

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**EFEITO BIOLÓGICO DA PROTEÍNA PENTRAXINA 3 SOBRE
FIBROSSARCOMAS**

ALUNA: PRISCILA FABIANA RODRIGUES

ORIENTADORA: ADRIANA ABALEN MARTINS DIAS

BELO HORIZONTE
2018

PRISCILA FABIANA RODRIGUES

**EFEITO BIOLÓGICO DA PROTEÍNA PENTRAXINA 3 SOBRE
FIBROSSARCOMAS**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-graduação em Genética, do Departamento de Biologia Geral, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como exigência parcial à obtenção do Título de Doutora em Genética.

ORIENTADORA: DRA. ADRIANA ABALEN MARTINS DIAS

BELO HORIZONTE
AGOSTO DE 2018

043 Rodrigues, Priscila Fabiana.
Efeito biológico da proteína Pentraxina 3 sobre fibrossarcomas
[manuscrito] / Priscila Fabiana Rodrigues. – 2018.

151 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Adriana Abalen Martins Dias.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas.

1. Genética - Teses. 2. Pentraxina 3 (PTX3). 3. Fibrosarcoma. 4. Câncer - Teses.
I. Dias, Adriana Abalen Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570




"Efeito biológico da Pentraxina 3 sobre fibrossarcomas"


Priscila Fabiana Rodrigues

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Adriana Abalen Martins Dias - Orientadora
UFMG/ICB


Patrícia Abrão Possik
INCA


Luciana Maria Silva
Fundação Ezequiel Dias


Renata Toscano Simões
Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa


Carolina Gomes
UFMG

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2018.

*“À resiliência,
que me manteve de pé diante de todas as dificuldades.”*

AGRADECIMENTOS

De maneira nenhuma foi fácil chegar até aqui, mas, certamente, seria impossível sozinha. Então, a todos aqueles que passaram ou estiveram ao meu lado nessa caminhada e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional: MUITO OBRIGADA!

A força maior que me permitiu abrir os olhos todas as manhãs, superar os desafios e me manteve de pé até o fim.

Aos meus pais, José Geraldo e Helena, pelo dom da vida e amor incondicional. Agradeço pela educação e pela estrutura familiar que me permitiram alçar voos cada vez mais altos. Por serem exemplo de perseverança, por acreditarem e se orgulharem de mim. Obrigada pelo apoio, por serem meu norte e fonte de forças para as minhas batalhas.

Aos meus irmãos, Camila e Mateus. À Camila por ser minha válvula de escape, me proporcionando momentos de risadas e idiotices que tornaram essa caminhada menos dolorosa. Agradeço por todo amor, amizade, por me achar “PHoda”, mesmo quando eu não, e me dizer que tudo daria certo. Ao Mateus, meu amor eterno, que embora não estivesse presente fisicamente, esteve sempre no meu coração e me deu forças para seguir.

Ao Thiago, o qual eu tive a sorte de encontrar nessa caminhada maluca que é a vida. Agradeço por todo amor, amizade, apoio, carinho e por acreditar que eu sou uma pesquisadora fantástica. Por entender minhas ausências, por ser minha companhia nos trabalhos de fins de semana e por sempre oferecer seu ombro para abrigar minhas lágrimas. Sua presença foi fundamental para me manter de pé durante essa jornada.

À minha família pelo apoio. À minha avó, agradeço por todo amor incondicional. Aos meus tios e tias, primos e primas que torceram por mim e entenderam minhas ausências nos encontros de família. Em especial, a minha tia Enedina, que sempre acreditou em mim.

À minha orientadora, Dra. Adriana Abalen, pela enorme contribuição na minha formação. Agradeço pela oportunidade, pelo incentivo constante e pela confiança depositada no meu trabalho. Obrigada pela dedicação, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em dividir seu conhecimento comigo.

Aos atuais e antigos alunos do LGEX, João, Joyce, Flavinha, Léo, Nathália, Lucas, Octávio, Flávia Delgado, Estefânia, Bárbara, Ana Flávia e Victor, por dividirem comigo, além das bancadas e conhecimento, risadas e momentos de descontração, tornando tudo menos pesado. Em especial, aos companheiros de toda jornada, João e Flavinha. Ao João pela amizade e por todo o auxílio e ajuda nos experimentos e discussões. À Flávia por toda amizade, carinho, pela ajuda e por me permitir auxiliá-la durante a iniciação científica, tão brilhantemente concluída.

Ao Dr. Roberto Ronca por confiar em mim, sem ao menos me conhecer, e gentilmente me receber na *Università degli Studi di Brescia*. Agradeço por me mostrar uma faceta diferente da pesquisa, por partilhar seus conhecimentos, pela paciência e por toda disponibilidade em me ajudar.

Aos alunos e professores do *Dipartimenti di Medicina Molecolare e Traslazionale* da *Università degli Studi di Brescia*, pela receptividade e por todo auxílio durante a minha estadia no laboratório. Em especial, agradeço ao Dr. Marco Presta, um exemplo de competência e simplicidade, e as Dras Gaia Ghedini e Sara Matarazzo por toda ajuda nos ensaios e rotina do laboratório.

Aos amigos que fiz em Brescia e que tornaram toda a experiência mais fácil, leve e única. Em especial, a Wandra e a Mila, por abrirem a porta de suas respectivas casas para mim e pelo companheirismo, amizade e carinho únicos.

Aos amigos da vida, pelo apoio e risadas.

Aos professores, Jonatas Abrahão, Erna Geessien, Cláudio Bonjardim, Giliane Trindade, Paulo César Ferreira e Betânia Drumond, e alunos do Laboratório de Vírus pela confiança que nos permitiu acesso ao laboratório e a utilização da infra-estrutura do mesmo, essenciais ao desenvolvimento desse trabalho.

Pela ajuda na execução de alguns experimentos e disponibilidade de uso de equipamentos e infra-estrutura, agradeço aos professores e alunos dos Laboratório de Genética de Populações, Laboratório de Diversidade Genética Humana, Laboratório de Genética Celular e Molecular, Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas, Laboratório de Genética de Microrganismos, Laboratório de Genética Humana e Médica, Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, Laboratório de Tecnologia Genética, Laboratório de Micologia, Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Laboratório de Apoio Multi-usuário da Microbiologia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular e Laboratório Aquacen.

O doutorado é apenas a ponta do *iceberg* na minha formação, então, agradeço a todos os mestres que passaram pela minha vida estudantil e me ajudaram a construir à minha base, contribuindo para o meu conhecimento que me permitiu chegar até aqui. Aos professores da Escola Municipal Carmelita Carvalho Garcia, Escola Estadual Lúcio dos Santos, Pré-vestibular Pré-UFMG, Universidade Federal de Ouro Preto e Universidade Federal de Minas Gerais, meus agradecimentos pela nobreza de partilharem seus conhecimentos.

À Dra. Cecília Garlanda, do *Istituto Clínico Humanitas*, que gentilmente nos doou a proteína Ptx3 recombinante. E à Dra. Marliete Carvalho, pelo auxílio na avaliação da sua atividade biológica.

Ao Dr. Leonardo Camilo, pelo apoio durante as transfecções celulares. E ao Ms. Jonas Pereira, pela ajuda em alguns experimentos com células.

Ao Dr. Alex Fiorini, pela ajuda no sequenciamento dos plasmídeos. E à Dra. Renata Santiago, pela ajuda nas análises dos resultados.

Aos Ms. Felipe do Carmo e Vanessa Pecini, pela ajuda nas transformações bacterianas.

À UFMG e ao Programa de Pós-graduação e Genética pela oportunidade.

Aos coordenadores e secretárias do Programa de Pós-graduação em Genética pelos serviços prestados e disponibilidade em ajudar.

Aos colegas de pós-graduação e funcionários do ICB e da UFMG.

Aos membros da banca que gentilmente se disponibilizaram em avaliar esse trabalho.

Aos Governos passados e mudanças políticas que investiram em educação e deram a pessoas de classes sociais mais baixas a oportunidade de estudar.

Ao povo brasileiro que financia as pesquisas do país.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo no país e da bolsa sanduíche.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq, PRPq/UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Genética, pelo auxílio financeiro para realização do projeto.

Gratidão!

*“Quando a vida te decepciona, qual é a solução?
Continue a nadar! Continue a nadar!
Continue a nadar, nadar, nadar!
Para achar a solução, nadar, nadar!”
(Procurando Nemo, 2003)*

RESUMO

O receptor de reconhecimento de padrão solúvel Pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína inflamatória de fase aguda, com papel importante e não redundante na imunidade inata, deposição de matriz, fertilidade feminina, angiogênese e inflamação. No câncer, PTX3 apresenta uma dualidade de ações sendo oncopromotora em alguns casos, contudo, oncosupressora em outros. A ligação entre PTX3 e os Fatores de Crescimento de Fibroblasto 2 e 8 (FGF2 e 8) inibe a sinalização via FGFR e as atividades proliferativas e pró-angiogênicas exercidas por estes fatores e é um dos mecanismos que suporta a ação antitumoral de PTX3. Os fibrossarcomas são tumores mesenquimais malignos de tecido mole, nos quais a via FGF/FGFR desempenha um papel fundamental na sua tumorigênese e progressão. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de PTX3 na proliferação de células de fibrossarcoma *in vitro* e na progressão deste tipo tumoral *in vivo*. O tratamento das células de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N *in vitro* com a proteína Pentraxina 3 recombinante murina (rmPtx3) apontou para uma ação pró-proliferativa da pentraxina. Entretanto, quando as células de fibrossarcoma murino MC17-51 e de fibrossarcoma humano HT1080 foram transfectadas com plasmídeo para expressão aumentada de PTX3, a superexpressão da pentraxina reduziu significativamente a proliferação celular, o potencial clonogênico e o crescimento independente de ancoragem dessas células *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, a superexpressão de PTX3 comprometeu o crescimento dos tumores tanto humanos quanto murinos induzidos em camundongos NOD/SCID e C57/BL6 pela inoculação subcutânea das células HT-1080 e MC17-51, respectivamente. Um dos mecanismos envolvidos no efeito oncosupressor detectado foi a inibição da via de sinalização de FGF/FGFR, uma vez que foi observado nestes tumores uma redução da ativação das moléculas a jusante desta via como ERK e AKT. Nossos dados não só contribuem para a caracterização do papel de PTX3 na biologia dos tumores como também sinalizam para a necessidade de novos estudos visando avaliar o potencial de PTX3 como biomarcador da progressão de sarcomas e também como uma ferramenta farmacológica para o tratamento destas neoplasias.

ABSTRACT

Soluble pattern recognition receptor Pentraxin-3 (PTX3) is an acute phase inflammatory protein, with an important and non-redundant role in innate immunity, matrix deposition, female fertility, angiogenesis and inflammation. In cancer, PTX3 presents a duality of actions being oncopromoter in some cases, however, oncosuppressor in others. PTX3 binding to Fibroblast Growth Factors 2 and 8 (FGF2 e 8) inhibits the signaling via FGF/FGFR and the proliferative and proangiogenic activities exerted by these factors, and it is one of the mechanisms that underline PTX3 antitumor activity. Fibrosarcomas are malignant soft tissue mesenchymal tumors in which the FGF/FGFR pathway plays a key role in onset and progression. The objective of this work was to analyze the effect of PTX3 on the proliferation of fibrosarcoma cells *in vitro* and the progression of this tumor type *in vivo*. Treatment of MC17-51 and SaIN murine fibrosarcoma cells *in vitro* with the recombinant murine Pentraxin 3 protein (rmPTX3) pointed to a proproliferative action of pentraxin. However, when murine MC17-51 and human HT-1080 fibrosarcoma cells were transfected with a plasmid for enhanced PTX3 expression, the overexpression of the pentraxin significantly reduced cell proliferation, clonogenic potential and anchorage independent growth of these cells *in vitro*. *In vivo* assays, overexpression of PTX3 compromised the growth of both human and murine tumors induced in NOD/SCID and C57BL/6 mice respectively by subcutaneous inoculation of HT-1080 and MC17-51 PTX3 overexpressing cells. One of the mechanisms involved in the oncosuppressive effect observed was the inhibition of the FGF/FGFR signaling pathway, since a reduction in the activation of the downstream molecules ERK and AKT, was observed. Our data not only contribute to the characterization of the role of PTX3 in the biology of tumors but also signal the need for new studies aiming to evaluate the potential of PTX3 as a biomarker of sarcomas progression and also as a pharmacological tool for the treatment of these neoplasms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pentraxinas curtas e longas.	19
Figura 2 – Estrutura molecular do gene de PTX3 humano e murino.	20
Figura 3 – Estrutura molecular dos principais membros da família das pentraxinas.	21
Figura 4 – Fonte e funções principais da pentraxina longa PTX3.	22
Figura 5 – PTX3 como um Oncosupressor Extrínseco no Câncer.	34
Figura 6 – Via de sinalização de FGF.	36
Figura 7 – Efeito de PTX3 sobre a via de sinalização de FGF.	39
Figura 8 – Desenho experimental para avaliar o efeito biológico da proteína Pentraxina 3 sobre fibrossarcomas.	43
Figura 9 – Representação do vetor retroviral pBABE/Puro.	48
Figura 10 – Avaliação da contaminação por micoplasma nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 e do fibroblasto NIH/3T3.	64
Figura 11 – A proteína Ptx3 recombinante murina aumenta a fagocitose de partículas de Zymosan por macrófagos murinos de medula óssea.	65
Figura 12 – Proliferação celular das células MC17-51, Sal/N e NIH/3T3 após o tratamento com a proteína Ptx3 recombinante em baixa e alta concentração de soro fetal bovino.	66
Figura 13 – Crescimento independente de ancoragem de células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e do fibroblasto murino NIH/3T3 após o tratamento com rmPtx3.	68
Figura 14 – Efeito do tratamento com Ptx3 sobre a migração celular da linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51.	69
Figura 15 – Efeito do tratamento com Ptx3 sobre a migração celular da linhagem de fibrossarcoma murino Sal/N.	70
Figura 16 – Efeito do tratamento com Ptx3 sobre a migração celular da linhagem de fibroblasto NIH/3T3.	71
Figura 17 – Integridade do RNA total extraído das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N tratadas com rmPtx3.	73
Figura 18 – Qualidade do cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N tratadas com rmPtx3.	74
Figura 19 – Perfil de expressão gênica nas linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N após o tratamento com rmPtx3.	76
Figura 20 – Transformação das bactérias TOP10 com os plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3.	77
Figura 21 – Confirmação das construções para expressão de Ptx3 (pBABE/PTX3) e controle (pBABE/Mock) nas midi-preps por PCR e análise de restrição.	79
Figura 22 – Expressão aumentada de PTX3 nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.	80
Figura 23 – Proliferação celular das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.	81
Figura 24 – Morfologia das linhagens celulares de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e humano HT-1080 transfectadas com PTX3.	82
Figura 25 – Crescimento independente da ancoragem nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock.	83
Figura 26 – Análise da capacidade de formação de colônias das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.	85
Figura 27 – Avaliação da migração celular das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.	86
Figura 28 – Tumorigênese experimental em modelo murino utilizando linhagens transfectadas com PTX3.	88
Figura 29 – Expressão proteica dos membros da via de sinalização de FGF em resposta a superexpressão de PTX3 nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e HT-1080.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos Iniciadores para análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	61
Tabela 2 – Quantificação e avaliação da contaminação por proteínas e sais dos RNAs extraídos das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N após tratamento com rmPtx3.	72
Tabela 3 – Condições otimizadas da RT-qPCR para os genes alvos do estudo.....	75
Tabela 4 – Quantificação dos plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3 após a purificação e extração plasmidial em média escala.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ARPCA	Pentapeptídeo Derivado de PTX3 (Alanina, Arginina, Prolina, Cisteína, Alanina)
ARRIVE	<i>Animals in Research Reporting In Vivo Experiments</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino
CAM	Membrana Corioalantóide de Embriões de Galinha
cDNA	DNA Complementar
CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
CO₂	Dióxido de carbono
CPG	5'-citosina-fosfato-guanina-3
Cq	Ciclo de quantificação
CRP	Proteína C-reativa
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal de uma proteína
DC	Células dendríticas
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
MEC	Matriz extracelular
E	Eficiência da reação de RT-qPCR
EGF	Fator de crescimento epidermal
EMT	Transição do epitélio-mesenquima
ESCC	Carcinoma de células escamosas do esôfago
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFBP	Proteína de Ligação a Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FGFR	Receptor de Fator de Crescimento de Fibroblasto
FH	Fator H do complemento
Fw	Iniciador <i>Foward</i> da PCR
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H	Hora
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
HSPG	Proteoglicanos heparan sulfatados
IαI	Inibitor inter-α-tripsina
Ig	Imunoglobulina
IL1B	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
kDa	QuiloDalton

LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate assay</i>
LB	Meio Luria Bertani
LGEX	Laboratório de Genética Experimental
LM	Lipossarcoma mixóide
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
GOI	Gene de interesse
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MC17-51	Linhagem de fibrossarcoma murino MC-TGS17-51
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Midi-prep	Extração de DNA Plasmidial de Média Escala
MMC	Mitomicina C
MNU	N-metil-N-nitrosourea
MT	Microambiente tumoral
MTT	Brometo de 3-[4,-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-kB	Fator de transcrição NF-kappa B
NPTX1	Pentraxina Neural 1
NPTX2	Pentraxina Neural 2
NPTXR	Receptor de Pentraxina Neural
NRE	Nível de expressão relativa
NRQ	Quantificação relativa normalizada
NSC12	Armadilha de FGF ((3β)-24,24,24-trifluoro-23-(trifluoromethyl)-21-norchol-5-ene-3,20,23-triol)
N-terminal	Extremidade amino-terminal de uma proteína
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
pBABE/Mock	Plasmídeo pBABE/Puro
PBABE/PTX3	Plasmídeo pBABE/Puro transfectado com o cDNA completo de PTX3
PGN	Peptideoglicano
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmidial
PRMs	Receptores de reconhecimento de padrões
PTX3	Pentraxina 3
PTX4	Pentraxina 4
q.s.p	Quantidade suficiente para
rhPTX3	Proteína PTX3 recombinante humana
rmPtx3	Proteína Ptx3 recombinante murina
RNA	Ácido rinonucleico
RNAm	RNA mensageiro

rRNA	RNA ribossomal
RPM	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RTK	Receptor tirosina quinase
RTq-PCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
Rv	Iniciador <i>Reverse</i> da PCR
SAP	Componente Amiloide P do Soro
SAXS	Ensaio de espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TB	Tampão de Bloqueio de anticorpo no ensaio de <i>Western Blot</i>
TSG-6	Gene 6 induzido pelo Fator de Necrose Tumoral
TSG-14	Gene 14 induzido pelo Fator de Necrose tumoral
TLR	Receptor do tipo Toll
TMA	Tissue microarray
TNFA	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular a
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Unibs	<i>Università degli Studi di Brescia</i>
UV	Luz ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde
WT	Linhagem ou animal do tipo selvagem
Zy	Partícula de Zymosan

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	18
1.1 FAMÍLIA DA PENTRAXINAS.....	18
1.2 PENTRAXINA 3	19
1.2.1 Estrutura Gênica e Proteica	19
1.2.2 Produção da Proteína.....	21
1.2.3 Funções Biológicas	23
1.3 FIBROSSARCOMA.....	26
1.4 PTX3 E CÂNCER.....	28
1.4.1 Microambiente Tumoral.....	28
1.4.2 Efeito Pró-tumoral de PTX3.....	29
1.4.3 Efeito Antitumoral de PTX3	31
1.5 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS	33
1.5.1 Via de Sinalização dos Fatores de Crescimento de Fibroblasto	33
1.5.2 Fator de Crescimento de Fibroblasto 2	37
1.5.3 Interação entre PTX3 e os Fatores de Crescimento de Fibroblasto	37
1.6 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	40
1.7 HIPÓTESE DE TRABALHO.....	41
2 – OBJETIVO	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42
3 – MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
3.2 LINHAGENS CELULARES	44
3.2.1 Cultura de Células	44
3.2.2 Detecção de Contaminação por Micoplasma.....	44
3.2.2.1 Extração de DNA.....	44
3.2.2.2 PCR Duplex para Micoplasma	45
3.3 PROTEÍNA RECOMBINANTE	46
3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEÍNA PTX3 RECOMBINANTE	46
3.5 TRANSFEÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES COM PTX3	47
3.5.1 Plasmídeo pBABE/Puro	47
3.5.2 Eluição dos Plasmídeos pBABE.....	48
3.5.3 Confirmação de PTX3 na Construção pBABE/PTX3	49
3.5.4 Transformação Bacteriana	49

3.5.5	Extração de DNA Plasmidial em Média Escala (Midi-Prep)	50
3.5.6	Transfecção das Linhagens Celulares	51
3.5.7	Análise da Produção de PTX3 nas Células Transfectadas por <i>Western Blotting</i>	53
3.5.7.1	Extração de Proteínas	53
3.5.7.2	Quantificação de Proteínas	54
3.5.7.3	Western Blotting	54
3.6	PROLIFERAÇÃO CELULAR	55
3.6.1	Tratamento com a Proteína Ptx3 Recombinante Murina	55
3.6.2	Células Transfectadas com PTX3	55
3.7	MIGRAÇÃO CELULAR (<i>Wound Healing</i>)	56
3.7.1	Células Tratadas com rmPtx3	56
3.7.2	Células Transfectadas com PTX3	57
3.8	CRESCIMENTO INDEPENDENTE DA ANCORAGEM (<i>Soft Agar</i>)	57
3.8.1	Células tratadas com rmPTX3	57
3.8.2	Células Transfectadas com PTX3	57
3.9	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA	58
3.10	TUMORIGÊNESE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS	58
3.11	VIA DE SINALIZAÇÃO DE FGF NAS LINHAGENS TRANSFECTADAS	59
3.12	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	59
3.12.1	Extração de RNA Total	59
3.12.2	Transcrição Reversa	60
3.12.3	Padronização das Reações de RT-qPCR	61
3.12.4	Expressão Gênica em Resposta ao Tratamento com rmPtx3	62
3.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	63
4	– RESULTADOS	64
4.1	TESTE DE CONTAMINAÇÃO POR MICOPLASMA	64
4.2	TRATAMENTO COM A PROTEÍNA Ptx3 RECOMBINANTE MURINA	64
4.2.1	Atividade Biológica da Proteína Ptx3 Recombinante Murina	64
4.2.2	Proliferação Celular	65
4.2.3	Crescimento Independente da Ancoragem	67
4.2.4	Migração Celular	67
4.2.5	Expressão Gênica	72
4.2.5.1	Extração de RNA e Transcrição Reversa	72
4.2.5.2	Padronização das Reações de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)	74
4.2.5.3	Expressão Gênica em Resposta a rmPTX3	75

4.3 LINHAGENS CELULARES TRANSFECTADAS COM PTX3	77
4.3.1 Transfecção das Linhagens Celulares com pBABE/Puro Expressando PTX3	77
4.3.1.1 Transformação Bacteriana e Midi-Prep.....	77
4.3.1.3 Expressão de PTX3 nas Linhagens Celulares Transfectadas	78
4.3.2 Proliferação Celular	80
4.3.3 Crescimento Independente da Ancoragem	82
4.3.4 Potencial Clonogênico.....	83
4.3.5 Migração Celular	84
4.3.6 Ensaio de Tumorigênese.....	87
4.3.7 Mecanismos Adjacentes ao Efeito Antiproliferativo de PTX3.....	87
5 – DISCUSSÃO.....	90
6 – RESUMO DOS RESULTADOS.....	102
7 – CONCLUSÃO	103
8 – PERSPECTIVAS	104
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
10 – ANEXOS.....	117
10.1 ARTIGO SOBRE O EFEITO DA TRANSFECÇÃO COM PTX3 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS FIBROSSARCOMAS	117
10.2 ARTIGO SOBRE O EFEITO DO TRATAMENTO COM rmPtX3 SOBRE AS CÉLULAS DE FIBROSSARCOMA.....	137

1 – INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA DA PENTRAXINAS

As pentraxinas são uma superfamília de proteínas multifuncionais e filogeneticamente conservadas desde aracnídeos até os mamíferos. Os membros da família, além de serem considerados os ancestrais funcionais dos anticorpos, são importantes componentes do braço humoral da imunidade inata, atuando como receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRMs) solúveis. Os PRMs reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são motivos microbianos altamente conservados. Dentre os PAMPs pró-inflamatórios estão os lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, peptidoglicanos (PGN) e flagelina, que são moléculas derivadas da parede celular de bactérias; os ácidos nucleicos de bactérias e vírus; e os glucanos e quitina, componentes da parede de fungos (Garlanda *et al.*, 2018).

O nome “Pentraxina” é derivado do grego, sendo penta para designar cinco partes, e foi usado para nomear a família devido à estrutura pentagonal dos primeiros membros identificados (Balhara *et al.*, 2013). Estruturalmente, todos os membros da família das Pentraxinas compartilham uma porção carboxi-terminal (C-terminal) semelhante, chamado de domínio pentraxina, onde está preservada uma sequência de 8 aminoácidos (HxCxS/TWxS, onde x é um aminoácido qualquer), que é a conhecida como a assinatura das pentraxinas (Garlanda *et al.*, 2018).

De acordo com o tamanho da estrutura primária, os membros da família são divididos em: pentraxinas curtas (25 kDa) e pentraxinas longas (40-50 kDa) (Goodman *et al.*, 1996) (Figura 1). A Proteína C-reativa (CRP, também conhecida como PCR na clínica médica, onde é amplamente utilizada como biomarcador) e o Componente Amiloide P do Soro (SAP) são os protótipos das pentraxinas curtas e são as principais proteínas de fase aguda no homem e no camundongo, respectivamente. Ou seja, em resposta a estímulos inflamatórios, as concentrações séricas dessas proteínas aumentam rapidamente.

Dentre as pentraxinas longas, o principal e mais bem estudado representante é a Pentraxina 3 (PTX3). Após a sua descoberta no início dos anos 90, outras pentraxinas longas foram identificadas: PTX4, pentraxina neural 1 (NP1 ou NPTX1), NP2 (NPTX2 ou Narp), o receptor de pentraxina neural (NPTXR ou NPR), que é o único membro associado à célula através de um domínio transmembranar, e a apexina, encontrada em espermatozoides de *Cavia porcellus* (porquinho da índia) (Gewurz *et al.*, 1995; Garlanda *et al.*, 2005; Martinez De La Torre *et al.*, 2010).

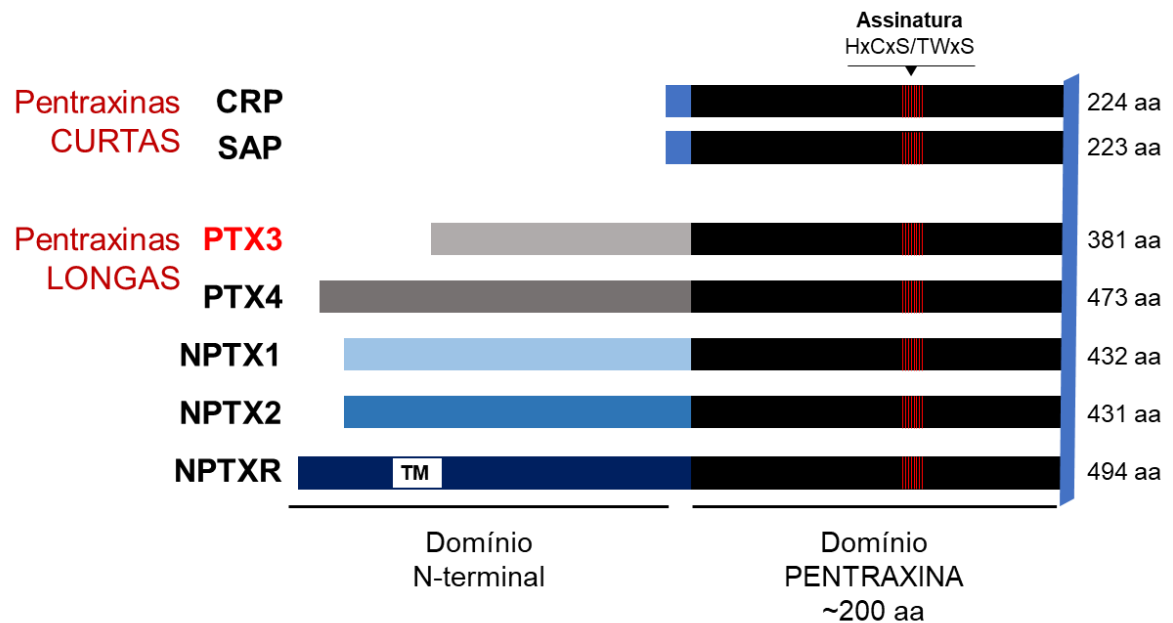


Figura 1 – Pentraxinas curtas e longas.

De acordo com o seu tamanho as pentraxinas são divididas em dois grupos: as pentraxinas curtas e as pentraxinas longas. As proteínas CRP e SAP são as principais representantes das proteínas curtas e PTX3 das longas. Em preto, o domínio pentraxina com a sequência de aminoácidos tida como a assinatura das pentraxinas; em cinza e azul, a porção N-terminal inédita de tamanho variável das pentraxinas longas PTX3, PTX4 e das proteínas neurais NPTX1, NPTX2 e NPTXR.

Fonte: modificado de Mantovani, *et. al.*, 2006.

1.2 PENTRAXINA 3

1.2.1 Estrutura Gênica e Proteica

A Pentraxina 3 é uma glicoproteína de 381 aminoácidos, incluindo um seguimento de 17 aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal (Breviario *et al.*, 1992) e foi a primeira pentraxina longa a ser identificada e caracterizada no início dos anos 1990s (Lee *et al.*, 1990; Breviario *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993). Inicialmente, PTX3 foi identificada em fibroblastos de prepúcio humano tratados com o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFA) e, por isso, foi nomeada de TSG-14 (*TNF stimulated gene-14*) (Lee *et al.*, 1990). Mais tarde, PTX3 também foi identificada em células endoteliais humanas tratadas com Interleucina 1-beta (IL1B) (Breviario *et al.*, 1992).

A sequência primária de PTX3 é conservada filogeneticamente entre as espécies animais, o que sugere uma alta pressão evolutiva para manter sua estrutura/função (Mantovani *et al.*, 2013; Garlanda *et al.*, 2018). Por exemplo, a identidade entre os resíduos na proteína humana e murina é de 82%, enquanto, 92% são conservados (Garlanda *et al.*, 2006). Com relação à organização gênica, tanto o gene humano, quanto o murino estão localizados em regiões sintênicas do cromossomo 3 e ambos são organizados em três éxons separados por

dois íntrons. Os dois primeiros éxons codificam o peptídeo sinal e a porção amino-terminal (N-terminal), enquanto o terceiro codifica o domínio Pentraxina C-terminal (Figura 2) (Bottazzi *et al.*, 2010; Garlanda *et al.*, 2018). A homologia entre os genes e as proteínas PTX3 humana e murina permite que os resultados obtidos a partir de estudos em camundongos possam ser extrapolados para humanos (Balhara *et al.*, 2013). O domínio C-terminal de PTX3, de 203 aminoácidos, apresenta homologia com as pentraxinas curtas CRP e SAP (57% de similaridade), enquanto o domínio N-terminal, de 178 aminoácidos, é inédito e não apresenta homologia com nenhuma outra proteína conhecida (Breviario *et al.*, 1992; Garlanda *et al.*, 2005). Em contraste com a estrutura pentamérica das pentraxinas clássicas, utilizando análises biofísicas, Inforzato e colaboradores propuseram que PTX3 é um octâmero assimétrico de 340 kDa, composto por oito protômeros idênticos, organizados em dois tetrâmeros e ligados por pontes dissulfeto intra e intercadeias (Figura 3) (Inforzato *et al.*, 2006; Inforzato *et al.*, 2010; Daigo *et al.*, 2014).

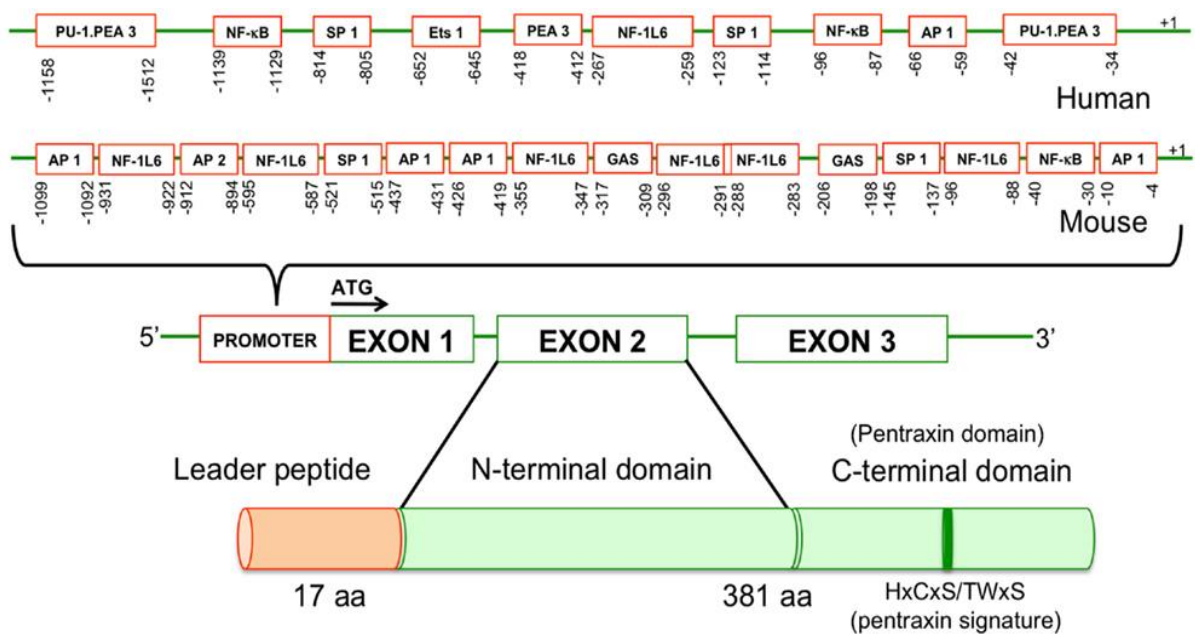


Figura 2 – Estrutura molecular do gene de PTX3 humano e murino.

O gene *PTX3* é organizado em uma região promotora e três éxons: o primeiro codifica o peptídeo sinal (17 aminoácidos), enquanto o segundo e o terceiro codificam os domínios N- e C-terminal da proteína (381 aminoácidos), respectivamente. A região promotora contém múltiplos sítios para fatores de transcrição.

Fonte: Modificado de Balhara *et al.*, 2013.

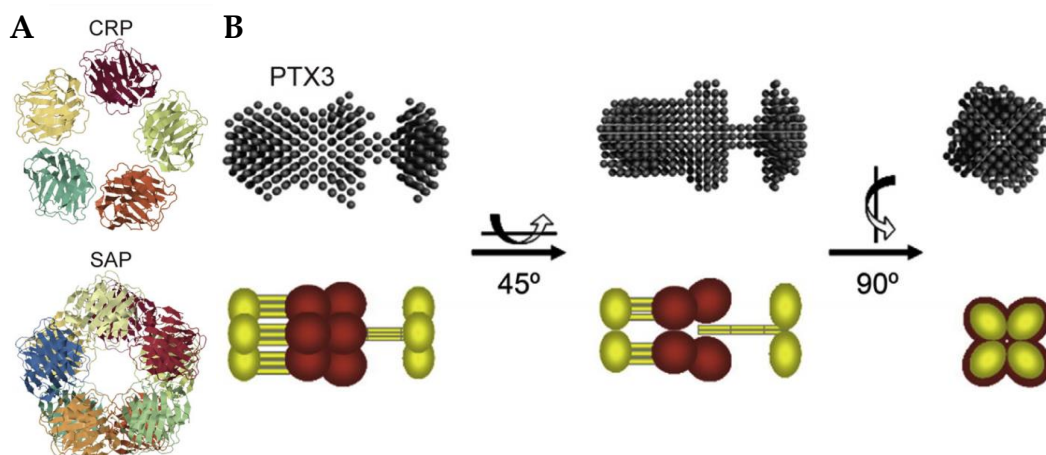


Figura 3 – Estrutura molecular dos principais membros da família das pentraxinas.

Estrutura molecular das proteínas CRP e SAP, principais pentraxinas curtas, e PTX3, principal pentraxina longa. **A)** Estruturas de cristalografia das pentraxinas curtas. Painel superior mostra a estrutura pentamérica da proteína CRP humana e o inferior da proteína SAP humana; **B)** Ensaio de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) de PTX3 e sua representação esquemática. O domínio PTX3 N-terminal é mostrado em amarelo e o domínio C-terminal em vermelho.

Fonte: Daigo *et al.*, 2014.

1.2.2 Produção da Proteína

Diferentemente das pentraxinas curtas CRP e SAP que são produzidas no fígado, principalmente em resposta à Interleucina 6 (IL6), PTX3 pode ser rápida e localmente produzida por diferentes tipos celulares e, uma vez sintetizada, pode atuar em vários processos biológicos (Figura 4). Dentre os tipos celulares que podem produzir PTX3 estão os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais do sistema vascular e linfático, células epiteliais, células do músculo liso, fibroblastos, neurônios, células da glia e, principalmente, células dendríticas (DC) mieloides (Pepys e Hirschfield, 2003; Mantovani, Garlanda, *et al.*, 2008; Deban *et al.*, 2011; Garlanda *et al.*, 2018). Embora PTX3 não seja sintetizadas em resposta a IL6, como ocorre com as pentraxinas curtas, sua síntese ocorre em resposta a diferentes estímulos pró-inflamatórios, tais como as citocinas IL1B e TNFA, sendo IL1B o principal indutor da produção de PTX3 em monócitos e DCs (Doni *et al.*, 2003; Perrier *et al.*, 2004). Ademais, agonistas dos receptores do tipo Toll (TLR), tais como LPS, principal componente da parede celular das bactérias gram-positivas, e lipoarabinomanana, outra lipoproteína de membrana bacteriana e principal glicoproteolípídeo associado à parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*, também podem estimular a produção de PTX3 em macrófagos e DCs (Garlanda *et al.*, 2005; Jaillon *et al.*, 2007; Inforzato *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2013). Hormônios glicocorticoides também podem induzir e aumentar a expressão dessa proteína em fibroblastos em condições inflamatórias, mas não em células mielóides (Doni *et al.*, 2009), enquanto as lipoproteínas de alta densidade podem induzir a sua produção nas células endoteliais (Norata *et al.*, 2008).

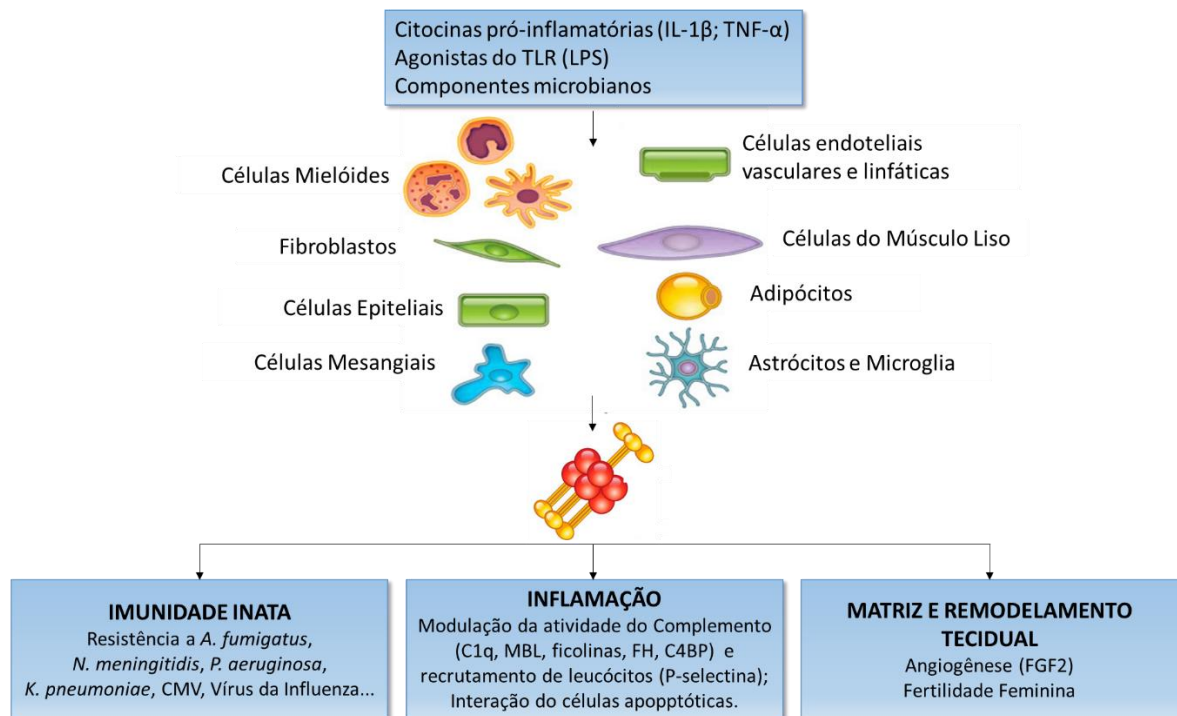


Figura 4 – Fonte e funções principais da pentraxina longa PTX3.

Estímulos pró-inflamatórios, engajamento de TLR e reconhecimento microbiano podem induzir a produção de PTX3 por uma ampla variedade de tipos celulares. Uma vez produzida a proteína participa do remodelamento da matriz, desempenha um papel não redundante na resistência contra patógenos específicos e tem um papel regulatório na inflamação e fertilidade feminina. As propriedades multifuncionais de PTX3 estão relacionadas a sua capacidade de interagir com diferentes ligantes.

Fonte: Garlanda, et al., 2018.

Apesar de ser rapidamente produzida em resposta a estímulos inflamatórios, PTX3 pode ser encontrada em uma forma constitutiva já pronta, que fica armazenada em grânulos específicos azurofílicos e não azurofílicos lactoferrina e lactoferrina/gelatinase positivos dos neutrófilos (Jaillon *et al.*, 2007; Razvina *et al.*, 2015). Após a ativação por estímulos pró-inflamatórios, cerca de 25% da PTX3 estocada pelos neutrófilos é rapidamente liberada em sua forma monomérica para o espaço extracelular. Assim, os neutrófilos representam um reservatório de PTX3 pronto para uso que garante a sua liberação e atividade funcional de forma rápida no início da inflamação aguda (Jaillon *et al.*, 2007). Parte da proteína liberada permanece associada à célula-mãe nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), já a que é liberada, é funcionalmente competente bem antes da síntese de novas proteínas por outras células e, mesmo após a síntese de novas moléculas de PTX3 por outros tipos celulares, a proteína liberada pelos neutrófilos contribui para os elevados níveis locais e séricos da pentraxina. PTX3 retida nas NETs contribui para a geração de um microambiente antimicrobiano que aumenta a capacidade local para prender e matar micróbios (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, a PTX3 proveniente de neutrófilos é

ainda responsável por um mecanismo de *feedback* negativo que restringe o excesso de transmigração de neutrófilos ativados em tecidos do hospedeiro, impedindo assim, a disseminação indesejada de reações inflamatórias (Jaillon *et al.*, 2009; Deban *et al.*, 2010; Kunes *et al.*, 2012).

1.2.3 Funções Biológicas

PTX3 é uma proteína multifuncional, cujas diversas funções biológicas estão associadas ao reconhecimento e interação com diferentes ligantes. No processo imunológico, PTX3 apresenta um papel chave no braço humoral da imunidade inata e desempenha uma função não redundante como PRM solúvel na detecção de patógenos, como fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas e alguns tipos de vírus (Garlanda *et al.*, 2002).

A primeira descrição de interação entre PTX3 e um microorganismo foi em 2002, por Garlanda e colaboradores. Eles identificaram que a ligação específica entre PTX3 e o fungo *Aspergillus fumigatus* facilita o reconhecimento dos conídios fúngicos pelos macrófagos e, conseqüentemente, aumenta a resistência a infecção. Em seguida, foi identificado que PTX3 também atua como uma opsonina e leva a um aumento da fagocitose do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e das partículas de Zymosan, componente da parede celular do fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae*, pelos macrófagos (Diniz *et al.*, 2004).

Posteriormente a esses achados, foi identificado que PTX3 tem relevante papel nas infecções bacterianas provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*. Na infecção ocasionada por *K. pneumoniae*, por exemplo, PTX3 apresenta um papel dual dependente da quantidade do agente infectante. Em presença de altas quantidades da bactéria, apesar de PTX3 reconhecer e se ligar a um componente da membrana externa dessa bactéria, o KOmpA, a presença de PTX3 foi associada a uma maior letalidade dos camundongos, aumento de óxido nítrico no soro, incapacidade dos neutrófilos em migrarem para o tecido pulmonar e maior disseminação da bactéria no sangue. Em contrapartida, em resposta a um menor número de partículas infectantes, a expressão aumentada de Ptx3 exerceu um papel protetor, com aumento da produção de TNFA, maior influxo de neutrófilos no pulmão e maior fagocitose dos patógenos pelos neutrófilos (Soares *et al.*, 2006).

