Santana G, Barcelos LS, Ishii S, Shimizu T, Romanha AJ, et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Microbes Infect.* 2003;5(9):789-96.
50. Soares AC, Pinho VS, Souza DG, Shimizu T, Ishii S, Nicoli JR, et al. Role of the platelet-activating factor (PAF) receptor during pulmonary infection with gram negative bacteria. *Br J Pharmacol.* 2002;137(5):621-8.
51. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 1992;22(10):2501-6.
52. Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di Padova K, Behin R, et al. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol.* 1996;26(7):1553-9.
53. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006;124(2):263-6.
54. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-55.

55. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):71-8.
56. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1155-66.
57. Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. *Int J Immunopharmacol*. 1990;12(1):57-65.
58. Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*. 1990;14(1):125-32.
59. de Oliveira SI, Andrade LN, Onuchic AC, Nonogaki S, Fernandes PD, Pinheiro MC, et al. Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;10:200.
60. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol*. 2008;180(4):2650-8.
61. Onuchic AC, Machado CM, Saito RF, Rios FJ, Jancar S, Chammas R. Expression of PAFR as part of a pro-survival response to chemotherapy: a novel target for combination therapy in melanoma. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:175408.
62. Ramos G, Limon-Flores AY, Ullrich SE. Dermal exposure to jet fuel suppresses delayed-type hypersensitivity: a critical role for aromatic hydrocarbons. *Toxicol Sci*. 2007;100(2):415-22.
63. Konger RL, Marathe GK, Yao Y, Zhang Q, Travers JB. Oxidized glycerophosphocholines as biologically active mediators for ultraviolet radiation-mediated effects. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2008;87(1-4):1-8.
64. Marathe GK, Johnson C, Billings SD, Southall MD, Pei Y, Spandau D, et al. Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35448-57.
65. Sahu RP, Turner MJ, DaSilva SC, Rashid BM, Ocana JA, Perkins SM, et al. The environmental stressor ultraviolet B radiation inhibits murine antitumor immunity through its ability to generate platelet-activating factor agonists. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1360-7.
66. Sahu RP, Petrache I, Van Demark MJ, Rashid BM, Ocana JA, Tang Y, et al. Cigarette smoke exposure inhibits contact hypersensitivity via the generation of platelet-activating factor agonists. *J Immunol*. 2013;190(5):2447-54.
67. Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(11):897-901.
68. Walterscheid JP, Ullrich SE, Nghiem DX. Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression. *J Exp Med*. 2002;195(2):171-9.

69. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(1):49-59.
70. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):59-73.
71. Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, et al. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med.* 1998;187(11):1779-88.
72. Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of murine macrophages. *Methods Mol Biol.* 2005;290:91-103.
73. Davies JQ, Gordon S. Basic cell culture protocols. *Methods Mol Biol.* 2005;290:91-103.
74. Prestes-Carneiro LE, Shio MT, Fernandes PD, Jancar S. Cross-regulation of iNOS and COX-2 by its products in murine macrophages under stress conditions. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(5):283-92.
75. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(6):1311-24.
76. Hu B, Punturieri A, Todt J, Sonstein J, Polak T, Curtis JL. Recognition and phagocytosis of apoptotic T cells by resident murine tissue macrophages require multiple signal transduction events. *J Leukoc Biol.* 2002;71(5):881-9.
77. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.
78. Bolte S, Cordelieres FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 2006;224(Pt 3):213-32.
79. Ferracini M, Martins JO, Campos MR, Anger DB, Jancar S. Impaired phagocytosis by alveolar macrophages from diabetic rats is related to the deficient coupling of LTs to the Fc gamma R signaling cascade. *Mol Immunol.* 2010;47(11-12):1974-80.
80. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
81. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7.
82. Pei Y, Barber LA, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW, Dy LC, et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol.* 1998;161(4):1954-61.

