

## A PENTRAXINA 3 POSSUI DUALIDADE DE FUNÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR *IN VITRO* DE CÉLULAS TUMORAIS QUE EXPRESSAM FGF2

João P.S. Nunes<sup>1</sup>, Priscila F. Rodrigues<sup>1</sup>, Adriana A.M. Dias<sup>2</sup>

1. Programa de Pós Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral – ICB, UFMG / Doutorandos
2. ICB-UFMG - Coordenadora do Laboratório de Genética Experimental, Departamento de Biologia Geral – ICB, UFMG / Orientadora

### Resumo

A Pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína de fase aguda com funções na resposta imune inata e inflamação. Sua síntese é estimulada no sítio da inflamação por IL1B, TNFA e agonistas dos receptores tipo Toll. PTX3 se liga ao fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) inibindo seus efeitos na proliferação celular e angiogênese. Nosso objetivo foi avaliar a ação de PTX3 sobre a proliferação de células tumorais que expressam FGF2. O perfil gênico das células de melanoma humano SK-MEL-188 e 37 e dos fibrossarcomas murino MC17-51 e Sal/N foi avaliado por PCR em tempo real e a ação da proteína PTX3 recombinante na proliferação celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Mostramos que PTX3 inibe a proliferação das células de melanoma humano, mas estimula a de fibrossarcomas murinos. As bases moleculares desta dualidade de funções observada precisam ser investigadas para que se possa avaliar tanto o papel de PTX3 na biologia dos tumores quanto sua aplicação como ferramenta terapêutica para cânceres.

**Palavras-chave:** PTX3; proliferação celular; FGF2

**Apoio Financeiro:** FAPEMIG, CAPES, PRPq/UFMG, CNPq.

### Introdução

A família das Pentraxinas é composta por proteínas filogeneticamente conservadas que atuam como receptores de reconhecimentos de padrões (PRR) com funções não redundantes na imunidade inata<sup>1</sup>. Essas proteínas são conhecidas por compartilharem várias funções no braço humoral do sistema imune através do reconhecimento e opsonização de ligantes microbianos e na inflamação, através da

ativação das vias do complemento<sup>2</sup>. A Pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína octamérica expressa principalmente por células dendríticas, epiteliais e fibroblastos em resposta a estímulos pró-inflamatórios como TNFA<sup>3;4</sup>, IL1B<sup>4</sup> e agonistas de receptores do tipo Toll<sup>5</sup>, no próprio sítio da inflamação. O protômero de PTX3 se organiza numa estrutura quaternária complexa<sup>6</sup>, que o torna capaz de reconhecer vários ligantes, dentre eles motivos microbianos (mediando a resposta imune inata a diferentes microrganismos) e fatores de crescimento como o FGF2 (Fator de Crescimento de Fibroblasto 2)<sup>7</sup>.

O FGF2 é um membro da superfamília dos FGFs e é um potente fator mitogênico e angiogênico<sup>8</sup>. Seu engajamento aos seus receptores específicos do tipo tirosina quinase (TKR) promove a ativação de vias de sinalização promotoras da migração, diferenciação, motilidade e sobrevivência celular<sup>8</sup>. FGF2 já foi caracterizado como um fator importante que estimula a progressão de tumores de mama, próstata e melanoma<sup>9</sup>.

Ao interagir com FGF2 (interação proteína/proteína) PTX3 inibe os efeitos mitogênicos e angiogênicos promovidos por este fator<sup>10</sup>, o que torna PTX3 um candidato para o tratamento de doenças dependentes da proliferação descontrolada de células e angiogênese, como a psoríase, a retinopatia diabética e o câncer<sup>9</sup>. Recentemente, foi mostrado que PTX3 é capaz de inibir a proliferação dependente de FGF2 em células endoteliais *in vitro*<sup>10</sup> e a transição epitélomesênquima (EMT) em células de melanomas murino *in vitro*<sup>11</sup>. Entretanto, mais estudos se fazem necessários visando à investigação do efeito biológico de PTX3 em diferentes tipos de tumores para avaliar o seu potencial para uso em terapias multimodais de neoplasias.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com a proteína PTX3 recombinante sobre a proliferação das células SK-MEL-37 e SK-MEL-188, provenientes de melanoma humano, e dos fibrossarcomas murinos MC-TGS-1751 (MC17-51) e Sal/N.

## Metodologia

A proteína PTX3 recombinante humana (rhPTX3) e murina (rmPtx3) foram gentilmente cedidas pela Dra. Cecilia Garlanda do Instituto Clínico *Humanitas* (Milão, Itália) e foram produzidas em células CHO em condições livres de LPS<sup>12</sup>. As linhagens de fibrossarcoma murino, MC17-51 e Sal/N, e de melanoma humano, SK-MEL-37 e SK-MEL-188, foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Sloan-Kettering Cancer Center*, respectivamente. As células foram cultivadas em DMEM ou IMDM (Sal/N) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB).