PTX3 também apresenta um importante papel na biologia de doenças virais, reconhecendo e se ligando ao citomegalovírus humano e murino e ao vírus da influenza tipo A, reduzindo a carga viral e o potencial infeccioso desses vírus em células em cultura (Bozza *et al.*, 2006; Reading *et al.*, 2008). Além disso, PTX3 tem sido apontada como um marcador biológico da infecção pelo vírus da dengue melhor que a proteína CRP (Mairuhu *et al.*, 2005).

Através da interação com moléculas chave envolvidas na ativação e/ou inativação da cascata do complemento, PTX3 compartilha com as pentraxinas curtas CRP e SAP a capacidade de modular as três vias do complemento: a clássica, a alternativa e a via da lectina (Bottazzi *et al.*, 1997; Nauta *et al.*, 2003; Braunschweig e Józsi, 2011; Doni *et al.*, 2012). PTX3 se liga de uma maneira independente de cálcio ao domínio globular de C1q, o primeiro componente da via clássica do complemento. A interação entre PTX3 imobilizada (nos tecidos) e a superfície de C1q, resulta na ativação da via clássica da cascata do complemento e deposição de C3 e C4 (Roumenina *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2016). Já PTX3 na forma solúvel (no sangue), inibe a cascata do complemento por bloqueio competitivo de relevantes sítios de interação (Garlanda *et al.*, 2018), demonstrando que PTX3 pode apresentar um papel dual na ativação da cascata do complemento.

Devido a interações específicas com a Ficolina-1, a Ficolina-2 e a Lectina Ligadora de Manose (MBL), PTX3 modula a via da lectina da cascata do complemento. A interação entre PTX3 e a Ficolina-2 ou MBL aumenta a deposição do complemento na superfície de *A. fumigatus* e *C. albicans*, respectivamente (Ma *et al.*, 2009; Gout *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011). PTX3 também é capaz de interagir com reguladores negativos da ativação do complemento, como o Fator H (FH). PTX3 imobilizada aumenta o recrutamento de FH e a deposição de iC3b, modulando a ativação da via alternativa do complemento e prevenindo uma excessiva resposta inflamatória na lesão tecidual, enquanto, aumenta a deposição de moléculas de opsonização (Deban *et al.*, 2008).

Assim como outros membros da família das pentraxinas, PTX3 se liga a células apoptóticas e inibe seu reconhecimento pelas DCs, por modular a produção de citocinas inflamatórias por esse tipo celular. Adicionalmente, a pré-incubação de células apoptóticas com PTX3 aumenta a ligação de C1q e a deposição de C3 na superfície celular, sugerindo um papel de PTX3 no *clearance* de células apoptóticas mediada pelo complemento. Na presença de células que estão em processo de morte, PTX3 pode contribuir para o reconhecimento de células em apoptose *versus* células infectadas e restringir a apresentação cruzada de antígenos derivadas de células em processo de morte (Rovere *et al.*, 2000).

Além do seu importante papel na resposta imune, PTX3 apresenta função extremamente relevante na inflamação, onde se comporta como uma proteína de fase aguda. Em condições normais, os níveis plasmáticos de PTX3 são baixos, aproximadamente 25 ng/ml em camundongos e menos que 2 ng/ml no homem, contudo, eles aumentam rapidamente (pico em 6-8 horas) e dramaticamente (200-800 ng/ml em camundongos e no homem)

durante o choque endotóxico, a sepse e em condições inflamatórias e infecciosas (Mantovani, Garlanda, *et al.*, 2008; Deban *et al.*, 2011).

A fim de investigar a função fisiológica de PTX3, nosso grupo desenvolveu camundongos transgênicos que carregam cópias extras do gene *Ptx3* e demonstrou, pela primeira vez, a importância dessa proteína na regulação da resposta inflamatória *in vivo*. Foi observado que, pelo menos em parte, essa regulação ocorre pela modulação da expressão de TNF e IL1B produzidos tanto no local da inflamação, quanto sistemicamente, amplificando a resposta inflamatória (Dias *et al.*, 2001). Os animais transgênicos que carregavam cópias extras do gene *Ptx3* apresentaram maior sobrevivência em resposta ao choque endotóxico promovido pela administração sistêmica de LPS, bem como à infecção polimicrobiana desencadeada pela ligadura e perfuração do ceco, em relação a camundongos do tipo selvagem (WT, do inglês *wild type*) (Dias *et al.*, 2001). Em animais transgênicos e nocautes para PTX3 (*Ptx3*^{-/-}) observou-se que a pentraxina exacerba a inflamação tecidual após a isquemia e reperfusão intestinal em camundongos (Souza *et al.*, 2009), aumentando a lesão nos pulmões e intestinos e levando ao aumento da mortalidade (Soares *et al.*, 2006).

Adicionalmente ao papel na imunidade inata e inflamação, PTX3 também atua no remodelamento e na fertilidade feminina (Salustri *et al.*, 2004). PTX3 interage com proteínas da matriz extracelular (MEC), tais como a proteína 6 induzida por TNF (TSG-6) e com o inibidor inter- α -tripsina (I α I), porém não se liga ao colágeno tipo IV, fibronectinas e gelatinas, como as pentraxinas curtas (Bottazzi *et al.*, 1997). A ligação de PTX3 a TSG-6 e I α I é essencial para a organização da matriz viscoelástica do *cumulus oophorus*. Em modelo murino de animais nocautes para PTX3, foi demonstrado que a deficiência em produzir PTX3 está associada com a subfertilidade feminina devido à instabilidade da matriz do *cumulus* (Salustri *et al.*, 2004; Scarchilli *et al.*, 2007). PTX3 também possui relação com doenças ovarianas como, por exemplo, a síndrome do ovário policístico, onde os níveis circulante de PTX3 estão diminuídos (Tosi *et al.*, 2014) e a torção ovariana em modelo murino, na qual os níveis da proteína estão elevados (Akman *et al.*, 2015).

Com relação ao remodelamento e regeneração tecidual, PTX3 possui funções não redundantes em diferentes modelos, como regeneração de feridas na pele, lesão hepática e pulmonar e trombose arterial, onde células deficientes em produzir PTX3 apresentaram uma fibrinólise pericelular deficiente *in vitro* e migração coletiva direcional na matriz provisória rica em fibrina *in vivo* (Bottazzi *et al.*, 2016). A deficiência de PTX3 foi associada ao aumento da formação de coágulo e deposição de fibrina, por um mecanismo de interação com a

fibrina e plasminogênio através do domínio N-terminal, onde PTX3 facilita a fibrinólise dependente de plasminogênio (Bottazzi *et al.*, 2016).

Foi reportado que PTX3 desempenha um papel relevante na biologia de várias doenças, tais como: cardiopatias (Bonacina *et al.*, 2013), aterosclerose (Garlanda *et al.*, 2011), enfermidades agudas e crônicas dos rins (Speeckaert *et al.*, 2013) e pulmonares (He *et al.*, 2007), lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (Real *et al.*, 2012), dentre outras. A similaridade com CRP, que é um biomarcador amplamente utilizado na clínica médica, incitou a investigação de PTX3 como marcador de doenças humanas de origem inflamatória ou infecciosa. Essa investigação foi suportada ainda pelo fato de os níveis plasmáticos de PTX3 aumentarem rapidamente em resposta à inflamação, sendo em muitos casos mais precocemente elevados que os níveis plasmáticos de CRP. Evidências em condições de infarto agudo do miocárdio e sepse meningocócica sugerem que os níveis de PTX3 aumentam entre 6-8 h após o início da lesão, enquanto, os de CRP aumentam somente após 24-30 h (Garlanda *et al.*, 2018). Assim, PTX3 tem sido apontada como um biomarcador de várias doenças cardíacas (Lee *et al.*, 2010; Kume *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2017), pulmonares (Oldani *et al.*, 2012; Tamura *et al.*, 2012; Kurt *et al.*, 2015), oftalmológicas (Mou *et al.*, 2018), gestacionais (Cozzi *et al.*, 2012) e obesidade (Witasp *et al.*, 2014). Outra importante doença, na qual PTX3 parece apresentar um importante papel são os cânceres. Na última década, o número de trabalhos buscando o entendimento do papel desempenhado por essa complexa proteína nas neoplasias sofreu um rápido aumento (Magrini *et al.*, 2016; Garlanda *et al.*, 2018; Giacomini *et al.*, 2018).

1.3 FIBROSSARCOMA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*, WHO), câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento de células anormais para além de seus limites habituais e que podem invadir partes adjacentes do corpo e/ou se espalharem para outros órgãos (World Health Organization, 2018). Dentro desse grupo, encontram-se os sarcomas, que são um grupo heterogêneo de cânceres raros de origem mesenquimal (Cormier e Pollock, 2004).

Os sarcomas representam aproximadamente 1% de todos os casos de neoplasias (Wibmer *et al.*, 2010) e quase 21 % de todos os casos de cânceres malignos sólidos pediátricos e menos de 1% das neoplasias malignas sólidas adultas. A estimativa é que existam 50 subtipos histológicos de distintos tipos de sarcomas, como os condrossarcomas, os sarcomas de Ewing, os osteossarcomas e os sarcomas de tecido mole (Burningham *et al.*, 2012). Apesar de serem relativamente raros, os sarcomas, levam a uma alta taxa de

mortalidade, principalmente os de tecidos moles, que são a maioria dos casos de sarcomas diagnosticados (Burningham *et al.*, 2012).

Embora os sarcomas de tecido mole possam ocorrer em qualquer parte do corpo, as extremidades são comumente mais afetadas (Cormier e Pollock, 2004), sendo os músculos, articulações, gordura, nervos, tecidos profundos da pele e vasos sanguíneos os principais tecidos acometidos (Burningham *et al.*, 2012). Esses tumores possuem alta taxa de mortalidade e mau prognóstico, associada à sua alta capacidade metastática e baixa taxa de resposta à quimioterapia convencional, sendo o tratamento padrão para esses sarcomas, a remoção cirúrgica (Hwang e Hunt, 2003; Santos *et al.*, 2008). Uma vez que são patologias raras, geralmente são diagnosticados tardiamente, quando a lesão tumoral já atinge dimensões elevadas. Em decorrência disso, a morte por metástase geralmente ocorre após 2 a 3 anos do diagnóstico inicial na maioria dos casos avançados. A taxa de sobrevivência global de 5 anos de pacientes acometidos pela patologia varia entre 50 e 60 % e de 10 anos é menor que 30% (Nakanishi *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008).

Representando menos de 5% dos casos de tumores malignos de partes moles estão os fibrossarcomas (Santos *et al.*, 2008) que, embora sejam raros, são malignos (Augsburger *et al.*, 2017). Os fibrossarcomas são derivados de fibroblastos e são tumores com produção de colágeno variada e alta atividade mitótica (Santos *et al.*, 2008; Greaves *et al.*, 2013). Esses tumores estão localizados predominantemente em tecidos moles profundos ou em áreas adjacentes aos ossos, sendo derivados de tendões, fáscias e estruturas aponeuróticas profundas, sendo raramente encontradas variantes superficiais (Santos *et al.*, 2008; Augsburger *et al.*, 2017). Assim como ocorre com outros sarcomas de tecido mole, o tratamento dos tumores de fibrossarcoma é a completa excisão cirúrgica, na qual é removida também uma margem adequada com projeção prognóstica dependente do tamanho e localização do tumor, seu grau histológico e a presença de metástase (Nakanishi *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2006).

Existem dois tipos distintos desse tumor: o fibrossarcoma infantil ou congênito e o fibrossarcoma do adulto. A WHO considera o tipo infantil como um tumor maligno intermediário e raramente metastático. Em contrapartida, o fibrossarcoma do adulto é classificado como um tumor com alta taxa de malignidade (Augsburger *et al.*, 2017). O fibrossarcoma do adulto já foi considerado o tipo mais comum de sarcoma em adultos, contudo, a incidência sofreu um grande declínio nas últimas décadas devido à evolução da classificação dos tumores de tecidos moles, identificação clínica, morfológica e genética de subtipos distintos de fibrossarcoma e aumento do conhecimento a cerca de outros tumores mesenquimais e não mesenquimais que podem mimetizar os fibrossarcomas, como o

lipossarcoma, rabiomiossarcoma, sarcoma sinovial, tumores malignos da bainha do nervo periférico e fibromatose (Folpe e Kwiatkowski, 2010).

1.4 PTX3 E CÂNCER

1.4.1 Microambiente Tumoral

O câncer se desenvolve através de um processo de múltiplas etapas que pode estender-se ao longo de várias décadas. Inicialmente, mediante um acúmulo de mutações, células normais vão progressivamente adquirindo um conjunto de marcas específicas e características que as transformam em células malignas (Hanahan e Weinberg, 2011). Quatro dessas marcas, a auto-suficiência na produção de sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, a evasão de apoptose e o potencial replicativo ilimitado, contribuem para a proliferação descontrolada de células cancerosas. Além disso, as células neoplásicas também adquirem a capacidade de invadir o tecido normal adjacente e promover metástases para órgãos distantes. A angiogênese, a sexta marca do câncer, além de auxiliar o processo de metástase hematogênica, contribui para o desenvolvimento neoplásico, por suprir o tumor em progressão de nutrientes e oxigênio, o que viabiliza o seu crescimento (Hanahan e Weinberg, 2011). Durante o desenvolvimento da doença, outra importante característica é a inflamação associada ao tumor. A inflamação pode contribuir para a aquisição de várias características favoráveis à progressão tumoral, tais como o fornecimento de moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase, e sinais que levam à ativação da transição epitélio-mesenquima (EMT). Assim, embora de suma importância para o desenvolvimento do tumor, a inflamação não é considerada como uma marca do câncer, mas como uma característica capacitadora da aquisição dessas marcas (Hanahan e Weinberg, 2011).

Os avanços científicos visando o melhor entendimento sobre a biologia dos tumores nos permite hoje entender que o tumor não pode ser visto apenas como um agregado de células com proliferação descontrolada, mas sim como um tecido complexo heterogêneo, formado por células normais, que são geneticamente estáveis, e por células cancerígenas (Quail e Joyce, 2013). O microambiente tumoral (MT) é o ambiente no qual o tumor existe, incluindo os vasos sanguíneos circundantes, células do sistema imune, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea, linfócitos e MEC. Além disso, há também a presença de moléculas sinalizadoras e proteínas produzidas por todos os tipos celulares

presentes no tumor e que suportam o seu crescimento (Mantovani, Allavena, *et al.*, 2008; Hanahan e Weinberg, 2011).

Embora a presença de PTX3 tenha sido identificada tanto no soro, quanto no microambiente tumoral de vários tipos de cânceres, o papel desempenhado pela proteína no aparecimento e progressão tumoral ainda não foi totalmente elucidado. Contudo, nos últimos anos, muitos esforços têm sido despendidos a fim de compreender o seu papel nos processos neoplásicos. Como resultado, uma dualidade de papéis, ora pró-, ora antitumorigênico têm sido observada (Magrini *et al.*, 2016; Giacomini *et al.*, 2018). Em alguns casos, a alta expressão da proteína é considerada um mau prognóstico, entretanto em outros, PTX3 é considerado como um oncosupressor. A dualidade de papéis desempenhados por PTX3 no processo neoplásico sugere que o efeito dessa proteína pode ser dependente do tipo de câncer, da fonte celular que o origina e do microambiente tumoral que o circunda (Giacomini *et al.*, 2018).

1.4.2 Efeito Pró-tumoral de PTX3

Elevados níveis séricos e locais de PTX3 tem sido observado em vários tipos de tumores humanos, tais como, tumores de mama (Tafani *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015; Player *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017), carcinoma pancreático (Kondo *et al.*, 2013), glioma (Locatelli *et al.*, 2013), câncer de pulmão (Diamandis *et al.*, 2011; Infante *et al.*, 2016), glioblastoma (Tafani *et al.*, 2011), câncer de próstata (Ravenna *et al.*, 2009; Stallone *et al.*, 2014), câncer de ovário (Tohill *et al.*, 2008), câncer cervical (Ying *et al.*, 2016), câncer gástrico (Choi *et al.*, 2016) e lipossarcoma (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010). E os altos níveis de PTX3 foram correlacionados a um alto grau de malignidade e pobre prognóstico. Além disso, variações genéticas de *PTX3* têm sido associadas a um risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em infecções pelo vírus da hepatite C (Carmo *et al.*, 2016).

Os altos níveis de PTX3 têm sido relacionados a um aumento da migração de células de carcinoma pancreático (Kondo *et al.*, 2013). Em células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), a produção aumentada de PTX3, estimulada pelo fator de crescimento epidermal (EGF) (Chang *et al.*, 2015) ou pelo sal orgânico oleato (Chan *et al.*, 2017), promove a migração e a invasão celular. Consequentemente, *in vivo*, foi observado que o *Knockdown* de *PTX3* diminuiu o potencial metastático desse tipo tumoral. Em cânceres gástricos, além de PTX3 aumentar a migração celular, a proteína também é capaz de aumentar o recrutamento de macrófagos e, por conseguinte, aumentar a inflamação associada ao tumor (Choi *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016). O papel de PTX3 no processo metastático também tem sido observado em tumores de mama, no qual a elevada expressão de PTX3 tem sido detectada localmente em metástases ósseas de pacientes

acometidos por câncer de mama (Choi *et al.*, 2014). *In vitro*, células derivadas de tumor de mama tem sua capacidade migratória aumentada pela presença de PTX3 (Choi *et al.*, 2014).

Em células de câncer cervical, o silenciamento de PTX3, além de uma diminuição no potencial de migração e invasão, promoveu uma redução significativa da proliferação, viabilidade celular e capacidade de formação de colônias e, em ensaios *in vivo*, inibiu a tumorigênese e o potencial de gerar metástase pulmonar (Ying *et al.*, 2016). De maneira semelhante, o silenciamento de *PTX3* também promoveu um decréscimo nas taxas de proliferação, migração celular e potencial invasivo de células de glioma *in vitro*, acompanhado por uma inibição do crescimento tumoral em modelo animal de camundongos, corroborando o papel pró-tumoral desta proteína na progressão desse tipo de tumor (Tung *et al.*, 2016).

Em 2006, Willeke e colaboradores relataram pela primeira vez a alta expressão de PTX3 no grupo dos sarcomas, mais precisamente em lipossarcoma, um subtipo de sarcoma de tecido mole. Posteriormente, Germano e colaboradores em 2010, identificaram elevados níveis plasmáticos e locais de PTX3 em pacientes acometidos por lipossarcoma mixóide (LM) em relação a pessoas saudáveis e pacientes acometidos por câncer colorretal ou de fígado. Esses autores reportaram também um aumento de PTX3 em tumores gerados experimentalmente em camundongos nude xenotransplantados com fragmentos de tumores extraídos de pacientes. O tratamento de um grupo de pacientes portadores de LM e dos animais xenotransplantados com LM com o fármaco antitumoral trabectina diminuiu os níveis de PTX3, sendo essa diminuição associada a uma melhora do quadro clínico. Esse resultado, correlacionou diretamente a presença PTX3 ao desenvolvimento desse tumor (Germano, *et. al*, 2006).

Embora evidências experimentais apontem o papel protumorigênico de PTX3 em diferentes tipos tumorais, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais essa proteína desempenha tal função. A glicosilação de Asn₂₂₀ na sequência de aminoácidos de PTX3 produzida por macrófagos M2 ou fibroblastos associados ao tumor parece ser uma possibilidade de mecanismo, que, contudo, precisa ser mais estudada (Chi *et al.*, 2015). O que se sabe até o momento é que PTX3 é regulada positivamente em vários tumores, o que reflete nos seus níveis plasmáticos. Assim, é sugerido que PTX3 pode representar um potencial biomarcador de prognóstico. De fato, PTX3 já foi proposta como um novo biomarcador de câncer de pulmão (Diamandis *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014), próstata (Stallone *et al.*, 2014) e mama (Pavlou *et al.*, 2013). Em carcinoma de pulmão, por exemplo, elevados níveis séricos de PTX3 foram positivamente correlacionados com o estágio do tumor e permitiram discriminar

pacientes acometidos por tumores de alto grau (Diamandis *et al.*, 2011). A alta expressão de PTX3 também tem sido mostrada como um indicador de sobrevida em câncer de pulmão de pequenas células e de não-pequenas células, indicando um mau prognóstico dessa magnitude (Liu *et al.*, 2014; Infante *et al.*, 2016).

1.4.3 Efeito Antitumoral de PTX3

Em oposição ao seu papel como uma molécula que auxilia e promove o desenvolvimento neoplásico, PTX3 também tem sido apontada como uma molécula com propriedades supressoras da progressão dos tumores. Já é bem difundido o conceito de que o câncer tem uma forte correlação com a inflamação (Mantovani, Allavena, *et al.*, 2008). Como as pentraxinas são importantes moduladores da inflamação, não seria surpreendente que essas proteínas tivessem algum papel sobre a biologia dos tumores. De fato, além de PTX3, alguns trabalhos apontam o papel de CRP no processo neoplásico (Kondo *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015; Mitsunaga *et al.*, 2016).

Para se estudar PTX3 na mediação da inflamação no contexto da carcinogênese, Bonavita e colaboradores em 2015 utilizaram um modelo de indução química de tumores epiteliais e mesenquimais em camundongos nocaute para PTX3 (*Ptx3*^{-/-}). A deficiência de PTX3 foi relacionada a uma resposta inflamatória ligada ao câncer mais pronunciada, com infiltração de macrófagos nos tumores, alta produção de citocinas inflamatórias, maior processo angiogênico e aumento da deposição do componente C3 do Complemento e dos níveis de C5a. Interessantemente, quando ocorre a redução da infiltração de macrófagos promovida pela inativação genética de C3 ou inibição de CCL2, o fenótipo observado nos animais *Ptx3*^{-/-} é revertido. Além disso, os tumores dos animais nocautes para PTX3 apresentavam um aumento de mutações no gene supressor de tumor *Trp53* e de danos oxidativos no DNA. Notavelmente, esses achados demonstram um papel protetivo de PTX3 na carcinogênese e representam a primeira evidência experimental do possível papel de PTX3 na modulação da resposta imune no câncer.

Além disso, em alguns cânceres mesenquimais e epiteliais humanos ocorre uma baixa expressão de *PTX3* (Bonavita *et al.*, 2015). Em contraste com o tecido normal, o promotor do gene *PTX3* foi encontrado altamente metilado em câncer coloretal, carcinoma de células escamosas de pele, sarcomas, incluindo tumor desmóide, cordoma, angiosarcoma e leiomiossarcoma (Bonavita *et al.*, 2015; Rubino *et al.*, 2017) e células de carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC) (Wang *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2017).

A metilação do DNA, que ocorre predominantemente em ilhas de 5'-citosina-fosfato-guanina-3 (ilhas CpG), envolve a adição de um grupo metil na posição 5 do anel de uma citosina do

DNA por ação de uma enzima metiltransferase que pode ocasionar aumento ou diminuição da atividade do gene (Edwards *et al.*, 2017). Muitos tumores humanos malignos são caracterizados por mudanças generalizadas nos padrões de metilação do DNA (Pfeifer, 2018). A hipometilação associada ao câncer pode aumentar a instabilidade genômica, a ativação de elementos repetitivos no DNA e a transcrição dos genes. Em contrapartida, a hipermetilação do promotor pode ocasionar o silenciamento de genes funcionais em vias de sinalização celular que atuam nas marcas do câncer, incluindo o reparo do DNA, regulação do ciclo celular, promoção da apoptose ou controle das principais redes de sinalização relevantes ao tumor (Pfeifer, 2018), sendo assim, a hipermetilação pode promover a carcinogênese por inativar genes supressores de tumor (Liang e Weisenberger, 2017). Visto que a hipermetilação do promotor de *PTX3* foi encontrada em diferentes tumores humanos e murinos, essa proteína tem sido apontada como um oncosupressor extrínseco e essa atuação, pelo menos em parte, se dá pela sua capacidade de regular a inflamação tumoral dependente do Complemento (Bonavita *et al.*, 2015).

Corroborando a hipótese de que o silenciamento de *PTX3* promove a progressão tumoral, células de ESCC, que sabidamente apresentavam o gene *PTX3* altamente metilado (Wang *et al.*, 2011), foram transfectadas para que produzissem altas quantidades de *PTX3*. A expressão aumentada da proteína diminuiu a proliferação celular e a formação de colônias, fenômeno observado juntamente com um aumento da taxa apoptótica. Além disso, em camundongos xenotransplantados com as células de ESCC transfectadas com *PTX3*, foi observada uma redução significativa do volume dos tumores promovida pela presença de *PTX3* (Ma *et al.*, 2016).

Um papel protetivo de *PTX3* no crescimento tumoral também foi reportado em tumores de próstata e melanoma (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Nesses tumores, *PTX3* inibiu a proliferação celular, a angiogênese tumoral, o crescimento e volume dos tumores e o processo metastático *in vivo* em modelo murino. Foi observada também diminuição da EMT em melanomas (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Em ambos os casos, o efeito inibitório promovido por *PTX3* foi mediado por sua capacidade de interagir com diferentes membros da família de Fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGF), FGF8b e FGF2.

A interação entre *PTX3* e os membros da família de FGF foi inicialmente reportada em 2004 (Rusnati *et al.*, 2004) e desde então vem sendo amplamente estudada. *PTX3* interage com FGF2 ou FGF8b impedindo a interação com os receptores específicos do tipo tirosina quinase, inibindo as atividades biológicas promovidas por esses fatores. A interação entre

PTX3 e os membros da família de FGF também reduziu a atividade angiogênica em células de carcinoma de mama (Margheri *et al.*, 2009) e mieloma múltiplo (Basile *et al.*, 2013).

Em camundongos transgênicos que apresentam expressão aumentada de PTX3 dirigida pelo promotor endotelial Tie2 (receptor tirosina-quinase transmembranar de angiopoeitina expresso em células endoteliais) o crescimento de tumores a partir de inóculo de células derivadas de tumores que expressam FGF2, como pulmão e próstata é prejudicado. Além da taxa de proliferação, PTX3 também reduziu a neovascularização e o potencial metastático. Em melanoma, outro tumor dependente de FGF2, o mesmo efeito de PTX3 foi observado. Em camundongos nocaute para PTX3, nos tumores gerados pela inoculação de células de melanoma metastático, foi observado aumento significativo da progressão tumoral do potencial metastático dependente de FGF2 (Ronca *et al.*, 2015). Esses achados apontam para um papel inibitório de PTX3 no processo tumoral dependente de FGF2.

Dessa forma, embora o papel de PTX3 na inibição do desenvolvimento do processo neoplásico ainda não seja totalmente elucidado, PTX3 tem sido considerada como um oncosupressor extrínseco para alguns tipos de câncer. Enquanto mediadores inflamatórios, tais como a IL1B e TNFA, estimulam a produção de PTX3, mecanismos genéticos e epigenéticos, como a metilação, regulam a expressão do gene. Uma vez produzida, PTX3, por sua vez, pode modular a atividade do complemento e a inflamação no microambiente tumoral e, através da sua interação direta com FGF, principalmente FGF2, pode inibir a atividade mitogênica e pró-angiogênica desses fatores. Em conjunto, essas ações biológicas impactam de forma negativa o desenvolvimento tumoral (Figura 5).

1.5 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

1.5.1 Via de Sinalização dos Fatores de Crescimento de Fibroblasto

Em mamíferos, a família dos FGFs é composta por 18 membros identificados que, além de serem relacionados estruturalmente, desempenham funções no desenvolvimento, homeostase tecidual e metabolismo (Beenken e Mohammadi, 2009). As atividades biológicas atribuídas aos FGFs são exercidas através da ligação das moléculas de FGF a receptores específicos transmembranares (FGFR) presentes na superfície celular (Ornitz e Itoh, 2015).

Com base em sua homologia e filogenia, os membros da família de FGFs de mamíferos foram agrupados em seis subfamílias (Ornitz e Itoh, 2001; Popovici *et al.*, 2008; Itoh e Ornitz, 2011; Ornitz e Itoh, 2015). Cinco dessas subfamílias atuam de maneira parácrina: a

subfamília FGF1 (FGF1 e 2), a FGF4 (FGF4, 5 e 6), a FGF7 (FGF3, 7, 10 e 22), a FGF8 (FGF8, 17 e 18) e a subfamília FGF9 (FGF9, 16 e 20). Em contraste, a subfamília FGF19 (FGF19, 21 e 23) sinaliza de uma maneira endócrina (Paradiso *et al.*, 2013). Interessantemente, algumas moléculas de FGFs foram identificadas como tendo uma função nuclear (Bryant e Stow, 2005; Beenken e Mohammadi, 2009). Embora a maioria dos FGFs apresentem sequências sinalizadoras para secreção na porção N-terminal, FGF1 e FGF2 não possuem estas sequências. Apesar disso, eles podem ser liberados a partir de células danificadas ou por meio de exocitose, independentemente da via do retículo endoplasmático-complexo de Golgi. Contudo, os mecanismos de sua secreção ainda não foram totalmente esclarecidos (Nickel, 2010; Paradiso *et al.*, 2013).

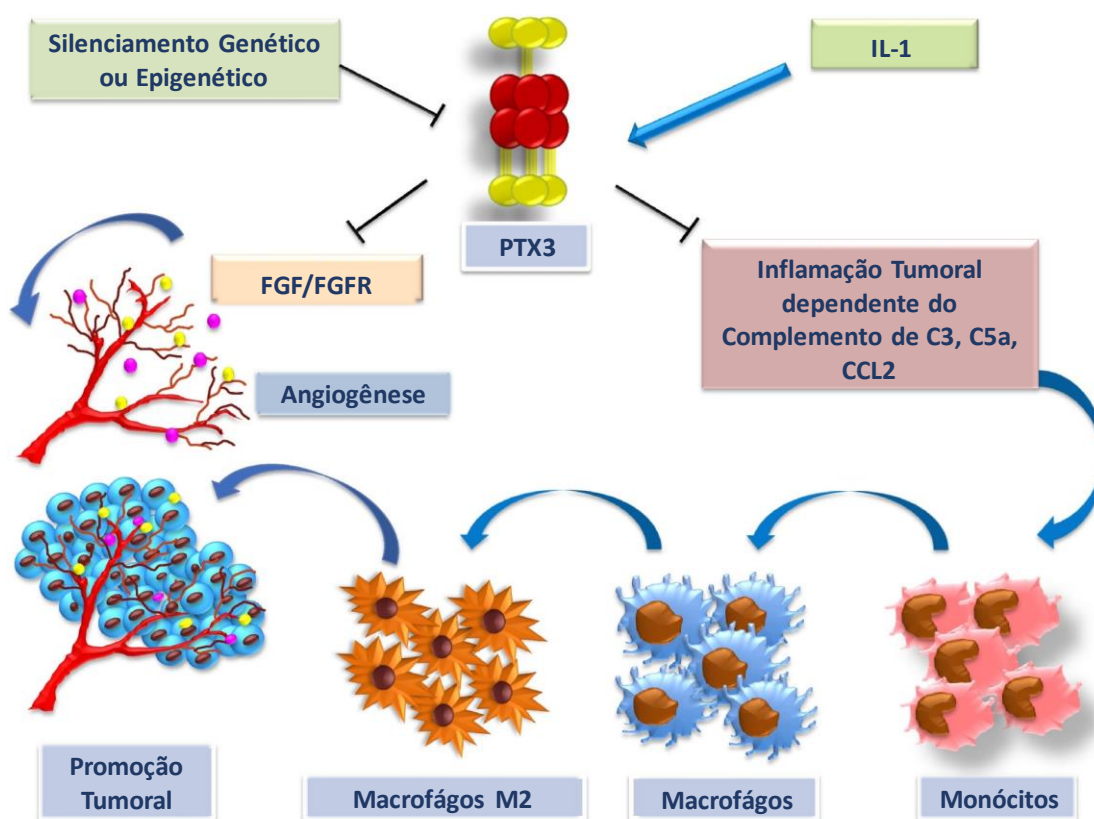


Figura 5 - PTX3 como um Oncosupressor Extrínseco no Câncer.

No câncer, a expressão do gene e da proteína PTX3 é controlada pela presença de mediadores inflamatórios (por exemplo, IL1B e TNFA) e/ou por mecanismos genéticos e epigenéticos, como a metilação. PTX3 regula a inflamação dependente de complemento, incluindo a infiltração de macrófagos e produção de citocinas no microambiente tumoral, bem como a angiogênese dependente do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o que pode levar a instabilidade genética e promoção do desenvolvimento do tumor.

Fonte: Magrini, *et al.*, 2016.

Peça chave na composição da via de sinalização de FGF, os FGFRs são receptores transmembranares do tipo tirosina quinase (RTK) altamente conservados e pertencentes a

superfamília das imunoglobulinas (Ig). Embora existam variações de isoformas, basicamente, existem quatro tipos de FGFR funcionais, chamados de FGFR1-4, e um quinto receptor, o FGFR5 (FGFRL-1), que, embora seja capaz de interagir com os FGFs, não apresenta atividade quinase e, conseqüentemente, não consegue promover a ativação de vias de sinalização intracelulares. Acredita-se que a função de FGFR5 seja sequestrar os FGFs do meio e atuar como um agente regulador negativo das atividades das moléculas de FGF (Johnson e Williams, 1993).

Estruturalmente, cada monômero de FGFR consiste de um domínio extracelular, que contém um sítio de ligação para a molécula de FGF, composto por duas ou três alças Ig, um domínio transmembranar e uma porção tirosina quinase intracelular. O primeiro domínio Ig apresenta um papel na auto-inibição do receptor (Olsen *et al.*, 2004), enquanto o segundo e terceiro mediam a ligação do FGF (Zhang *et al.*, 2006; Ornitz e Itoh, 2015). Nos FGFR1-3 pode ocorrer *splicing* alternativo do terceiro domínio Ig que influencia a geração de uma segunda divisão na terceira Ig, as isoformas IIIb e IIIc (Chellaiah *et al.*, 1994). A isoforma IIIc é usualmente expressa em tecidos mesenquimais, enquanto IIIb é geralmente expressa em células epiteliais, principalmente durante o desenvolvimento. Interessantemente, os ligantes de receptores epiteliais são frequentemente expressos em tecidos mesenquimais e vice-versa, o que demonstra uma sinalização parácrina (Grose *et al.*, 2007).

Na via de sinalização de FGF, após serem produzidas, as moléculas de FGFs são secretadas e sequestradas para a MEC, onde se ligam com baixa afinidade a proteoglicanos heparan sulfatados (HSPG) (Harmer *et al.*, 2004; Mohammadi *et al.*, 2005; Ori *et al.*, 2008). Eles podem ser liberados da MEC em um complexo com o HSPG por heparanases, proteases específicas ou proteínas de ligação a FGF (FGFBP) e, uma vez livres, o complexo FGF/HSPG pode interagir com os FGFRs na membrana plasmática da células, formando um complexo composto por 2 ligantes, 2 receptores e 1 molécula de HSPG (Naski e Ornitz, 1998). Nesse complexo proteico, a molécula de HSPG protege os FGFs da degradação e estabiliza a interação de alta afinidade que ocorre entre FGF e FGFR. A interação com o ligante promove a ativação do receptor, induzindo uma mudança conformacional que resulta na sua dimerização e transfosforilação dos resíduos tirosina-quinase intracelulares. A ativação dos receptores, desencadeia o recrutamento de proteínas adaptadoras de início de vias de sinalização, que por sua vez, recrutam outras proteínas, promovendo a ativação de importantes vias de transdução de sinal. A cascata de sinalização dos FGFs culmina em uma resposta no núcleo para a indução de genes específicos que atuam nos processos de diferenciação, proliferação, migração, e sobrevivência celular. Quatro vias de sinalização principais são ativadas pela interação FGF/FGFR, as vias RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT,

STAT e PLC γ (Figura 6) (Beenken e Mohammadi, 2009; Turner e Grose, 2010; Paradiso *et al.*, 2013).

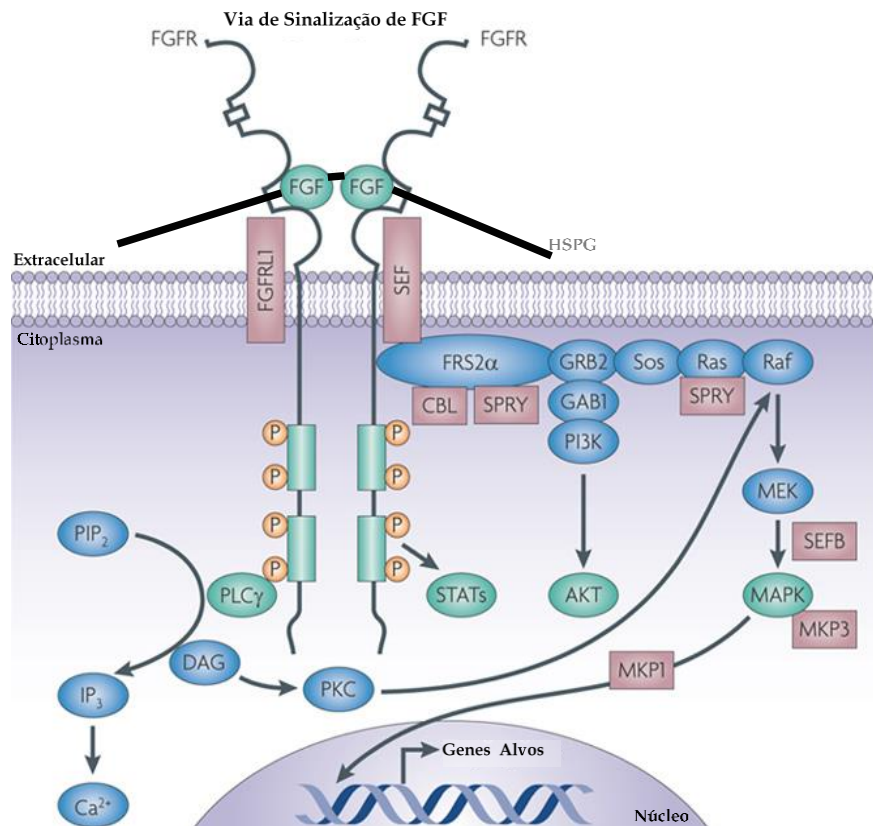


Figura 6 - Via de sinalização de FGF.

A via de transdução de sinais desencadeada pelos FGFs é composta por dois receptores (FGFR), duas moléculas (FGF) e um proteoglicano heparan sulfatado (HSPG). Após ligação dos ligantes, ocorre a ativação e dimerização dos receptores, que transfosforilam seus domínios quinase, levando à ancoragem de proteínas adaptadoras e ativação de quatro vias de sinalização principais: a via RAS-RAF- MAPK, a de PI3K - AKT, a do transdutor e ativador de sinal de transcrição (STAT) e fosfolipase Cy (PLC γ) (verde). A cascata de sinalização pode ser regulada negativamente em vários níveis pela internalização do receptor ou pela indução de reguladores negativos, incluindo *FGFR-like 1* (FGFRL1), *SEF*, *Sprouty* (SPRY), CBL, MAPK fosfatase 1 (MKP1) e *mcp3* (roxo). DAG, diacilglicerol; FRS2 α , FGFR substrato 2 α ; GRB2, factor de crescimento ligado ao receptor 2; IP3 inositol trifosfato; P, fosforilação; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PKC, proteína-quinase C; Sos, filho de Sevenless.

Fonte: Modificado de Turner e Grose, 2010.

As vias de sinalização desencadeadas pelos FGFs desempenham papel essencial no desenvolvimento e metabolismo dos metazoários. Vários autores tem apontado o papel crítico dos FGFs em vias de sinalização envolvidas em múltiplos processos durante a embriogênese, morfogênese e organogênese, processos metabólicos e homeostase (Beenken e Mohammadi, 2009; Belov e Mohammadi, 2013). Dada a sua importância biológica, alterações na via de sinalização ativadas pelos FGFs contribuem para o aparecimento e o desenvolvimento de várias doenças, incluindo algumas síndromes, tais como a craniosinostose congênita e a síndrome de nanismo (Naski *et al.*, 1996; Wilkie *et al.*,

2002; Wilkie, 2005) e para a progressão de desordens metabólicas adquiridas, como a obesidade (Inagaki *et al.*, 2007; Moyers *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011) e desordens crônicas do rim (Fliser *et al.*, 2007). Também há evidências do importante papel da sinalização via FGF no aparecimento e desenvolvimento de muitos tipos de tumores (Rand *et al.*, 2005; Pollock *et al.*, 2007; Gartside *et al.*, 2009; Di Martino *et al.*, 2012). Diante da importância fisiopatológica da sinalização de FGF, ela se torna alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Alessi *et al.*, 2009; Beenken e Mohammadi, 2009).

1.5.2 Fator de Crescimento de Fibroblasto 2

FGF1 e FGF2 foram os primeiros membros da família dos FGFs a serem descobertos. Particularmente, FGF2 foi descoberto e descrito pela primeira vez em 1973 (Armelin, 1973), sendo, posteriormente, caracterizado como um fator mitogênico por Gospodarowicz em 1975 que induzia a proliferação do fibroblasto da linhagem NIH/3T3. Devido ao seu caráter básico, FGF2 foi inicialmente denominado de FGFb (Gospodarowicz, Greene, *et al.*, 1975; Gospodarowicz e Moran, 1975; Gospodarowicz, Weseman, *et al.*, 1975).

Atualmente, o papel biológico atribuído a FGF2 é extenso, incluindo, além do seu efeito mitogênico, o desenvolvimento embrionário (cérebro, membros, pulmão, coração, músculo, osso, sangue, pele e olhos), a cicatrização de feridas, a sobrevivência celular, o bloqueio da apoptose em células neuronais, entre outros (Ornitz e Itoh, 2015). Além disso, FGF2 é o principal membro da família FGF indutor da angiogênese, tanto diretamente, quanto indiretamente, uma vez que induz a expressão de outros fatores pro-angiogênicos, como a angiopoetina-2 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), por exemplo (Pepper *et al.*, 1992; Fujii e Kuwano, 2010; Turner e Grose, 2010).

FGF2 tem sua expressão aumentada em sítios de inflamação crônica, após a injúria tecidual e em diferentes tipos de cânceres (Presta *et al.*, 2007). No processo neoplásico, FGF2 está intimamente relacionado a progressão e metástase neoplásica devido ao seu alta capacidade mitogênica e angiogênica (Basilico e Moscatelli, 1992; Nugent e Iozzo, 2000; Presta *et al.*, 2017), de forma que o antagonismo de FGF2 tem sido apontado e estudado como um alvo terapêutico na patologia do câncer (Alessi *et al.*, 2009; Presta *et al.*, 2017).

1.5.3 Interação entre PTX3 e os Fatores de Crescimento de Fibroblasto

Em 2004, Runasti e colaboradores, a fim de melhor entenderem os mecanismos responsáveis pelo complexo papel biológico de PTX3, investigaram sua capacidade de interação com uma série de polipeptídeos de sinalização extracelular. Dentre as moléculas analisadas, eles demonstraram pela primeira vez a interação específica e de alta afinidade

entre PTX3 e FGF2. Posteriormente, visando avaliar o efeito dessa interação nas atividades biológicas promovidas por FGF2, eles realizaram ensaios de proliferação celular *in vitro* e de neovascularização da membrana corioalantóide de embriões de galinha (CAM) e observaram que o tratamento com a proteína recombinante PTX3 inibia a atividade mitogênica de células endoteliais, bem como a angiogênese.

Posteriormente, além de FGF2, foi demonstrado que PTX3 é capaz de interagir com outros membros da família de FGF. PTX3 se liga com afinidade à isoforma b de FGF8 e, assim como ocorre com FGF2, reduz as atividades biológicas estimuladas por esse fator (Leali *et al.*, 2011). Recentemente, foi reportado que PTX3 pode se ligar também a FGF1, FGF5, FGF6, FGF7, FGF10, FGF16, FGF17, FGF18, FGF20 e FGF22, porém com baixo impacto biológico (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Giacomini *et al.*, 2015).

Em 2006, Camozzi e colaboradores identificaram que a interação entre PTX3 e FGF2 se dá pela porção N-terminal inédita da pentraxina. Mais tarde, foi identificado que existem 2 sítios de ligação para FGF2 na estrutura quaternária de PTX3, formando um complexo proteico composto por uma molécula de PTX3 e duas moléculas de FGF2 (Inforzato *et al.*, 2010). PTX3 se liga a FGF2 justamente no sítio de interação deste fator com o seu receptor, dessa forma, quando PTX3 está presente no meio, a interação física entre FGF2 e FGFR, responsável pelas atividades biológicas de FGF, fica impedida de ocorrer (Figura 7).