83. Yao Y, Wolverton JE, Zhang Q, Marathe GK, Al-Hassani M, Konger RL, et al. Ultraviolet B radiation generated platelet-activating factor receptor agonist formation involves EGF-R-mediated reactive oxygen species. *J Immunol.* 2009;182(5):2842-8.
84. Harrison KA, Davies SS, Marathe GK, McIntyre T, Prescott S, Reddy KM, et al. Analysis of oxidized glycerophosphocholine lipids using electrospray ionization mass spectrometry and microderivatization techniques. *J Mass Spectrom.* 2000;35(2):224-36.
85. Kayganich-Harrison KA, Murphy RC. Characterization of chain-shortened oxidized glycerophosphocholine lipids using fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1994;221(1):16-24.
86. Zhang Q, Mousdicas N, Yi Q, Al-Hassani M, Billings SD, Perkins SM, et al. Staphylococcal lipoteichoic acid inhibits delayed-type hypersensitivity reactions via the platelet-activating factor receptor. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2855-61.
87. Zhang Q, Yao Y, Konger RL, Sinn AL, Cai S, Pollok KE, et al. UVB radiation-mediated inhibition of contact hypersensitivity reactions is dependent on the platelet-activating factor system. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1780-7.
88. Silverstein RL, Li W, Park YM, Rahaman SO. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2010;121:206-20.
89. Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(11):2012-30.
90. Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L. Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(5):963-8.
91. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol.* 2006;79(5):896-903.
92. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 2010;327(5961):46-50.
93. Li N, Mak A, Richards DP, Naber C, Keller BO, Li L, et al. Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics.* 2003;3(4):536-48.
94. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-61.
95. Alvarez Y, Municio C, Alonso S, Sanchez Crespo M, Fernandez N. The induction of IL-10 by zymosan in dendritic cells depends on CREB activation by the coactivators CREB-binding protein and TORC2 and autocrine PGE2. *J Immunol.* 2009;183(2):1471-9.

96. Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol.* 2002;168(5):2255-63.
97. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, Kristariyanto Y, et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol.* 2013;190(2):565-77.
98. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol.* 2000;164(1):361-70.
99. Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med.* 1994;180(6):2365-70.
100. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE, British Association of Dermatologists Therapy G, Audit S, the British Photodermatology G. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol.* 2008;159(6):1245-66.
101. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(12):889-905.
102. Yao Y, Harrison KA, Al-Hassani M, Murphy RC, Rezania S, Konger RL, et al. Platelet-activating factor receptor agonists mediate xeroderma pigmentosum A photosensitivity. *J Biol Chem.* 2012;287(12):9311-21.
103. Mroz P, Hamblin MR. The immunosuppressive side of PDT. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(5):751-8.
104. Rios FJ, Koga MM, Ferracini M, Jancar S. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. *PLoS One.* 2012;7(5):e36632.
105. Kazerounian S, Duquette M, Reyes MA, Lawler JT, Song K, Perruzzi C, et al. Priming of the vascular endothelial growth factor signaling pathway by thrombospondin-1, CD36, and spleen tyrosine kinase. *Blood.* 2011;117(17):4658-66.
106. Triantafilou M, Gamper FG, Lepper PM, Mouratis MA, Schumann C, Harokopakis E, et al. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2007;9(8):2030-9.
107. Poisson C, Rollin S, Veronneau S, Bousquet SM, Larrivee JF, Le Gouill C, et al. Caveolae facilitate but are not essential for platelet-activating factor-mediated calcium mobilization and extracellular signal-regulated kinase activation. *J Immunol.* 2009;183(4):2747-57.
108. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81.

109. Bastos KR, Alvarez JM, Marinho CR, Rizzo LV, Lima MR. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *J Leukoc Biol.* 2002;71(2):271-8.
110. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722-8.
111. Correa M, Machado J, Jr., Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, et al. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer.* 2005;114(3):356-63.
112. Bachi AL, Dos Santos LC, Nonogaki S, Jancar S, Jasiulionis MG. Apoptotic cells contribute to melanoma progression and this effect is partially mediated by the platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:610371.
113. Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B. Platelet-activating factor (PAF): a review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2008;2(1):72-6.
114. Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J Immunol.* 2006;177(2):1282-8.
115. Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med.* 1997;185(11):1977-85.
116. Matthews YJ, Damian DL. Topical photodynamic therapy is immunosuppressive in humans. *Br J Dermatol.* 2010;162(3):637-41.
117. Henderson BW, Waldow SM, Mang TS, Potter WR, Malone PB, Dougherty TJ. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res.* 1985;45(2):572-6.
118. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1(1):1-21.
119. Elmets CA, Bowen KD. Immunological suppression in mice treated with hematoporphyrin derivative photoradiation. *Cancer Res.* 1986;46(4 Pt 1):1608-11.
120. Koga MM, Bizzarro B, Sa-Nunes A, Rios FJ, Jancar S. Activation of PAF-receptor induces regulatory dendritic cells through PGE2 and IL-10. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89(5):319-26.
121. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):580-92.
122. Gerber JS, Mosser DM. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* 2001;166(11):6861-8.
123. La Flamme AC, Harvie M, McNeill A, Goldsack L, Tierney JB, Backstrom BT. Fc gamma receptor-ligating complexes improve the course of experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing basal Th2 responses. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(6):522-9.