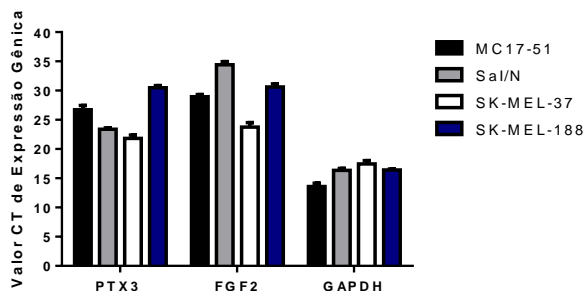
Para análise da expressão basal dos genes, o RNA total das linhagens celulares foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando a transcriptase reversa ImProm-II™ (Invitrogen) e iniciadores oligo(dT)<sub>20</sub> (IDT), a partir de 2 µg do RNA total. O cDNA sintetizado foi utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real (qPCR) utilizando iniciadores específicos para os genes alvo *PTX3* e *FGF2* e para os genes normalizadores *GAPDH*, *ACTB* e *HPRT1*. As reações de RT-qPCR foram feitas utilizando o reagente SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) no termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystems) sob condições padronizadas de iniciadores que forneciam eficiência de amplificação na faixa de 90-110% e que não gerassem dímeros e amplificações inespecíficas.

A proliferação celular em resposta ao tratamento com a Pentraxina 3 foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para esse ensaio, as células das linhagens de fibrossarcoma murino (1 a 3 x 10<sup>3</sup>) e de melanoma humano (3 a 6 x 10<sup>3</sup>) foram cultivadas em placas de 96 poços (área de 0,3 cm<sup>2</sup>) e incubadas em DMEM ou IMDM (Sal/N) com 10% SFB por 18 a 24 h. Em seguida, o meio foi substituído e as células

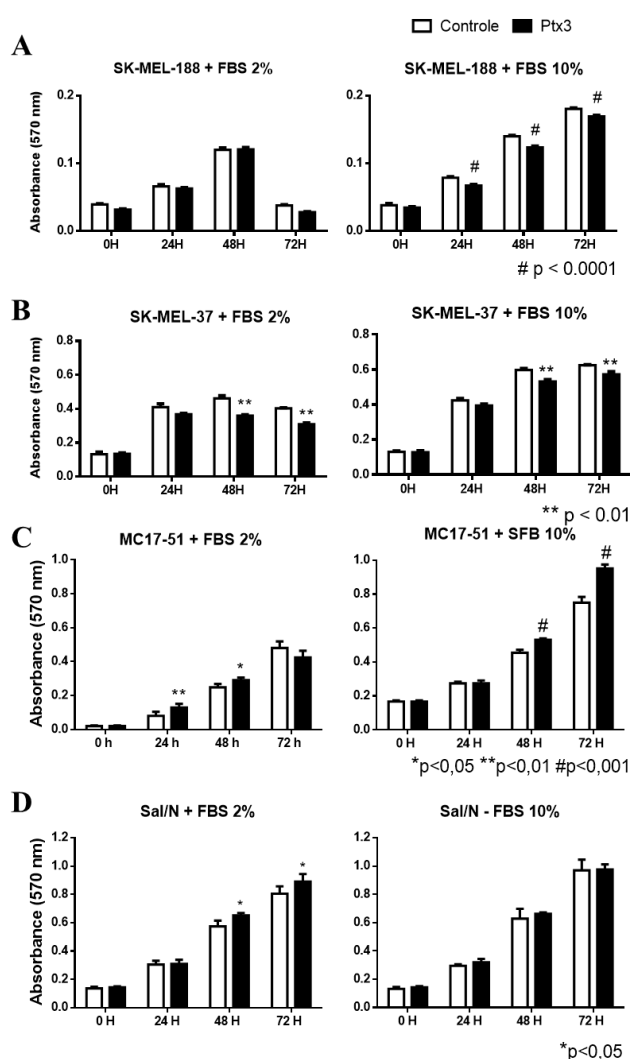
incubadas por mais 24 h em meio contendo 0,5% de SFB. Após o período de privação de soro, as células foram tratadas com a PTX3 murina ou humana (5 µg/ml) nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h em presença de baixa (2%) ou alta (10%) concentração de SFB. Em seguida, o MTT (0,5 µg/ml) foi adicionado às culturas e, após 2-3 horas, o meio foi aspirado e os cristais de formazan formados solubilizados em solução de dimetilformamida e duodecil-sulfato de sódio 10% (SDS) (1:1, v/v). As placas foram mantidas a temperatura ambiente, em agitação e protegidas da luz por 2 h. A absorbância da solução foi avaliada sob o comprimento de onda de 570 nm no leitor de placas *Varioskan Flash* (Thermo Scientific). Os ensaios de proliferação celular foram realizados em triplicatas biológicas. As análises estatísticas (ANOVA), foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism® 6* (GraphPad Softwares). Foram consideradas comparações significativas as que apresentaram um valor de *p* menor ou igual a 0,05.