Visando o desenvolvimento de um novo antagonista de FGF2 viável para ser aplicado na clínica médica, vários peptídeos sintéticos de diferentes sequências proteicas correspondentes à porção N-terminal de PTX3 foram testados e se mostraram eficientes em inibir as atividades biológicas atribuídas a FGF2 (Leali *et al.*, 2009). O pentapeptídeo acetilado Ac-ARPCA-NH₂, ou simplesmente, ARPCA (Alanina, Arginina, Prolina, Cisteína, Alanina), correspondente aos aminoácidos 100-104 da porção N-terminal de PTX3, foi tido como o menor peptídeo sintético capaz de se ligar a FGF2 e inibir suas atividades biológicas (Leali *et al.*, 2010). De fato, ARPCA foi capaz de diminuir a atividade proliferativa, angiogênica e o desenvolvimento tumoral promovidas por FGF8b em câncer de próstata (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013) e por FGF2 em melanoma (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

Visto o potencial inibitório de PTX3 sobre FGF2, um modelo atomístico do complexo ARPCA/FGF2 foi gerado para identificar os determinantes físico-químicos necessários para essa interação. A informação foi traduzida em um modelo de farmacóforo semelhante a um medicamento através da triagem do bando de dados de pequenas moléculas NCI2003 (*Developmental Therapeutics Program*, NCI/NIH. <https://dtp.cancer.gov/>) (Colombo *et al.*, 2010; Ronca *et al.*, 2015). Assim, o composto (3β)-24,24,24-trifluoro-23-(trifluoromethyl)-21-norchol-5-ene-3,20,23-triol (NSC12) foi caracterizado como uma molécula que atua como

uma armadilha extracelular para FGF2, sendo capaz de interferir na sua interação com FGFR1, contudo, sem afetar a sua habilidade de interagir com o HSPG (Ronca *et al.*, 2015). Além de ser capaz de se ligar com outros membros da família de FGF, NSC12 mostrou-se eficiente em diminuir a angiogênese e a proliferação celular *in vitro* e o crescimento tumoral em tumores de próstata e pulmão promovido por FGF em modelo murino, tal como PTX3 e o pentapeptídeo ARPCA (Ronca *et al.*, 2015).

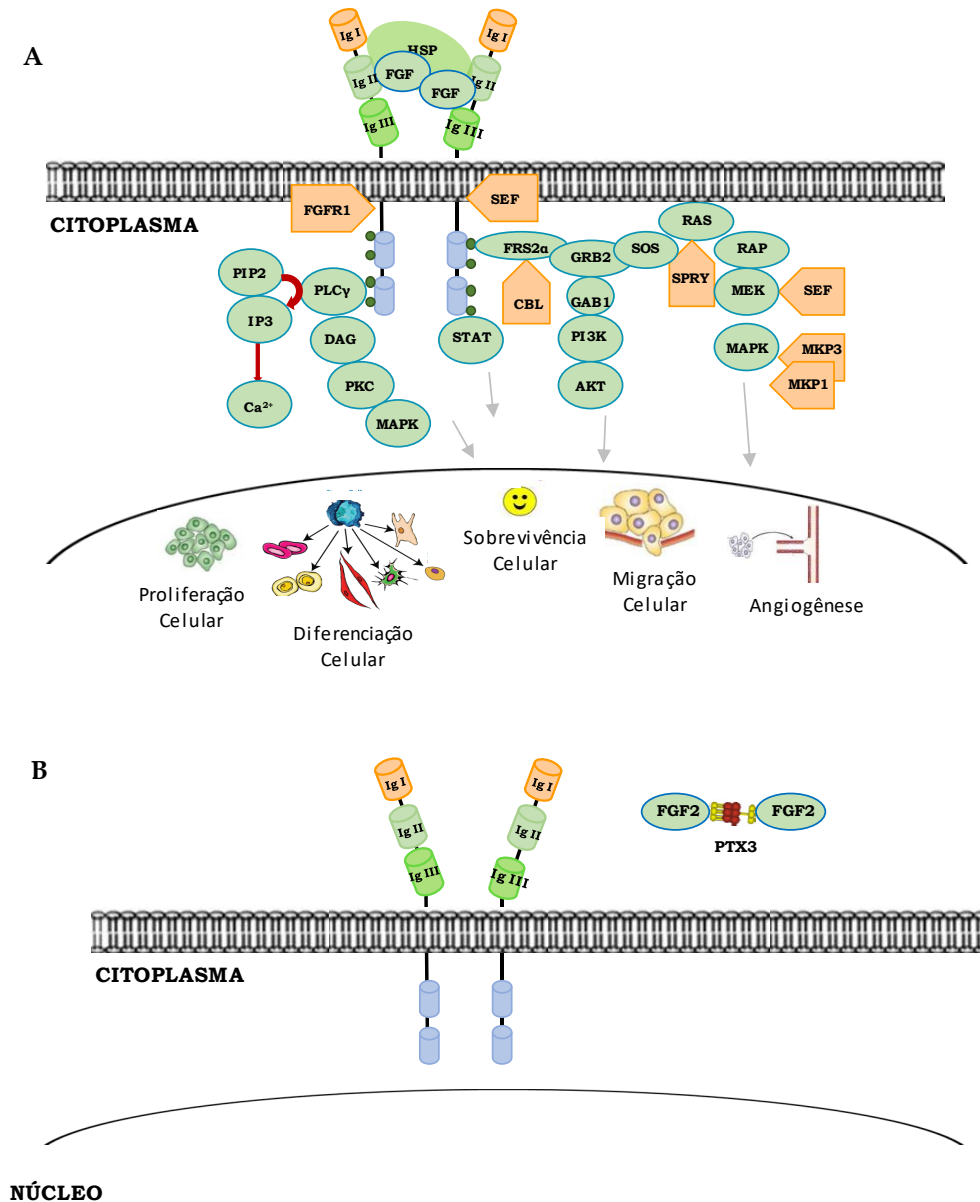


Figura 7 - Efeito de PTX3 sobre a via de sinalização de FGF.

A) O complexo composto por duas moléculas de FGF e uma de HSPG se liga ao FGFR, promovendo a ativação dos receptores e sua transfosforilação que desencadeia a ativação de vias de sinalização que culminam na ligação de genes que induzem a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular e, também a angiogênese; B) Quando PTX3 está presente no meio, ela se liga a duas moléculas de FGF nos sítios de interação com o receptor, dessa forma, a ligação de FGF ao seu receptor fica impedida, bem como a ativação das vias de sinalização. Assim, os efeitos biológicos induzidos por FGF2, são inibidos na presença de PTX3.

Ainda através da interação PTX3/FGF, PTX3 foi capaz de diminuir a proliferação de células tumorais de melanoma e próstata *in vitro*, bem como o volume e o tempo de aparecimento desses tumores *in vivo* (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). O efeito inibitório de PTX3 sobre a proliferação e migração celular, capacidade de formar colônias que crescem independentemente da ancoragem, angiogênese e crescimento tumoral em modelo murino dependentes de FGF2 foi observado em melanomas, onde também foi mostrado que PTX3 inibiu a transição do epitélio-mesenquima, requerida para o processo de metástase (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Ensaios com animais transgênicos superexpressando PTX3 sobre o controle do promotor Tie/2 evidenciaram uma redução da progressão neoplásica mediada por FGF2 (Ronca *et al.*, 2015). Em mieloma múltiplos e câncer de pulmão a angiogênese mediada por FGF2 também foi inibida (Basile *et al.*, 2013), em modelo murino, efeito acompanhado pela inibição crescimento tumoral (Ronca *et al.*, 2015).

Em modelos de cânceres dependentes de hormônios e de FGF8, como o câncer de próstata e de mama, também foram observados os efeitos inibitórios de PTX3 sobre a proliferação, a angiogênese e o crescimento tumoral (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca *et al.*, 2015) (Margheri *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2011). Diante desses achados, PTX3 se destaca como um importante antagonista dos membros da família de FGF, principalmente FGF2 e FGF8, e como uma possível ferramenta para a terapêutica de tumores dependentes de FGF.

1.6 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Segundo a WHO, o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo (World Health Organization, 2018). Diante desse dado alarmante, torna-se cada vez mais relevante e necessário o desenvolvimento de terapias que contribuam para conter a progressão dessa patologia. O conhecimento da biologia dos tumores ajuda a entender melhor o processo canceroso e contribui para o desenvolvimento de estratégias para o seu diagnóstico, prognóstico e tratamento (Hanahan e Weinberg, 2011).

Os fibrossarcomas são sarcomas de tecido mole, originados de fibroblastos, malignos, com produção de colágeno variada e alta atividade mitótica (Santos *et al.*, 2008; Greaves *et al.*, 2013). Por ser um tipo tumoral raro, os fibrossarcomas apresentam difícil diagnóstico, sendo a patologia, geralmente, identificada em estágio avançado, o que ocasiona baixas taxas de sobrevida (Nakanishi *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008). O tratamento abrange a completa excisão cirúrgica (Nakanishi *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2006) e o prognóstico depende do tamanho e local do tumor, grau histológico e a presença de metástases.

PTX3 tem sido apontada como uma importante molécula no desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (Giacomini *et al.*, 2018). Em alguns tumores, PTX3 apresenta um papel antitumoral, enquanto, em outros desempenha uma função pró-tumoral. Essa dualidade de papéis atribuídos à PTX3 parece ser dependente do tipo de câncer, da fonte celular que origina o tumor e do microambiente tumoral (Magrini *et al.*, 2016; Garlanda *et al.*, 2018; Giacomini *et al.*, 2018). O papel de PTX3 no desenvolvimento de câncer de mama, pulmão, próstata, lipossarcoma, melanoanoma, entre outros, já foi reportada na literatura (Magrini *et al.*, 2016; Garlanda *et al.*, 2018; Giacomini *et al.*, 2018). Entretanto nada era sabido sobre a ação biológica de PTX3 em fibrossarcomas.

Diante disso, esse estudo visou entender o efeito de PTX3 sobre o desenvolvimento dos fibrossarcomas. O melhor entendimento da função biológica de PTX3 na progressão desse tipo tumoral, além de contribuir para a caracterização da proteína no processo canceroso, pode indicar um potencial uso de PTX3 tanto como uma ferramenta terapêutica quanto como para auxiliar no diagnóstico e/ou prognóstico dos fibrossarcomas.

1.7 HIPÓTESE DE TRABALHO

A proteína PTX3 exerce uma ação biológica sobre as células de fibrosarcoma regulando aspectos importantes para a tumorigênese como a taxa de proliferação celular, migração, crescimento independente de ancoragem e angiogênese e esses efeitos são dependentes, pelo menos, em parte, da interação entre PTX3 e FGF2.

2 – OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito biológico da proteína Pentraxina 3 sobre fibrossarcomas murinos e humano.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Analisar alterações na taxa de proliferação celular, na capacidade migratória e no crescimento independente da ancoragem das células MC-TGS17-51 (MC17-51) e Sal/N de fibrossarcoma murino e do fibroblasto murino não-tumorigênico NIH/3T3 em resposta ao tratamento com a proteína Ptx3 recombinante murina (rmPtx3);

2.2.2 Averiguar alterações no perfil de expressão dos genes Ptx3, Fgf2, Fgfr 1-4 e Fgfbp, da via de sinalização de FGF, do gene pró-angiogênico Vegf e dos genes pro-inflamatórios Il1b e Tnfa nas células de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N em resposta ao tratamento com rmPtx3;

2.2.3 Gerar linhagens de fibrossarcoma murino (MC17-51 e Sal/N) e humano (HT-1080) com expressão aumentada de PTX3;

2.2.4 Examinar alterações promovidas pela expressão aumentada de PTX3 sobre a taxa de proliferação celular, formação de colônias, crescimento independente da ancoragem e migração celular nas células de fibrossarcoma murinas, MC17-51 e Sal/N, e humana, HT-1080;

2.2.5 Avaliar o efeito da expressão aumentada de PTX3 sobre a via de sinalização de FGF nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e HT-1080;

2.2.6 Induzir tumores experimentais em modelo murino utilizando as linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e HT-1080 com expressão aumentada de PTX3.

2.2.7 Analisar o efeito da expressão aumentada de PTX3 sobre o volume e peso dos tumores de fibrossarcoma gerados.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As células de fibrossarcoma murinas e humana e do fibroblasto murino foram avaliadas quanto a contaminação por micoplasma. As culturas de células foram tratadas com a proteína Pentraxina 3 recombinante murina e o efeito do tratamento sobre a proliferação, a migração celular e crescimento independente da ancoragem foram avaliados, bem como, a expressão de genes pró-inflamatórios, pró-angiogênicos e de membros da via de FGF. Paralelamente, as células de fibrossarcoma foram transfectadas com o vetor de expressão pBABE/Puro contendo o cDNA humano completo de PTX3 ou somente com o vetor vazio. A proliferação e migração celular, o crescimento independente da ancoragem e o potencial clonogênico das células transfectadas foram avaliados, bem como a expressão proteica de membros da via de sinalização de FGF. As linhagens transfectadas também foram utilizadas para induzir experimentalmente tumores em camundongos em ensaios *in vivo* (Figura 8).

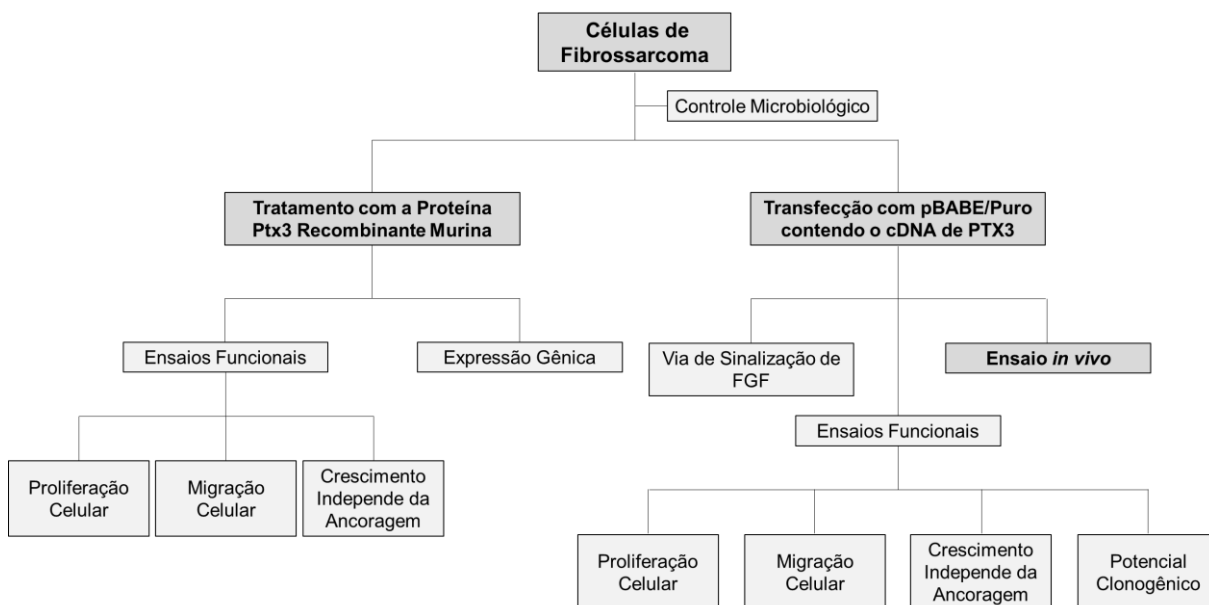


Figura 8 - Desenho experimental para avaliar o efeito biológico da proteína Pentraxina 3 sobre fibrossarcomas.

As células de fibrossarcoma e fibroblasto foram cultivadas e avaliadas quanto a contaminação por micoplasma. As culturas de células foram tratadas com a proteína Pentraxina 3 recombinante murina e o efeito do tratamento sobre a proliferação e migração celular e crescimento independente da ancoragem foram avaliados, assim como, a expressão gênica. Em paralelo, as células de fibrossarcoma foram transfectadas com o vetor pBABE/Puro contendo o cDNA humano completo de PTX3 ou somente com o vetor vazio. A proliferação e migração celular, o crescimento independente da ancoragem e o potencial clonogênico das células transfectadas foi avaliado, bem como a expressão proteica de membros da via de sinalização de FGF. As linhagens transfectadas também foram utilizadas para induzir experimentalmente tumores em camundongos em ensaios *in vivo*.

3. 2 LINHAGENS CELULARES

3.2.1 Cultura de Células

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens tumorais MC-TGS17-51 (MC17-51) e Sal/N, derivadas de fibrossarcoma murino, a linhagem imortalizada de fibroblasto murino NIH/3T3 e HT-1080 de fibrossarcoma humano. Todas as linhagens são provenientes do banco de células do Laboratório de Genética Experimental (LGEX), do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As linhagens foram adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC), como os seguintes números de catálogo: CRL-2799 (MC17-51), CRL-2544 (Sal/N), CRL-1658 (NIH/3T3) e CCL-121 (HT-1080). Foram seguidos os protocolos sugeridos pela ATCC para crescimento e subcultivo das linhagens. Para o subcultivo, o meio foi aspirado e a monocamada celular lavada 1 x com solução de tampão de fosfato salino 1x (PBS), seguido pelo desprendimento celular por solução de tripsina (0,25% de p/v de tripsina; 0,53 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA; Gibco). As células foram então coletadas e transferidas para nova placa ou garrafa de cultivo celular.

As linhagens MC17-51, NIH/3T3 e HT-1080 foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) e a linhagem Sal/N em meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (Gibco), posteriormente, substituído por DMEM. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de uma solução estabilizada de 10.000 U de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich) (meio completo). As células foram crescidas em estufa a 37 °C e com condições atmosféricas de 5% de dióxido de carbono (CO₂). A fim de tentar minimizar alterações genéticas durante os experimentos e possibilitar que todos os experimentos fossem realizados com as células na mesma passagem, foi feito um estoque de alíquotas de células criopreservadas em 40% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) em meio completo.

3.2.2 Detecção de Contaminação por Micoplasma

3.2.2.1 Extração de DNA

O gênero *Mycoplasma* é composto por bactérias que apresentam pequeno tamanho (0,3-0,8 µm) e ausência de parede celular. Embora sejam de difícil detecção, os micoplasmas são uma das principais fontes de contaminação de cultura de células, onde podem ocasionar alterações na morfologia celular, na taxa de proliferação e na estabilidade genética das células e, dessa forma, comprometer a confiabilidade dos resultados (Young *et al.*, 2010).

Portanto, é imprescindível o teste de contaminação de qualquer linhagem de células por micoplasma antes do início e durante qualquer trabalho com as mesmas. Para verificar a contaminação das linhagens celulares de fibrossarcoma e fibroblasto murino por micoplasma, foi empregado um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) duplex desenvolvido no LGEX, que amplifica simultaneamente o gene do ácido ribonucleico ribossomal 16 S (rRNA) de *Mycoplasma sp.* e o gene constitutivo que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) usado como controle interno da reação.

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Peter W. Laird (Laird *et al.*, 1991). Brevemente, a um pellet de células (variando entre 1 e 2 milhões de células) foi acrescentado 0,5 ml de tampão de lise (100 mM Tris.HCl pH 8.5; 5,0 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl; e 100 µg/ml de Proteinase K) e foi feita uma incubação *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, foi adicionado 0,5 ml de isopropanol, após a homogeneização do tubo por inversão até a formação do novelo de DNA, foi feita uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 8.600 g para precipitação do DNA, que foi lavado 1 X com etanol 70% e centrifugado novamente. Após o descarte do sobrenadante e completa evaporação do etanol, ao DNA foram acrescentados 20-40 µL de água Milli-Q autoclavada, o tubo foi incubado a 55 °C por 30-60 minutos, o DNA foi solubilizado e quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.2.2.2 PCR Duplex para *Mycoplasma*

Após a extração do DNA este foi utilizado como molde em reações de PCR duplex para detecção de micoplasma. Para detecção do rRNA 16S do gênero *Mycoplasma* foi utilizado o par de iniciadores descritos por Young e colaboradores em 2010: GPO-3: 5'-GGG.AGC.AAA.CAG.GAT.TTA.ATA.CCC.T-3' e MGSO: 5'-TGC.ACC.ATC.TGT.CAC.TCT.GTT.AAC.CTC-3' (Young *et al.*, 2010), que amplificam um fragmento de 270 pares de bases (pb). Como controle positivo da presença e integridade do DNA genômico, foram utilizados iniciadores específicos para o gene constitutivo *GAPDH*: *Forward* (Fw): 5'-CTC.TCT.GCT.CCT.CCT.GTT.C-3' e *Reverse* (Rv): 5'-GAT.GAT.GAC.CCT.TTT.GGC.TC-3' (437 pb). Em cada reação de PCR foram utilizados: Tampão de PCR 1X (Gibco); 1,5 mM de MgCl₂ (Promega); 0,25 mM de mix de dNTP (Promega); 2,5% de DMSO (Sigma-Aldrich); 2,0 µM cada iniciador: MGSO e GPO-3, para micoplasma, e *forward* e *reverse* para GAPDH; 0,05 U da enzima Taq polimerase (Gibco); água ultra pura q.s.p. (quantidade suficiente para) 24 µl; e 1 µl contendo 400 ng de DNA como molde. Os parâmetros do termociclador (Applied Biosystems) foram: 94 ° C por 30 segundos (1 ciclo); 94 ° C por 30 segundos, 56 ° C por 1 minuto , 60 ° C por 45 segundos, 72 ° C por 1 minuto (40 ciclos); 72 ° C por 7 minutos (1 ciclo). Os produtos da PCR foram

fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e visualizados sobre luz ultravioleta (UV).

3.3 PROTEÍNA RECOMBINANTE

A proteína PTX3 murina (rmPtx3) foi gentilmente cedida pela Dra. Cecilia Garlanda do *Istituto Clinico Humanitas* (Milão, Itália). A proteína foi produzida conforme descrito por Garlanda *et al.*, 2002. Brevemente, PTX3 foi expressa em células CHO (*chinese hamster ovary*) e purificada em condições livres de endotoxinas por imunoafinidade. A pureza da proteína foi checada por SDS-PAGE e a contaminação por LPS foi avaliada pelo ensaio LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) (<124 pg LPS/mg de proteína) e pela ausência de estimulação de IL6 em monócitos (Garlanda *et al.*, 2002; Bozza *et al.*, 2014).

3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEÍNA PTX3 RECOMBINANTE

A proteína rmPtx3 foi testada quanto à sua capacidade biológica de estimular a fagocitose de partículas de Zymosan (Zy) por macrófagos, utilizando o protocolo adaptado de Diniz e colaboradores (Diniz *et al.*, 2004). Esse ensaio foi feito em colaboração com a Dra. Marliete Carvalho da Costa e do Dr. Daniel de Assis Santos, do Departamento de Microbiologia da UFMG.

Para esse ensaio, células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos machos da linhagem C57BL/6 de 7 semanas de vida. Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) diluídas em PBS 1X e eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures e tíbias foram cuidadosamente extraídos. Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo nº. 40/2015, relativo ao projeto intitulado “Influência do gênero na progressão da infecção por *Cryptococcus gattii*”).

Para a diferenciação de macrófagos, as células extraídas do fêmur e da tíbia foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 20% SFB (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica (Sigma-Aldrich) e também com 30% de sobrenadante da cultura de células do fibroblasto murino da linhagem L-929. O sobrenadante de células L-929 contém quantidades significativas do Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF), que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras de macrófagos. A suspensão de células foi, então, colocada em placas de Petri e incubada a 37°C em estufa com atmosfera saturada de 5% de CO₂ por 7 dias, sendo o meio renovado a cada

dois dias. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células na placa lavada com 5 mL de PBS 1x esterilizado para eliminação das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 3 mL de PBS/EDTA 10 mM à cultura na placa, seguida pela incubação no gelo por 10 minutos. As células aderidas à placa, já diferenciadas como macrófagos, foram ressuspensas e $1,0 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas em placa de 24 poços (área de $1,9 \text{ cm}^2$), cujo fundo estava coberto por lamínulas esterilizadas. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e também com 30% de sobrenadante de cultura de células L-929. Após 16 horas (h) de incubação, o meio foi substituído por novo meio contendo a rmPt3 (20 $\mu\text{g/ml}$) ou não (grupo controle) e partículas de Zy (Sigma-Aldrich) foram acrescentadas à cultura, na proporção de 5 partículas de Zy para cada célula plaqueada. As placas foram incubadas por 2 h a 4°C para que ocorresse a fagocitose e por 20 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as lamínulas foram retiradas e coradas com o corante hematológico panótico rápido (Laborclin), conforme sugerido pelo fabricante (cerca de 10 segundos mergulhadas em cada solução), e montadas sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica de contraste de fase (Olympus BX41) no aumento de 400 x. Foram contadas um total de 1.000 células em campos aleatórios sem sobreposição e foram anotados o número de células que apresentaram partículas de Zy internalizadas.

3.5 TRANSFEÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES COM PTX3

3.5.1 Plasmídeo pBABE/Puro

O plasmídeo pBABE/Puro é um vetor retroviral de 5.169 pb comumente utilizado para expressão em células de mamíferos (Morgenstern e Land, 1990). O vetor contém múltiplos sítios de clonagem e apresenta gene de resistência bacteriano a ampicilina e, para seleção de transfecção em células de mamíferos, gene de resistência a puomicina (Figura 9).

O plasmídeo pBABE/Puro transfectado com PTX3 foi construído pela clonagem do DNA complementar (cDNA) completo de PTX3 (número de acesso no *GenBank* X63613, 1.837 pb) no sítio de Bam HI do vetor (Rusnati *et al.*, 2004), gerando um vetor com aproximadamente 7.000 pb, aqui chamado de pBABE/PTX3. Como controle experimental, foi utilizado o vetor vazio pBABE/Puro, nomeado de pBABE/Mock.

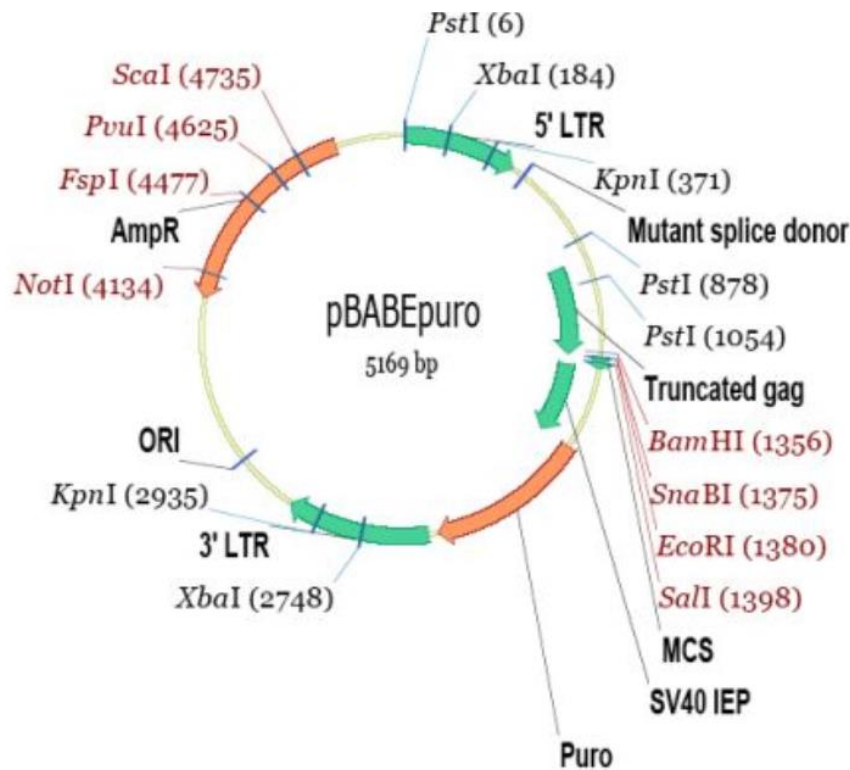


Figura 9 – Representação do vetor retroviral pBABE/Puro.

O plasmídeo pBABE/Puro é derivado do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV) e apresenta 5.169 pb. O vetor contém a origem bacteriana de replicação, o gene de resistência à ampicilina e o gene de resistência à puromicina para o crescimento e seleção de linhagens celulares estáveis de mamíferos e múltiplos sítios de clonagem.

Fonte: Site Addgene.

3.5.2 Eluição dos Plasmídeos pBABE

Os vetores pBABE/PTX3 e pBABE/Mock foram gentilmente doados pelo Dr. Roberto Ronca da *Università degli Studi di Brescia* (Unibs), em Brescia na Itália. Eles foram recebidos secos em papel filtro dentro de uma área demarcada e eluídos para sua recuperação. Brevemente, as áreas demarcadas do papel de filtro contendo o DNA foram cuidadosamente recortadas e, com auxílio de uma pinça autoclavada, colocadas sobre uma placa de Petri esterilizada. Vagarosamente, foram pingados sobre cada papel 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 0,1 mM EDTA) e as placas foram incubadas tampadas por 2 minutos à temperatura ambiente para permitir a absorção do líquido pelo papel. Com o auxílio de uma pinça, os papéis foram dobrados no formato de um filtro de café e colocados dentro de um microtubo novo de 0,6 ml com um furo na parte inferior, de forma a permitir a passagem de líquidos (feito com agulha de 18 ou 19 G). Esses tubos foram, por sua vez, colocados dentro de outro microtubo de 1,5 ml novo e centrifugados por 1 minuto a 14.000 rotação por minuto (RPM). Os plasmídeos em solução foram coletados em tampão TE no microtubo de 1,5 ml e armazenados a -20 °C.

3.5.3 Confirmação de PTX3 na Construção pBABE/PTX3

Para confirmar a expressão de PTX3 no plasmídeo pBABE/PTX3 e a ausência em pBABE/Mock, foram realizadas reações de PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação de PTX3: Fw: 5'-ACT.CGG.AAT.GGG.ACA.AGC-3' e Rv: 5'-AGG.CAC.TAA.AAG.ACT.CAA.GCC-3' (471 pb). Como reagentes da reação de PCR foram utilizados: Tampão de PCR 1X (Gibco); 2,5 mM de MgCl₂ (Promega); 0,4 mM de mix de dNTP (Sigma-Aldrich); 1,0 % de DMSO (Sigma); 0,4 pmol de cada iniciador; 0,025 U da enzima Taq polimerase (Gibco); água ultra pura q.s.p. 24 µl; e 1 µl contendo 100 pg do DNA plasmidial (pDNA). Os parâmetros da ciclagem foram:

95 ° C por 5 minutos – 1 x	} 35 x
95 ° C por 30 segundos	
51 ° C por 45 segundos	
72 ° C por 60 segundos	
72 ° C por 10 minutos – 1 x	

Os produtos da PCR foram fracionados eletroforicamente em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e visualizados sob luz UV.

Além da PCR, a presença de PTX3 nas construções foi avaliada por sequenciamento das áreas correspondentes ao local de clonagem de PTX3 pelo método de Sanger, em colaboração com o Dr. Alex Fiorini de Carvalho, do Laboratório Aquacen, da Escola de Veterinária da UFMG. Foram utilizados os iniciadores específicos Fw: 5'-CTT.TAT.CCA.GCC.CTC.AC-3' e Rv: 5'-ACC.CTA.ACT.GAC.ACA.CAT.TCC-3' (Addgene). O alinhamento dos fragmentos plasmidiais sequenciados foi feito utilizando o *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 7.0.9.

3.5.4 Transformação Bacteriana

Os plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3 foram utilizados para transformar bactérias a fim de expandir o número de cópias do plasmídeo e possibilitar a obtenção de quantidade suficiente de pDNA para a transfecção das linhagens celulares. Para transformação, foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific) quimiocompetentes, gentilmente doadas pelo M.Sc. Fillipe Luiz Rosa do Carmo e pelo Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, do Departamento de Biologia Geral da UFMG.

A transformação bacteriana com pBABE_PTXX3 ou pBABE_Mock foi realizada segundo o protocolo de choque térmico descrito no livro *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Sambrock e Russell, 2001). Brevemente, as células bacterianas foram descongeladas no gelo por 15 minutos, em seguida, 200 µl da suspensão foram pipetadas em tubos de micocentrífuga de 1,5 ml esterilizados aos quais foram acrescentados 100 pg de

pBABE/Mock ou pBABE/PTX3. Os tubos foram incubados no gelo por 15 minutos, 1 minuto a 42 °C no termobloco e mais 10 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado 1 ml de caldo Luria Bertani (LB) sem antibióticos e os tubos foram incubados a 37 °C por 90 minutos sob agitação de 400 rotações por minuto (RPM), para permitir a recuperação das bactérias e a expressão do marcador de resistência à ampicilina. Após a incubação, foram plaqueados 100, 200 ou 500 µl da suspensão de células em meio LB-agar contendo ampicilina (100 µg/ml). As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C na estufa. Como controle negativo, foi incubada uma placa com meio contendo ampicilina sem nenhum inóculo e como controle positivo, foram plaqueadas bactérias *E. Coli* TOP10 não-transformadas em meio LB-agar sem penicilina.

Após a incubação das placas na estufa e aparecimento das colônias resistentes a ampicilina, as mesmas foram coletadas com o auxílio de uma alça de coleta microbiológica esterilizada e transferidas para um microtubo de 1,5 ml contendo 1 ml de caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubadas por 2 h a 37 °C sob agitação. A fim de garantir a seleção dos clones de pBABE/PTX3 que expressavam PTX3 e clones pBABE/Mock que não expressavam, uma alíquota de 5 µl desse pré-inóculo foi diluída em 15 µl de água estéril e usado como molde em reações de PCR para PTX3, conforme descrito no item 3.4.2. Também desse pré-inóculo, uma alíquota de 95 µl foi utilizada para inocular 4 ml de meio LB caldo contendo 100 µg/ml de ampicilina (controle negativo: meio sem inóculo de células) e incubada por 16 horas a 37 °C e sob agitação vigorosa. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 1:1 em glicerol 80% e armazenadas a -80 °C.

3.5.5 Extração de DNA Plasmidial em Média Escala (Midi-Prep)

Um clone de pBABE/Mock e um de pBABE/PTX3 foram selecionados aleatoriamente e utilizados para aumentar o número de cópias do plasmídeo por meio de uma reação de midi-prep (Sambrook e Russell, 2001). Os clones foram descongelados no gelo e uma alíquota de 100 µl foi utilizada para inocular 10 ml de caldo LB (tubo cônico de 15 ml) contendo 100 µg/ml de ampicilina. Os inóculos foram incubados a 37 °C *overnight* sob agitação vigorosa e no dia seguinte, foram centrifugados a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C, para precipitar as bactérias. O sobrenadante foi completamente descartado para que o pellet bacteriano ficasse o mais seco possível, seguido pela adição de 200 µl da solução alcalina de lise I estéril (50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; e 10 mM EDTA pH 8,0). A suspensão de células foi agitada em vórtex vigorosamente por 30 segundos e transferida para um novo microtubo de 1,5 ml estéril. Em seguida, adicionou-se 400 µl de solução alcalina de lise II (0,2 N de NaOH; e 1% p/v de SDS). Os microtubos foram homogeneizados e mantidos no gelo para adição de 300 µl da solução alcalina de lise III (5 M de acetato de

potássio). Eles, foram, então, homogeneizada por inversão várias vezes e depois mantidos por 3 a 5 minutos no gelo e centrifugados a 16.000 g, por 5 minutos à 4 °C. Uma alíquota de 600 µl do sobrenadante de cada tubo foi coletado e transferido para um novo microtubo estéril de 1,5 ml, seguido pela adição de 600 µl de uma solução de 1:1 de fenol:clorofórmio e a mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi cuidadosamente coletada e transferida para um novo microtubo estéril de 1,5 ml, ao qual foram adicionados 600 µl de isopropanol, seguida por uma breve agitação no vórtex e incubação a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado 1 x com 1 ml de etanol 70% e, após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Após a completa evaporação do etanol, o precipitado foi ressuscitado em 100 µl de tampão TE contendo 20 µg/ml de RNase A. O pDNA foi quantificado por espectrofotometria no aparelho de NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -20 °C.

Para confirmar a expressão de PTX3 no produto da midi-prep, foi realizada uma nova reação de PCR conforme descrito no item 3.4.2. Além disso, foi feita uma digestão enzimática de pBABE/PTX3 e pBABE/Mock utilizando a enzima de restrição EcoRI (*E.coli* RY 13, Promega). Essa endonuclease de restrição cliva o plasmídeo pBABE/Puro no sítio G⁺AATTC, dessa forma, o vetor pBABE/Mock fica linearizado e, após o fracionamento eletroforético, é possível visualizar uma banda de aproximadamente 5.000 pb, enquanto pBABE/PTX3, por ter três sítios de corte para EcoRI, gera três bandas de 5.000, 900 e 600 pb, aproximadamente.

O protocolo de digestão foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, em tubos de 0,6 ml foram adicionados tampão 1X, 2 µg/µl de albumina do soro bovino (BSA) acetilada, 1 µl de DNA plasmidial e água q.s.p. 19 µl. A solução foi gentilmente homogeneizada por pipetagem e, em seguida, foram adicionadas 5 U da enzima EcoRI. A reação foi novamente homogeneizada por pipetagem e incubada por 2,5 h a 37 °C. Após a incubação, 10 µl da reação enzimática foi fracionada eletroforeticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. Em paralelo, no mesmo gel foram aplicados 300 ng de cada plasmídeo não digerido.

3.5.6 Transfecção das Linhagens Celulares

As células WT de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N, fibrossarcoma humano HT-1080 e do fibroblasto murino NIH/3T3 foram transfectadas com o vetor pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock e selecionadas pelo cultivo em presença do antibiótico puromicina (Qiagen). A puromicina é um antibiótico derivado da bactéria *Streptomyces alboniger* que inibe a síntese proteica procaríota e eucariota por interromper a transferência de peptídeos nos ribossomos

causando a interrupção prematura da cadeia de polipeptídeos durante a tradução (Nathans, 1964b; a).

Para escolher a dose mínima necessária para seleção das células transfectadas com pBABE, foi feita uma curva de morte com puromicina. As células de cada linhagem (6×10^3) foram plaqueadas em meio completo e expostas a diferentes concentrações de puromicina: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; ou 4,0 $\mu\text{g/ml}$. A cada 24 h de exposição ao antibiótico, as culturas foram observadas sob microscopia óptica de contraste de fase (Motic 3.0MP). A concentração considerada ideal foi a menor dose capaz de matar quase completamente as células após 48 h de tratamento e completamente em 72 h.

As linhagens HT-1080 e NIH/3T3 foram transfectadas em colaboração com o Dr. Leonardo Camilo de Oliveira, do Departamento de Microbiologia da UFMG, utilizando o reagente de transfecção *Effectene* (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, em placas de 6 poços para cultura celular, foram plaqueadas 1×10^5 células em 1 ml de meio completo e as placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada de 5% de CO₂. No dia seguinte, em um tubo de 1,5 ml esterilizado, foi feita uma diluição de 0,4 μg de pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock no tampão do kit em um volume final de 60 μl . O tubo foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foram adicionados 5 μl do reagente de transfecção. Em seguida, a solução foi homogeneizada por pipetagem e os tubos incubados por 10 minutos a temperatura ambiente para formação do complexo de transfecção e, após a incubação, foram adicionados 350 μl de meio completo ao tubo. Enquanto ocorria a formação do complexo, o meio das placas foi aspirado e substituído por 1 ml de meio novo, em seguida, em duplicata, foi pipetado vagarosamente gota a gota todo o volume do complexo de transfecção presente no tubo. Nos poços contendo as células controle, foi pipetado somente meio completo. As placas foram incubadas na estufa e, após 48 h, o meio das placas foi aspirado e substituído por 1 ml de meio completo contendo puromicina na concentração específica de cada linhagem. As culturas foram mantidas em meio seletivo até o aparecimento dos clones, seguida pela expansão e congelamento dos mesmos, sempre em meio seletivo, gerando um pool de clones que foram usados nos ensaios funcionais.

As células das linhagens MC17-51 e Sal/N foram transfectadas utilizando o reagente de transfecção FuGENE (Promega) no Departamento de Medicina Molecular e Translacional da *Università degli Studi di Brescia*, onde também foram conduzidos todos os ensaios com as linhagens transfectadas. Em 3 poços de uma placa de cultura celular de 6 poços, foram semeadas 1×10^5 células por poço em 2 ml de meio completo e as culturas foram incubadas *overnight* na estufa a 37 °C e atmosfera com 5% de saturação de CO₂. No dia seguinte, o

meio foi aspirado e substituído por 1 ml de meio completo uma hora antes do início da transfecção e as placas foram novamente incubadas na estufa. Em um tudo de 1,5 ml esterilizado foi preparado 100 µl de meio, 3 µg de plasmídeo pBABE/Mock ou pBABE/PTX3 e 10 µl do reagente FuGENE. O tubo foi brevemente agitado no aparelho de vórtex e, em seguida, incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, a solução foi cuidadosamente pipetada gota a gota sobre a monocamada celular do poço correspondente e no terceiro poço, o poço controle, foi adicionado somente meio. A placa foi incubada na estufa e após 24 h, o meio foi aspirado e substituído por novo meio completo e a placa novamente incubada por mais 24 h na estufa. Após as 48 h do início da transfecção, o meio foi aspirado e substituído por meio completo contendo puromicina na concentração específica de cada linhagem e as placas foram novamente incubadas na estufa. Após o aparecimento de clones (aproximadamente 48 h), o meio foi aspirado para retirada das células não-transfectadas mortas e substituído por meio completo. Mantendo sempre a pressão seletiva da puromicina, as culturas com os clones foram expandidas, gerando um *pool* de clones usado nos experimentos subsequentes.

3.5.7 Análise da Produção de PTX3 nas Células Transfectadas por *Western Blotting*

3.5.7.1 Extração de Proteínas

As proteínas totais das linhagens WT de MC17-51, Sal/N, HT-1080 e NIH/3T3 ou transfectadas com pBABE/PTX3 (MC17-51_PTX3, Sal/N_PTX3, HT-1080_PTX3 ou NIH/3T3_PTX3) ou com pBABE/Mock (MC17-51_Mock, Sal/N_Mock, HT-1080_Mock ou NIH/3T3_Mock) foram extraídas utilizando o tampão de lise NP-40 (1% de Nonidet P-40; 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 137 mM de NaCl; 10 % de glicerol; 2 mM de EDTA; 1 mM de orvanadato de sódio; 10 µg/ml de Aprotinina; e 10 µg/ml de Leupeptina). Brevemente, as células transfectadas foram plaqueadas em placas de Petri de 100 x 20 mm para cultura celular e crescidas até apresentarem confluência entre 70 e 95%. Atiginda a confluência, o meio foi aspirado, as células desprendidas utilizando solução de tripsina e coletadas em 1 ml de PBS 1x gelado em um tubo cônico de 15 ml. Os tubos foram centrifugados a 1.500 RPM por 5 minutos (Heal Force). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido em 1 ml de PBS 1x gelado e transferido para tubos de 1,5 ml, que foram centrifugados a 2.000 RPM por 5 minutos (Z 216 M, Hermle). Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µl de tampão de lise NP-40. Os tubos foram incubados a – 20 °C por 1 hora ou *overnight* e, em seguida, foram mantidos no gelo até o descongelamento e centrifugados a 13.000 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado em um novo tubo de 1,5 ml e armazenado a – 20 °C.

3.5.7.2 Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo ensaio de Bradford, que se baseia na adsorção do reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bradford, 1976). O reagente de Bradford apresenta uma coloração castanha avermelhada e, na presença de proteínas, muda para uma coloração azulada, de forma que, quanto maior a quantidade de proteína presente na amostra, maior a intensidade da coloração azul que é medida por espectrofotometria. Para esse ensaio foi feita uma curva padrão de três pontos utilizando a proteína BSA nas concentrações de 2,5; 5,0; e 10,0 µg/ml em um volume final de 500 µl de Solução de Bradford (Bio-Rad). Para quantificar as proteínas extraídas das linhagens transfectadas e das linhagens WT, foi preparada uma solução de 499 µl da Solução de Bradford acrescida de 1 µl da amostra. Em uma placa de 96 poços para leitura de ensaios proteicos, foram pipetados em duplicata 200 µl de cada ponto da curva e das amostras a serem quantificadas e foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em aparelho de espectrofotometria (ELX 800, Bio Tek Instruments). Como branco foram utilizados 200 µl da Solução de Bradford.

3.5.7.3 Western Blotting

Uma quantidade de 35 ou 50 µg de proteína foi preparada em um volume final de 30 µl e incubada a 95 °C por 5 minutos, seguido pelo fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida/SDS 10% a 100 V por 1,5 horas. Após a corrida, as proteínas foram eletricamente transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Millipore) a uma corrente de 350 A por 1,5 horas. Em seguida, a fim de evitar ligações inespecíficas, a membrana foi bloqueada com o tampão de bloqueio (TB) contendo BSA e posteriormente incubada *overnight* a 4 °C sob agitação com o anticorpo primário policlonal anti-PTX3 (*rabbit*) diluído 1:1000. O anticorpo policlonal anti-PTX3 foi gentilmente cedido pela Dra. Barbara Bottazzi, do *Istituto Clinico Humanitas*. Esse anticorpo foi preparado pela imunização de coelhos com a proteína PTX3 recombinante humana (Deban *et al.*, 2010). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 x com solução de TBS-Tween (10 minutos cada lavagem) e incubada a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora com o anticorpo secundário mouse anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, diluído 1:5000). Decorrida a incubação, a membrana foi lavada novamente 2 x com TBS-Tween e 1 x com TBS. Para detecção das proteínas, foi utilizado o kit *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) e a quimioluminescência foi lida no equipamento *ChemiDoc Touch Systems* (Bio-Rad). Como normalizador da quantidade de proteína das amostras foi utilizado o anticorpo contra a proteína de expressão constitutiva α-Tubulina (*anti-mouse*, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:1000 e o anticorpo secundário anti-mouse m-IgGλ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:5000.