APÊNDICES

Artigos publicados ou submetidos durante o período do doutorado.

APÊNDICE A

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

APÊNDICE B

Rios FJ, Koga MM, Pecenin M, **Ferracini M**, Gidlund M, Jancar S. Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:198193.

APÊNDICE C

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

APÊNDICE D

Ferracini M, Rios FJ, Pecenin M, Jancar S. Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:950273.

APÊNDICE E

Ferracini M, Sahu RP, Harrison KA, Waeiss RA, Murphy RC, Jancar S, Konger RL, Travers JB. Topical photodynamic therapy induces systemic immunosuppression via generation of platelet-activating factor receptor ligands. *J Invest Derm*. *no prelo*.

APÊNDICE F

Sahu RP, Ocana JA, Harrison KA, **Ferracini M**, Touloukian CE, Al-Hassani M, Sun L, Loesch M, Murphy RC, Althouse SK, Perkins SM, Speicher PJ, Tyler DS, Konger RL, Travers JB. Chemotherapeutic agents subvert tumor immunity by generating Platelet-activating Factor agonists. *Submetido*.

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

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

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

Abstract

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

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

Editor: Maurizio Perse, Centro Cardiologico Monzino, Italy

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

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

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

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

* E-mail: fjos@usp.br

Introduction

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

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

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

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

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



Research Article

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

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

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

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

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

Received 2 June 2013; Accepted 22 July 2013

Academic Editor: Ishak Tekin

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

Editor: Andrea Cignarella, University of Padova, Italy

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

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

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

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

* E-mail: forios@usp.br

Introduction

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

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

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

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



Research Article

Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages Induces Regulatory Phenotype and Involves Stimulation of CD36 and Platelet-Activating Factor Receptor

Matheus Ferracini,¹ Francisco J. O. Rios,^{1,2} Mateus Pecenin,¹ and Sonia Jancar¹

¹ Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Avenue Professor Lineu Prestes 1730, ICB IV, Sala 140/146, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

² Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, British Heart Foundation Glasgow Cardiovascular Research Centre, University of Glasgow, Glasgow G12 8TA, UK

Correspondence should be addressed to Sonia Jancar; sojancar@ich.usp.br

Received 10 July 2013; Revised 14 September 2013; Accepted 8 October 2013

Academic Editor: Hidde Bult

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

Phagocytosis of apoptotic cells (efferocytosis) induces macrophage differentiation towards a regulatory phenotype (IL-10^{high}/IL-12p40^{low}). CD36 is involved in the recognition of apoptotic cells (AC), and we have shown that the platelet-activating factor receptor (PAFR) is also involved. Here, we investigated the contribution of PAFR and CD36 to efferocytosis and to the establishment of a regulatory macrophage phenotype. Mice bone marrow-derived macrophages were cocultured with apoptotic thymocytes, and the phagocytic index was determined. Blockage of PAFR with antagonists or CD36 with specific antibodies inhibited the phagocytosis of AC (~70–80%). Using immunoprecipitation and confocal microscopy, we showed that efferocytosis increased the CD36 and PAFR colocalisation in the macrophage plasma membrane; PAFR and CD36 coimmunoprecipitated with flotillin-1, a constitutive lipid raft protein, and disruption of these membrane microdomains by methyl- β -cyclodextrin reduced AC phagocytosis. Efferocytosis induced a pattern of cytokine production, IL-10^{high}/IL-12p40^{low}, that is, characteristic of a regulatory phenotype. LPS potentiated the efferocytosis-induced production of IL-10, and this was prevented by blocking PAFR or CD36. It can be concluded that phagocytosis of apoptotic cells engages CD36 and PAFR, possibly in lipid rafts, and this is required for optimal efferocytosis and the establishment of the macrophage regulatory phenotype.

1. Introduction

Clearance of apoptotic cells (AC) by macrophages, also called efferocytosis, plays a central role in tissue homeostasis, and the impaired clearance of altered cells has been associated with the development of autoimmune and chronic inflammatory diseases [1]. Macrophages can acquire distinct phenotypes depending on the stimulus. M1 or classically activated macrophages are induced by the recognition of PAMPs (pathogen associated molecular patterns) and by proinflammatory cytokines. These cells exhibit high microbicidal activity and induce inflammation. In contrast, M2 macrophages produce anti-inflammatory and tissue remodelling cytokines and can be divided into subtypes according to the stimulus;

the alternatively activated macrophages are induced by Th2 cytokines, and the regulatory macrophages are induced by anti-inflammatory cytokines, immune complexes, apoptotic cells, and oxidised lipids, among other stimuli [2, 3].