## Resultados e discussão

Os resultados do RT-qPCR mostraram que as linhagens de fibrossarcoma murino estudadas expressam *Ptx3* e *Fgf2* de forma constitutiva (Figura 1). O tratamento com PTX3 promoveu um aumento (entre 10 e 33%), estatisticamente significativo (*p*<0,05), da proliferação celular a partir de 48 h observado nas culturas em presença de baixa concentração de SFB (Figura 2C e D). O mesmo efeito pró-proliferativo foi observado para a linhagem MC17-51 cultivada em presença de 10% de SFB (Figura 2C). Os melanomas humanos SK-MEL-37 e 188 apresentam níveis similares de expressão gênica basal de *FGF2* e *PTX3* (Figura 1). A proliferação celular destas linhagens foi inibida (entre 6 e 23%; *p*<0,01) em resposta ao tratamento com rhPTX3 a partir de 24 horas quando na presença de alta concentração de SFB (10%) (Figura 2A e B). Já no meio contendo baixa concentração de SFB (2%) foi observada inibição da proliferação apenas na linhagem SK-MEL-37 (Figura 2A).



**Figura 1** – Níveis de expressão basal de *PTX3* e *FGF2* nas células de melanoma SK-MEL37 e SK-MEL-188 e de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N por RT-qPCR. Maior CT, menor a expressão gênica.



**Figura 2** – Análise da proliferação celular após o tratamento com PTX3 recombinante em meio contendo SFB 2% ou SFB 10% utilizando o método MTT. A) Melanoma humano SK-MEL-37; B) Melanoma humano SK-MEL-188; C) Fibrossarcoma Murino MC17-51; Fibrossarcoma murino Sal/N.

## Conclusões

Nossos dados corroboram outros achados que indicam uma dualidade de papéis de PTX3 na progressão neoplásica, onde, dependendo do tipo tumoral, PTX3 age tanto um fator oncogênico, quanto supressor de tumor<sup>13; 14; 15</sup>. FGF2 é um dos componentes do SFB e um fator pró-mitogênico essencial para melanomas e outros tipos celulares<sup>11</sup>. Porém, alguns autores também atribuem um papel inibitório da proliferação celular promovido por FGF2<sup>16; 17</sup>. Dessa forma, o efeito anti-proliferativo de PTX3 observado nos melanomas pode ter relação com o sequestro de FGF2 endógeno e/ou do SFB por PTX3, enquanto, nos fibrossarcomas, esse fator pode ter um papel anti-proliferativo e o seu sequestro por PTX3, pode estimular a proliferação celular. Contudo, são necessários mais estudos para melhor entender a interação PTX3/FGF2 e o seu impacto sobre a proliferação celular desses tipos tumorais.

## Referências

- 1 MOALLI, F. et al. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 830421, 2011. ISSN 1110-7251.
- 2 DINIZ, S. N. et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 4, p. 649-56, Apr 2004. ISSN 0741-5400.
- 3 LEE, T. H. et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 1982-8, May 1990. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).
- 4 LEE, G. W.; LEE, T. H.; VILCEK, J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. **J Immunol**, v. 150, n. 5, p. 1804-12, Mar 1993. ISSN 0022-1767.

- 5 ABDERRAHIM-FERKOUNE, A. et al. Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells. **J Lipid Res**, v. 44, n. 5, p. 994-1000, May 2003. ISSN 0022-2275.
- 6 INFORZATO, A. et al. The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17681-92, Jun 2010. ISSN 1083-351X.
- 7 BIAGI, E. et al. PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 30, n. 12, p. 881-5, Dec 2008. ISSN 1536-3678.
- 8 TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116-29, Feb 2010. ISSN 1474-175x.
- 9 ALESSI, P. et al. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. **Eur Cytokine Netw**, v. 20, n. 4, p. 225-34, Dec 2009. ISSN 1952-4005.
- 10 RUSNATI, M. et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. **Blood**, v. 104, n. 1, p. 92-9, Jul 2004. ISSN 0006-4971.
- 11 RONCA, R. et al. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2760-71, Dec 2013. ISSN 1535-7163.
- 12 BUSSOLATI, B. et al. The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates mesangial cells. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1466-72, Feb 2003. ISSN 0022-1767.
- 13 HE, X. et al. PTX3 as a potential biomarker of acute lung injury: supporting evidence from animal experimentation. **Intensive Care Med**, v. 36, n. 2, p. 356-64, Feb 2010. ISSN 1432-1238.
- 14 CHANG, W. C. et al. PTX3 gene activation in EGF-induced head and neck cancer cell metastasis. **Oncotarget**, v. 6, n. 10, p. 7741-57, Apr 2015. ISSN 1949-2553.
- 15 BONAVITA, E. et al. PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 700-14, Feb 2015. ISSN 1097-4172.
- 16 CHANG, C. C. et al. Significant elevation of plasma pentraxin 3 in patients with pelvic inflammatory disease. **Clin Chem Lab Med**, v. 49, n. 10, p. 1655-60, Oct 2011. ISSN 1434-6621.
- 17 DAGNA, L. et al. Pentraxin-3 as a marker of disease activity in Takayasu arteritis. **Ann Intern Med**, v. 155, n. 7, p. 425-33, Oct 2011. ISSN 1539-3704.