3.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.6.1 Tratamento com a Proteína Ptx3 Recombinante Murina

Alterações na taxa de proliferação celular das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e do fibroblasto NIH/3T3 após o tratamento com rmPtx3 foram analisadas pelo ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Este ensaio mede a habilidade da desidrogenase mitocondrial em clivar os anéis tetrazólio do corante MTT, resultando na formação de cristais formazan de coloração púrpura. Estes cristais são impermeáveis à membrana plasmática e, desta forma, se acumulam apenas no interior de células viáveis. Utiliza-se, então, uma solução solubilizante para dissolver os cristais gerando uma solução de coloração azulada, cuja absorbância pode ser mensurada por espectrofotômetro. Dessa forma, quanto maior o número de células viáveis, maior a intensidade da coloração produzida.

Para realização desse ensaio, 1×10^4 células viáveis (contadas com Azul de Tripán) das linhagens de fibrossarcoma ou de fibroblasto murino foram plaqueadas em triplicata em uma área de 0,3 cm² (placa de 96 poços) em meio completo. Entre 18 e 24 horas após o plaqueamento, o meio foi aspirado e substituído por novo meio contendo SFB 0,5% e as células foram incubadas por 16 h, para sincronização do ciclo celular. Em seguida, foi realizado o tratamento com a rmPtx3 (5 µg/ml) em meio contendo baixa (2%) ou alta (10%) concentração de SFB por 0, 24, 48 ou 72 h. Nos poços controle, as células não foram tratadas com a proteína recombinante. A dose de rmPtx3 utilizada foi baseada nos dados de Nunes que mostraram que esta dose foi suficiente para promover alterações significativas na taxa de proliferação celular da linhagem de melanoma humano SK-MEL-37 (Nunes, 2018). Decorrido o tempo de tratamento, foram adicionados 10 µl da solução de MTT (concentração final: 0,5 µg/ml) aos poços, e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C em estufa com atmosfera saturada de 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi aspirado e substituído por uma solução solubilizante composta por dimetilformamida e solução de SDS 10% (1:1, v/v). As placas foram mantidas à temperatura ambiente, sob agitação e protegidas da luz, por 2 h, para completa solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a absorbância da solução foi avaliada sob o comprimento de onda de 570 nm no leitor de placas *Varioskan Flash* (Thermo Scientific). A solução de solubilização contendo dimetilformamida e SDS 10% foi utilizada como branco.

3.6.2 Células Transfectadas com PTX3

O ensaio de proliferação celular com as linhagens MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com pBABE/Mock ou pBABE/PTX3 foi realizado por citometria de fluxo. Em placa de 48

poços e em quaduplicata, foram plaqueadas 5×10^3 células viáveis/poço (contadas com Azul de Tripán) das células transfectadas pBABE/Mock ou pBABE/PTX3 ou das células WT em meio de crescimento completo acrescido de puromicina na concentração especificada para cada linhagem, no caso das células transfectadas, e em meio de crescimento completo sem puromina, no caso das células WT. As placas foram incubadas *overnight* na estufa a 37 °C e atmosfera saturada de 5% de CO₂. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, o meio dos poços foi aspirado, as células desprendidas utilizando 50 µl de solução de tripsina, ressuspensas em 50 µl de uma solução de PBS 1x – SFB 5% (PBS-FBS) e transferidas para uma placa de 96 poços. Todos os poços foram lavados com mais 100 µl da solução de PBS-FBS e o volume foi adicionado ao poço correspondente na nova placa de 96 poços. No equipamento de citometria de fluxo MACS Quant X (Miltenyi Biotec) foi realizada a leitura do número de células/µl presentes em um volume de 25 µl. Para análise, foi feita uma normalização com o tempo 0 h.

3.7 MIGRAÇÃO CELULAR (*Wound Healing*)

3.7.1 Células Tratadas com rmPtx3

O efeito do tratamento com a proteína rmPtx3 sobre a taxa de migração celular das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e do fibroblasto murino NIH/3T3 foi avaliado pelo ensaio de *Wound healing* ou cicatrização *in vitro* (Bürk, 1973). Esse ensaio consiste em provocar uma lesão na monocamada celular confluenta e mensurar o tempo de regeneração da mesma. Para esse ensaio, 5×10^4 células foram plaqueadas em triplicata em 500 µl de meio completo em uma área de 1,9 cm² (placas de 24 poços) e, quando a monocamada atingiu 100% de confluência, com o auxílio de ponteiros de 200 µl, foram realizadas duas lesões longitudinais por poço na monocamada celular. Em seguida, o meio foi aspirado e a monocamada lavada uma vez com PBS 1 x pré-aquecido a 37 °C, para retirada das células não aderidas e foram acrescentados 300 µl de meio completo contendo ou não (controle) rmPtx3 (5 µg/ml). Em paralelo, alguns poços foram previamente tratados com 1 µg/ml do antibiótico anti-proliferativo mitomicina C (MMC) (*Streptomyces caespitosus*, Sigma-Aldrich) antes de serem tratadas ou não com rmPtx3. Para mensurar o tamanho da lesão na monocamada, a mesma região de cada lesão foi fotografada nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 h utilizando microscópio óptico invertido de contraste de fase com câmera acoplado (Motic 3.0MP). A regeneração da área lesionada foi calculada usando o *software* Image J 1.49 e o algoritmo WH_NJ, desenvolvido por nosso grupo (Nunes e Dias, 2017).

3.7.2 Células Transfectadas com PTX3

A avaliação da taxa de migração celular das linhagens MC17-51, Sal/N e HT-1080 WT e transfectadas com pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock foi feita seguido o mesmo protocolo acima descrito, com as seguintes alterações: as células foram plaqueadas em quadruplicada (5×10^5 células/poço) em 500 μ l de meio completo e privadas de SFB (0%) durante todo o ensaio, para evitar a proliferação celular. Dessa forma, dispensou-se o tratamento prévio com MMC.

3.8 CRESCIMENTO INDEPENDENTE DA ANCORAGEM (*Soft Agar*)

3.8.1 Células tratadas com rmPTX3

Alterações no crescimento independente da ancoragem das linhagens MC17-51, Sal/N e NIH/3T3 após o tratamento com rmPtx3 foram avaliadas pelo ensaio de *Soft-agar*, que visa avaliar a capacidade das células em crescer e formar colônias de forma independente de uma superfície sólida, sendo essa uma das características de células neoplásicas. Para esse ensaio, foi feita uma base solidificada de 200 μ l em áreas de 1,9 cm² (placa de 48 poços) contendo agar 0,5% (Sigma-Aldrich) e meio completo. Sob essa base, foi plaqueada uma suspensão de $2,5 \times 10^2$ células viáveis/poço (contadas com Azul de Tripán) em meio completo contendo agarose 0,35 % (Invitrogen) em um volume final de 200 μ l. Após a solidificação desta segunda camada de meio na qual as células ficaram imobilizadas, foram acrescentados 100 μ l de meio completo contendo ou não rmPtx3 (5 μ g/ml). As placas foram incubadas na estufa por 3 semanas e o meio foi renovado a cada 3-4 dias. Após o tempo de incubação, o número total de colônias por poço foi contado por microscopia óptica de contraste de fase. Em cada poço, 20 colônias aleatórias foram fotografadas, utilizando um microscópio óptico invertido de contraste de fase com câmera acoplado (Motic 3.0MP). Posteriormente, a área de cada colônia fotografada foi mensurada utilizando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ, desenvolvido por nosso grupo (Nunes e Dias, 2017).

3.8.2 Células Transfectadas com PTX3

Em uma placa de 6 poços para cultura celular, foi feita uma base de agar 0,6% em meio completo em um volume final de 2 ml. Após a solidificação da base, foi preparada a camada celular do topo contendo as células transfectadas com os plasmídeos pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock e as células WT em duplicata. Para isso, foi pipetada sobre a camada base solidificada uma suspensão de $1,5 \times 10^5$ células viáveis/poço (contadas com Azul de Tripán) em meio completo acrescido de 0,3% de agar, em um volume final de 3 ml. Após a solidificação da camada do topo, foi adicionado 1 ml de meio completo em cada poço e as

placas foram incubadas na estufa a 37 °C e atmosfera saturada de 5% de CO₂ por 3 semanas. Foram feitas observações quantitativas semanais da densidade de colônias por microscopia óptica de contraste de fase (Olympus BX41) e após 3 semanas, a quantidade de colônias foi avaliada qualitativamente e 25 colônias por grupo foram fotografadas e tiveram sua área mensuradas com auxílio do *software Image J* e o algoritmo WH_NJ, desenvolvido por nosso grupo (Nunes e Dias, 2017).

3.9 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

O ensaio de formação de colônia ou clonogênico é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro* baseado na habilidade de uma única célula em crescer e se transformar em uma colônia (Franken *et al.*, 2006). Para esse ensaio, realizado em duplicata, 3 x 10² células viáveis das linhagens MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com pBABE/Mock ou pBABE/PTX3 ou WT foram plaqueadas em 2 ml de meio completo em placas de 6 poços e incubadas na estufa até a formação de colônias (aproximadamente 10 dias). Após a formação das colônias, o meio foi aspirado, os poços lavados duas vezes com 1 ml de PBS 1x e as colônias coradas com 1 ml de uma solução de cristal violeta (cristal violeta 0,1%; metanol 20% em PBS 1x) por 20 minutos. Após a coloração, a solução de cristal foi aspirada e os poços lavados com 1 ml de PBS 1x e as placas incubadas a temperatura ambiente para secagem. Em seguida, o fundo das placas foi digitalizado (HP Deskjet 2546) e as imagens utilizadas para contagem das colônias utilizando o *software Image J*. Após a contagem, cada poço recebeu 1 ml de solução de SDS 1% em água e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas, sob agitação e para solubilização do corante. Em seguida, 200 µl da solução foram utilizados para leitura da absorbância por espectrofotometria a 595 nm (ELX 800, Bio Tek Instruments).

3.10 TUMORIGÊNESE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Todo os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados foram realizados após aprovação pelo comitê de ética animal da Unibs, na Itália (*Organismo Preposto ao Benessere degli Animali*, OPBA), onde foram realizados os ensaios e pela CEUA/UFMG. Os experimentos foram realizados em conformidade com as leis e políticas nacionais e internacionais (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 12 de dezembro de 1987) e com as diretrizes do CONCEA.

Foram utilizados nos experimentos camundongos machos das linhagens C57BL/6 ou NOD/SCID SPF, de 6 a 7 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Unibs. Os animais foram mantidos em mini-isoladores em racks ventiladas em

regime de 12h de claro e 12 horas de escuro, recebendo água e ração *Ad libitum*. Os tumores de fibrossarcoma foram induzidos experimentalmente nos camundongos pela injeção subcutânea das células tumorais em ambos flancos traseiros (bilateral). Desta forma, os camundongos C57BL/6 receberam um inóculo de 1×10^6 células de MC17-51_PTX3 ou MC17-51_Mock em cada flanko traseiro (4 animais por grupo), enquanto os NOD/Scid receberam um inóculo de 3×10^6 células de HT-1080_PTX3 ou HT-1080_Mock, também bilateral e subcultâneo nos flancos traseiros (4 animais por grupo). Os tumores formados foram mensurados com auxílio de um paquímetro até atingirem 400 mm^3 e o volume foi calculado de acordo com a fórmula $V = (D \times d^2)/2$, onde D e d são os diâmetros maior e menor do tumores, respectivamente. No final do procedimento experimental, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os tumores foram removidos cirurgicamente e pesados.

3.11 VIA DE SINALIZAÇÃO DE FGF NAS LINHAGENS TRANSFECTADAS

Alterações nos perfis de expressão de elementos da via de sinalização de FGF promovidas pela expressão aumentada de PTX3 nas células MC17-51 e HT-1080 transfectadas com pBABE/PTX3 ou pBABE/Puro foram avaliadas por *western blot*, como descrito no item 3.4.6.3. Foram avaliadas as expressões de pFGFR1 e pFGFR3 (*anti-rabbit*, Cell Signaling; número de catálogo: 25445 e 4574S, respectivamente), pAKT e pERK (*anti-rabbit*, Cell Signaling; número de catálogo: 9271S e 9101S, respectivamente). Todos os anticorpos primários foram diluídos 1:1000 e detectados com o anticorpo secundário mouse anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, diluído 1:5000; número de catálogo: sc5327). Como normalizador da quantidade de proteína das amostras foi utilizado o anticorpo contra a proteína de expressão constitutiva GAPDH (*anti-rabbit*, Santa Cruz Biotechnology; número de catálogo: sc-32233) diluído 1:1000 e o mesmo anticorpo secundário descrito anteriormente.

3.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.12.1 Extração de RNA Total

As células das linhagens de fibrossarcoma (1×10^6 célula/poço) foram plaqueadas em meio contendo 10% de SFB em áreas de $9,6 \text{ cm}^2$ (placas de 6 poços) e incubadas até atingirem uma confluência entre aproximadamente 75 e 85%. Em seguida, o meio foi substituído por novo meio contendo ou não $10 \mu\text{g/ml}$ de rmPtx3 e as culturas foram incubadas novamente em estufa por 3 h. Esta concentração foi baseada nos dados de Marques (2008), que mostrou que a dose de $10 \mu\text{g/ml}$ é suficiente para promover alterações na expressão gênica

(Marques, 2008). Após as 3 horas, o RNA total das células foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações e especificações do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada através de espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) na absorvância de 260 nm. Para estimativa da presença de proteína e sais na amostra, no mesmo aparelho, foram medidas as absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 e 230 nm, respectivamente. Foram considerados de boa qualidade, os RNAs que apresentaram a razão 260/280 próxima de 2 e a razão 260/230 variando entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA total foi verificada através de fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em tampão tris-acetato-EDTA 1X (TAE) corado com brometo de etídio de uma alíquota de 100 ng. Foram considerados RNAs de boa qualidade os que apresentaram bandas visíveis correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, sendo a intensidade da banda correspondente ao 28s igual ou maior a da banda equivalente ao RNA 18S (banda inferior) e sem perfil de arraste, característico de degradação do ácido nucléico.

3.12.2 Transcrição Reversa

O RNA total das linhagens celulares foi submetido a uma reação de transcrição reversa para síntese do cDNA. Alíquotas de 2 µg do RNA total, 1 µl de iniciadores oligodT (500 µg/ml) (Invitrogen) e água tratada com DEPC 1% (dietil-pirocarbonato, Sigma-Aldrich) q.s.p. 5 µl foram misturados em microtubo de 0,2 ml e incubados por 10 minutos a 70 °C em aparelho termociclador (Eppendorf). Em seguida, foram adicionados à reação 4,3 µl de água tratada com DEPC 1%; 4,0 µl de tampão Impron 5X (Promega); 3,2 µl de MgCl₂ (25 mM) (Promega); 2,0 µl mix de dNTP (Promega) (desoxirribonucleotídeos, 10 mM); 0,5 µl do inibidor de RNase RNasin (40 U/µl) (Promega); e 1,0 µl da enzima ImProm-II™ *reverse transcriptase* (Promega). A reação foi incubada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos também no termociclador (Eppendorf).

A qualidade do cDNA sintetizado e a ausência de inibidores presentes na amostra, foi averiguada por amplificação, por PCR, do gene de expressão constitutiva *Gapdh*, utilizando iniciadores específicos (IDT): Fw: 5'-TTG.TGG.AAG.GGC.TCA.TGA.CCA-3' e Rv: 5'-CGT.TAT.TCA.TTG.TCA.TAC.GGA-3'. O produto da reação foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Foram considerados de boa qualidade, os cDNAs sintetizados a partir dos quais houve amplificação de *Gapdh* na reação de PCR, indicando síntese de cDNA de tamanho adequado e a ausência de inibidores.

3.12.3 Padronização das Reações de RT-qPCR

A caracterização do padrão de expressão dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1-4*, *Fgfbp*, *Vegfa*, *Il1b* e *Tnfa* após o tratamento com rmPtx3 foi realizada por *Quantitative reverse transcription PCR* (RTq-PCR). Os iniciadores específicos foram desenhados em regiões de junção de éxons, a fim de evitar amplificações inespecíficas a partir de possíveis contaminações por DNA genômico (Tabela 1) (Rodrigues, 2014) e foram sintetizados pela IDT.

Tabela 1 - Sequência dos Iniciadores para análise da expressão gênica por RT-qPCR.

Gene	Sequência do Iniciador	Amplicon a partir do cDNA (pb)	Amplicon a partir do DNA genômico (pb)
<i>Ptx3</i>	Fw: TGCCCGCAGGTTGTGAAAC Rv: ATACATCTGGCTTTGACCCAA	132	569
<i>Fgf2</i>	Fw: CGACCCACACGTCAAACACTACA Rv: TTGGCACACACTCCCTTGAT	72	11.084
<i>Fgfr1</i>	Fw: CTACAAGGTTTCGCTATGCCA Rv: CTCATTCTCCACGATGCAGGT	91	17.112
<i>Fgfr2</i>	Fw: GGAGACAGGTAACAGTTTCCGG Rv: GCGTTGTTATCCTCACCAGC	75	2.777
<i>Fgfr3</i>	Fw: TGCTGAAAGATGATGCGACT Rv: AATGATGTTCTTGTGCTTGCCA	93	615
<i>Fgfr4</i>	Fw: CTGCTTTGGCAAGTGGTTC Rv: TGTCGGAGGCATTGTCTTTCA	107	1173
<i>Fgfbp</i>	Fw: CACACTCACAGAAAGGTGTCC Rv: GGTGCGTTCCTGGCTCTCTT	127	768
<i>Tnfa</i>	Fw: CCACGCTCTTCGTCTACTGAACTT Rv: CAGCTGCTCCTCCACTTGGT	78	594
<i>Il1b</i>	Fw: TCCACCTCAATGGACAGAATATCA Rv: GGTTCTCCTTGACAAAAGCTCATG	67	1.216
<i>Vegfa</i>	Fw: AGACAGAACAAAGCCAGAAAATCAC Rv: CACGTCTGCGGATCTTGGAC	82	3.868
<i>Gapdh</i>	Fw: AGGTCGGTGTGAACGGATTT Rv: TGCCGTGAGTGGAGTCATAC	150	-
<i>Hprt</i>	Fw: CAGTCCCAGCGTCGTGATTA Rv: CACTTTTTCCAAATCCTCGGCA	94	3.481

Fw representa o iniciador *forward* e Rv o *reverse*.

Na padronização das reações de RT-qPCR e cálculo da eficiência de amplificação foram usados como molde os cDNAs da linhagem de fibrossarcoma Sal/N, do fibroblasto murino NIH/3T3 ou de músculo de coração murino tratado com LPS. A eficiência (E) das reações foi calculada utilizando o valor do *slope* gerado (grau de inclinação da reta) sobre os valores dos ciclos de quantificação (C_q) (Equação 1) (Rasmussen, 2001).

Equação 1

$$E = \left[(10)^{-\frac{1}{slope}} - 1 \right]$$

Os valores gerados, foram multiplicados por 100% para obtenção do valor da eficiência em porcentagem. Foram considerados padronizados os genes que apresentaram a eficiência

variando entre 90 e 110% (valor de *slope* entre -3,1 e -3,6), valores de Cq abaixo de 25 e um único pico de amplificação nas curvas de dissociação. Em todas as reações foi utilizado o sistema de detecção SYBR Green (Applied Biosystems), a plataforma ABI 7900 HT Real Time PCR (Life Technologies) e o programa de ciclagem universal: 1 ciclo a 50° C por 2'; 1 ciclo de 95° C por 10'; 40 ciclos contendo um passo de 95° C por 15" seguido de outro de 60° C por 1'.

3.12.4 Expressão Gênica em Resposta ao Tratamento com rmPtx3

Os ensaios para análise do perfil de expressão gênica após o tratamento com rmPtx3 foram realizados em triplicatas. Além disso, foram realizadas triplicatas técnicas para cada cDNA, que consistiram na aplicação da mesma amostra em três poços diferentes. Foram consideradas aceitáveis reações cujo desvio padrão entre as triplicatas foi menor que 0,5. Essa normalização tem como objetivo corrigir as variações experimentais embutidas no método, como variação na quantidade de RNA adicionada às reações de transcrição reversa, erros de pipetagem e eficiência da reação de RT-PCR quantitativa (GIULIETTI et al., 2001). Nas análises da expressão gênica foram usados como normalizadores os genes de expressão constitutiva *Gapdh* e *Hprt1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) murinos. Para análise, foi utilizado o método de quantificação relativa normalizada (NRQ), segundo a equação 2 (Hellemans et al., 2007).

(Equação 2)

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt[n]{\prod_0^n E_{ref0}^{\Delta, ref}}}$$

A equação descreve o cálculo do nível expressão relativa (NRE) do gene hipotético x através do valor de eficiência de amplificação do gene de interesse (goi) (E_{goi}), elevado ao ΔCt_{goi} , dividido pelo fator de normalização da expressão de goi, este último obtido pela raiz *enésima* da média geométrica dos \prod valores de eficiência de amplificação de cada gene de referência (E_{ref}) elevados aos seus respectivos ΔCt s, sendo n o número de genes de referência usados no cálculo de NRE. A avaliação da modulação dos genes normalizadores foi feita fixando um dos genes como normalizador e analisando a modulação do outro segundo a fórmula sugerida por Pfaffl, 2001 (Pfaffl, 2001).

(Equação 3)

$$razão\ de\ expressão = \frac{E_{gene\ alvo}^{(Ct\ alvo\ controle - Ct\ alvo\ tratado)}}{E_{gene\ referência}^{(Ct\ endógeno\ controle - Ct\ endógeno\ tratado)}}$$

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A confecção de todos os gráficos e a análise estatísticas dos dados, foram realizadas utilizando o *software* estatístico *GraphPad Prism*® 6 (GraphPad Softwares). O teste *t de Student* foi utilizado para comparar duas amostras não pareadas (ensaios de avaliação da atividade biológica de rmPtx3, crescimento independente da ancoragem, ensaio de formação de colônias e expressão gênica). Para mais de dois grupos amostrais e com mais de duas categorias, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) (proliferação celular e migração celular e ensaio de tumorigênese). Comparações que apresentaram um valor-p menor que 0,05 foram considerados significativamente diferentes e foram identificadas nos gráficos.

4 – RESULTADOS

4.1 TESTE DE CONTAMINAÇÃO POR MICOPLASMA

Primeiramente, as linhagens de fibrossarcoma murino, MC17-51 e SaI/N, humano, HT-1080, e do fibroblasto murino NIH/3T3 provenientes do Banco de Células do LGEX foram testadas quanto a contaminação por micoplasma utilizando um protocolo de PCR duplex desenvolvido no referido laboratório. Como pode ser observado no gel de eletroforese do produto da PCR (Figura 10), nenhuma das linhagens apresentaram a banda correspondente à região do rRNA 16S de micoplasma (270 pb), contudo, apresentaram amplificação do gene *GAPDH*, indicando que a presença e integridade do DNA utilizado como molde nas reações de PCR. Dessa forma, confirmou-se que todas as linhagens utilizadas neste trabalho encontrava-se livres da presença de micoplasma.

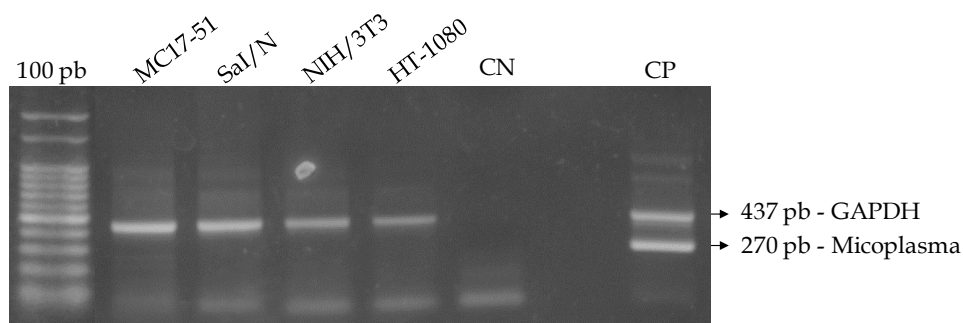


Figura 10 - Avaliação da contaminação por micoplasma nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, SaI/N e HT-1080 e do fibroblasto NIH/3T3.

O DNA das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N, HT-1080, de fibrossarcoma humano, e do fibroblasto murino NIH/3T3 foi extraído utilizando proteinase K e uma alíquota de 400 ng foi utilizada como molde em reações de PCR duplex para amplificação simultânea do rRNA 16S de micoplasma (banda de 270 pb) e do gene constitutivo *GAPDH* humano (437 pb). O produto da PCR foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

4.2 TRATAMENTO COM A PROTEÍNA Ptx3 RECOMBINANTE MURINA

4.2.1 Atividade Biológica da Proteína Ptx3 Recombinante Murina

A atividade biológica da proteína rmPtx3 foi avaliada por ensaio de fagocitose de Zy por macrófagos murino. Como descrito por Diniz e colaboradores em 2004, uma das atividades biológicas atribuídas à PTX3 é a sua capacidade de opsonizar partículas de Zy, e aumentar sua fagocitose por macrófagos peritoneais murinos. Para esse teste, foram utilizados macrófagos provenientes da medula óssea diferenciados por GM-CSF. Verificamos um maior número de macrófagos que foram capazes de fagocitar Zy nas culturas tratadas com

a proteína Ptx3 recombinante murina ($124,5 \pm 2,5$) em relação ao grupo controle não tratado ($98,5 \pm 4,5$) (Figura 11). Esse resultado indicou que a proteína rmPtx3 usada no estudo estava biologicamente ativa.

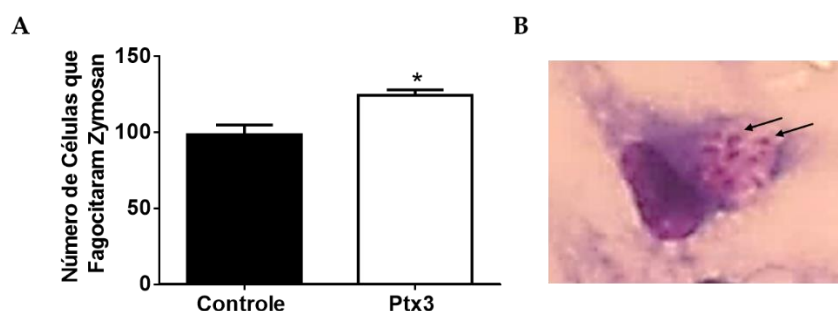


Figura 11 - A proteína Ptx3 recombinante murina aumenta a fagocitose de partículas de Zymosan por macrófagos murinos de medula óssea.

Macrófagos de medula óssea diferenciados pelo estímulo com GM-CSF foram plaqueados sobre lamínulas e tratados ou não (controle) com a rmPtx3 (20ug/ml) na presença de partículas de Zymosan (Zy) (5 partículas de Zy/célula). As culturas foram incubadas a 4 °C por 2 h, e, em seguida, à temperatura ambiente por 20 minutos. As lamínulas foram coradas com o corante Panótico Rápido e 1000 células por lâmina foram avaliadas por microscopia óptica de contraste de fase sobre a presença partículas de Zy internalizado. A) Número de células que fagocitaram as partículas de Zy após o tratamento com rmPtx3. B) Macrófago com partículas de Zy internalizadas (setas).

Magnificação de 1000 x.

Teste estatístico: Teste t de *Student*. * = $p < 0,05$ da comparação entre o grupo tratado e o controle.

4.2.2. Proliferação Celular

A proliferação celular em resposta ao tratamento com rmPtx3 nas linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e no fibroblasto murino NIH/3T3 foi avaliado nos tempos 0, 24, 48 e 72 h por ensaio de MTT em meio com diferentes concentrações de SFB: baixa (2 %) ou alta (10 %). Na linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51 foi observado um aumento significativo na proliferação celular em decorrência do tratamento com rmPtx3 tanto no meio contendo SFB 2% (Figura 12A), quanto em meio SFB 10% (Figura 12B). Em meio contendo SFB 2%, contudo, o início do efeito pró-proliferativo de Ptx3 foi observado mais precocemente que o observado em meio SFB 10%. Já na linhagem Sal/N, foi observado aumento significativo da proliferação celular promovida por Ptx3 somente quando o tratamento foi realizado em meio com baixa concentração de soro (SFB 2%) (Figura 12C), não sendo observada alteração quanto o tratamento foi realizado em meio com 10% de SFB (Figura 12D). Em contrapartida, a taxa de proliferação da linhagem de fibroblasto murino imortalizado NIH/3T3 não sofre alteração em decorrência do tratamento com rmPtx3 em meio com baixa concentração de soro (Figura 12E) ou alta (Figura 12F). Apesar disso, em meio com baixa concentração de SFB, as células de NIH/3T3 apresentaram dificuldade em proliferar e sobreviver, promovida pela baixa disponibilidade de nutrientes.

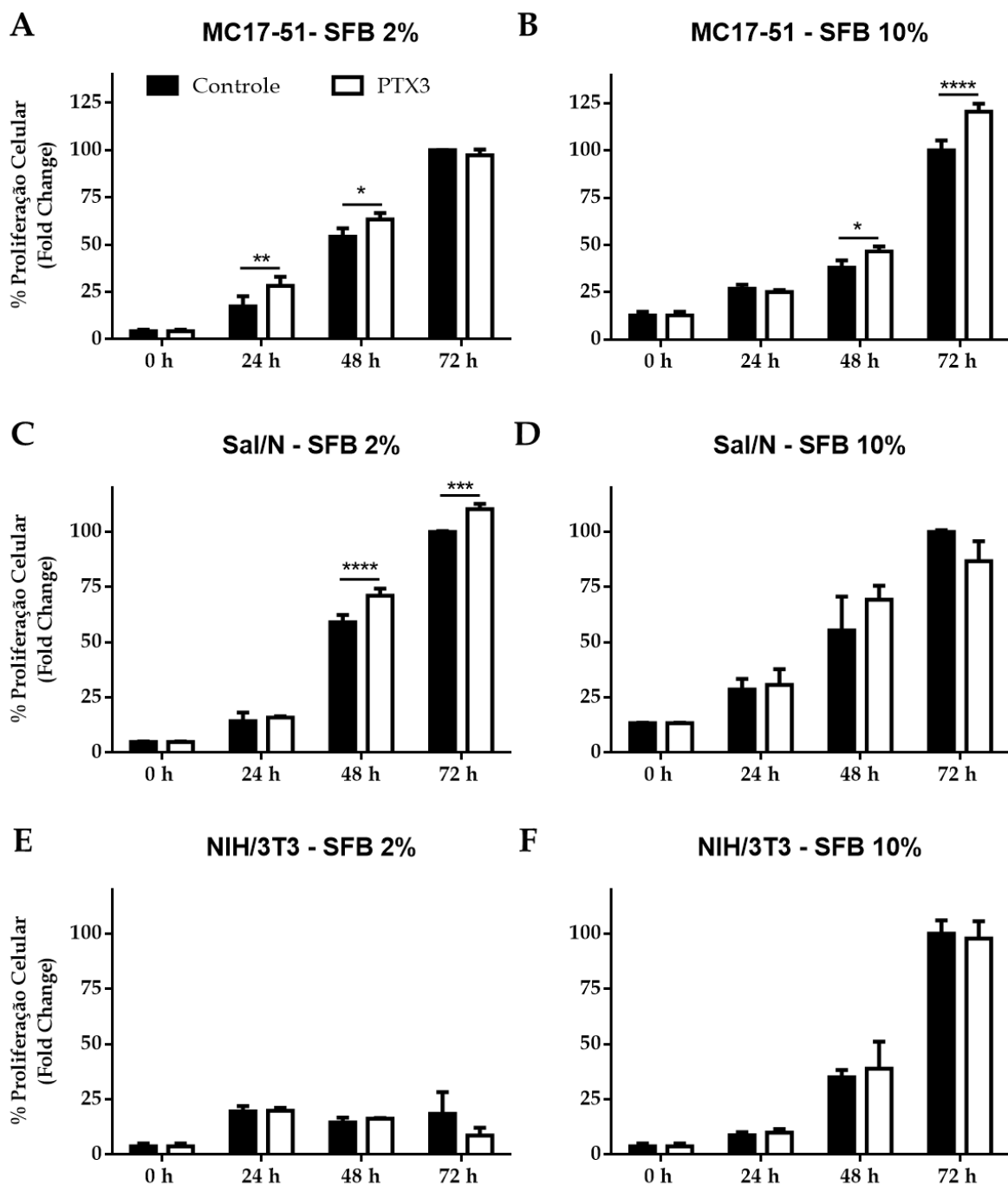


Figura 12 - Proliferação celular das células MC17-51, Sal/N e NIH/3T3 após o tratamento com a proteína Ptx3 recombinante em baixa e alta concentração de soro fetal bovino.

Células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e do fibroblasto murino NIH/3T3 foram tratadas com rmPtx3 (5 µg/ml) em meio contendo baixa (2%) ou alta (10%) concentração de soro fetal bovino por 0, 24, 48 e 72 h. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Após 2 h de incubação com o MTT e solubilização dos cristais formados, a absorbância da solução foi medida no comprimento de onda de 570 nm. A e B) Linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51; C e D) Linhagem de fibrossarcoma murino Sal/N; E e F) Linhagem de fibroblasto murino NIH/3T3; A, C e E) Células tratadas em meio com 2% de SFB; B, D e F) Células tratadas em meio com 10% de SFB.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre o grupo tratado e o controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

4.2.3 Crescimento Independente da Ancoragem

O ensaio de *soft agar* foi utilizado para avaliar se as alterações morfofisiológicas promovidas pelo tratamento com a proteína rmPtx3 nas linhagens celulares de fibrossarcoma e fibroblasto murinos poderia interferir no padrão de crescimento independente da ancoragem, uma característica das células tumorais e que favorece o processo de metástase. Neste ensaio, as células MC17-51 e Sal/N, de fibrossarcoma murino, e NIH/3T3, de fibroblasto murino, foram plaqueadas imobilizadas em meio contendo agar, sobre uma camada base de agar, e nutridas duas vezes por semana com meio contendo ou não 5 µg/ml de rmPtx3. Após três semanas de incubação, o número de colônias formadas foi contado. Como resultado, após o tratamento com rmPtx3 observamos um aumento significativo da quantidade de colônias capazes de crescer independente da ancoragem da linhagem de fibrossarcoma MC17-51 ($149 \pm 3,0$) em relação ao grupo controle não tratado ($112 \pm 6,0$) (Figura 13A). Entretanto, o tratamento com Ptx3 não alterou o número de colônias capazes de crescer independentes da ancoragem das linhagens Sal/N (tratado: $125,0 \pm 3,79$; controle: $134,3 \pm 8,67$) e NIH/3T3 (tratado: $217,0 \pm 10,54$; controle: $221,0 \pm 13,23$).

O tamanho das colônias formadas após o tratamento com a rmPtx3, foi aferido utilizando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ. Não foram detectadas alterações significativas na área das colônias que cresceram nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51 (controle: $1037,0 \mu\text{m}^2 \pm 90,04$; tratado: $971,90 \mu\text{m}^2 \pm 79,99$; Figura 13B) ou Sal/N (controle: $1222,9 \mu\text{m}^2 \pm 71,72$; tratado: $1049,0 \mu\text{m}^2 \pm 61,39$; Figura 13C) ou no fibroblasto murino NIH/3T3 (controle: $986,3 \mu\text{m}^2 \pm 73,95$; tratado: $1042,0 \mu\text{m}^2 \pm 77,64$; Figura 13D).

4.2.4 Migração Celular

As células de fibrossarcoma e fibroblasto murino foram tratadas com 5 µg/ml de rmPtx3 e perfomadas em ensaios de *wound healing* para avaliar a migração celular em resposta ao tratamento. Em até 96 h avaliadas, o tratamento com Ptx3 não foi capaz de induzir alterações no perfil migratório da linhagem de fibrossarcoma MC17-51 (Figura 14), nem da linhagem Sal/N por até 72 h de tratamento (Figura 15). No fibroblasto murino NIH/3T3, também não foram observadas alterações por até 48 h de ensaio (Figura 16). O tratamento prévio com MMC, que teve como objetivo inibir a proliferação celular, não promoveu alteração na taxa migratória em resposta a Ptx3 em nenhuma das três linhagens analisadas, de forma que, nesses grupos, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado com Ptx3. Todavia, como esperado, há diferença estatística entre os grupos tratados com MMC e os grupos não tratados.

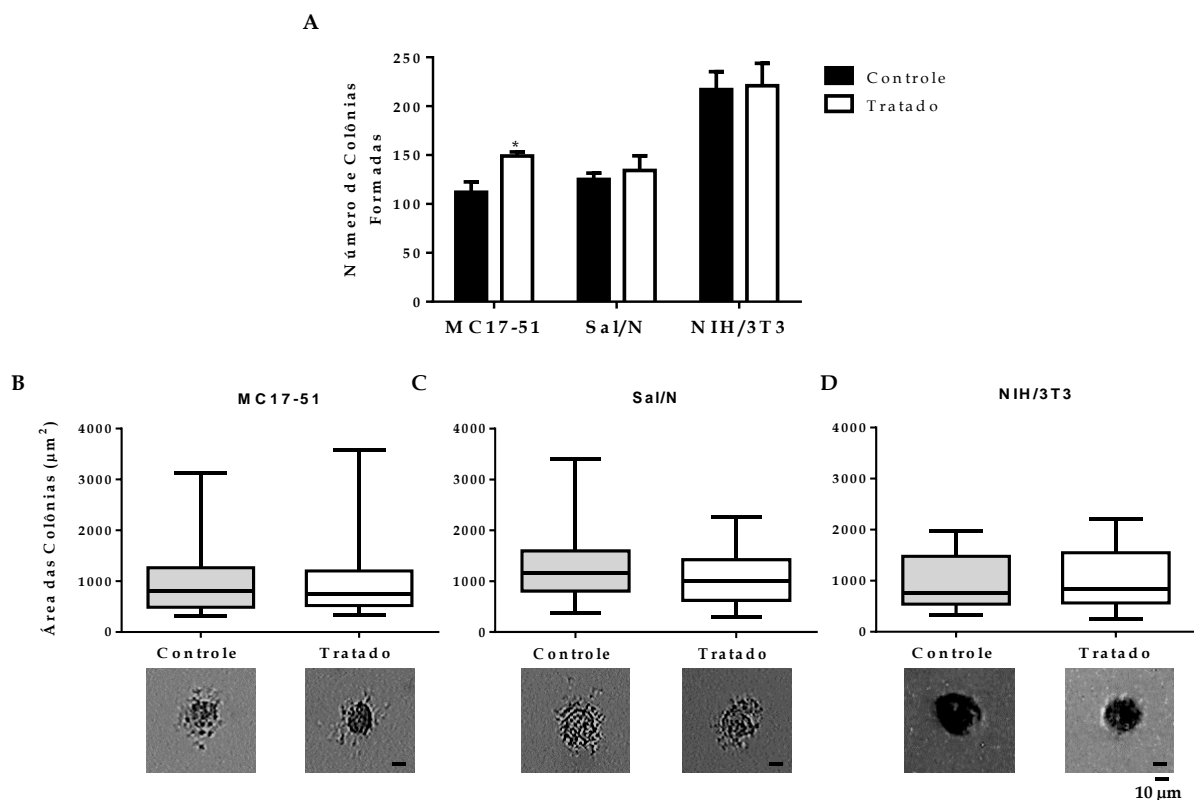


Figura 13 - Crescimento independente de ancoragem de células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N e do fibroblasto murino NIH/3T3 após o tratamento com rmPtx3.

Células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N e do fibroblasto murino NIH/3T3 foram plaqueadas em meio contendo agarose 0,35%, sobre uma camada base de agar 0,5 %. O topo dos poços foi nutrido duas vezes por semana com meio contendo ou não (controle) 5 µg/ml de rmPtx3. Após três semanas de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C, as colônias formadas foram contadas sob microscopia óptica e 20 colônias aleatórias por poço foram fotografadas e tiveram a área aferida utilizando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ. A) Número de colônias formadas; B) Área das colônias e fotomicrografia representativa da linhagem MC17-51; C) Área das colônias e fotomicrografia representativa da linhagem SaI/N; e D) Área das colônias e fotomicrografia representativa do fibroblasto NIH/3T3.

Barra de escala: 10 µm.

Teste t-Student, comparação entre os grupos tratado e controle. * p < 0,05.

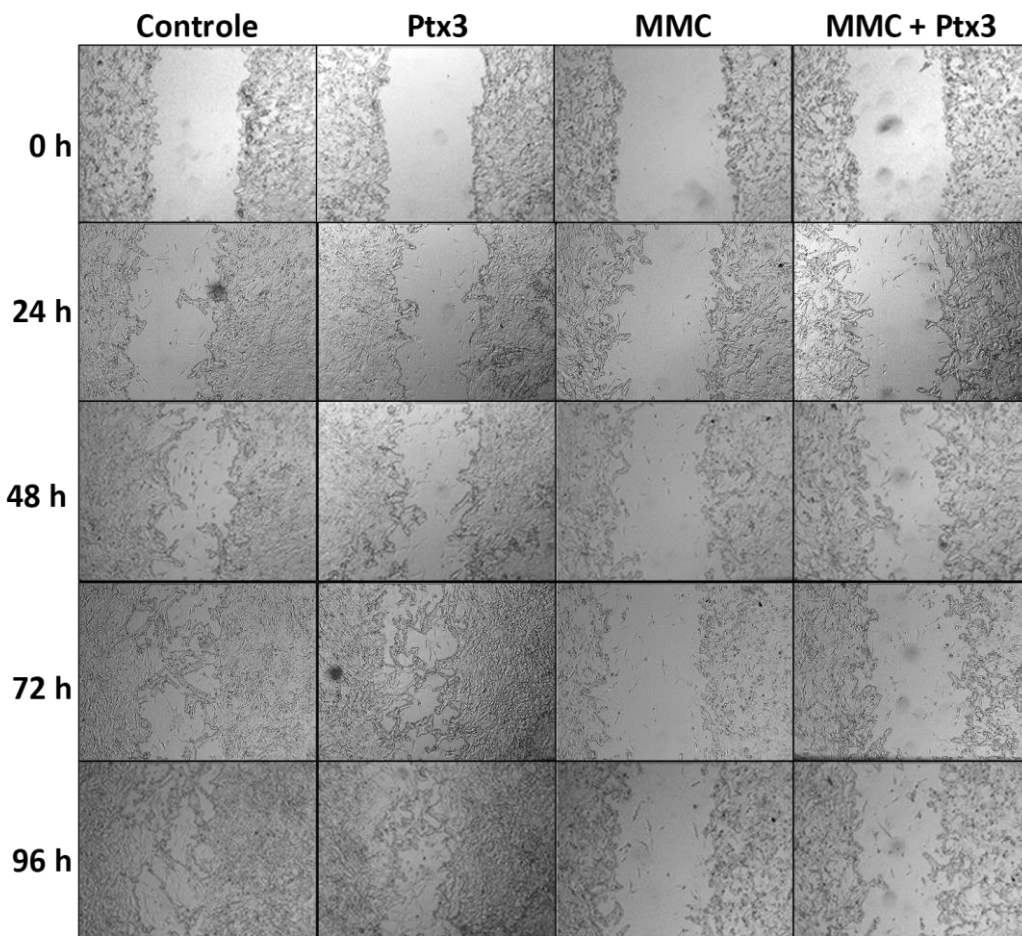
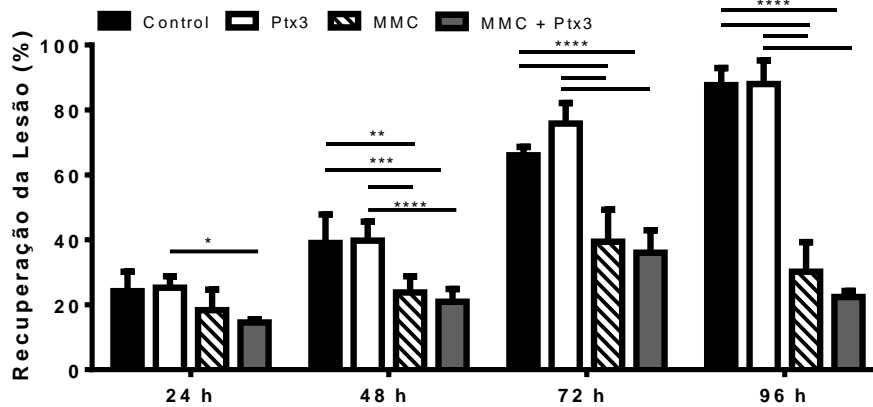


Figura 14 - Efeito do tratamento com Ptx3 sobre a migração celular da linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51.