The first evidence that efferocytosis induces a suppressor phenotype came from the studies of Fadok et al. [4]. The authors showed that the addition of apoptotic cells to macrophages inhibited the expression of proinflammatory cytokines induced by LPS. Later on, it was reported that the clearance of apoptotic neutrophils induced an IL-10^{high}/IL-12^{low} regulatory phenotype in macrophages [5].

There is evidence that platelet-activating factor (PAF) or PAF-like moieties present in the tumour microenvironment

APÊNDICE E

Page 1 of 19

Journal of Investigative Dermatology

Ferracini *et al.***Topical photodynamic therapy induces systemic immunosuppression via generation of platelet-activating factor receptor ligands**

Matheus Ferracini¹, Ravi P. Sahu^{2,3}, Kathleen A. Harrison⁵, Robert A. Waeiss⁴, Robert C. Murphy⁵, Sonia Jancar¹, Raymond L. Konger^{2,3} and Jeffrey B. Travers^{2,4,6,7}.

¹Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Brazil.

Departments of ²Dermatology, ³Pathology and Laboratory Medicine, ⁴Pharmacology and Toxicology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202.

⁵Department of Pharmacology, University of Colorado Health Sciences Center, Aurora CO.

⁶The Richard L. Roudebush V.A. Medical Center, Indianapolis, IN 46202.

Running title: PDT-induced immunosuppression is via PAF-R

⁷Corresponding author:

Jeffrey B. Travers, M.D., Ph.D.

H.B. Wells Center for Pediatric Research

Indiana University School of Medicine

1044 W. Walnut St. Rm. 202

Indianapolis, IN 46202

Key words: Photodynamic therapy, platelet-activating factor, immunosuppression

Abbreviations used in this paper: PDT, photodynamic therapy; 5-ALA, 5-aminolevulinic acid; CHS, contact hypersensitivity; WT, wild type; PAF-R KO, PAF-R-deficient mice; KBP, PAF-R-expressing human epithelial KB cell line; KBM, PAF-R-non-expressing human epithelial KB cell line; COX-2, cyclooxygenase type 2; PGE₂, prostaglandin E₂; UVB, ultraviolet B; IL-8, interleukin-8; IL-10, interleukin-10; CPAF, 1-hexadecyl-2-N-methylcarbamoyl glycerophosphocholine; DNFB, dinitrofluorobenzene; NAC, N-acetylcysteine; PAF, platelet-activating factor; GPC, glycerophosphocholine; Ox-GPC, oxidized GPC; PAF-R, PAF receptor; i.p., intraperitoneal injection; s.c., subcutaneous injection.

None of the authors have a relevant conflict of interest.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

APÊNDICE F

Sahu, Ocana et al.

**Chemotherapeutic agents subvert tumor immunity by generating
Platelet-activating Factor agonists**

Ravi P. Sahu,^{1,2*} Jesus A. Ocana,^{1,3*} Kathleen A. Harrison,⁵ Matheus Ferracini,¹ Christopher E. Touloukian,⁴ Mohammed Al-Hassani,¹ Louis Sun,¹ Mathew Loesch,¹ Robert C. Murphy,⁵ Sandra K. Althouse⁶, Susan M. Perkins⁶, Paul J. Speicher⁷, Douglas S. Tyler⁷, Raymond L. Konger,^{1,2} and Jeffrey B. Travers.^{1,3,8,9}

Departments of ¹Dermatology, ²Pathology and Laboratory Medicine, ³Pharmacology and Toxicology, ⁴Surgery, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN

⁵Department of Pharmacology, University of Colorado Health Sciences Center, Aurora CO

⁶Department of Biostatistics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN

⁷The Department of Surgery, Duke University Medical Center, Durham, NC

⁸the Richard L. Roudebush V.A. Medical Center, Indianapolis, IN 46202.

*These two authors contributed equally to this work.

Running Title: Chemotherapy immunosuppression via PAF agonists

⁹Corresponding author:

Jeffrey B. Travers, M.D., Ph.D.
H.B. Wells Center for Pediatric Research
Indiana University School of Medicine
1044 Walnut St. Rm. 202
Indianapolis, IN 46202