A monocamada confluenta da linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51 foi lesionada com auxílio de uma ponteira de 200 μ l, formando duas feridas longitudinais por poço. As culturas foram tratadas ou não com rmPtx3 (5 μ g/ml) e, quando indicado, foram previamente tratadas com MMC (1 μ g/ml) por 24 h. As feridas foram fotografadas sob microscopia óptica de contraste de fase sempre na mesma região em diferentes tempos e as áreas lesionadas foram mensuradas usando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre os grupos controle, tratado, MMC e Ptx3 + MMC.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Magnificação de 40 x.

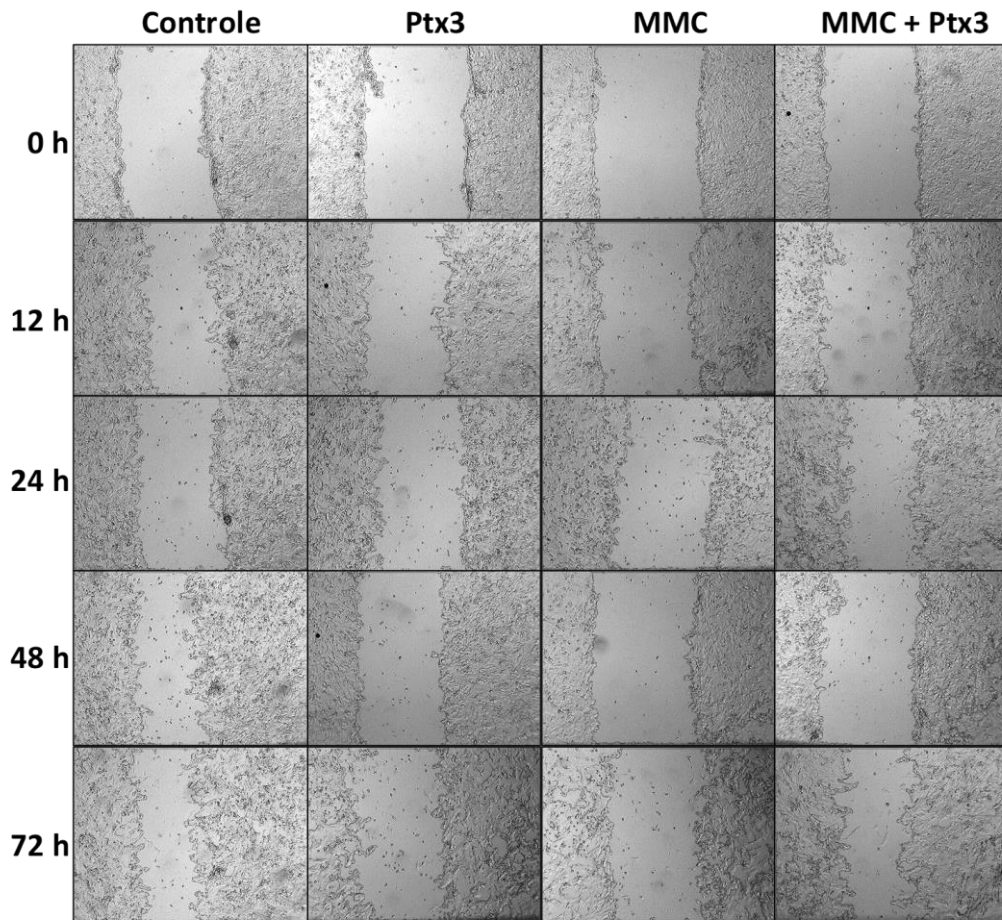
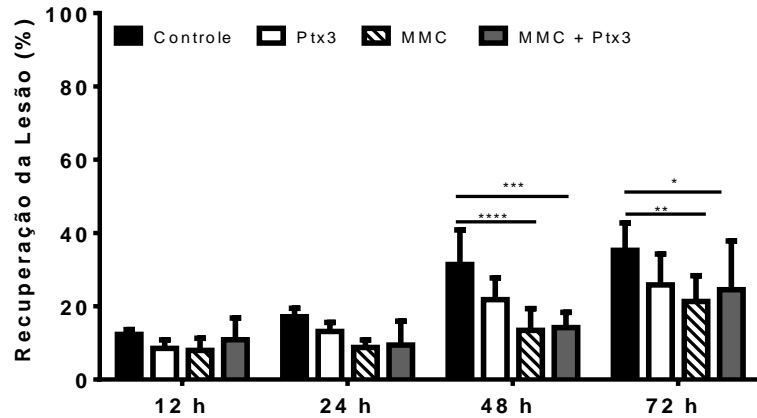


Figura 15 - Efeito do tratamento com Ptx3 sobre a migração celular da linhagem de fibrossarcoma murino SaI/N.

A monocamada confluyente da linhagem de fibrossarcoma murino SaI/N foi lesionada com auxílio de uma ponteira de 200 μ l, formando duas feridas longitudinais por poço. As culturas foram tratadas ou não com rmPtx3 (5 μ g/ml) e previamente tratadas com MMC (1 μ g/ml) por 24 h quando indicado. Em diferentes tempos, as feridas foram fotografadas sob microscopia óptica de contraste de fase, sempre no mesmo ponto, e as áreas lesionadas foram mensuradas usando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre os grupos controle, tratado, MMC e Ptx3 + MMC.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Magnificação de 40 x.

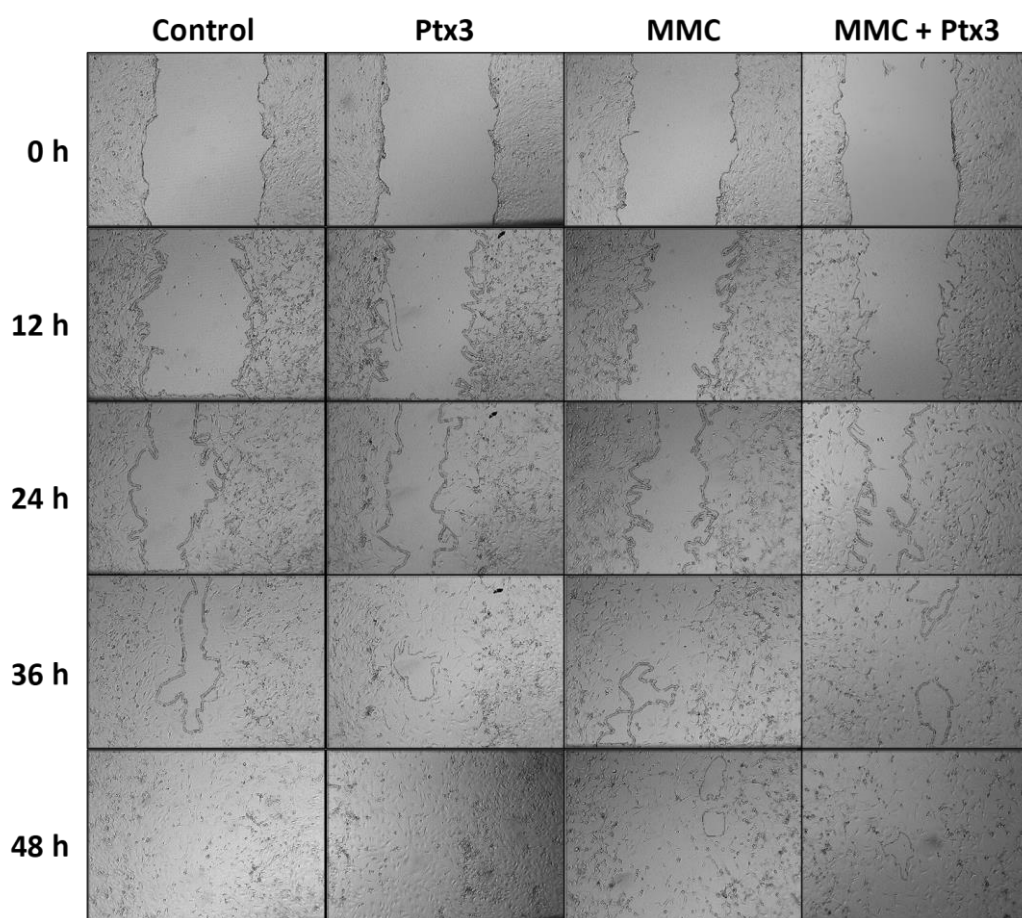
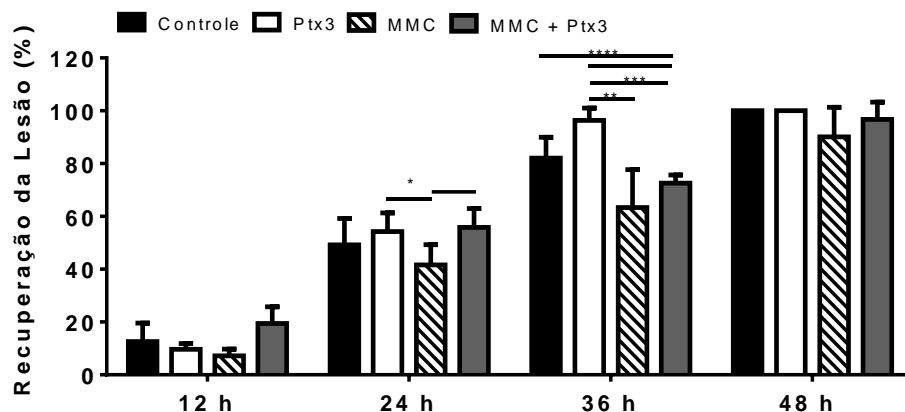


Figura 16 - Efeito do tratamento com Ptx3 sobre a migração celular da linhagem de fibroblasto NIH/3T3.

A monocamada confluenta da linhagem de fibroblasto murino NIH/3T3 foi lesionada com auxílio de uma ponteira de 200 μ l, formando duas feridas longitudinais por poço. As culturas foram tratadas ou não com rmPtx3 (5 μ g/ml) e, onde indicado, foram previamente tratadas por 24 h com MMC (1 μ g/ml). Em diferentes tempos, as feridas foram fotografadas sob microscopia óptica de contraste de fase sempre no mesmo ponto da lesão e as áreas lesionadas foram mensuradas usando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre os grupos controle, tratado, MMC e Ptx3 + MMC.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Magnificação de 40 x.

4.2.5 Expressão Gênica

4.2.5.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa

A modulação da expressão gênica em resposta ao tratamento com 10 µg/ml de rmPtx3 por 3 horas foi analisada por RT-qPCR. Para isso, o RNA total das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N foram extraídos pelo método TRIzol e quantificados e analisados quanto a sua pureza por espectrofotometria. Como pode ser observado na tabela 2, a quantidade de RNA total extraído da linhagem MC17-51 variou entre 30 e 46 µg e a de SaI/N entre 11 e 20 µg, de forma que, em ambas as linhagens foi extraída quantidade suficiente para realizar as reações de transcrição reversa.

A estimativa da contaminação do RNA total extraído por proteínas foi feita pela razão da leitura das absorbâncias a 260 (comprimento de onda de absorção de luz pelos ácidos nucleicos) e 280 nm (absorção de luz pelas proteínas) e por sais orgânicos pela razão 260 e 230 nm (comprimento de onda de absorção de luz pelos sais). Todas as amostras apresentaram valores de razões dentro da faixa de contaminação aceitável (1,8 a 2,2) e, por isso, foram consideradas adequadas para serem usadas como moldes em reações de transcrição reversa.

Tabela 2 - Quantificação e avaliação da contaminação por proteínas e sais dos RNAs extraídos das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N após tratamento com rmPtx3.

Amostra	A260	A280	260/280	260/230	Quantidade de RNA (µg)
MC17-51					
Controle 1	5,448	2,453	2,22	1,89	32,685
Controle 2	5,719	2,725	2,10	2,34	34,32
Controle 3	5,049	2,397	2,11	2,28	30,3
Tratado 1	5,277	2,592	2,04	2,31	31,665
Tratado 2	7,749	3,822	2,03	2,18	46,5
Tratado 3	5,711	2,844	2,01	2,24	34,275
SaI/N					
Controle 1	2,43	1,178	2,06	2,23	13,155
Controle 2	2,595	1,306	1,99	2,28	15,57
Controle 3	1,923	0,956	2,01	2,3	11,535
Tratado 1	3,375	1,66	2,03	2,32	20,25
Tratado 2	2,617	1,299	2,02	2,27	15,705
Tratado 3	2,191	1,07	2,05	2,29	13,155

A integridade dos RNAs extraídos foi aferida por fracionamento eletroforético de uma alíquota de 400 ng de cada amostra em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A integridade das amostras foi evidenciada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18 e 28S, sendo a intensidade da banda do 28S maior ou igual a do 18S (Figura 17). Além disso, foi possível observar nas amostras fracionadas a ausência de um

perfil de arraste no gel, característica de degradação de ácidos nucleicos. Uma vez que os RNAs foram considerados íntegros e de boa qualidade, eles foram utilizados como moldes em reações de transcrição reversa.

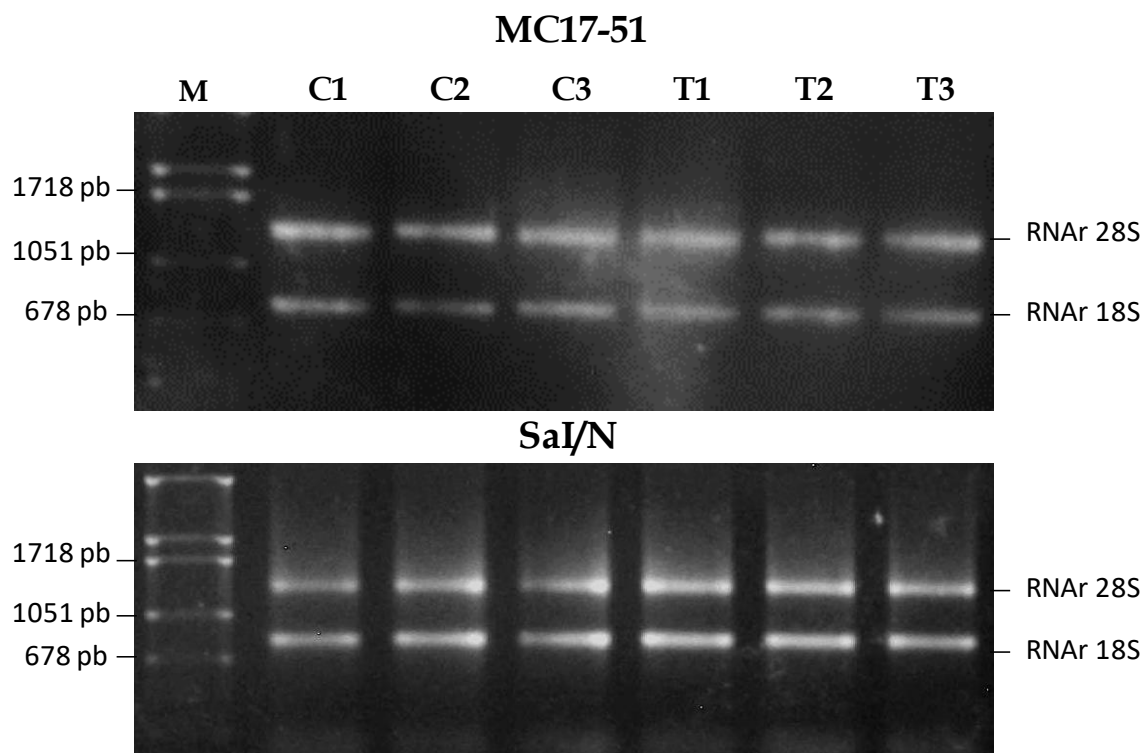


Figura 17 - Integridade do RNA total extraído das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N tratadas com rmPtx3.

As linhagens de fibrossarcoma murino foram tratadas ou não com 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rmPtx3 por 3 horas e tiveram o seu RNA total extraído. Uma alíquota de 400 ng de cada amostra desse RNA foi fracionada eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A integridade dos RNAs totais extraídos é dada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 18 e 28S e ausência de *smear*. M = Marcador de peso molecular plasmídeo peL-45 digerido com a enzima HIND III; C1, C2 e C3: grupos controle 1, 2 e 3, respectivamente; T1, T2 e T3: grupos tratados 1, 2 e 3, respectivamente.

Após as reações de transcrição reversa utilizando 2 μg do RNA total extraído como molde, a qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por PCR para o gene constitutivo *Gapdh* utilizando 1 μl do cDNA construído como molde da reação. A figura 18 mostra que houve amplificação da banda de tamanho esperado de *Gapdh* (470 pb) em todas as amostras, indicando a qualidade do cDNA sintetizado.

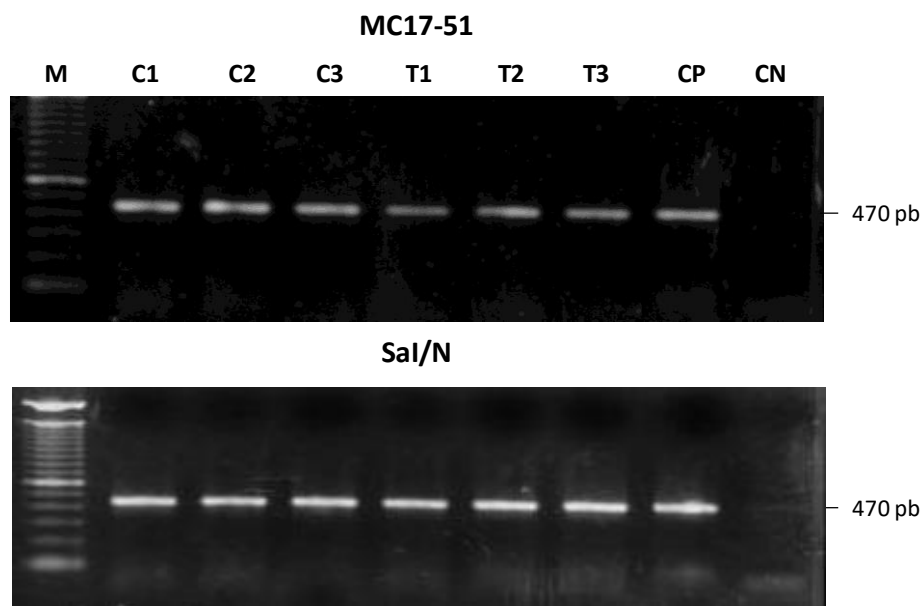


Figura 18 - Qualidade do cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N tratadas com rmPtx3.

As linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N foram tratadas com 10 µg/ml de rmPtx3 por 3 horas e tiveram o seu RNA total extraído. Dois µg desse RNA foram utilizados como molde em reações de transcrição reversa. A qualidade do cDNA sintetizado foi mensurada por sua utilização como molde em reações de PCR para amplificação do gene de expressão constitutiva *Gapdh*. Os produtos da reação de PCR foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado como brometo de etídeo.

Marcador de peso molecular 100 pb; C1, C2 e C3: amostras controle 1, 2 e 3, respectivamente; T1, T2 e T3: amostras tratadas 1, 2 e 3, respectivamente; CP: controle positivo; CN: controle negativo.

4.2.5.2 Padronização das Reações de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

Alterações promovidas pelo tratamento com 10 µg/ml de rmPtx3 por 3 horas sobre o padrão de expressão dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1-4*, *Fgfbp*, *Vegfa*, *Il1b* e *Tnfa* foram avaliadas por RTq-PCR utilizando iniciadores específicos para os genes alvos. Na padronização das condições ideais de amplificação de cada par de iniciadores específicos, o cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores foi feito variando-se a concentração do par de iniciadores (5-25 pmol/µl) em reações utilizando diferentes diluições do cDNAs molde (1:1; 1:10; 1:100; e 1:1000). Na padronização foram utilizados como molde o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído da linhagem de fibrossarcoma murino Sal/N, do fibroblasto murino NIH/3T3 ou de um músculo cardíaco murino tratado com LPS, que sabidamente expressavam os genes alvos. O valor da eficiência foi calculado com base no valor de inclinação da reta (*slope*). Foram considerados padronizados os genes que apresentaram a eficiência entre 90 e 110% (valor de *slope* entre -3,1 e -3,6), valores de Cq abaixo de 25 e um único pico de amplificação nas curvas de dissociação, indicando que somente um

produto foi formado. A tabela 3 resume as condições otimizadas para os iniciadores específicos dos genes alvos.

Tabela 3 – Condições otimizadas da RT-qPCR para os genes alvos do estudo.

Gene Alvo	Concentração de Iniciadores (pmol)	<i>Threshold</i>	<i>Slope</i>	Eficiência	Controle Positivo	Diluição de cDNA
<i>Ptx3</i>	20	0.0838	-3.3598	98%	Fibrossarcoma Murino Sal/N	1:10
<i>Fgf2</i>	15	0.1224	-3.2145	105%	Fibroblasto Murino NIH/3T3	1:10
<i>Fgfr1</i>	10	0.0848	-3.4299	96%	Fibrossarcoma Murino Sal/N	1:10
<i>Fgfr2</i>	20	0.2536	-3.4086	97%	Fibrossarcoma Murino Sal/N	1
<i>Fgfr3</i>	20	0.0964	-3.495	93%	Fibrossarcoma Murino Sal/N	1
<i>Fgfr4</i>	20	0.113	-3.2408	104%	Músculo de Coração trado com LPS	1
<i>Fgfbp</i>	5	0.3764	-3.559	91%	Músculo de Coração trado com LPS	1:10
<i>Il1b</i>	10	0.3141	-3.3402	99%	Músculo de Coração tratado com LPS	1:10
<i>Tnfa</i>	10	0.2245	-3.3222	100%	Músculo de Coração tratado com LPS	1
<i>Vegfa</i>	15	0.1501	-3.2331	104%	Fibroblasto Murino NIH/3T3	1:10
<i>Gapdh</i>	15	0.1041	-3.3217	100%	Fibrossarcoma Murino Sal/N	1:10
<i>Hprt1</i>	10	0.3048	-3.3234	100%	Fibrossarcoma Murino Sal/N	1:10

4.2.5.3 Expressão Gênica em Resposta a rmPTX3

Após a padronização dos iniciadores específicos, eles foram utilizados em reações de PCR quantitativa para avaliar a modulação dos *Ptx3*, dos genes ligados a via de FGF: *Fgf2*, *Fgfr1-4* e *Fgfbp*, do gene pró-angiogênico, *Vegfa*, e dos genes pró-inflamatórios que induzem a expressão de *Ptx3*, *Il1b* e *Tnfa*. A diferença dos níveis de expressão entre as células tratadas e não tratadas com a rmPtx3 foi avaliada seguindo a fórmula proposta por

Hellemans e colaboradores em 2007 e utilizando como genes normalizadores os genes *Gapdh* e *Hprt1*.

O tratamento com rmPtx3 na dose e tempo utilizados aqui, promoveu na linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51, a modulação da expressão dos genes ligados a via de FGF *Fgf2* e *Fgfbp*. A expressão do gene pró-proliferativo *Fgf2* foi modulada negativamente (controle: $1,00 \pm 0,005$; tratado: $0,95 \pm 0,006$) e *Fgfbp* foi modulado positivamente (controle: $1,04 \pm 0,010$; tratado: $1,10 \pm 0,009$) (Figura 19A). Já na linhagem Sal/N, o tratamento com rmPtx3 induz modulação positiva de *Ptx3* (controle: $1,00 \pm 0,001$; tratado: $1,08 \pm 0,005$) e *Fgf2* (controle: $1,00 \pm 0,009$; tratado: $1,07 \pm 0,027$), enquanto *Vegfa* foi modulado negativamente (controle: $1,00 \pm 0,003$; tratado: $0,95 \pm 0,017$) (Figura 19B).

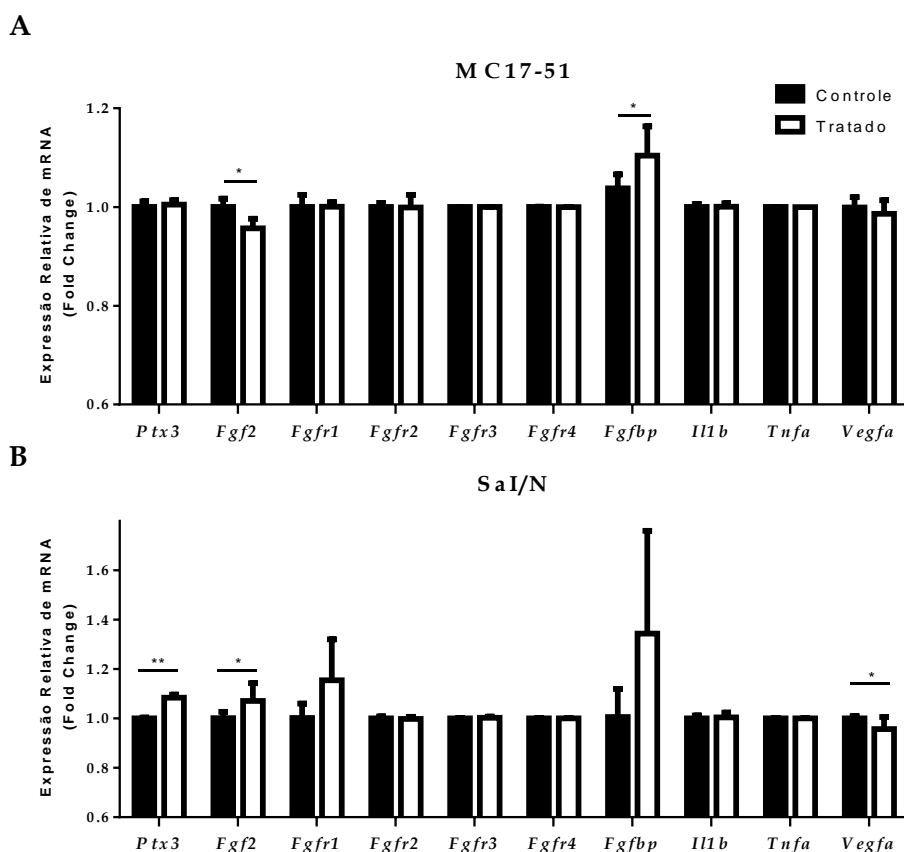


Figura 19 - Perfil de expressão gênica nas linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N após o tratamento com rmPtx3.

Células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N foram tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de rmPtx3 por 3 horas, seguida pela extração do RNA total das células pelo método TRIzol. O RNA total extraído foi utilizado como molde em reações de transcrição reversa e o cDNA sintetizado foi usado para avaliar a expressão dos genes *Ptx3*, os genes da via de FGF/FGFR (*Fgf2*, *Fgfr1-4* e *Fgfbp*), do gene pró-angiogênico *Vegfa* e dos genes pró-inflamatórios que induzem a produção da proteína Ptx3, *Il1b* e *Tnfa* por RT-qPCR. A quantificação relativa de mRNA foi avaliada pelo método de quantidade de expressão relativa normalizada proposto por Hellemans e colaboradores em 2007. Os genes utilizados como normalizadores foram *Gapdh* e *Hprt*.

Teste t-Student, comparação entre o grupo controle e tratado. *p < 0,05; **p < 0,01.

4.3 LINHAGENS CELULARES TRANSFECTADAS COM PTX3

4.3.1 Transfecção das Linhagens Celulares com pBABE/Puro Expressando PTX3

4.3.1.1 Transformação Bacteriana e Midi-Prep

Bactérias da linhagem TOP10 foram transformadas com pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock por choque térmico e foram plaqueados 100, 200 ou 500 µl da suspensão bacteriana em meio LB agar contendo 10 µg/ml de ampicilina. Nas placas de pBABE/PTX3, houve crescimento de 4 clones na placa que recebeu o inóculo de 500 µl. Em contrapartida, em todas as placas de pBABE/Mock houve formação de clones. Assim, foram selecionados 10 clones (colônias maiores) da placa de 200 µl de inóculo, pois apresentavam colônias mais bem definidas e espaçadas. Já no controle negativo, contendo somente meio sem nenhum tipo de inóculo, não foi observado crescimento bacteriano (Figura 20A).

Após a seleção dos clones, a presença do inserto de PTX3 foi verificada por reações de PCR utilizando iniciadores específicos para PTX3 e o pDNA dos clones como molde. Foi verificada a presença do cDNA de PTX3 nos 4 clones selecionados de pBABE/PTX3 e a ausência nos 10 clones selecionados de pBABE/Mock (Figura 20B).

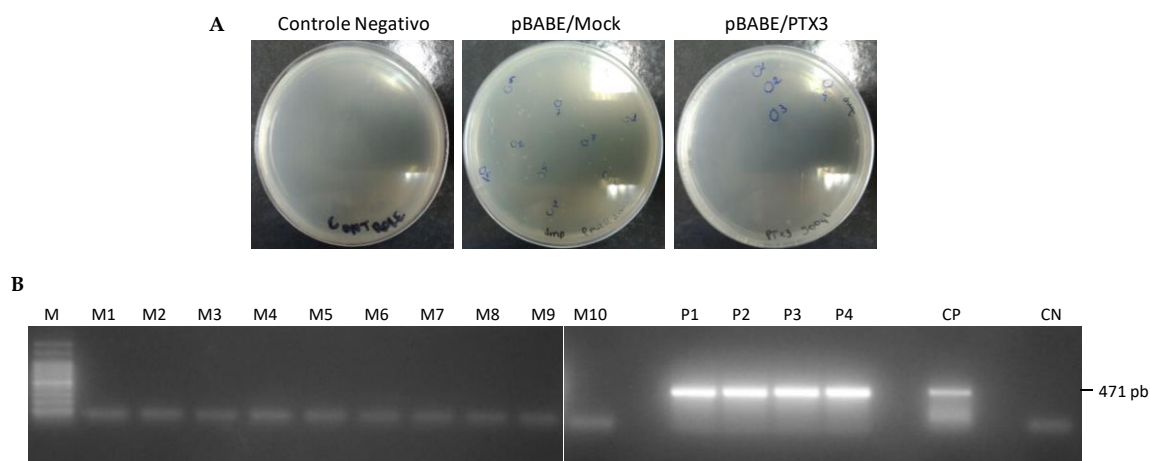


Figura 20 - Transformação das bactérias TOP10 com os plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3.

Bactérias da linhagem TOP10 foram transformadas com os plasmídeos pBABE/Mock ou pBABE/PTX3. A) Ausência de formação de colônias na placa controle, seleção de 10 clones na placa de pBABE/Mock e seleção de todos os 4 clones formados na placa de pBABE/PTX3; B) A presença do inserto de PTX3 foi testada nos clones selecionados por PCR e os produtos da reação visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

M: Marcador de peso molecular 100 pb; M1-M10: clones selecionados de pBABE/Mock 1-10, respectivamente; P1-P4: clones de pBABE/PTX3 1-4, respectivamente; CP: controle positivo; e CN: controle negativo.

Como descrito no item 3.4.4, um clone aleatório de pBABE/Mock e um de pBABE/PTX3 foram selecionados, crescidos e os plasmídeos purificados em escala média. Após a extração, os plasmídeos (pDNA) foram quantificados por espectrofotometria (Tabela 4) a 260 nm. No total, foram extraídos 560,2 µg de pBABE/Mock e 258,2 µg de pBABE/PTX3.

Tabela 4 - Quantificação dos plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3 após a purificação e extração plasmidial em média escala.

Amostra	A260	A280	260/280	260/230	Quantidade de DNA (µg)
pBABE/Mock	5,602	2,541	2,2	2,38	560,2
pBABE/PTX3	2,582	1,177	2,19	2,23	258,2

Após a reação de Midi-prep, o pDNA extraído foi avaliado quanto a presença do inserto de PTX3 por PCR utilizando iniciadores específicos e por análise de restrição utilizando a enzima EcoRI. Os produtos da reação foram fracionados eletroforicamente e, conforme esperado, a linearização de pBABE/Mock promovida pela digestão com EcoRI gerou uma banda única de aproximadamente 5 kb, em contrapartida, em pBABE/PTX3, visto que há a presença de dois sítios de restrição de EcoR1 dentro do cDNA de PTX3, foi observado um perfil de 3 bandas de aproximadamente 5 kb, 900 e 600 pb (Figura 21A). Em paralelo, o fracionamento do plasmídeo inteiro, permitiu verificar a integridade e o perfil de bandeamento do mesmo sem digestão. A presença do inserto de PTX3 nos plasmídeos foi avaliada por PCR utilizando iniciadores específicos. Como esperado, não foi amplificada a banda esperada de PTX3 em pBABE/Mock, entretanto, a mesma foi obtida quando o plasmídeo pBABE/PTX3 foi usado como molde na PCR (Figura 21B).

A construção dos plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3 foi previamente avaliada por PCR e análise de restrição enzimática, mas, posteriormente foi confirmada por sequenciamento. Após o sequenciamento, foi feito o alinhamento no *software* MEGA e foi verificada a presença do inserto na construção, permitindo com que os plasmídeos fossem utilizados com segurança para transfecção das linhagens celulares de fibrossarcoma e fibroblasto.

4.3.1.3 Expressão de PTX3 nas Linhagens Celulares Transfectadas

As linhagens de fibrossarcomas MC17-51, Sa1/N e HT-1080 e o fibroblasto murino NIH/3T3 foram transfectadas com os plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3. Os transfectantes de Sa1/N, HT-1080 e NIH/3T3 foram selecionados pelo crescimento em meio contendo 1µg/ml de puomicina e os de MC17-51 em meio contendo 4 µg/ml. A eficiência da transfecção e,

consequente, produção aumentada de PTX3 foi avaliada por *western blot* utilizando como normalizador das amostras da proteína de expressão constitutiva α -tubulina.

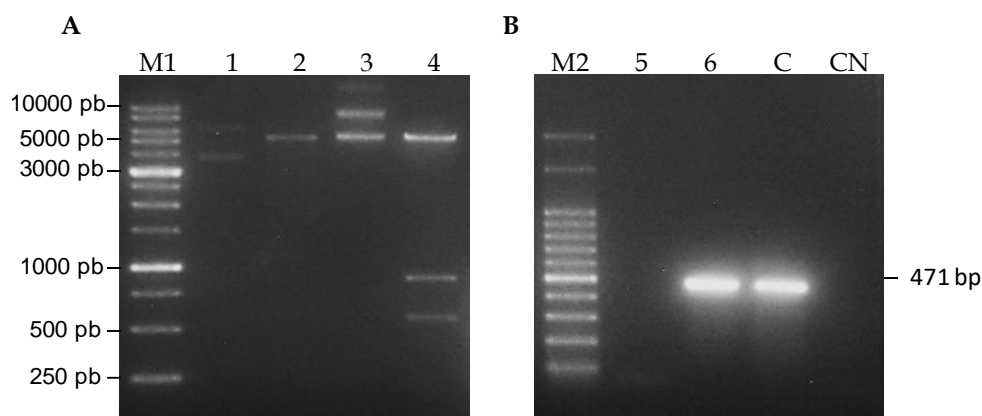


Figura 21 - Confirmação das construções para expressão de Ptx3 (pBABE/PTX3) e controle (pBABE/Mock) nas midi-preps por PCR e análise de restrição.

Os plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3 foram extraídos e purificados em média escala e analisados quanto a presença da sequência de PTX3 por PCR utilizando iniciadores específicos e por digestão enzimática com a enzima de restrição EcoRI para visualização das bandas esperadas em cada caso. Tanto os produtos da PCR, quanto da digestão enzimática foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em paralelo ao fracionamento do resultado da digestão enzimática, foram fracionados 300 ng de cada um dos plasmídeos não digeridos. A) Digestão dos plasmídeos pBABE/Mock e pBABE/PTX3 com EcoRI gerando uma única banda de aproximadamente 5 kb em pBABE/Mock e 3 bandas de 5 kb, 900 e 600 pb, aproximadamente, em pBABE/PTX3. Em paralelo, foi feito o fracionamento dos plasmídeos íntegros; B) PCR específica para PTX3 no produto da Midi-prep de pBABE/Mock e pBABE/PTX3.

Gel A = M1: Marcador de peso molecular 1 kb; Canaleta 1: pBABE/Mock; 2: PbabE/Mock digerido com EcoRI; 3: pBABE/PTX3; 4: pBABE/PTX3 digerido com EcoRI; Gel B = M2: marcador de peso molecular de 100 pb; 5 PCR de pBABE/Mock; 6: PCR de pBABE/PTX3; CP: controle positivo; e CN: controle negativo.

Como é possível observar na figura 22, as linhagens MC17-51 e Sal/N não produzem níveis PTX3 detectáveis. A expressão de PTX3 também não foi observada nas células transfectadas com o vetor vazio, pBABE/Mock, enquanto, foi detectada nas células transfectadas com pBABE/PTX3. A linhagem HT-1080 expressa níveis basais baixos de PTX3, evidenciados pela presença de bandas detectadas pelo anticorpo anti-PTX3 nas amostras WT e pBABE/Mock e a transfecção com pBABE/PTX3 promoveu um aumento significativo na produção da proteína. Esses resultados demonstram que a transfecção foi eficiente nas linhagens MC17-51, Sal/N e HT-1080. Entretanto, na linhagem de fibroblasto murino NIH/3T3, não foi observada expressão de PTX3 em nenhuma das células (WT, pBABE/Mock e pBABE/PTX3), indicando que as condições empregadas não foram adequadas para obtenção de transfectantes que expressassem PTX3. A linhagem NIH/3T3 apesar de não ser tumoral não é uma célula totalmente normal, pois trata-se de uma linhagem imortalizada. Ela foi utilizada no estudo como um controle de linhagem não tumoral proveniente do mesmo tipo celular precursor dos fibrossarcomas, o fibroblasto. Contudo,

após a transfecção, as células dessa linhagem não expressaram PTX3 e, portanto, análises funcionais do efeito de PTX3 sobre o desenvolvimento dos fibrossarcomas foi continuada utilizando-se somente as linhagens desse tipo tumoral transfectadas com o vetor vazio como controle.

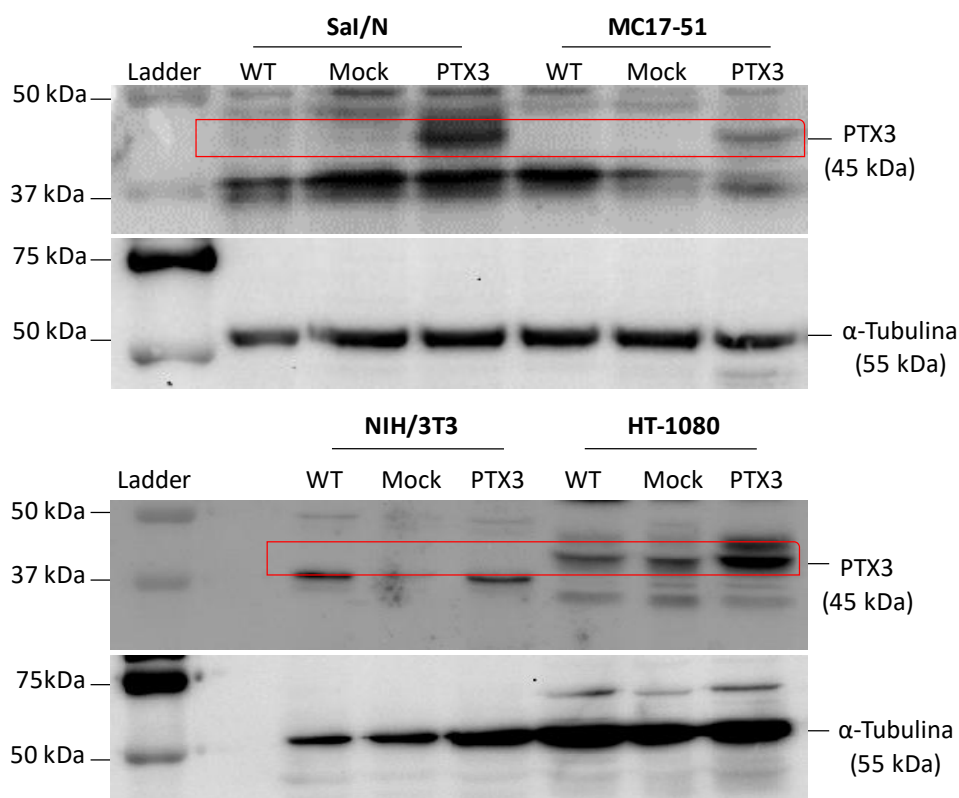


Figura 22 - Expressão aumentada de PTX3 nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.

As linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N, HT-1080 de fibrossarcoma humano e o fibroblasto murino NIH/3T3 foram transfectadas com pBABE/Mock ou pBABE/PTX3, contendo o cDNA completo de PTX3, e selecionadas com puomicina. As proteínas das linhagens transfectadas e do tipo selvagem (WT) foram extraídas e fracionadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida e analisadas quanto a produção de PTX3 por *Western blot*. A produção da proteína α -Tubulina foi utilizada como normalizador das amostras.

WT: linhagem do tipo selvagem; Mock: linhagem transfectada com pBABE/Mock; e PTX3: linhagem transfectada com pBABE/PTX3.

4.3.2 Proliferação Celular

A proliferação celular das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 transfectadas com pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock foi avaliada por citometria de fluxo nos tempos 0, 24, 48 e 72 h. Na linhagem MC17-51, a produção aumentada de PTX3 inibiu significativamente a proliferação celular a partir de 24 h e esse perfil foi mantido por até 72 h, tanto em relação ao grupo pBABE/Mock, quanto em relação ao grupo WT (Figura 23A). A proliferação do grupo Mock também sofre uma redução em relação ao grupo WT, sendo o mesmo resultado observado nas linhagens Sal/N e HT-1080, indicando que,

independentemente da presença de PTX3, o plasmídeo pBABE/Puro por si só causa um decaimento na taxa de proliferação celular nas linhagens de fibrossarcoma.

Assim, como ocorre na proliferação da linhagem murina MC17-51, a presença de PTX3 promoveu uma redução significativa da taxa proliferativa da linhagem humana HT-1080, em relação a linhagem Mock, contudo, essa redução foi observada apenas a partir de 72 h (Figura 23B). Já na linhagem de fibrossarcoma murino SaI/N, não houve alteração significativa no perfil de proliferação em decorrência da presença de PTX3 (Figura 23C). Embora tenham sido observadas alterações na taxa proliferativa das linhagens de fibrossarcoma, por microscopia óptica de contraste de fase, não foi observada nenhuma alteração na morfologia celular das linhagens promovidas por pBABE/Mock ou por pBABE/PTX3 (Figura 24).

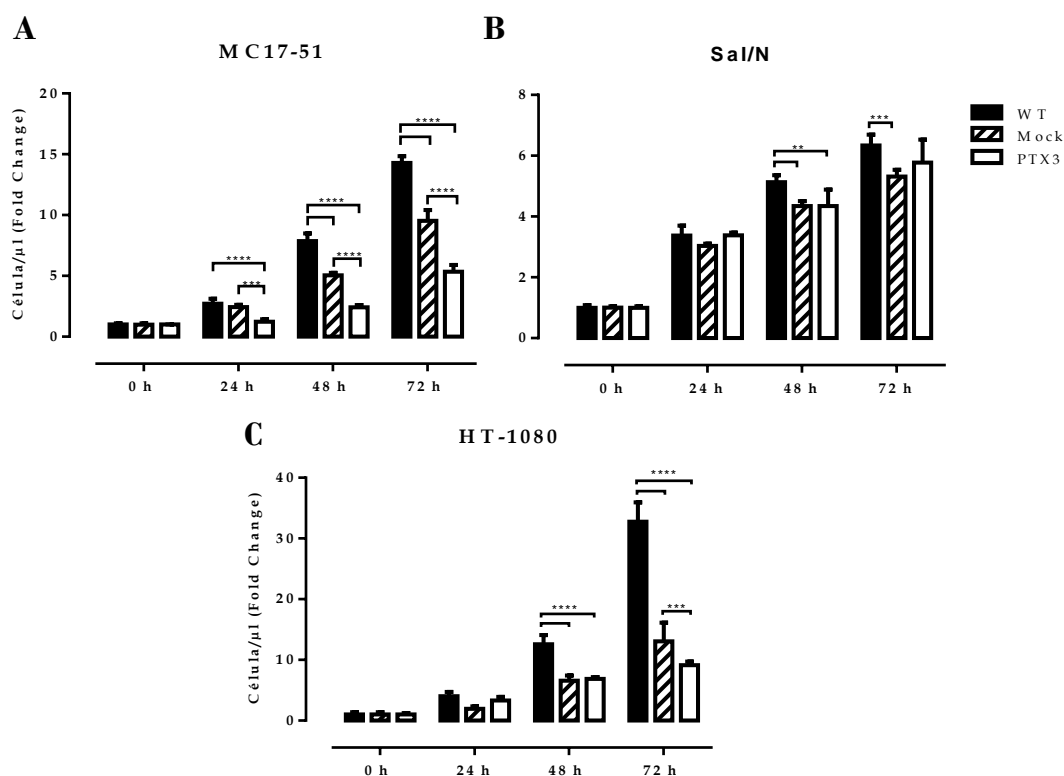


Figura 23 - Proliferação celular das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, SaI/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.

Células das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, SaI/N e HT-1080 foram transfectadas com pBABE/Mock ou pBABE/PTX3 e, juntamente com a linhagem WT, tiveram a sua proliferação averiguada por citometria de fluxo. Em placas de 48 poços, foram plaqueadas 3×10^3 células por poço e nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, as células foram desprendidas e foi avaliada a quantidade de célula por μl em uma alíquota de $25 \mu\text{l}$ da suspensão celular por citometria de fluxo. Para análise, as amostras foram normalizadas com o tempo 0 h. A) Linhagem murina MC17-51; B) Linhagem murina SaI/N; e C) Linhagem humana HT-1080.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre os grupos WT (barras preta), pBABE/Mock (barras hachuradas) e pBABE/PTX3 (barras brancas). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

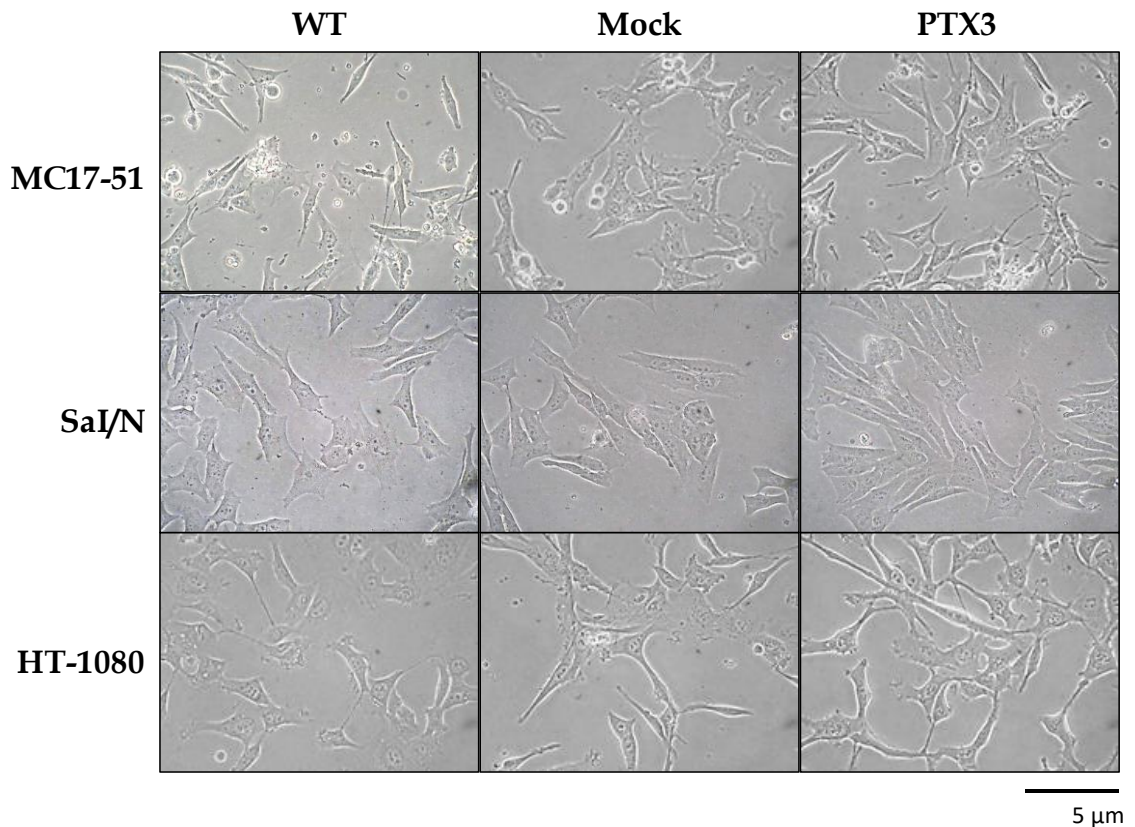


Figura 24 - Morfologia das linhagens celulares de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e humano HT-1080 transfectadas com PTX3.

As células das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 foram transfectadas com pBABE/Puro contendo o cDNA completo de PTX3 (PTX3) ou o vetor vazio (Mock). A morfologia das linhagens transfectadas e das respectivas linhagens do tipo selvagem (WT) foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase.

Magnificação = 40x, barra de escala 5 μ m.

4.3.3 Crescimento Independente da Ancoragem

A capacidade de crescer e formar colônias independente da ancoragem nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 foi avaliada por ensaio de *soft agar* conforme descrito no item 3.7.2. A quantidade e o tamanho das colônias formadas a partir da linhagem MC17-51_PTX3 ($1344,0 \mu\text{m}^2 \pm 252,8$) foi menor que as formadas pelas linhagens MC17-51_Mock ($3171,0 \mu\text{m}^2 \pm 753,7$) e WT ($1539,0 \mu\text{m}^2 \pm 317,8$) (Figura 25A). O mesmo perfil foi observado na linhagem de fibrossarcoma humano HT1080, onde a quantidade e a área das colônias de PTX3 foram significativamente menores ($448,9 \mu\text{m}^2 \pm 31,47$) que as colônias formadas nos grupos Mock ($773,0 \mu\text{m}^2 \pm 105,5$) e WT ($386,5 \mu\text{m}^2 \pm 52,85$) (Figura 25B). Já na linhagem Sal/N, não foi observada alteração na área das colônias promovida por PTX3, somente entre o grupo WT ($18677,0 \mu\text{m}^2 \pm 2551,0$) e as linhagens transfectadas Mock ($3171,0 \mu\text{m}^2 \pm 753,7$) e PTX3 ($4936,0 \mu\text{m}^2 \pm 773,0$) (Figura 25C).

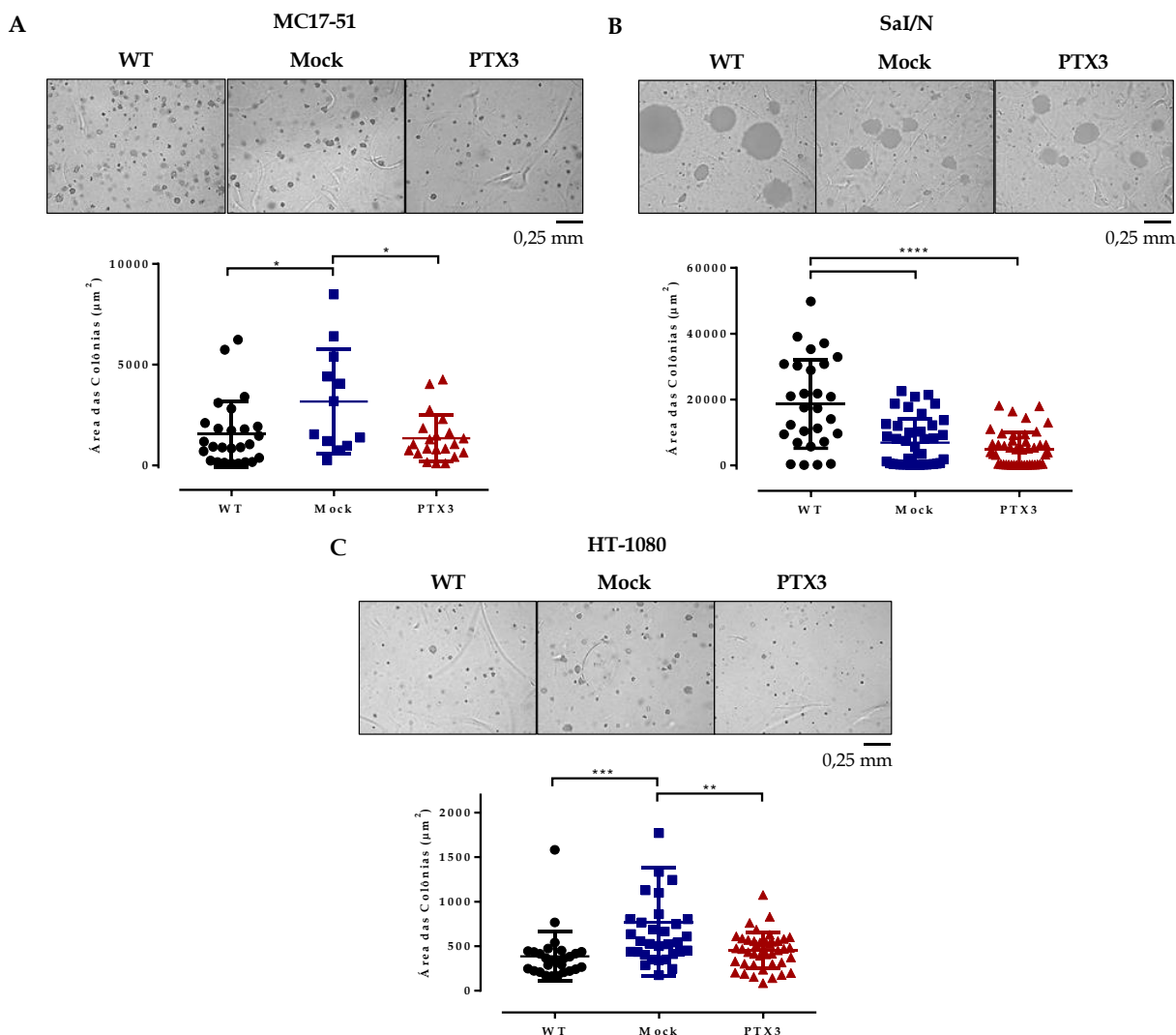


Figura 25 - Crescimento independente da ancoragem nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51, SaI/N e HT-1080 transfetadas com pBABE/PTX3 ou pBABE/Mock.

Células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N e humano HT-1080 foram transfetadas com pBABE/Puro contendo o cDNA completo de PTX3 (PTX3) ou com o vetor vazio (Mock). As linhagens transfetadas e WT foram avaliadas quanto a capacidade de crescimento independente da ancoragem por um ensaio de *soft agar*, no qual sobre uma base de agar 0,3% em placa de cultura celular de 6 poços, foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células em meio contendo 0,3% de agar. Após 3 semana de incubação, a quantidade de colônias formadas foi qualitativamente avaliada e fotografadas por microscopia óptica de contraste de fase (painel superior). Em um aumento de 10x, 25 colônias de cada grupo foram fotografadas individualmente e tiveram a sua área mensurada utilizando o software Image J e algoritmo WH_NJ (painel inferior). A) Fibrossarcoma murino MC17-51; B) Fibrossarcoma SaI/N; C) Fibrossarcoma humano HT-1080.

Teste ANOVA one-way, comparação entre os grupos WT (preto), Mock (azul) e PTX3 (vermelho). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

Barra de escala: 0,25 mm.

4.3.4 Potencial Clonogênico

Após 10 dias de incubação das células plaqueadas em baixa densidade, observou-se que o número de colônias formadas da linhagem MC17-51_PT3 foi significativamente menor

($29,5 \pm 2,5$) em relação a MC17-51_Mock ($88,0 \pm 1,0$), bem como em relação a linhagem WT ($74,5 \pm 2,5$), sendo também observada diferença entre WT e MC17-51_Mock (Figura 26A). Após a solubilização do cristal violeta das colônias e leitura da absorbância a 595 nm, o mesmo perfil foi observado, uma redução do número de células MC17-51_PTX3 ($0,44 \pm 0,04$) em relação às células MC17-51_Mock ($1,29 \pm 0,09$) e WT ($1,24 \pm 0,04$), evidenciando que, além de PTX3 diminuir o número de colônias, também reduziu a quantidade de células nas colônias. Semelhantemente a resposta da linhagem MC17-51, na linhagem HT-1080, o número de colônias formadas no grupo HT-1080_PTX3 foi significativamente menor ($55,0 \pm 1,0$) que as formadas no grupo HT-1080_Mock ($73,0 \pm 3,0$) e WT ($100,0 \pm 1,0$), bem como de Mock em relação a WT (Figura 26B). Com relação à absorbância, também houve uma redução significativa de HT-1080_PTX3 ($0,44 \pm 0,14$) em relação aos grupos HT-1080_Mock ($0,68 \pm 0,14$) e WT ($0,96 \pm 0,05$). Apesar dessas duas linhagens de fibrossarcoma apresentarem uma diminuição no número de colônias formadas em resposta a PTX3, na linhagem Sal/N não foi observada nenhuma alteração no número de colônias de Sal/N_PTX3 ($65,0 \pm 3,0$) em relação a Sal/N_Mock ($58,0 \pm 8,0$), tampouco na absorbância (Sal/N_PTX3: $1,18 \pm 0,14$; Sal/N_Mock: $1,10 \pm 0,15$), contudo, foi observada diferença significativa entre ambos os transfectantes e o grupo WT, tanto no número de colônias formadas ($100,5 \pm 3,5$), quanto na leitura da absorbância da solubilização das colônias ($1,65 \pm 0,06$) (Figura 26C).

4.3.5 Migração Celular

O efeito da expressão aumenta de PTX3 sobre a taxa de migração celular das linhagens celulares de fibrossarcoma MC17-51, Sal/N e HT-1080 foi avaliado por ensaio de *wound healing* utilizando as linhagens do tipo selvagem e transfectadas com pBABE/PTX3 e pBABE/Mock. A migração celular da linhagem MC17-51 foi acompanhada até o tempo de 48 h e somente nesse tempo foi observado o início de uma diferença significativa entre PTX3 e Mock, contudo, o início de diferença na taxa migratória nesse tempo não é considerada como efeito migratório, mas sim, como efeito proliferativo, dessa forma PTX3 não afetou a migração celular dessa linhagem (Figura 27A). Da mesma forma, PTX3 não interferiu na migração celular das linhagens Sal/N (Figura 27B) e HT-1080 (Figura 27C), que foram acompanhadas até a completa regeneração da lesão, nos tempos 36 e 24 h, respectivamente. Assim, parece que nas linhagens de fibrossarcoma a migração celular ocorre por uma via de sinalização que não requer o envolvimento de PTX3.

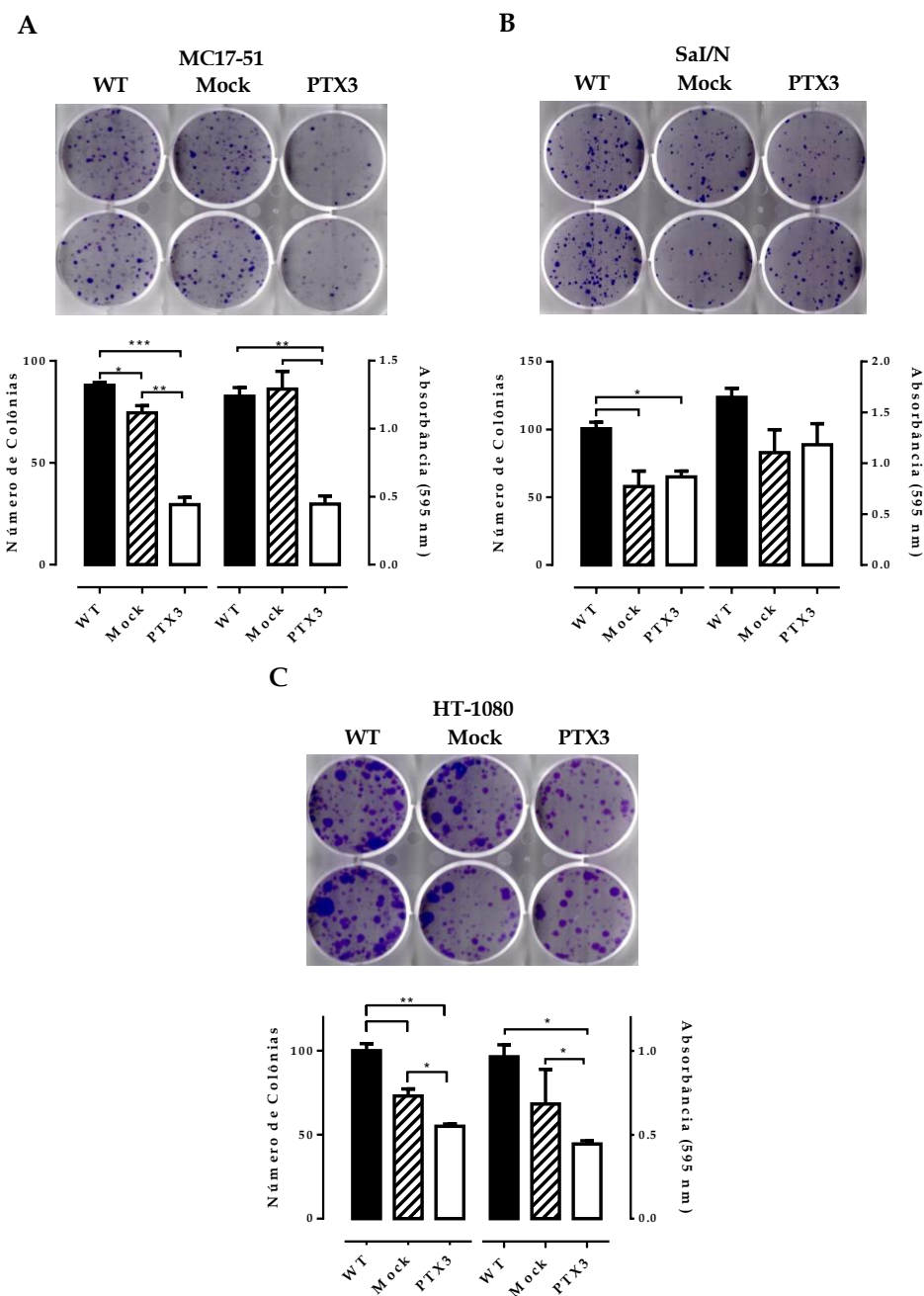


Figura 26 - Análise da capacidade de formação de colônias das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, SaI/N e HT-1080 transfetadas com PTX3.

Células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N e HT-1080 de fibrossarcoma humano foram transfetadas com pBABE/Puro contendo ou não o cDNA completo de PTX3 e utilizados em ensaios clonogênicos, juntamente com as respectivas linhagens do tipo selvagem (WT). Foram plaqueadas 300 células por poço em placas de 6 poços e as placas foram incubadas na estufa até a formação das colônias, aproximadamente 10 dias. As placas foram coradas com solução de cristal violeta e as colônias contadas usando o *software Image J*, seguida pela solubilização do corante com solução de SDS 1 % e aferição da absorbância a 595 nm. O painel superior mostra imagens representativas das colônias formadas e o painel inferior a quantificação da absorbância das colônias. A) Linhagem de fibrossarcoma murino MC17-51; B) Linhagem murina SaI/N; C) Linhagem humana HT-1080.

Teste ANOVA one-way, comparação entre os grupos WT (barras pretas), Mock (barras hachuradas) e PTX3 (barras brancas). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

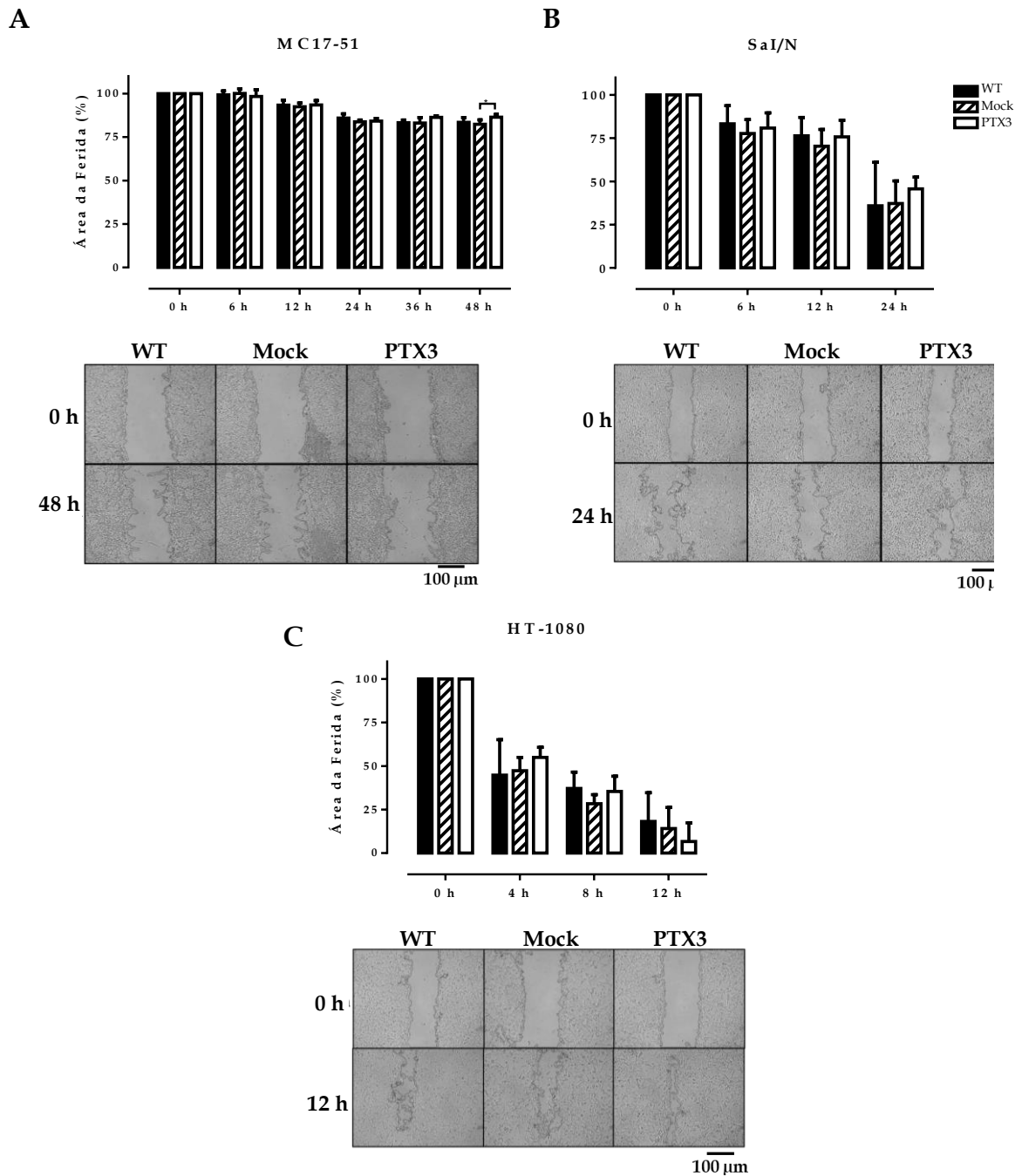


Figura 27 - Avaliação da migração celular das linhagens de fibrossarcoma MC17-51, SaI/N e HT-1080 transfectadas com PTX3.

Células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e SaI/N e de fibrossarcoma humano HT-1080 foram transfectadas com o plasmídeo pBABE/Puro contendo ou não o cDNA completo de PTX3 e analisadas quanto a migração celular por ensaio de *wound healing*. Em placas de 24 poços com a monocamada celular confluyente, foram realizadas duas lesões longitudinais por poço com auxílio de uma ponteira de 200 μ l. Um ponto específico da ferida foi fotografado em diferentes tempos e as imagens utilizadas para calcular a regeneração da lesão, mensurando a área livre de células utilizando o *software Image J* e o algoritmo WH_NJ. A) linhagem de fibrossarcoma murina MC17-51; B) Linhagem SaI/N; e C) Linhagem HT-1080. Painel superior gráfico da área da ferida pelo tempo e painel inferior, imagens representativas das lesões em diferentes tempos.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre os grupos WT, Mock e PTX3. WT (barras pretas), Mock (barras hachuradas) e PTX3 (barras brancas). * $p < 0,05$.

4.3.6 Ensaio de Tumorigênese

Diante da evidência do efeito antiproliferativo de PTX3 observado nas linhagens MC17-51 e HT-1080 *in vitro*, foram realizados ensaios de tumorigênese em modelo murino para avaliar se a superexpressão da proteína teria o mesmo efeito inibitório na progressão dos tumores *in vivo*. Foi observada uma redução significativa no tempo de aparecimento, volume e peso dos tumores induzidos nos camundongos pela injeção das células MC17-51_PTX3 (volume: $112,6 \text{ mm}^3 \pm 50,16$; peso: $0,28 \text{ g} \pm 0,04$) em relação aos tumores induzidos pelas células MC17-51_Mock (volume: $168,2 \text{ mm}^3 \pm 73,88$; peso: $0,43 \text{ g} \pm 0,05$) (Figura 28A). De maneira semelhante, nos tumores induzidos pela linhagem humana nos animais NOD/Scid foi observada uma diminuição estatisticamente significativa do tempo de aparecimento, volume e peso dos tumores induzidos por HT-1080_PTX3 (volume: $58,47 \text{ mm}^3 \pm 27,45$; peso: $0,12 \text{ g} \pm 0,02$) em relação aos tumores induzidos por HT-1080_Mock (volume: $153,5 \text{ mm}^3 \pm 67,83$; peso: $0,37 \text{ g} \pm 0,02$) (Figura 28B). Logo, PTX3 foi capaz de inibir a proliferação das linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e HT-1080 *in vitro* e o crescimento dos tumores induzidos experimentalmente por essas linhagens nos camundongos.

4.3.7 Mecanismos Adjacentes ao Efeito Antiproliferativo de PTX3

Visto que a superexpressão de PTX3 causou um efeito inibitório sobre a proliferação das células de fibrossarcoma *in vitro* e sobre o crescimento tumoral *in vivo* e que dados na literatura mostram que o efeito antiproliferativo e antitumoral de PTX3 é, pelo menos em parte, mediado por sua interação com ligantes da via de sinalização de FGF (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013; Ronca *et al.*, 2015), nós investigamos se o efeito antiproliferativo e antitumoral desencadeado por PTX3 nos tumores de fibrossarcomas ocorre pela interferência da pentraxina na via de sinalização de FGF. Para responder essa hipótese, a expressão proteica de membros ativos da via de FGF foi analisado por Western blot. Nas células MC17-51 a superexpressão de PTX3 diminuiu significativamente a expressão dos principais receptores de FGF2, pFGFR1 e pFGFR3, em relação às células transfectadas somente com o plasmídeo vazio (Figura 29). Além disso, há uma diminuição dos fatores de transcrição fosforilados do final da via, pAKT e pERK, o que indica que os mesmos não foram ativados e ocorre uma redução da sinalização por essa via. Em HT-1080, assim como em MC1751, a superexpressão de PTX3 promove um decréscimo na ativação de pFGFR3 e pAKT. Contudo, não houve alteração dos níveis de pFGFR1 e pERK. Esse resultado mostra que PTX3 interfere diretamente na via de FGF nas linhagens de fibrossarcoma e que, sua ação de inibição da proliferação celular *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo* se deve, pelo menos em parte, a esse mecanismo biológico.

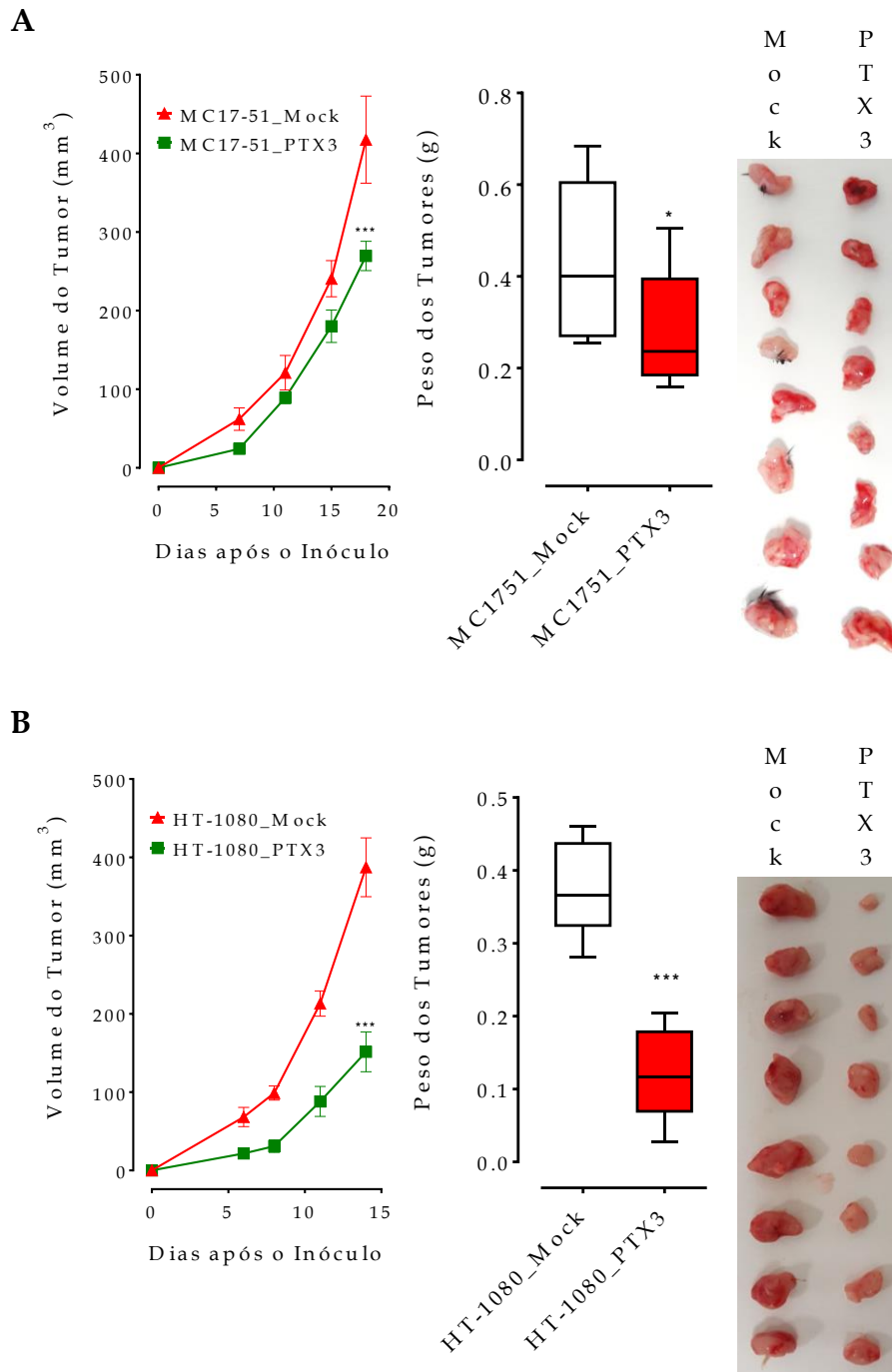


Figura 28 - Tumorigênese experimental em modelo murino utilizando linhagens transfectadas com PTX3.

As linhagens de fibrossarcoma MC17-51 (murina) e HT-1080 (humana) foram transfectadas com pBABE/Puro contendo ou não o cDNA completo de PTX3 e foram utilizadas para induzir tumores experimentalmente *in vivo*. Camundongos machos com 6-7 semanas de idade da linhagem C57BL/6 foram inoculados bilateralmente nos flancos traseiros por inóculos subcutâneos contendo 1×10^6 células de MC17-51_PTX3 ou MC17-51_Mock. Já animais da linhagem NOD/Scid foram inoculados com 3×10^6 células de HT-1080_PTX3 ou HT-1080_Mock. O desenvolvimento dos tumores foi acompanhado e o volume mensurado com auxílio de um paquímetro. Quando os tumores atingiram um volume de 400 mm³, eles foram extraídos cirurgicamente, pesados e fotografados. A) Tumores induzidos pelas células da Linhagem de fibrossarcoma murina MC17-51; B) Tumores induzidos pelas células da Linhagem humana HT-1080 em camundongos NOD/SCID.

Teste ANOVA Two-way, comparação entre os tumores Mock e PTX3. *** $p < 0,001$.

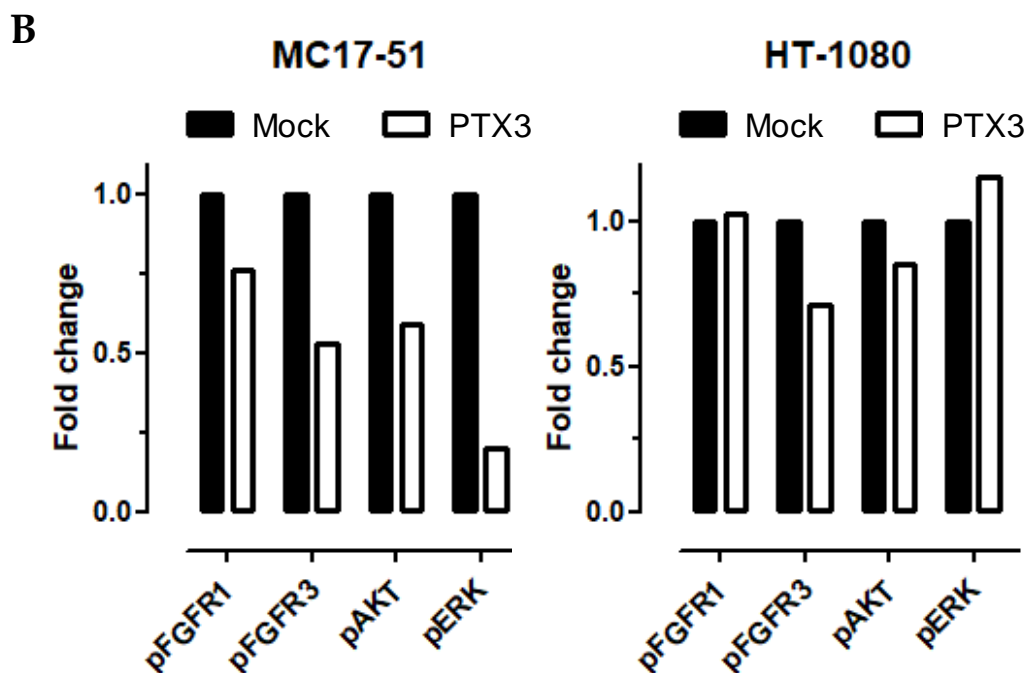
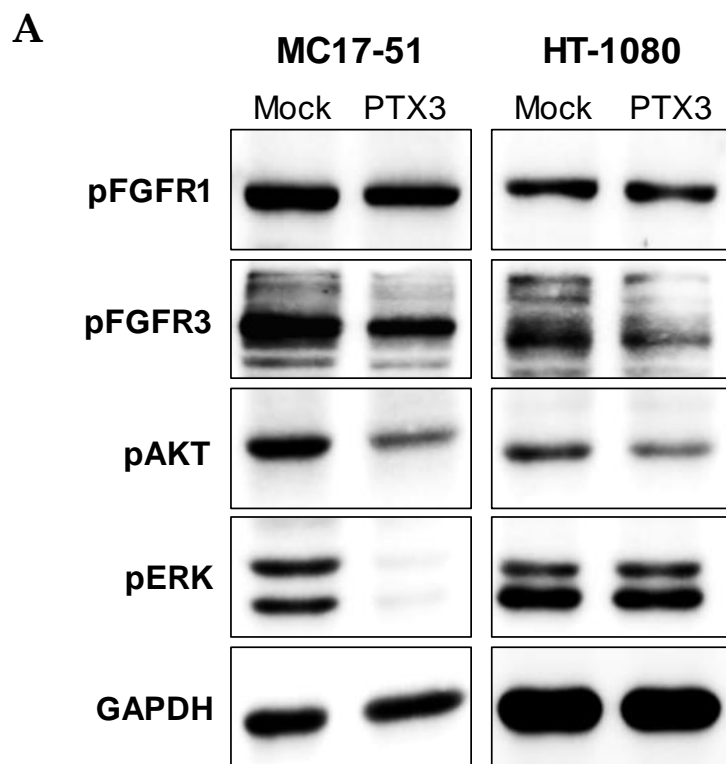


Figura 29 - Expressão proteica dos membros da via de sinalização de FGF em resposta a superexpressão de PTX3 nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e HT-1080.

Células das linhagens de fibrossarcoma MC17-51 (murina) e HT-1080 (humana) foram transfectadas com pBABE/Puro contendo (PTX3) ou não (Mock) o cDNA humano completo de PTX3 e foram analisadas por *western blot* quanto à expressão de membros ativados da via de sinalização de FGF: pFGFR1, pFGFR3, pAKT e pERK. A proteína constitutiva GAPDH foi utilizada como normalizadora da quantidade de proteína aplicada. A) *Western blot* da expressão proteica dos membros ativados da via de sinalização de FGF. B) Densitometria da expressão proteica normalizada pela expressão de GAPDH.

5 – DISCUSSÃO

Desde sua descoberta, no início dos anos 90 (Lee *et al.*, 1990; Breviario *et al.*, 1992), estudos visando a caracterização funcional da proteína Pentraxina 3 vem sendo realizados e os resultados tem mostrado que ela é uma proteína pleiotrópica que exerce múltiplos papéis em diferentes processos biológicos (Garlanda *et al.*, 2018). Assim, como as pentraxinas curtas, PTX3 tem sido caracterizada como um receptor de reconhecimento de padrões solúveis, desempenhando um papel chave no braço humoral da imunidade inata e possuindo, ainda, função não-reduntante no reconhecimento de patógenos, como fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas e alguns tipos de vírus (Garlanda *et al.*, 2002; Garlanda *et al.*, 2018). Na inflamação, PTX3 se comporta como uma proteína de fase aguda, cujos níveis plasmáticos normalmente baixos, aumentam de forma rápida e dramática durante o choque endotóxico, a sepse e condições inflamatórias e infecciosas (Garlanda *et al.*, 2002; Garlanda *et al.*, 2018). Uma vez que a expressão de PTX3 tem sido associada à inflamação, essa proteína tem sido proposta como um biomarcador em potencial de várias condições patológicas. Além de ser um marcador de inflamação, alguns estudos mostram que PTX3 atua na reparação de feridas, remodelamento tecidual e fertilidade feminina (Garlanda *et al.*, 2018). Por ter uma função importante nos processos imunológicos e inflamatórios, PTX3 desempenha um papel relevante na biologia de várias doenças, entre elas, as neoplasias (Magrini *et al.*, 2016; Garlanda *et al.*, 2018; Giacomini *et al.*, 2018).

O crescimento tumoral é resultado de um complexo, todavia, ainda não completamente elucidado, processo de interações entre células malignas heterogêneas e geneticamente instáveis, uma diversidade de outros tipos celulares e componentes não celulares. As células tumorais, fibroblastos associados ao tumor, células endoteliais e células do infiltrado imune, tais como, macrófagos, linfócitos, mastócitos e outras células mieloides, estabelecem, portanto, um *loop* de interações autócrinas e parácrinas que afetam profundamente a progressão do tumor. Além disso, essas células contribuem para a deposição de matriz extracelular, que ativamente participa da modulação do microambiente tumoral (Ronca *et al.*, 2018).

A inflamação também é um componente essencial do MT, que afeta diretamente o desenvolvimento e crescimento do tumor, cujo efeito pode ser tanto favorável, quanto desfavorável ao “ciclo de vida” do tumor (Mantovani, Allavena, *et al.*, 2008). Outro importante processo que contribui para o desenvolvimento do tumor é a angiogênese (Hanahan e Weinberg, 2011). A angiogênese é um processo natural de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes (Folkman e Klagsbrun, 1987; Carmeliet e Jain, 2011). Esse processo biológico é finamente regulado por um balanço entre fatores pró e

anti-angiogênicos e o desbalanço desses fatores pode favorecer o aparecimento de doenças angiogênicas, dentre elas o câncer (Presta *et al.*, 2007). Nas neoplasias, a neovascularização é estimulada pela própria massa tumoral, a fim de recrutar vasos sanguíneos que promovem a nutrição do tumor em formação (Van Hinsbergh *et al.*, 1999).

Dado o já bem estabelecido papel de PTX3 durante a deposição de matriz, a inflamação e a angiogênese, era de se esperar que essa proteína tivesse um papel relevante no processo tumoral, o que, de fato, vem sendo comprovado. Todavia, nesse contexto as funções de PTX3 são controversas, a proteína ora apresenta função oncopromotora, e ora oncosupressora. Portanto, o papel de PTX3 durante o desenvolvimento neoplásico precisa ser mais estudado (Giacomini *et al.*, 2018).

A dualidade funcional de PTX3 no câncer parece ser estritamente relacionada com o tipo de câncer, a fonte celular que origina o tumor e o MT (Giacomini *et al.*, 2018). Sabe-se que o gene *PTX3* encontra-se superexpresso em alguns tumores e que essa supressão pode ser indicadora de um pior prognóstico (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010; Diamandis *et al.*, 2011; Tafani *et al.*, 2011; Kondo *et al.*, 2013; Locatelli *et al.*, 2013; Pavlou *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Infante *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Player *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017). Além disso, PTX3 parece modular a inflamação tumoral dependente do complemento (Bonavita *et al.*, 2015). Particularmente, no grupo dos sarcomas, foi reportada a expressão aumentada de PTX3 em sarcoma de Kaposi (Klouche *et al.*, 2002) e lipossarcoma (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010), no qual a diminuição dos níveis de PTX3 foi associada a uma resposta positiva ao tratamento medicamentoso antitumoral com trabectina e, conseqüentemente, melhora no quadro clínico dos pacientes (Germano *et al.*, 2010). Em contrapartida, o promotor do gene *PTX3* foi encontrado altamente metilado em angiossarcoma, leiomiossarcoma e sarcoma sinovial (Bonavita *et al.*, 2015), indicando a dualidade de papéis de PTX3 dentro do grupo dos sarcomas. Entretanto, apesar desses trabalhos, nada se sabia sobre o papel de PTX3 no desenvolvimento dos fibrossarcomas e, a fim de preencher essa laguna, esse trabalho foi desenvolvido.

Os fibrossarcomas são tumores mesenquimais raros e malignos, originados de fibroblastos transformados/hiperproliferados (Folpe, 2014). Esses tumores podem ser divididos em 2 grupos: os fibrossarcomas do tipo infantil/congênito, com características malignas intermediárias e metástases raras, e os fibrossarcomas do tipo adulto, que são tumores malignos (Augsburger *et al.*, 2017). Embora a incidência dos fibrossarcomas adultos, seja baixa, aproximadamente apenas 3,6% de todos os sarcomas adultos (Toro *et al.*, 2006), as opções terapêuticas são limitadas e o prognóstico geralmente é ruim. De fato, apesar da

classificação histopatológica ser considerada o indicador de prognóstico mais importante, independentemente do grau, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 40-60% e a taxa de sobrevida em 10 anos é de 60% para tumores com um grau baixo e de 30% para alta (Coindre, 2006; Bahrami e Folpe, 2010). Até o momento, a cirurgia, juntamente com a radioterapia e a quimioterapia, representam as abordagens terapêuticas padrão para o tratamento dos sarcomas localizados em tecidos moles. Contudo, um número elevado de pacientes com fibrossarcoma não responde ou apresentam baixa resposta à radioterapia e desenvolvem resistência a múltiplas drogas utilizadas na quimioterapia (Slovak *et al.*, 1988). Dessa forma, dada à dificuldade de tratamento e agressividade do tumor, é relevante o entendimento da biologia desse tipo tumoral e a descoberta de novas abordagens terapêuticas que visem parar o seu desenvolvimento e garantir qualidade de vida e maior sobrevida aos pacientes acometidos pela doença. A fim de contribuir nesse contexto, nós buscamos entender o papel de PTX3 no desenvolvimento desses tumores.

Inicialmente, tratamos linhagens celulares murinas com a proteína Ptx3 recombinante murina. Nossos resultados demonstram que Ptx3 promove um aumento da proliferação celular das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51, tanto em meio com o baixo estímulo pró-proliferativo do SFB, quanto em meio com alto estímulo (meio com SFB 2 e 10%, respectivamente) e em Sal/N somente em meio com baixa concentração de SFB (Figura 12). Todavia, Ptx3 não alterou a taxa proliferativa do fibroblasto murino NIH/3T3 em meio com SFB em baixa ou alta concentração. Nessa linhagem é possível observar que as células apresentaram dificuldade de crescerem em meio suplementado com 2% de SFB, demonstrando que essa linhagem é mais dependente de estímulos pró-proliferativos exógenos que as células tumorais.

Como o SFB é um suplemento para meios de cultura celular que contém grandes quantidades de ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas, os quais tem por finalidade promover o crescimento das células (Zhang *et al.*, 2006), optamos por usá-lo em baixa e alta concentração a fim de garantir que seu efeito pró-proliferativo não mascarasse um possível efeito também pró-proliferativo de Ptx3. De fato, observamos que na linhagem Sal/N a alta concentração de SFB se sobrepõe ao efeito pró-proliferativo de PTX3, que foi observado apenas no meio com baixo estímulo de SFB.

A metástase é um processo no qual as células cancerosas se disseminam do tumor primário e se estabelecem e crescem em outros sítios, sejam eles distantes ou não. Esse processo é considerado a principal causa de mortalidade associada ao câncer, sendo responsável por 90% das mortes causadas pela doença (Seyfried e Huysentruyt, 2013; Guan, 2015; Kochanek *et al.*, 2018). O processo metastático é favorecido por algumas habilidades

adquiridas e desenvolvidas pelas células do tumor. Primeiro, a habilidade em migrar, seguida pela capacidade de degradar a matriz extracelular, pela sobrevivência no sangue e pela capacidade de se estabelecer em um ambiente tecidual novo (Mbeunkui e Johann, 2009; Hanahan e Weinberg, 2011).

Outra característica das células tumorais que favorece a disseminação do tumor é a capacidade de sobreviver e crescer independentemente da presença de substratos que simulem a matriz extracelular e sem o contato com células adjacentes. Essas características estão intrinsecamente relacionadas ao potencial tumorigênico da célula, uma vez que a possibilidade de crescer independente da ancoragem e de forma isolada favorecem a sobrevivência e crescimento em locais inóspitos, bem como beneficiam o potencial invasivo, facilitando a metástase (Growth, 2012). Nesse sentido, nós avaliamos os efeitos de Ptx3 tanto sobre a taxa de migração celular quanto sobre a capacidade de crescimento independente da ancoragem, das células de fibrossarcoma.

Como mostrado na figura 13, pelo ensaio de *Soft agar* foi possível observar um efeito positivo de Ptx3 sobre o desenvolvimento tumoral, visto que a presença de Ptx3 aumentou a formação de colônias capazes de crescer independentes da ancoragem em células da linhagem MC17-51 em relação ao grupo controle. Entretanto, não foi observada alteração do tamanho das colônias formadas. Já nas linhagens Sal/N e NIH/3T3 não foram observadas alterações na taxa de formação de colônias capazes de crescer independentemente da ancoragem, tampouco no tamanho das colônias formadas.

Nenhuma alteração foi verificada na taxa de migração celular induzida por Ptx3 nas linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e Sal/N (Figura 14 e 15, respectivamente), tampouco no fibroblasto NIH/3T3 (Figura 16). Mesmo quando as células foram previamente tratadas com mitomicina C, não foi observada alteração na taxa migratória de nenhuma das três linhagens. A MMC é um antimetabólito derivado de *Streptomyces caespitosus* que atua bloqueando a replicação do DNA e RNA e inibindo a síntese proteica (Wallau, 2005). Esse antibiótico foi utilizado com o objetivo de evitar a proliferação celular durante o ensaio e garantir que a regeneração da lesão ocorresse exclusivamente em decorrência da migração celular.

Em resumo, nossos dados *in vitro* apontam que o tratamento com a proteína Ptx3 recombinante parece ter um papel que contribuiria positivamente para o desenvolvimento dos fibrossarcomas por induzir a proliferação celular e aumentar o número de colônias capazes de crescer independente da ancoragem. Germano e colaboradores (2010), mostraram que os lipossarcomas humanos, outro tipo de sarcoma de tecido mole, são

constituídos por um microambiente tumoral altamente inflamatório no qual PTX3 tem um importante papel favorecendo o desenvolvimento do tumor.

Em outro estudo do nosso grupo, vimos que o tratamento da linhagem de melanoma humano SK-MEL-37 com a proteína PTX3 recombinante humana inibiu a proliferação e a migração celular e aumentou significativamente o número de colônias capazes de crescer independentes da ancoragem, contudo, diminuindo o tamanho das colônias formadas (Nunes, 2018). Esses resultados indicam um possível potencial antitumoral de PTX3 no desenvolvimento dos melanomas e se contrapõem ao efeito pró-tumoral encontrado nas células de fibrossarcomas murinos, reforçando a hipótese da dualidade de papéis atribuídas a PTX3 na progressão tumoral dependente do tipo celular. Corroborando com a hipótese do efeito antitumoral de PTX3 no desenvolvimento dos melanomas, Ronca e colaboradores em 2013 verificaram na linhagem de melanoma murino B16F10 transfectada com o cDNA completo de PTX3, a inibição da proliferação e migração celular e uma diminuição do tamanho das colônias capazes de crescer independentemente da ancoragem por ensaio de *Soft agar*, bem como, uma diminuição do tamanho desses tumores experimentalmente induzidos em camundongos pelas linhagens superexpressando PTX3. Nesse caso, o efeito inibitório de PTX3 sobre os melanomas foi atribuído a sua interação com FGF2 e consequente redução das atividades pró-proliferativa, angiogênica e tumorais promovidas por esse fator (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). De maneira semelhante, foi observada redução da proliferação de células de adenocarcinoma de próstata com expressão aumentada de PTX3 e de tumores induzidos por essas linhagens em camundongos. Nessa situação, o efeito inibitório de PTX3 também foi atribuído a sua interação com FGF8b, outro membro da família de FGF (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

A via de FGF desempenha um papel chave na tumorigênese e angiogênese tumoral (Ahmad *et al.*, 2012). Os FGFs são importantes agentes mitogênicos e angiogênicos (Daniele *et al.*, 2012). Particularmente, a superexpressão de FGF2 pode contribuir para a progressão dos fibrossarcomas, facilitando a transformação dos fibroblastos e aumentando a agressividade do tumor, a neovascularização e o potencial metastático (Moscatelli e Quarto, 1989; Nissen *et al.*, 2007). Dessa forma, muitos esforços têm sido despendidos a fim de descobrir agentes que possam, de alguma forma, interferir nesta via e serem usados na terapia de doenças onde a via encontra-se alterada, incluindo as neoplasias (Presta *et al.*, 2005; Alessi *et al.*, 2009; Daniele *et al.*, 2012; Presta *et al.*, 2017). Em estudos anteriores, nosso grupo avaliou a expressão de elementos da via de FGF em linhagens de fibrossarcoma murinos e humano. As linhagens murinas MC17-51 e Sal/N expressam constitutivamente FGF2 e seus receptores (Rodrigues, 2014), bem como a linhagem humana HT-1080 (Nunes, 2014). A presença de FGF2 e seus receptores nessas linhagens

pode indicar a atividade dessa via de sinalização para a manutenção das células de fibrossarcoma e sugerir a via como alvo na terapia desses tumores.

A fim de avaliar o quanto a via de FGF é afetada por Ptx3 nos fibrossarcomas, as linhagens murinas MC17-51 e Sal/N foram tratadas com a proteína recombinante e a expressão de genes relacionados à via de FGF foram avaliadas por RT-qPCR. Além desses genes, avaliamos também a expressão de *Vegfa*, *Il1b*, *Tnfa* e *Ptx3*. Como pode ser observado na figura 19A, na linhagem MC17-51, o tratamento com rmPtx3 na dose e tempo utilizados modulou negativamente, a nível de RNA mensageiro, a expressão de *Fgf2* e positivamente a expressão de *Fgfbp*, proteína de ligação a FGF que promove sua liberação da membrana, tornando o fator disponível para se ligar aos receptores na membrana plasmática e, dessa forma, desempenhar suas atividades biológicas (Naski e Ornitz, 1998). Nenhum dos receptores de FGF teve sua expressão alterada pelo tratamento com rmPtx3, assim como o fator pró-angiogênico *Vegfa* e os fatores pró-inflamatórios *Il1b* e *Tnfa* e do próprio gene *Ptx3*. Já na linhagem Sal/N, *Ptx3* e *Fgf2* foram ligeiramente modulados positivamente, enquanto, *Vegfa* foi modulado negativamente em resposta a presença de Ptx3 na dose e tempo utilizados.

Embora FGF2 seja um potente agente mitogênico (Gospodarowicz, 1975; Gospodarowicz, Weseman, *et al.*, 1975), cujas atividades biológicas são inibidas por PTX3 (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Leali *et al.*, 2010; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013), a linhagem MC17-51 teve a expressão de *Fgf2* modulada negativamente em resposta ao tratamento com Ptx3. Apesar disso, sua proliferação foi estimulada pelo tratamento com a proteína e foi verificado um maior número de colônias que foram capazes de crescer independentemente da ancoragem. Em contrapartida, Sal/N, que foi menos responsiva ao tratamento com Ptx3 nos ensaios funcionais, apresentou uma modulação positiva de *Fgf2*. Esses resultados demonstram que PTX3 parece apresentar um papel modulador na via de sinalização de FGF, porém essa via pode não ser a principal via responsável pela proliferação celular nessas linhagens de fibrossarcomas. Nesse contexto, parece existir outra via de sinalização, ainda não elucidada, que responde ao tratamento com PTX3 e, através disso, controla a proliferação celular. Entretanto, para esclarecer qual seria essa via, são necessários mais estudos. Nesse cenário a via de sinalização EGF surge com uma possível candidata, uma vez que por estimular a via de EGF, PTX3 apresenta um efeito pró-tumoral nos cânceres HNSCC (Chang *et al.*, 2015).

Outra hipótese para os resultados encontrados é que FGF2 pode inibir a proliferação celular nas linhagens de fibrossarcoma e o tratamento com Ptx3 reverte esse efeito e promove a proliferação. Apesar de ser considerado como importante fator mitogênico, alguns estudos

demonstraram que FGF2 pode inibir a proliferação celular em alguns casos (Liu *et al.*, 1998; Oesterle *et al.*, 2000). O tratamento com FGF2 pode estimular a proliferação de células de câncer de mama MCF-7, porém, quando essas células foram transfectadas para superexpressar a proteína de transdução de sinais RAS (MCF-7Ras), FGF2 inibiu a proliferação celular. O efeito dual de FGF2 sobre a proliferação celular dessas linhagens de câncer de mama foi atribuído a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) na via de sinalização de MAPK (Liu *et al.*, 1998). Como pode ser observado na figura 7, a proteína Ras é uma das proteínas de transdução de sinais da via MAPK ativada por FGF, que culmina na indução da proliferação celular (Ornitz e Itoh, 2015). A maior produção de RAS na linhagem MCF-7Ras faz com que as MAPK sejam ativadas de uma maneira constante pelo tratamento com FGF2, ocasionando a inibição da proliferação celular. Em contrapartida, na linhagem MCF-7 com produção normal de RAS, FGF2 ativa transientemente MAPK e isso ocasiona uma estimulação da proliferação celular (Liu *et al.*, 1998).

Os cânceres de mama são reportados com um dos tipos tumorais em que PTX3 desempenha um papel pró-tumorigênico. Níveis locais e séricos altos de PTX3 tem sido relatados em pacientes com tumores de mama (Tafani *et al.*, 2010; Tafani *et al.*, 2011; Pavlou *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Player *et al.*, 2017) e, além disso, essa proteína foi associada a um aumento da migração e invasão desse tipo tumoral (Choi *et al.*, 2014). A expressão de RAS é considerada importante para o desenvolvimento dos cânceres de mama, sendo associada com a maior agressividade do tumor (Spandidos *et al.*, 1989; Calaf e Abarca-Quinones, 2016). Sendo assim, pode-se extrapolar e pensar que nesses tumores a ativação constitutiva de MAPK pelo aumento de RAS, pode aumentar a proliferação celular e o desenvolvimento do tumor.

Trazendo essa hipótese para o contexto dos fibrossarcomas, sabe-se que as linhagens de fibrossarcoma MC17-51 e Sal/N expressam constitutivamente FGF2, pode-se pensar que, uma vez produzido, esse fator pode ativar constitutivamente a via MAPK e, conseqüentemente, controlar de forma negativa a proliferação celular. Dessa forma, quando as linhagens são tratadas com Ptx3, a pentraxina é capaz de sequestrar FGF2 do meio e, ainda, diminuir sua expressão na linhagem MC17-51 (mais responsiva ao tratamento com Ptx3), fazendo com que a via de MAPK não esteja mais constitutivamente ativa e, em consequência, a proliferação celular é aumentada. Além disso, a cascata de sinalização MAPK regula a ativação de NF-kappa B (NF-kB) (Schulze-Osthoff *et al.*, 1997), um fator de transcrição que desempenha um papel crucial na regulação de numerosos genes envolvidos no controle da resposta inflamatória, incluindo o gene *PTX3* (Bottazzi *et al.*, 2006), cujo

promotor possui sítios de ligação para o fator transcricional NF-kb (Breviario *et al.*, 1992). NF-kB regula a proliferação celular do epitélio mamário (Brantley *et al.*, 2001). Pode-se pensar que a desregulação positiva da cascata de sinalização de MAPK por FGF2, pode aumentar a ativação de NF-kB, que aumenta a transcrição do gene *PTX3* nos tumores de mama, culminando no aumento da proliferação celular nesses tumores. De fato, gene *PTX3* encontra-se altamente expresso nos tumores de mama (Giacomini *et al.*, 2018). Diante dessa hipótese, dentro do contexto dos fibrossarcomas, pode-se pensar que a maior produção de *PTX3* pode intensificar o efeito da proteína recombinante exógena e aumentar o sequestro de FGF2 e diminuição do seu efeito inibitório sobre a via de MAPK, culminando no aumento da proliferação celular. Todavia, para testar essas hipóteses são necessários mais ensaios visando a análise da expressão gênica, tanto basal, quanto após o tratamento com *Ptx3*, de Ras, MAPK, NF-kB e outros componentes da via de sinalização nas linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N.

Embora tenhamos detectado o efeito de *PTX3* sobre as linhagens de fibrossarcoma murino, nenhuma resposta ao tratamento com a proteína foi observada no fibroblasto murino NIH/3T3. A linhagem NIH/3T3 foi utilizada como controle experimental de linhagem não tumorigênica, permitindo avaliar se as células tumorigênicas e não-tumorigênicas respondem da mesma forma a *Ptx3*. Porém, embora esse fibroblasto murino não seja tumorigênico, não se trata de uma célula normal, mas sim de uma linhagem imortalizada. As células do fibroblasto embrionário NIH/3T3 são derivadas de uma cultura de células de fibroblasto embrionário de camundongos da linhagem *Swiss* e foi isolada em 1962 na Escola de Medicina do Departamento de Patologia da Universidade de Nova Iorque por George Todaro e Howard Green. O código 3T3 refere-se à transferência de células e protocolo de inoculação da linhagem, e significa "transferência a cada 3 dias de um inóculo de 3×10^5 células". Usando este protocolo, a linhagem celular imortalizada começou a proliferar e se estabilizar em cultura após cerca de 20-30 gerações de crescimento *in vitro* (Line, 2016). Além disso, apesar dos fibroblastos serem capazes de produzir *PTX3* (Lee *et al.*, 1990; Breviario *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993), esse tipo celular responde fracamente ao tratamento com essa proteína. *PTX3* recombinante humana foi capaz de modular a expressão de vários genes em macrófagos murinos, todavia, na linhagem de fibroblasto humano imortalizado GM-637, poucos genes foram modulados (Marques, 2008).

Estudos *in vitro*, utilizando tecidos tumorais removidos de pacientes em estágios avançados de desenvolvimento, são importantes ferramentas para pesquisas sobre as neoplasias. Apesar disso, essa abordagem não possibilita o estudo do MT como um todo. Sendo a complexidade do MT, que é composto por vasos sanguíneos circundantes, células do sistema imune, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea, linfócitos,

MEC moléculas sinalizadoras e proteínas produzidas por todos os tipos celulares presentes no tumor e que suportam o seu crescimento (Mantovani, Allavena, *et al.*, 2008), fica limitada a poucos aspectos nos estudos *in vitro*. Assim, como complementação a esses estudos, são relevantes estudos *in vivo* que permitam analisar, não somente o microambiente tumoral como um todo, mas toda a resposta do organismo e sua complexidade de interações biológicas (Katt *et al.*, 2016). Dessa forma, buscando outra abordagem para entender melhor o efeito de PTX3 sobre os fibrossarcomas e visando a viabilidade de avaliar o efeito de PTX3 *in vivo*, nós transfectamos linhagens celulares de fibrossarcoma com o plasmídeo pBABE/Puro contendo o cDNA completo de PTX3 e, conseqüentemente, essas linhagens passaram a superexpressão a proteína.

Com o objetivo de conferir um aspecto translacional ao estudo, mais uma linhagem de fibrossarcoma foi acrescentada ao grupo experimental, a linhagem HT-1080, de fibrossarcoma humano. Essa linhagem foi isolada em 1972 e é proveniente de tumor de fibrossarcoma de um paciente do sexo masculino, caucasiano e com 35 anos de idade (Rasheed *et al.*, 1974).

Contrariamente aos resultados pró-tumorais encontrados após o tratamento das linhagens de fibrossarcoma com a proteína Ptx3 recombinante murina, a superexpressão de PTX3 nas linhagens MC17-51 e HT-1080 teve um efeito antiproliferativo e antitumoral. A proliferação celular dessas linhagens foi inibida pela superexpressão de PTX3 (Figura 23), bem como a formação de colônias que crescem independente da ancoragem (Figura 25) e que crescem aderidas (Figura 26).

Apesar do efeito antitumoral de PTX3 sobre a linhagens de fibrossarcoma humano HT-1080 e murino MC17-51, na linhagem murina Sal/N a superexpressão de PTX3 não alterou a taxa de proliferação celular ou formação de colônias. Embora MC17-51 e Sal/N sejam linhagens murinas, as diferenças observadas entre as duas células podem ser devido a características biológicas distintas. Entretanto, na literatura, há poucos estudos que utilizem essas linhagens e, conseqüentemente, há poucas descrições a cerca da biologia de ambas. Sabe-se que os tumores dos quais as células foram extraídas foram gerados experimentalmente em camundongos por compostos químicos. Sal/N foi gerada pelo tratamento de camundongos da linhagem A/Jax com dibenzoantraceno, que é um hidrocarboneto aromático policíclico com 5 anéis benzeno (C₂₂H₁₄) (Baskar *et al.*, 1995). Enquanto, MC17-51 foi originada pela indução de um fibrossarcoma murino, chamado de MC1A, pela injeção de metilcolantreno, um hidrocarboneto aromático policíclico altamente carcinogênico (C₂₀H₁₆), em camundongos machos da linhagem C57BL/10. Desse tumor, foi isolada uma variante denominada MC1A-C1, que foi capaz de crescer tanto *in vitro*, como um tumor

subcutâneo em camundongos C57BL/6. As células MC1AC1 foram tratadas com N-metil-N-nitrosourea (MNU), e selecionado com baixas concentrações de 6-tioguanina. Clones resistentes a 6-tioguanina (*HPRT*⁻) foram isolados e pesquisados quanto a tumorigenicidade, sendo o clone MC-TRG17 selecionado. MC-TGS17-51 foi o 51^o mutante espontâneo selecionado que foi sensível a 6-tioguanina (*HPRT*⁺) (Wilkinson *et al.*, 1995).

Visto que somente as linhagens MC17-51 e HT-1080 responderam *in vitro* à superexpressão de PTX3, elas foram utilizadas na indução de tumores experimentais em modelos de camundongo. A célula murina MC17-51 foi inoculada em camundongos do mesmo *background* genético das células (C57BL/6), já HT-1080, por se tratar de uma linhagem humana, foi inoculada em animais imunodeficientes NOD/Scid. Em ambos os casos, os tumores que foram gerados pelas células que superexpressavam PTX3 apresentaram volume e peso reduzidos em relação aos tumores provenientes pelo inóculo das células transfectadas apenas com os plasmídeos vazios (Figura 28). Corroborando com a hipótese de que a expressão aumentada de PTX3 tem um efeito antitumoral no desenvolvimento dos fibrossarcomas.

A superexpressão de PTX3 também diminuiu a proliferação celular e formação de colônias e reduziu o volume e peso de tumores induzidos por essas linhagens em melanoma murino B16F10 (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013), em adenocarcinoma de próstata TRAMP-C2 (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013) e nas linhagens de HSCC EC109 e KYSE-450 (Ma *et al.*, 2016). Embora não tenha sido avaliado nas linhagens esofageais, nas linhagens de melanoma e próstata a diminuição da proliferação e da formação de colônias por PTX3 foi atribuída a capacidade que essa proteína tem de se ligar a FGF2 e FGF8 e inibir suas atividades biológicas (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Assim, nós também avaliamos se o efeito proliferativo e antitumoral promovido pela superexpressão de PTX3 foi resultante do seu papel inibitório sobre a via de FGF, em decorrência do sequestro das moléculas de FGF do meio. Como hipotetizado, a superexpressão de PTX3 promoveu uma diminuição a nível proteico dos receptores de FGF ativos, bem como de membros *downstream* da via de sinalização (Figura 29). Isso indica que assim como em tumores de próstata e melanoma, o efeito antiproliferativo e antitumoral de PTX3 se dá, pelo menos em parte, pela inibição da via de sinalização de FGF.

Como pode ser observado na figura 27, embora a proliferação celular e a formação de colônias *in vitro* das linhagens MC17-51 e HT-1080 tenham sido diminuídas pela inibição da via de sinalização de FGF promovida pela superexpressão de PTX3, a maior produção da proteína não alterou a taxa de migração celular dessas linhagens. Isso pode indicar que nas

linhagens de fibrossarcoma, a via de sinalização de FGF não é o principal responsável por regular essa atividade biológica.

Em um desdobramento desse trabalho, camundongos transgênicos que produzem quantidades aumentadas de PTX3 e camundongos WT foram inoculados com células WT da linhagem MC17-51 e o desenvolvimento do tumor foi acompanhado (Anexo I). Os tumores que cresceram nos animais transgênicos apresentaram menor volume e peso, quando comparados com os tumores desenvolvidos nos animais WT. Além disso, por imunohistoquímica, foi verificada a diminuição da expressão do marcador de proliferação celular Ki67 e do marcador de angiogênese CD31 nos tumores extraídos dos animais transgênicos em comparação com os tumores dos animais WT. Esse resultado reforça o efeito antiproliferativo e antitumoral de PTX3 sobre o desenvolvimento dos fibrossarcomas e ainda demonstra que PTX3 exerce também um efeito inibitório sobre a angiogênese tumoral.

Apesar do seu potencial oncosupressivo, a complexa estrutura proteica de PTX3 limita o seu potencial farmacológico na clínica médica. Por essa razão, a busca por pequenas moléculas derivadas da macromolécula PTX3 e com o mesmo efeito biológico antitumoral representa uma vantagem para a abordagem translacional. Em 2015, Ronca e colaboradores fizeram uma triagem em banco de pequenas moléculas e chegaram a molécula NSC12, uma molécula química com estrutura semelhante à porção N-terminal de PTX3 capaz de interagir e sequestrar os membros da família de FGF e, por isso, chamada de “armadilhas de FGF”. O efeito das moléculas de NSC12 sobre o desenvolvimento de fibrossarcomas em modelo murino foi avaliado em colaboração com o Dr. Roberto Ronca (Anexo I). Animais NOD/Scid foram inoculados com células da linhagem HT-1080 WT e, após o aparecimento do tumor, os animais foram tratados diariamente pela via intraperitoneal com DMSO ou NSC12 (7,5 mg/kg). Foi observada uma diminuição significativa no volume e peso dos tumores gerados nos animais tratados com NSC12, em relação aos animais controle tratados com DMSO. Esse resultado reforça o efeito antitumoral de PTX3 no desenvolvimento dos fibrossarcomas e a ideia de que esse efeito se dá pela interação da proteína com os membros da família de FGF. Além disso, ele indica também uma perspectiva de uso de PTX3, através de seus derivados, na clínica médica para tratamento dos tumores, em especial os fibrossarcomas.

Nossos resultados após o tratamento das células de fibrossarcoma com a proteína recombinante *in vitro* são divergentes dos encontrados após a transfecção das células com o cDNA de PTX3. No modelo de tratamento das células com a proteína recombinante, a dose utilizada foi baseada em ensaios de análise de expressão de genes precoces e da atividade

fagocítica de macrófagos, realizados em intervalo de tempo de 3 horas (Marques, 2008). Assim, seria importante verificar se o mesmo comportamento seria observado em presença de doses mais altas da proteína recombinante. Em nossos ensaios os níveis tanto de PTX3 quanto de FGF no sobrenadante das células não foram dosados. Entretanto, embora também não tenha sido dosada a produção de PTX3 no sobrenadante das células transfectadas, pressupõe-se a partir dos dados obtidos por western (Figura 22) que os níveis de proteína produzidos por estas células são mais elevados do que os produzidos pelas células WT.

Outra suposição para a diferença funcional de PTX3 nos ensaios *in vitro*, é que não sabemos qual a estabilidade da proteína recombinante no sistema ao longo do tempo, tampouco se sua atividade biológica permanece inalterada. Pode ser que no primeiro momento, a proteína recombinante seja totalmente consumida e, portanto, seu efeito biológico ao longo do tempo seja alterado, em relação a presença constante da proteína no meio. Podemos supor ainda, que essa pentraxina não seja estável ao longo do tempo, sendo degradada ou sofrendo alguma modificação que altere seu efeito biológico. Mesmo que alguma dessas possibilidades aconteçam, o tempo de permanência e a dose de PTX3 utilizada nos tratamentos *in vitro* pode estimular a ativação de outra molécula e/ou via de sinalização pró-mitogênica ainda não identificada. Em contrapartida, a transfecção estável com o cDNA de PTX3 confere ao sistema quantidades constantes da proteína e sua disponibilidade contínua no contexto biológico, o que, em nosso ponto de vista, confere ao modelo maior robustez. E os ensaios *in vivo*, tanto com as células transfectadas, quanto usando os animais transgênicos, corroboram os resultados obtidos a partir deste modelo.

Nos ensaios *in vivo*, podemos observar uma acentuação dos efeitos antitumorais de PTX3 em relação ao *in vitro* com as células transfectadas. Como já mencionado anteriormente, os cânceres são compostos por uma heterogeneidade celular e um complexo MT que suporta o seu crescimento (Mantovani, Allavena, *et al.*, 2008; Hanahan e Weinberg, 2011). Desta forma, no contexto *in vivo*, os efeitos antitumorais de PTX3 se tornam mais contundentes uma vez que sua ação biológica também é exercida sobre outros componentes que constituem o MT e sobre outros processos importantes para a progressão tumoral como a inflamação e angiogênese. Ensaios *in vivo*, permitiram entender o importante papel de PTX3 na regulação da inflamação tumoral (Bonavita *et al.*, 2015). Durante a carcinogênese, essa proteína inibe a infiltração de macrófagos, a produção de citocinas e a angiogênese nos tumores mensequimais e epiteliais. Assim, são relevantes mais estudos que visem entender à ação de PTX3 sobre o MT dos fibrossarcomas e a seu papel na inflamação desses tumores.

6 – RESUMO DOS RESULTADOS

- *In vitro*, o tratamento com a proteína Ptx3 recombinante promoveu a proliferação celular dos fibrossarcomas murinos MC17-51 e Sal/N e aumentou o número de colônias da linhagem MC17-51 capazes de crescer independentemente da ancoragem sem interferir no tamanho das colônias formadas, porém não alterou a migração celular dessas linhagens de fibrossarcomas;
- O tratamento com a proteína Ptx3 recombinante murina modulou negativamente a expressão do gene *Fgf2* e positivamente o gene *Fgfbp*, no fibrossarcoma murino MC17-51; e, no fibrossarcoma da linhagem Sal/N, aumentou a expressão de *Ptx3* e *Fgf2* e diminuiu a expressão de *Vegfa*;
- A expressão aumentada de PTX3 nas células das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e humano HT-1080 inibiu a proliferação celular, reduziu o potencial clonogênico, o crescimento independente da ancoragem e o tamanho das colônias formadas;
- A superexpressão de PTX3 não alterou a taxa migratória das linhagens de fibrossarcoma murino MC17-51 e Sal/N e humano HT-1080;
- Em modelo experimental de tumorigênese em camundongos, a superexpressão de PTX3 inibiu o crescimento dos fibrossarcomas induzidos pelas linhagens MC17-51 e HT-1080;
- PTX3 modulou negativamente a ativação da via de sinalização de FGF nas células das linhagens MC17-51 e HT-1080 transfectadas com PT

7 – CONCLUSÃO

PTX3 interfere na taxa proliferativa e formação de colônias dos fibrossarcomas *in vitro* e inibe o crescimento de fibrossarcomas *in vivo*, e um dos mecanismos envolvidos é a modulação negativa da via de sinalização de FGF.

8 – PERSPECTIVAS

Embora os estudos a cerca da ação biológica de PTX3 no desenvolvimento de tumores tenham sofrido grande impulso na última década, mais pesquisas são necessárias, uma vez que PTX3 parece apresentar um efeito dual dependente do contexto tecidual e dos níveis produzidos desta proteína no microambiente tumoral. Esses novos estudos científicos serão importantes para que se possa avaliar o papel de PTX3 no desenvolvimento tumoral, a fim de explorar o seu efeito antitumoral em alguns tipos de tumores bem como desenvolver abordagens terapêuticas para inibir a sua ação pró-tumoral, em outros casos. Além disso, também é fundamental a investigação de PTX3 como um biomarcador para diagnóstico e prognóstico de alguns tipos de neoplasias. Dentro desse contexto, esse trabalho contribui para o entendimento de PTX3 no contexto dos fibrossarcomas e abre novos horizontes e perspectivas de trabalho.

Apesar do seu potencial oncosupressivo, a complexa estrutura proteica de PTX3 limita seu potencial uso farmacológico na clínica médica. No desdobramento desse trabalho, verificamos que a molécula NSC12, uma armadilha de FGF2, tem o mesmo efeito antitumoral que PTX3 nos fibrossarcomas. Por conseguinte, mais estudos visando melhor entender o efeito inibitório dessa molécula no desenvolvimento dos fibrossarcomas, e ainda, extrapolando para abordagens clínicas deverão ser avaliados. Bem como o efeito dessa molécula no desenvolvimento de outros tipos tumorais.

Ademais, uma complementação desse trabalho em andamento é a análise da expressão de PTX3 por *Tissue microarray* (TMA) utilizando anticorpos específicos em amostras de vários tipos de sarcomas de tecidos moles extraídos de pacientes acometidos pela doença e em diferentes estágios de desenvolvimento. Posteriormente, pretende-se correlacionar a expressão de PTX3 com o estágio de desenvolvimento do tumor, o prognóstico e a expectativa de vida do paciente, bem como, a uma possível resposta a tratamento medicamentoso, químico e/ou radioterápico. Assim, dependendo dos resultados, PTX3 pode ser apontada como um biomarcador de diagnóstico e prognóstico dos sarcomas.

Esse projeto já foi submetido ao comitê de ética e encontra-se em fase de análise. O mesmo vai ser desenvolvido com amostras do Biorepositório do hospital A.C. Camargo *Cancer Center*, em colaboração com a Dra. Isabela Werneck da Cunha, médica patologista especialista em sarcomas do hospital.

Outra perspectiva para avaliar o efeito de PTX3 sobre a biologia dos fibrossarcomas é analisar os efeitos biológicos da proteína sobre outros componentes do MT desses tumores, como fibroblastos e macrófagos. Além disso, avaliar a regulação de vias de sinalização que podem sofrer efeito de PTX3 nos fibrossarcomas, como a via de EGF e RAS/MAPK.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167562> >.
- ARMELIN, H. A. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, n. 9, p. 2702-6, Sep 1973. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4354860> >.
- AUGSBURGER, D. et al. Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma -perspectives for future therapeutic targets and strategies. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 104638-104653, Nov 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262667> >.
- BALHARA, J. et al. Pentraxin 3: an immuno-regulator in the lungs. **Front Immunol**, v. 4, p. 127, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23755050> >.
- BASILE, A. et al. Pentraxin 3 (PTX3) inhibits plasma cell/stromal cell cross-talk in the bone marrow of multiple myeloma patients. **J Pathol**, v. 229, n. 1, p. 87-98, Jan 2013. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847671> >.
- BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv Cancer Res**, v. 59, p. 115-65, 1992. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1381547> >.
- BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 3, p. 235-53, Mar 2009. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247306> >.
- BELOV, A. A.; MOHAMMADI, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 6, Jun 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732477> >.
- BONACINA, F. et al. Long pentraxin 3: experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 725102, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690668> >.
- BONAVITA, E.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. PTX3 acts as an extrinsic oncosuppressor. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32309-10, Oct 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457877> >.
- BOTTAZZI, B. et al. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 157-83, 2010. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19968561> >.
- BOZZA, S. et al. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3387-96, Nov 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840729> >.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.
- BREVIARIO, F. et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22190-7, Nov 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1429570> >.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782> >.

BRYANT, D. M.; STOW, J. L. Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. **Traffic**, v. 6, n. 10, p. 947-54, Oct 2005. ISSN 1398-9219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138907> >.

BURNINGHAM, Z. et al. The epidemiology of sarcoma. **Clin Sarcoma Res**, v. 2, n. 1, p. 14, Oct 2012. ISSN 2045-3329. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036164> >.

BÜRK, R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, n. 2, p. 369-72, Feb 1973. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4510281> >.

CARMO, R. F. et al. Genetic variation in PTX3 and plasma levels associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV. **J Viral Hepat**, v. 23, n. 2, p. 116-22, Feb 2016. ISSN 1365-2893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400151> >.

CHAN, D. S. et al. Circulating C-Reactive Protein and Breast Cancer Risk-Systematic Literature Review and Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 24, n. 10, p. 1439-49, Oct 2015. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224798> >.

CHAN, S. H. et al. Oleate-induced PTX3 promotes head and neck squamous cell carcinoma metastasis through the up-regulation of vimentin. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 41364-41378, Jun 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28489600> >.

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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25797258> >.

CHELLAIAH, A. T. et al. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. **J Biol Chem**, v. 269, n. 15, p. 11620-7, Apr 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512569> >.

CHEN, W. Y. et al. Analyzing the differentially expressed genes and pathway cross-talk in aggressive breast cancer. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 41, n. 1, p. 132-40, Jan 2015. ISSN 1447-0756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25227254> >.

CHI, J. Y. et al. Targeting chemotherapy-induced PTX3 in tumor stroma to prevent the progression of drug-resistant cancers. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p. 23987-4001, Sep 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124179> >.

CHOI, B. et al. Pentraxin-3 Silencing Suppresses Gastric Cancer-related Inflammation by Inhibiting Chemotactic Migration of Macrophages. **Anticancer Res**, v. 35, n. 5, p. 2663-8, May 2015. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25964543> >.

_____. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor in advanced gastric cancer contributes to bone metastatic osteolysis by inducing long pentraxin 3. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55506-55517, Aug 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27458153> >.

_____. Elevated Pentraxin 3 in bone metastatic breast cancer is correlated with osteolytic function. **Oncotarget**, v. 5, n. 2, p. 481-92, Jan 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457902> >.

COLOMBO, G. et al. Non-peptidic thrombospondin-1 mimics as fibroblast growth factor-2 inhibitors: an integrated strategy for the development of new antiangiogenic compounds. **J Biol Chem**, v. 285, n. 12, p. 8733-42, Mar 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056600> >.

CORMIER, J. N.; POLLOCK, R. E. Soft tissue sarcomas. **CA Cancer J Clin**, v. 54, n. 2, p. 94-109, 2004 Mar-Apr 2004. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15061599> >.

DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B. The yin-yang of long pentraxin PTX3 in inflammation and immunity. **Immunol Lett**, v. 161, n. 1, p. 38-43, Sep 2014. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24792672> >.

DEBAN, L. et al. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 1, p. 237-49, Jan 2011. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683616> >.

_____. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. **Nat Immunol**, v. 11, n. 4, p. 328-34, Apr 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208538> >.

DI MARTINO, E.; TOMLINSON, D. C.; KNOWLES, M. A. A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. **Adv Urol**, v. 2012, p. 429213, 2012. ISSN 1687-6377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899908> >.

DIAMANDIS, E. P. et al. Pentraxin-3 is a novel biomarker of lung carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 8, p. 2395-9, Apr 2011. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257721> >.

DIAS, A. A. et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 928-36, Jun 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404378> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726497> >.

DONI, A. et al. The long pentraxin 3 is a soluble and cell-associated component of the human semen. **Int J Androl**, v. 32, n. 3, p. 255-64, Jun 2009. ISSN 1365-2605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179560> >.

_____. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 10, p. 2886-93, Oct 2003. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515272> >.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 3, p. 377-92, Sep 1997. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293187> >.

EDWARDS, J. R. et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics Chromatin**, v. 10, p. 23, 2017. ISSN 1756-8935. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28503201> >.

FERRERO, L.; CAMERON, B.; CROUZET, J. Analysis of gyrA and grlA mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of Staphylococcus aureus. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 7, p. 1554-8, Jul 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7492103> >.

FLISER, D. et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 9, p. 2600-8, Sep 2007. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656479> >.

FOLPE, A. L.; KWIATKOWSKI, D. J. Perivascular epithelioid cell neoplasms: pathology and pathogenesis. **Hum Pathol**, v. 41, n. 1, p. 1-15, Jan 2010. ISSN 1532-8392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604538> >.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473> >.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 176, n. 2, p. 231-41, Jan 2007. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210947> >.

FUJII, T.; KUWANO, H. Regulation of the expression balance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 by Shh and FGF-2. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 46, n. 6, p. 487-91, Jun 2010. ISSN 1543-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112075> >.

GARLANDA, C. et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 337-66, 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771574> >.

_____. PTX3, a Humoral Pattern Recognition Molecule, in Innate Immunity, Tissue Repair, and Cancer. **Physiol Rev**, v. 98, n. 2, p. 623-639, Apr 2018. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29412047> >.

_____. Pentraxins and atherosclerosis: the role of PTX3. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 1, p. 38-46, 2011. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226667> >.

_____. Pentraxins in innate immunity and inflammation. **Novartis Found Symp**, v. 279, p. 80-6; discussion 86-91, 216-9, 2006. ISSN 1528-2511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17278387> >.

_____. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 182-6, Nov 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432394> >.

GARTSIDE, M. G. et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 1, p. 41-54, Jan 2009. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147536> >.

GERMANO, G. et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. **Cancer Res**, v. 70, n. 6, p. 2235-44, Mar 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20215499> >.

GIACOMINI, A. et al. Long pentraxin 3: A novel multifaceted player in cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1869, n. 1, p. 53-63, Jan 2018. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29175552> >.

_____. A long pentraxin-3-derived pentapeptide for the therapy of FGF8b-driven steroid hormone-regulated cancers. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13790-802, May 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25912421> >.

GOODMAN, A. R. et al. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 2, p. 191-202, Aug 1996. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8899296> >.

GOSPODAROWICZ, D.; GREENE, G.; MORAN, J. Fibroblast growth factor can substitute for platelet factor to sustain the growth of Balb/3T3 cells in the presence of plasma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 65, n. 2, p. 779-87, Jul 1975. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170869> >.

GOSPODAROWICZ, D.; MORAN, J. S. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. **J Cell Biol**, v. 66, n. 2, p. 451-7, Aug 1975. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170180> >.

GOSPODAROWICZ, D.; WESEMAN, J.; MORAN, J. Presence in brain of a mitogenic agent promoting proliferation of myoblasts in low density culture. **Nature**, v. 256, n. 5514, p. 216-9, Jul 1975. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239350> >.

GREAVES, P. et al. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse soft tissue, skeletal muscle and mesothelium. **J Toxicol Pathol**, v. 26, n. 3 Suppl, p. 1S-26S, 2013. ISSN 0914-9198. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035576> >.

GROSE, R. et al. The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development. **EMBO J**, v. 26, n. 5, p. 1268-78, Mar 2007. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304214> >.

GUO, L. et al. C-reactive protein and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 5, p. 10508, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26001129> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HARMER, N. J. et al. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. **J Mol Biol**, v. 339, n. 4, p. 821-34, Jun 2004. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165853> >.

HE, X.; HAN, B.; LIU, M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 292, n. 5, p. L1039-49, May 2007. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277044> >.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291332> >.

HUANG, Z. et al. A better anti-diabetic recombinant human fibroblast growth factor 21 (rhFGF21) modified with polyethylene glycol. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20669, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673953> >.

HWANG, R. F.; HUNT, K. K. Experimental approaches to treatment of soft tissue sarcoma. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 12, n. 2, p. 499-521, Apr 2003. ISSN 1055-3207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12916466> >.

IEVOLI, E. et al. Implication of the oligomeric state of the N-terminal PTX3 domain in cumulus matrix assembly. **Matrix Biol**, v. 30, n. 5-6, p. 330-7, Jun 2011. ISSN 1569-1802. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619930> >.

INAGAKI, T. et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. **Cell Metab**, v. 5, n. 6, p. 415-25, Jun 2007. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550777> >.

INFANTE, M. et al. Prognostic and diagnostic potential of local and circulating levels of pentraxin 3 in lung cancer patients. **Int J Cancer**, v. 138, n. 4, p. 983-91, Feb 2016. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26348770> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363749> >.

_____. The long pentraxin PTX3 at the crossroads between innate immunity and tissue remodelling. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 4, p. 271-82, Apr 2011. ISSN 1399-0039. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388349> >.

_____. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. **Biochemistry**, v. 45, n. 38, p. 11540-51, Sep 2006. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981714> >.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **J Biochem**, v. 149, n. 2, p. 121-30, Feb 2011. ISSN 1756-2651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940169> >.

JAILLON, S. et al. Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 3, p. 465-74, Mar 2009. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079137> >.

_____. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 793-804, Apr 2007. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389238> >.

JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Adv Cancer Res**, v. 60, p. 1-41, 1993. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417497> >.

KONDO, S. et al. Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. **Br J Cancer**, v. 109, n. 3, p. 739-46, Aug 2013. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828517> >.

KUNES, P. et al. Pentraxin 3(PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 920517, 2012. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577258> >.

LAIRD, P. W. et al. Simplified mammalian DNA isolation procedure. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 15, p. 4293, Aug 1991. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870982> >.

LEALI, D. et al. Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1600-10, Sep 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764903> >.

_____. Fibroblast growth factor-2 antagonist and antiangiogenic activity of long-pentraxin 3-derived synthetic peptides. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 30, p. 3577-89, 2009. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860702> >.

_____. Fibroblast growth factor 2-antagonist activity of a long-pentraxin 3-derived anti-angiogenic pentapeptide. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 8, p. 2109-21, Aug 2010. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627396> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679696> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183014> >.

LIANG, G.; WEISENBERGER, D. J. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. **Epigenetics**, v. 12, n. 6, p. 416-432, 06 2017. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28358281> >.

LIN, C. N. et al. Prognostic factors of myxofibrosarcomas: implications of margin status, tumor necrosis, and mitotic rate on survival. **J Surg Oncol**, v. 93, n. 4, p. 294-303, Mar 2006. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496357> >.

LIU, C.; YAO, Y.; WANG, W. Pentraxin-3 as a prognostic marker in patients with small-cell lung cancer. **Med Oncol**, v. 31, n. 10, p. 207, Oct 2014. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25178940> >.

LOCATELLI, M. et al. The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation and prognosis of malignancy in gliomas. **J Neuroimmunol**, v. 260, n. 1-2, p. 99-106, Jul 2013. ISSN 1872-8421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664694> >.

MA, D. et al. Inhibitory Role of Pentraxin-3 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Chin Med J (Engl)**, v. 129, n. 18, p. 2233-40, 09 2016. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27625097> >.

MAGRINI, E.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. The Dual Complexity of PTX3 in Health and Disease: A Balancing Act? **Trends Mol Med**, v. 22, n. 6, p. 497-510, Jun 2016. ISSN 1471-499X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27179743> >.

MAIRUHU, A. T. et al. Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections. **J Med Virol**, v. 76, n. 4, p. 547-52, Aug 2005. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15977234> >.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> >.

_____. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 1, p. 1-13, Jan 2008. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828584> >.

_____. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1285, p. 1-14, May 2013. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527487> >.

MARGHERI, F. et al. Systemic sclerosis-endothelial cell antiangiogenic pentraxin 3 and matrix metalloprotease 12 control human breast cancer tumor vascularization and development in mice. **Neoplasia**, v. 11, n. 10, p. 1106-15, Oct 2009. ISSN 1476-5586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794969> >.

MARQUES, M. M. **Modulação da expressão de genes pela pentraxina 3**. 2008.

MITSUNAGA, S. et al. C-Reactive Protein Level Is an Indicator of the Aggressiveness of Advanced Pancreatic Cancer. **Pancreas**, v. 45, n. 1, p. 110-6, Jan 2016. ISSN 1536-4828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26566216> >.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; IBRAHIMI, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 107-37, Apr 2005. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863029> >.

MORGENSTERN, J. P.; LAND, H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. **Nucleic Acids Res**, v. 18, n. 12, p. 3587-96, Jun 1990. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2194165> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MOYERS, J. S. et al. Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. **J Cell Physiol**, v. 210, n. 1, p. 1-6, Jan 2007. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063460> >.

NAKANISHI, H. et al. Tumor size as a prognostic indicator of histologic grade of soft tissue sarcoma. **J Surg Oncol**, v. 65, n. 3, p. 183-7, Jul 1997. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236927> >.

NASKI, M. C.; ORNITZ, D. M. FGF signaling in skeletal development. **Front Biosci**, v. 3, p. d781-94, 1998. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683641> >.

NASKI, M. C. et al. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. **Nat Genet**, v. 13, n. 2, p. 233-7, Jun 1996. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640234> >.

NICKEL, W. Pathways of unconventional protein secretion. **Curr Opin Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 621-6, Oct 2010. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637599> >.

NORATA, G. D. et al. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 5, p. 925-31, May 2008. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218986> >.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 32, n. 2, p. 115-20, Feb 2000. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687947> >.

NUNES, J. P. S. **Avaliação do papel da Pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas**. Tese de doutorado. Belo Horizonte 2018.

NUNES, J. P. S.; DIAS, A. A. M. ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. **Biotechniques**, v. 62, n. 4, p. 175-179, Apr 2017. ISSN 1940-9818. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28403808> >.

OLSEN, S. K. et al. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 4, p. 935-40, Jan 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732692> >.

ORI, A.; WILKINSON, M. C.; FERNIG, D. G. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. **Front Biosci**, v. 13, p. 4309-38, 2008. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508513> >.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276432> >.

_____. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 4, n. 3, p. 215-66, 2015 May-Jun 2015. ISSN 1759-7692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772309> >.

PARADISO, B.; ZUCCHINI, S.; SIMONATO, M. Implication of fibroblast growth factors in epileptogenesis-associated circuit rearrangements. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 152, 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062643> >.

PAVLOU, M. P.; DIMITROMANOLAKIS, A.; DIAMANDIS, E. P. Coupling proteomics and transcriptomics in the quest of subtype-specific proteins in breast cancer. **Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1083-95, Apr 2013. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386393> >.

PENG, X. et al. Accumulated promoter methylation as a potential biomarker for esophageal cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 679-691, Jan 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27893424> >.

PEPPER, M. S. et al. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 189, n. 2, p. 824-31, Dec 1992. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281999> >.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, n. 12, p. 1805-12, Jun 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813013> >.

PERRIER, P. et al. Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. **J Immunol**, v. 172, n. 11, p. 7031-42, Jun 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153525> >.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 2001. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886> >.

PFEIFER, G. P. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, Apr 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29649096> >.

PLAYER, A. et al. Identification of candidate genes associated with triple negative breast cancer. **Genes Cancer**, v. 8, n. 7-8, p. 659-672, Jul 2017. ISSN 1947-6019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28966727> >.

POLLOCK, P. M. et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. **Oncogene**, v. 26, n. 50, p. 7158-62, Nov 2007. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525745> >.

POPOVICI, R. M. et al. The long pentraxin PTX3 in human endometrium: regulation by steroids and trophoblast products. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1136-43, Mar 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048494> >.

PRESTA, M. et al. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 723-38, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760835> >.

_____. Fibroblast growth factors (FGFs) in cancer: FGF traps as a new therapeutic approach. **Pharmacol Ther**, v. 179, p. 171-187, Nov 2017. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28564583> >.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-37, Nov 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202395> >.

RAND, V. et al. Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 40, p. 14344-9, Oct 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186508> >.

RASMUSSEN, R. **Quantification on the LightCycler**. IN MEUER, S.; WITTEWER, C., et al. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*: Springer Press: 21-34 p. 2001.

- RAVENNA, L. et al. Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. **Prostate**, v. 69, n. 11, p. 1245-55, Aug 2009. ISSN 1097-0045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444819> >.
- READING, P. C. et al. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. **J Immunol**, v. 180, n. 5, p. 3391-8, Mar 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292565> >.
- REAL, J. M. et al. Pentraxin 3 accelerates lung injury in high tidal volume ventilation in mice. **Mol Immunol**, v. 51, n. 1, p. 82-90, May 2012. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425349> >.
- RODRIGUES, P. F. **Avaliação do efeito da proteína Pentraxina 3 em células tumorais murinas**. Dissertação de Mestrado 2014.
- ROFSTAD, E. K.; HALSØR, E. F. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. **Cancer Res**, v. 60, n. 17, p. 4932-8, Sep 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987309> >.
- RONCA, R. et al. Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer. **J Pathol**, v. 230, n. 2, p. 228-38, Jun 2013. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23424081> >.
- _____. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2760-71, Dec 2013. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130051> >.
- _____. Long-Pentraxin 3 Derivative as a Small-Molecule FGF Trap for Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v. 28, n. 2, p. 225-39, Aug 2015. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26267536> >.
- RUBINO, M. et al. Epigenetic regulation of the extrinsic oncosuppressor PTX3 gene in inflammation and cancer. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 7, p. e1333215, 2017. ISSN 2162-4011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811977> >.
- 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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031207> >.
- SALUSTRI, A. et al. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1577-86, Apr 2004. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998931> >.
- SAMBROCK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 2001.
- SANTOS, C. E. R. et al. Sarcomas de Partes Moles. In: SILVA, M. R. e CASTRO, M. C. R. (Ed.). **Fundamentos de Dermatologia**. 1. Rio de Janeiro: Atheneu v.2, 2008. cap. 124, p.1761-1774.
- SOARES, A. C. et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes Infect**, v. 8, n. 5, p. 1321-9, Apr 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697676> >.
- SOUZA, D. G. et al. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. **Am J Pathol**, v. 174, n. 4, p. 1309-18, Apr 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286566> >.

SPEECKAERT, M. M. et al. Biology of human pentraxin 3 (PTX3) in acute and chronic kidney disease. **J Clin Immunol**, v. 33, n. 5, p. 881-90, Jul 2013. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443958> >.

STALLONE, G. et al. Pentraxin 3: a novel biomarker for predicting progression from prostatic inflammation to prostate cancer. **Cancer Res**, v. 74, n. 16, p. 4230-8, Aug 2014. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24950910> >.

TAFANI, M. et al. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 32, Apr 2011. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21489226> >.

_____. Up-regulation of pro-inflammatory genes as adaptation to hypoxia in MCF-7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. **Cancer Sci**, v. 101, n. 4, p. 1014-23, Apr 2010. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20151982> >.

THOMAS, C. et al. Pentraxin-3 is a PI3K signaling target that promotes stem cell-like traits in basal-like breast cancers. **Sci Signal**, v. 10, n. 467, Feb 2017. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28223411> >.

TOTHILL, R. W. et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 16, p. 5198-208, Aug 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698038> >.

TUNG, J. N. et al. Inhibition of pentraxin 3 in glioma cells impairs proliferation and invasion in vitro and in vivo. **J Neurooncol**, v. 129, n. 2, p. 201-9, 09 2016. ISSN 1573-7373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27278519> >.

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 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094046> >.

WANG, J. K.; GOLDFARB, M. Amino acid residues which distinguish the mitogenic potentials of two FGF receptors. **Oncogene**, v. 14, n. 15, p. 1767-78, Apr 1997. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150382> >.

WANG, J. X. et al. Aberrant methylation of the 3q25 tumor suppressor gene PTX3 in human esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 37, p. 4225-30, Oct 2011. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072855> >.

WIBMER, C. et al. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. **Ann Oncol**, v. 21, n. 5, p. 1106-11, May 2010. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858086> >.

WILKIE, A. O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 187-203, Apr 2005. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863034> >.

WILKIE, A. O. et al. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. **Am J Med Genet**, v. 112, n. 3, p. 266-78, Oct 2002. ISSN 0148-7299. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12357470> >.

WILLEKE, F. et al. Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 15, p. 2639-46, Oct 2006. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959485> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. World Health Organization - Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>, 2018. Acesso em: 15 de maio de 2018.

YING, T. H. et al. Knockdown of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 29385, Jul 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27377307> >.

YOUNG, L. et al. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nat Protoc**, v. 5, n. 5, p. 929-34, May 2010. ISSN 1750-2799.

ZHANG, X. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 15694-700, Jun 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597617> >.

10 – ANEXOS

10.1 ARTIGO SOBRE O EFEITO DA TRANSFEÇÃO COM PTX3 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS FIBROSSARCOMAS

Artigo submetido à revista *Frontiers in Oncology*, em 8 de julho de 2018.

Fibroblast growth factor trapping impairs fibrosarcoma growth ON TIME

Priscila Fabiana Rodrigues, Sara Matarazzo, Federica Maccarinelli, Eleonora Foglio, Arianna Giacomini, João Paulo Silva Nunes, Marco Presta, Adriana Abalen Martins Dias and Ronca Roberto

Associate Editor:

Simona Pisanti



Frontiers in
Oncology | Molecular and Cellular Oncology

Submitted on
08/07/2018

Interactive Review on
17/08/2018

FIBROBLAST GROWTH FACTOR TRAPPING IMPAIRS FIBROSARCOMA GROWTH.

Priscila Fabiana Rodrigues^{1*}, Sara Matarazzo^{2*}, Federica Maccarinelli², Eleonora Foglio², Arianna Giacomini², João Paulo Silva Nunes¹, Marco Presta², Adriana Abalen Martins Dias^{1#}, Roberto Ronca^{2#}

¹ *Laboratory of Experimental Genetics, General Biology Department – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

² *Department of Molecular and Translational Medicine, School of Medicine, University of Brescia, 25123 Brescia, Italy*

* Co-first authorship

Co-senior authorship

Running title: FGF trapping in fibrosarcoma

Keywords: Long pentraxin-3, FGF-trap, fibrosarcoma, FGF, FGFR.

Correspondence to: Roberto Ronca, University of Brescia, Department of Molecular and Translational Medicine, viale Europa 11, 25123 Brescia, Italy. Phone: +39-0303717735. FAX: +39-0303717747. E-mail: roberto.ronca@unibs.it

Financial support: This work was supported by IG 18943 and MFAG 18459 grants from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) to MP and RR, respectively and from Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) to AAMD. SM was supported by a Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (FIRC) and PFR by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship.

Conflicts of Interest: The authors disclose no potential conflicts of interest.

ABSTRACT

Fibrosarcomas are soft tissue mesenchymal tumors originating from transformed fibroblasts. Fibroblast growth factor-2 (FGF2) and its tyrosine-kinase receptors (FGFRs) play pivotal roles in fibrosarcoma onset and progression, FGF2 being actively produced by fibroblasts in all stages along their malignant transformation to the fibrosarcoma stage. The soluble pattern recognition receptor long pentraxin-3 (PTX3) is an extrinsic oncosuppressor whose expression is reduced in different tumor types, including soft tissue sarcomas, *via* hypermethylation of its gene promoter. PTX3 interacts with FGF2 and other FGF family members, thus acting as a multi-FGF antagonist able to inhibit FGF-dependent neovascularization and tumor growth. Here, PTX3 overexpression significantly reduced the

proliferative and tumorigenic potential of fibrosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. In addition, systemic delivery of human PTX3 driven by the Tie2 promoter inhibited the growth of fibrosarcoma grafts in transgenic mice. In a translational perspective, the PTX3-derived small molecule FGF trap NSC12 prevented activation of the FGF/FGFR system in fibrosarcoma cells and reduced their tumorigenic activity *in vivo*. In conclusion, impairment of the FGF/FGFR system by FGF trap molecules may represent a novel therapeutic approach for the treatment of fibrosarcoma.

INTRODUCTION

Soft tissue sarcomas are a heterogeneous population of mesenchymal tumors that accounts for approximately 1% of all malignancies (1). Among them, fibrosarcoma originates from transformed spindle shaped fibroblasts, it occurs as a soft-tissue mass or as a primary or secondary bone tumor, and is predominantly located in deep soft tissue or adjacent to bones. Depending on the clinical presentation, fibrosarcomas can be divided into infantile/congenital fibrosarcoma, a low malignant/rarely metastasizing tumor, and adult-type fibrosarcoma, which occurs mainly between 30 and 60 years of age with more aggressive and malignant features (2).

As with all soft-tissue and bone sarcomas, the mainstay of fibrosarcoma treatment consists in the complete excision with an adequate margin, with prognostic projection depending on size and location of the tumor, histologic grade, and the presence of metastatic disease. For instance, high-grade primary fibrosarcoma and secondary fibrosarcoma have a 10-year survival rate lower than 30% and 10%, respectively (3,4).

Fibroblast growth factor-2 (FGF2) is the prototypic member of the FGF gene family that exerts its activity by binding to tyrosine kinase FGF receptors (FGFRs) expressed by four distinct FGFR1-4 genes (5). FGF2 is produced by different cell types (including endothelial cells, immune cells, fibroblasts, and cancer cells) and plays pleiotropic roles in different settings, including inflammation, tissue remodeling, wound repair and cancer (6,7). In general, FGF production/release promotes the activation of autocrine and paracrine loops of stimulation driving important cellular/tissue processes like differentiation and proliferation. In cancer, different tumor cell lines express different members of the FGF family, including FGF2, and/or display an aberrant activation of the FGF/FGFR system (6,8).

Normal fibroblasts produce FGF2 and its overexpression triggers their transformation *in vitro* (9). Indeed, in a transgenic murine model of dermal fibrosarcoma, FGF2 is actively produced by fibroblasts at all stages along their malignant transformation (mild fibromatosis, aggressive

fibromatosis, and fibrosarcoma) and its expression correlates with the angiogenic phenotype of the tumor (10). Moreover, the forced expression of FGF2/Platelet-derived growth factor-BB in fibrosarcoma cells increases their aggressiveness, thus promoting neovascularization and a higher metastatic potential (11). On these bases, given its role on fibroblast transformation and its impact on tumor vascularization, the FGF2/FGFR system might represent a promising target for fibrosarcoma therapy.

The soluble pattern recognition receptor long pentraxin-3 (PTX3) is a member of the pentraxin family produced locally in response to inflammatory signals by different cell types, including various myeloid cells, vascular and lymphatic endothelial cells, epithelial cells, and mesenchymal cells (including fibroblasts) (12). PTX3 has been shown to play non-redundant functions in various physiopathological conditions, including angiogenesis and cancer (13). A unique N-terminal domain determines specific functions of PTX3, including its FGF-binding and inhibitory capacity (14,15), whereas its C-terminal domain contains the pentraxin signature shared with the other family members (16). The anti-angiogenic/anti-tumor potential of PTX3 has been demonstrated in different types of FGF-dependent tumors, including melanoma, prostate and lung cancer (17-20). Moreover, PTX3 has been proposed as an extrinsic oncosuppressor, able to affect tumor-promoting inflammation mediated by complement and macrophages (21). Indeed, genetic loss of PTX3 in *PTX3*^{-/-} mice increases the incidence of cancer development and growth in carcinogen-induced models of fibrosarcoma and skin cancer (21). In addition, when compared to their normal tissue counterpart, different types of mesenchymal and epithelial tumors are characterized by loss/reduced expression of PTX3 due to epigenetic regulation of the gene (21,22). For instance, high methylation levels of the *PTX3* gene promoter occur in mesenchymal cancers, including angiosarcoma, synovial sarcoma, leiomyosarcoma and chordoma (21).

Here, we demonstrate that PTX3 overexpression significantly reduced the proliferative and tumorigenic potential of fibrosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. In addition, PTX3 overexpression driven by the Tie2 promoter inhibits the growth of syngeneic fibrosarcoma tumor grafts in transgenic mice. In a translational perspective, the PTX3-derived small molecule chemical FGF trap NSC12 prevented the activation of the FGF/FGFR system in fibrosarcoma cells and reduced their tumorigenic activity *in vivo*. In conclusion, impairment of the FGF/FGFR system by FGF trap molecules may represent a novel therapeutic approach for the treatment of fibrosarcoma.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture.

Human HT-1080 and murine MC-TGS17-51 (MC17-51) fibrosarcoma cells from American Type Culture Collection (ATCC) were cultured in DMEM (Gibco) containing penicillin/streptomycin (100 U and 10 mg/mL respectively) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco) at 37°C with 5% CO₂. Fibrosarcoma cells were transfected with a pBABE-Puro vector harboring the full length human PTX3 cDNA (GenBank accession n° X63613) or a pBABE-Puro empty vector (Mock) using FuGENE (Promega). HT-1080 and MC17-51 stable transfectants were selected in the presence of 1.0 or 4.0 μM puromycin, respectively.

Western Blot Analysis.

Fibrosarcoma cells harvested from 80-90% confluent monolayers were homogenized in RIPA buffer containing 1% Triton-X100, 0.2% BriJ, 1.0 mmol/L sodium orthovanadate and protease inhibitors cocktail (Sigma). Protein concentrations were determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy). The expression of PTX3 was detected using a rabbit polyclonal anti-PTX3 antibody from B. Bottazzi (Humanitas Clinical Institute, Milan, Italy).

The analysis of FGFR signaling was performed using anti-pFGFR1 and anti-pFGFR3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and anti-pFRS2, anti-pAKT, anti-pERK_{1/2} antibodies (Cell Signaling), and normalized with an anti-α-GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology).

PCR analysis.

The expression of *PTX3*, *FGF2* and *FGFR1-4* was evaluated by RT-PCR. Total RNA was extracted from 80% confluent fibrosarcoma cell monolayers cultured in complete growth media using the TRIzol® reagent (Invitrogen), following manufacturer's recommendations. Two μg of total RNA were retro-transcribed using ImProm-IITM reverse transcriptase kit (Invitrogen) and oligo(dT)₂₀ primers (IDT). The cDNA was used as template in PCR reactions using specific primers (see **Supplementary Table 1**).

Cell Proliferation.

Cells were seeded (5×10^3) in 48-well cell culture plates in complete medium. At 24, 48 and 72 hours, cells were detached and absolute cell counts were obtained by using the MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) and normalized in respect to time 0. Human HT-1080 fibrosarcoma cells were seeded (5×10^3) in 48-well cell culture plates in complete medium, starved in 1% FBS for 24 hours, and treated with DMSO or different concentration of NSC12 (0,1- 1- 3- 6- 10- 20 μ M). At 24 or 48 hours cells were detached, counted after propidium iodide labeling using the MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) and normalized in respect to DMSO-treated cells.

Clonogenic Assay.

Cells were seeded (3×10^2) in 6-well cell culture plates and incubated in complete growth medium until visible colonies were formed (approximately 10 days). Then, the supernatant was removed and cells were stained for 20 minutes with a solution containing 0.1% crystal violet/20% methanol. After the removal of the staining solution, plates were photographed and colonies were counted by using the Image J software. Then, a 1% SDS solution was added to each well and the plates were incubated overnight at room temperature. Solution absorbance was measured at 595 nm using a spectrophotometer.

Soft agar assay.

Cells (5×10^4) were suspended in 3 ml of complete growth medium containing 0.3% agar and poured onto 2 ml pre-solidified 0.6% agar in a 6-well plate. After 3 weeks of incubation, colonies were observed under a phase contrast microscope, photographed, and their area was measured using the ImageJ Software and the SA_NJ algorithm (23).

In vivo studies.

Animal experiments were approved by the local animal ethics committee (OPBA, Organismo Preposto al Benessere degli Animali, Università degli Studi di Brescia, Italy) and were performed in accordance with national guidelines and regulations. Procedures involving animals and their care conformed with institutional guidelines that comply with national and international laws and policies (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358, 12 December 1987) and with “ARRIVE” guidelines (Animals in Research Reporting In Vivo Experiments).

Seven-week-old NOD/Scid and C57BL/6 male mice were injected subcutaneously (s.c.) into the dorsolateral flank with mock and PTX3-transfected human HT-1080 (3×10^6) and murine

MC17-51 (1×10^6) cells, respectively. In an additional experiment, wild-type and transgenic TgN(Tie2-hPTX3) mice (17) were injected s.c. with 10^6 wild type MC17-51 cells.

For therapeutic treatment, seven-week-old NOD/Scid male mice were injected s.c. with HT-1080 cells (3×10^6). When tumors were palpable (approximately 40 mm^3), mice were treated intraperitoneally (i.p.) with vehicle (DMSO) or NSC12 (7.5 mg/kg) every other day. Tumors were measured with calipers and the volume was calculated according to the formula $V = (D \times d^2)/2$, where D and d are the major and minor perpendicular tumor diameters respectively. Tumor volume data were analyzed with a 2-way analysis of variance, and individual group comparisons were evaluated by the Bonferroni correction. At the end of the experimental procedure, tumors were surgically removed, weighed and paraffin embedded for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemistry.

Formalin-fixed, paraffin-embedded samples were sectioned at a thickness of $3 \mu\text{m}$, dewaxed in xylene, hydrated and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis or alternatively processed for immunohistochemistry.

The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-human PTX3 (kind gift of B. Bottazzi, Humanitas Clinical Institute - Milan), rat monoclonal anti-mouse CD31 (Dianova), rat monoclonal anti-mouse Ki67 (Dako). Sections were then incubated with HRP labelled polymer anti-rabbit or with biotinylated anti-rat secondary antibody and subsequently in Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories). Positive signal was revealed by 3,3'-diaminobenzidine staining (Roche) and counterstained with Carazzi's haematoxylin to identify nuclei, dehydrated and mounted in DPX (Sigma) before analysis by light microscopy. Images were acquired with the automatic high-resolution scanner Aperio System (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany, EU).

RESULTS

PTX3 impairs the growth of fibrosarcoma cells *in vitro*.

The FGF/FGFR system plays a crucial role in fibroblast transformation and fibrosarcoma onset and progression (9,10). Accordingly, human HT-1080 and murine MC17-51 fibrosarcoma cells express FGF2 and different FGFRs (**Figure 1A**).

PTX3 has been described as a potent FGF2 inhibitor (14,18,19) and has been reported to be down-modulated in different types of cancer, including soft tissue sarcomas (21,22) in which its absence exerts pro-tumor effects (13,21). In line with literature data (21), HT-1080 and

MC17-51 cells express negligible levels of PTX3 due to an epigenetic regulation of the gene whose expression can be upregulated following treatment with demethylating agents (**Supplementary Figure 1**).

On this basis, murine MC17-51 and human HT-1080 cells were transfected with a pBABE-Puro vector harboring the full-length human PTX3 cDNA whereas an empty vector was used to generate control (mock) cell populations. As a result, wild type and mock MC17-51 and HT-1080 cell populations express very low levels of PTX3 protein, whereas stable PTX3 transfectants produce and released significant amounts of PTX3 (**Figure 1B**).

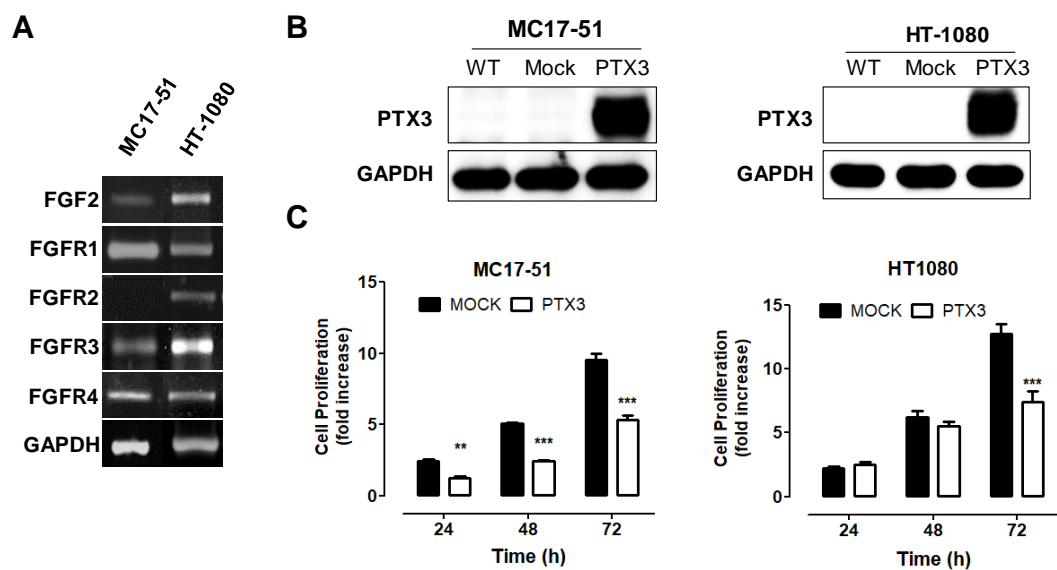


Figure 1. PTX3 impairs fibrosarcoma proliferation *in vitro*.

A) RT-PCR analysis of the expression of the FGF2/FGFR system in MC17-51 and HT-1080 cells. **B)** Western blot analysis of PTX3 expression in wild type (WT), empty vector- transduced (Mock), and PTX3-overexpressing (PTX3) MC17-51 and HT-1080 cells. **C)** Proliferation of control (mock) and PTX3-overexpressing (PTX3) MC17-51 and HT-1080 cells at 24, 48 and 72 hours. Cell proliferation is expressed as fold increase in respect to the number of seeded cells; data are the mean \pm S.E.M of 3 independent determinations (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t-test).

As shown in **Figure 1C**, PTX3 overexpression significantly reduced the proliferation rate of both murine and human fibrosarcoma transfectants when compared to controls, with a significant decrease of their clonogenic capacity (**Figure 2A**). In addition, PTX3 overexpression reduced the anchorage-independent ability of both murine and human transfectants to form 3D colonies in soft agar (**Figure 2B**).

In keeping with its FGF trapping antagonist potential (14,17,24), the inhibitory activity exerted by PTX3 overexpression in fibrosarcoma cells is paralleled by a decrease of FGFR1/FGFR3 phosphorylation, as well as of the activation of mitogen activated protein

kinase Erk1/2 and AKT, in murine MC17-51 cells, and of FGFR3/Akt activation in HT-1080 cells (**Figure 2C**).

At variance, no significant differences were observed between mock- and PTX3-transfected MC17-51 and HT-1080 cells for their capacity to repair a wounded cell monolayer (**Supplementary Figure 2**), thus indicating that PTX3 overexpression does not affect the motility of fibrosarcoma cells whose migratory capacity might be regulated by FGF/FGFR independent signaling pathways.

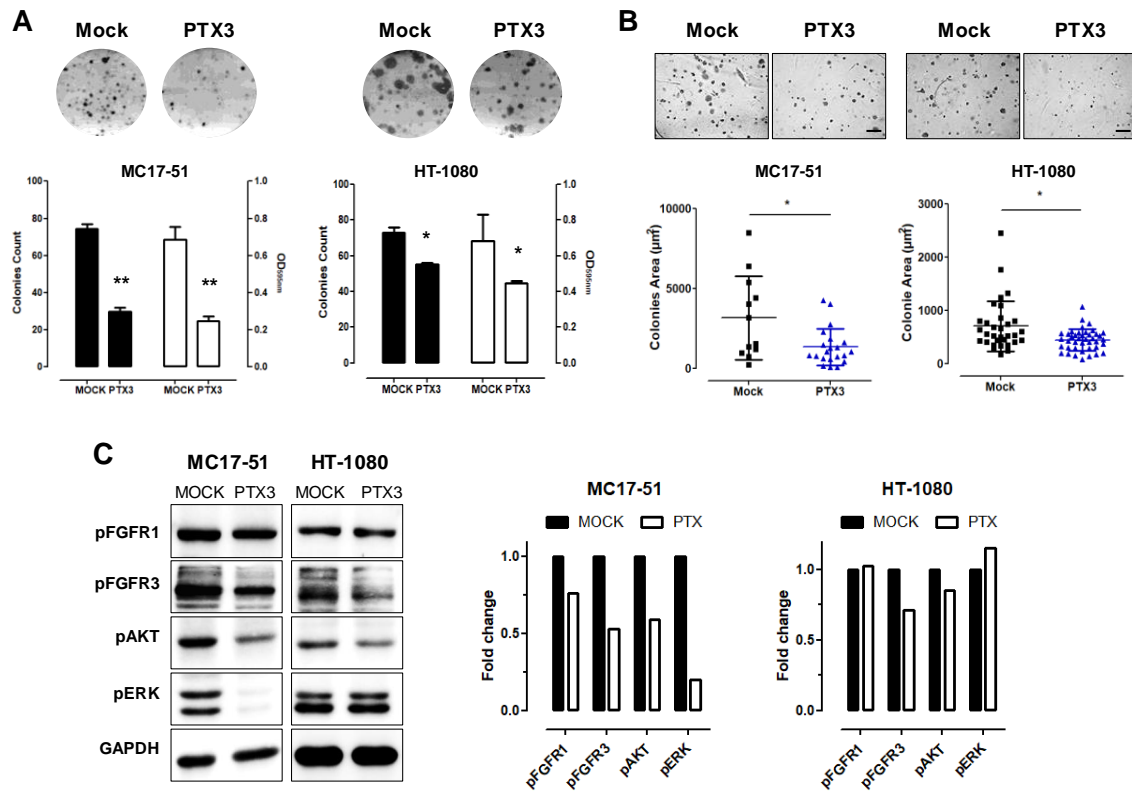


Figure 2. PTX3 overexpression reduces the clonogenic capacity, anchorage independent growth and FGF/FGFR signaling in fibrosarcoma cells.

A) Mock- and PTX3-transfected MC17-51 and HT-1080 cells were seeded at low density. After 10 days, cell colonies were stained with crystal violet (upper representative images) and counted (black bars) or solubilized in 1% SDS and solution absorbance was measured at 595 nm using a spectrophotometer (white bars). B) Transfectants were grown in soft agar for about 3 weeks, cell colonies were photographed (upper representative images) and their area (in µm²) was measured. Scale bar: 0.25 mm. C) Western blot and corresponding densitometric analysis of FGF/FGFR signaling in mock- and PTX3- transduced MC17-51 and HT-1080 cells. Data are the mean ± S.E.M of triplicate observations (* P<0.05, ** P<0.01, Student's t-test).

PTX3 impairs fibrosarcoma growth *in vivo*.

To assess the effect of PTX3 on the tumorigenic activity exerted by fibrosarcoma cells *in vivo*, mock- and PTX3-overexpressing MC17-51 and HT-1080 cells were injected s.c. in the flank of C57BL/6 and NOD/Scid mice, respectively. As shown in **Figure 3A-B**, PTX3 overexpression caused a significant delay of tumor growth in both murine and human tumor

grafts. Accordingly, the average weight of harvested PTX3-overexpressing MC17-51 and HT-1080 tumors was significantly reduced when compared to mock derived lesions (**Figure 3A-B**).

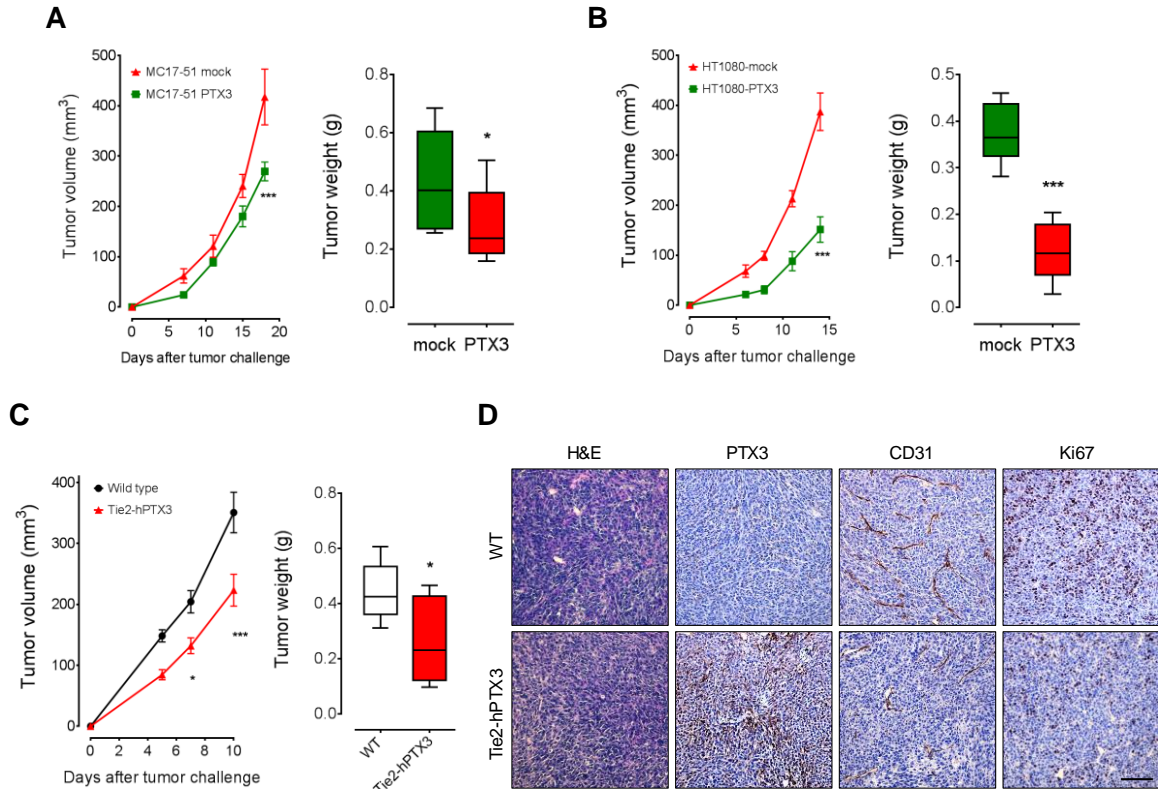


Figure 3. PTX3 impairs the growth of fibrosarcoma cells *in vivo*.

Mock and PTX3-transfected MC17-51 and HT-1080 cells were injected s.c. in syngeneic C57BL/6 (**A**) or immune-compromised NOD/Scid (**B**) mice, respectively. Tumors were measured with caliper at different time points and weighted at the end of the experiment. **C**) Wild type MC17-51 cells were injected s.c. in wild type (C57BL/6) and transgenic (Tie2-hPTX3) mice. **D**) Explanted tumors were immunostained with anti-PTX3, anti-CD31 and anti-Ki67 antibodies (scale bar, 200 μ m). Data are the mean \pm S.E.M of 10 tumors per group. (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

On this basis, to assess the effect of the local/systemic delivery of PTX3 protein on fibrosarcoma growth, MC17-51 cells were injected in syngeneic wild type (C57BL/6) and transgenic TgN(Tie2-hPTX3) mice that overexpress human PTX3 under the endothelial specific Tie2 promoter (17).

In line with the *in vivo* data herewith obtained with fibrosarcoma PTX3 transfectants (see above) and previous observations on different FGF-dependent tumor types grafted in TgN(Tie2-hPTX3) mice (17,25), endothelial expression and stroma accumulation of PTX3 significantly impaired the growth of fibrosarcoma MC17-51 tumor grafts in these animals. This resulted in reduced average weight of the lesions harvested from transgenic mice when compared to wild type animals (**Figure 3C**). Immunohistochemical analyses performed on

tumor samples revealed that PTX3 overexpressing lesions showed a decrease of cell proliferation (expressed as Ki67⁺ areas) and of vascularization (CD31⁺ areas) in comparison with control tumors (**Figure 3D**).

The PTX3-derived small molecule FGF trap impairs fibrosarcoma growth *in vitro* and *in vivo*.

The PTX3-derived small molecule NSC12 represents the first low molecular weight FGF-trap endowed with significant implications for the therapy of FGF-dependent tumors (17,25). Thus, in a translational effort to exploit the FGF-blocking activity exerted by PTX3 on fibrosarcoma cells, we evaluated the effect of this novel FGF trap on the tumorigenic potential of human HT-1080 cells *in vitro* and *in vivo*. As shown in **Figure 4A**, NSC12 inhibits the proliferation of HT-1080 cells with an IC₅₀ equal to approximately 5.2 μM and 3.2 μM after 24 and 48 hours of treatment, respectively. Accordingly, the activation of FGFR1, FGFR3 and of the Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2 (FRS2) is significantly reduced following 6 and 16 hours of treatment with NSC12 (**Figure 4B**). On this basis, HT-1080 cells were injected in immunocompromised mice and, once tumors were palpable, animals were treated i.p. every other day with vehicle or 7.5 mg/kg of NSC12 (17). As shown in **Figure 4C**, treatment with NSC12 significantly affects the rate of growth of HT-1080 tumors and the average weight of harvested lesions when compared to vehicle.

DISCUSSION

Fibrosarcoma is a rare and highly malignant mesenchymal tumor originating from transformed/hyper-proliferating spindle-shaped fibroblasts (26). Since other spindle-cell shaped sarcomas exist, its identification is based on a diagnosis of exclusion, and the WHO classification of soft tissue sarcomas includes fibrosarcoma as part of the fibroblastic/myofibroblastic sarcomas (27). In general, fibrosarcoma can be divided in infantile/congenital type fibrosarcoma, with intermediate malignant and rarely metastasizing features, and adult-type fibrosarcoma, a highly malignant tumor.

Even though fibrosarcomas occurring in adults represent only 3.6% of all adult sarcomas (28), the therapeutic options are limited and prognosis is generally poor. Indeed, despite the histopathological grading is considered the most important prognostic indicator, regardless of grade, the 5-year survival rate is around 40–60% and the 10- year survival rate is 60% for low-grade, and 30% for high-grade tumors (29,30).

To date, surgery represents the standard therapy of localized soft tissue sarcomas together with radiotherapy and chemotherapy, but a high number of fibrosarcoma patients are low or non-responder to radiotherapy and develop multidrug resistance to chemotherapy (31).

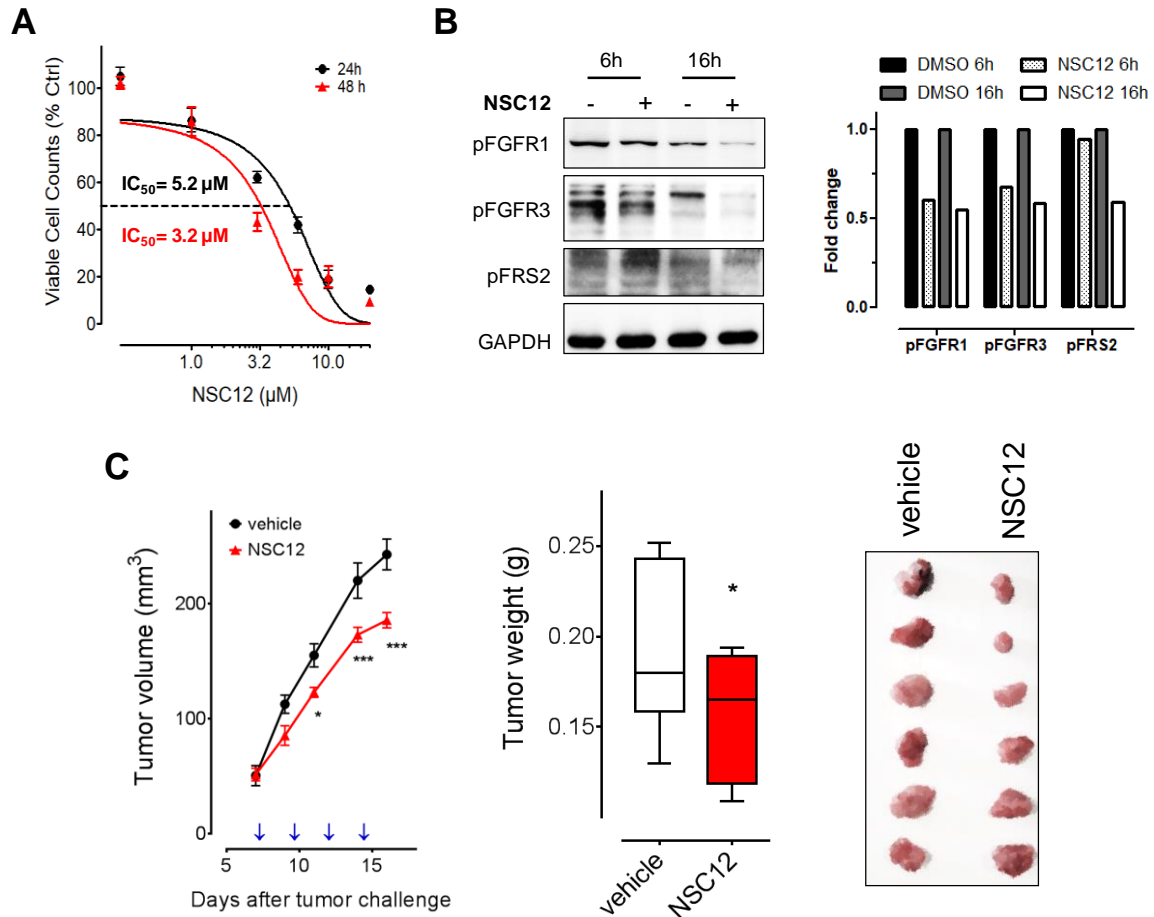


Figure 4. The FGF trap small molecule NSC12 decreases cell viability, FGF/FGFR signaling and tumorigenic activity of human fibrosarcoma cells.

A) Proliferation of HT-1080 cells treated for 24 or 48 hours with increasing concentrations of NSC12. Data are expressed as percentage of viable cells in respect to DMSO-treated control cells. B) Western blot and densitometric analysis of FGF/FGFR signaling in HT-1080 cells after 6 or 16 hours treatment with 10 μ M NSC12. C) HT-1080 cells were injected s.c in NOD/Scid mice and animals were treated with 7.5 mg/kg of NSC12 or with DMSO at the indicated time points (arrows). Tumors were measured with caliper (left panel) and weighted at the end of the experiment (middle panel). Representative tumors are shown in the right panel. Data are the mean \pm S.E.M of 10 tumors per group. (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

On these bases, tumor heterogeneity and microenvironment are under investigation in soft tissue sarcomas, and in particular in fibrosarcoma, to investigate new therapeutic perspectives that take into consideration tumor stemness, malignant fibroblast differentiation and extracellular matrix/stromal components.

The FGF/FGFR system is a key player in the tumor/microenvironment interplay (5,32) and its aberrant activation consequent to FGF2 overexpression may trigger fibrosarcoma progression by facilitating fibroblast transformation and increasing fibrosarcoma aggressiveness, neovascularization and metastatic potential (9,11). In addition, *FGFR1* has been shown to represent a driver gene in multiple soft tissue sarcoma subtypes characterized by its amplification/overexpression, thus representing a potential therapeutic target in these tumors (33). Notably, the multi-target tyrosine kinase inhibitor AL3818 (anlotinib), targeting also FGFR1/2/3 (34), is in phase III trial for metastatic/advanced alveolar soft part sarcoma, leiomyosarcoma and synovial sarcoma (NCT03016819).

Here, we demonstrate that FGF trap molecules can hijack the FGF/FGFR system to reduce the tumorigenic potential of murine and human fibrosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. The pattern recognition receptor PTX3 has been proposed as an extrinsic oncosuppressor, genetic loss of PTX3 in *Ptx3*^{-/-} mice increasing tumor growth in carcinogen-induced models of fibrosarcoma and skin cancer (21). Accordingly, homozygous PTX3 inactivation in *Ptx3*^{-/-} mice enhances FGF-dependent angiogenesis, tumor growth and metastasis (17). When assessed for the capacity to interact with a variety of extracellular signaling polypeptides, PTX3 was found to bind FGF2, thus inhibiting FGF2-dependent endothelial cell proliferation *in vitro* and angiogenesis *in vivo* (14,15,35,36). In addition, PTX3 binds other members of the FGF family *via* its N-terminal extension, including FGF6, FGF8b, FGF10 and FGF17 (19). Accordingly, transgenic PTX3 overexpression by tumor cells efficaciously impairs the activation of the FGF/FGFR system in FGF-driven tumor cell lines, thus affecting tumor growth and metastasis in different models of melanoma, prostate and mammary carcinomas (18-20). Moreover, PTX3 accumulation in tumor stroma and bloodstream, obtained through endothelial specific overexpression of PTX3 in transgenic mice, deeply affects the tumorigenic, angiogenic and metastatic potential of various syngeneic FGF-dependent tumor cell lines (17). Our study shows that PTX3 overexpression hampers the tumorigenic potential of fibrosarcoma cells and that stromal PTX3 accumulation in transgenic TgN(Tie2-hPTX3) mice significantly inhibits the growth of syngeneic fibrosarcoma tumor grafts.

Despite its oncosuppressive activity, the complex proteinaceous structure of PTX3 limits its clinical/pharmacological exploitation. In order to overcome these limitations, NMR data about FGF2/PTX3 interaction and pharmacophore modeling of a minimal PTX3-derived FGF2-binding pentapeptide were used for the identification of NSC12 as the first small

molecule able to act as an extracellular pan-FGF trap and endowed with a significant activity against various FGF-dependent tumor types (17,37).

In keeping with the inhibitory activity exerted by PTX3 on fibrosarcoma cells, NSC12 causes a significant inhibition of the tumorigenic potential of HT-1080 cells *in vitro* and *in vivo*, paralleled by a decrease of FGFR activation and signaling in these cells.

Together, our data indicate that FGF trapping may represent a novel strategy for the therapy of fibrosarcoma. In this frame, the PTX3-derived small molecule FGF-trap NSC12 may pave the way to the discovery of novel drug candidates for those subsets of soft tissue sarcomas, including fibrosarcomas, in which FGFR ligands play an onco-driving role.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by IG 18943 and MFAG 18459 grants from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) to MP and RR, respectively, and by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) to AAMD. SM was supported by a Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (FIRC) fellowship, and PFR by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship.

REFERENCES

1. Wibmer C, Leithner A, Zielonke N, Sperl M, Windhager R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2010**;21(5):1106-11 doi 10.1093/annonc/mdp415.
2. Augsburger D, Nelson PJ, Kalinski T, Udelnow A, Knosel T, Hofstetter M, *et al.* Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma -perspectives for future therapeutic targets and strategies. *Oncotarget* **2017**;8(61):104638-53 doi 10.18632/oncotarget.20136.
3. Lin CN, Chou SC, Li CF, Tsai KB, Chen WC, Hsiung CY, *et al.* Prognostic factors of myxofibrosarcomas: implications of margin status, tumor necrosis, and mitotic rate on survival. *Journal of surgical oncology* **2006**;93(4):294-303 doi 10.1002/jso.20425.
4. Nakanishi H, Tomita Y, Ohsawa M, Naka N, Araki N, Ochi T, *et al.* Tumor size as a prognostic indicator of histologic grade of soft tissue sarcoma. *Journal of surgical oncology* **1997**;65(3):183-7.

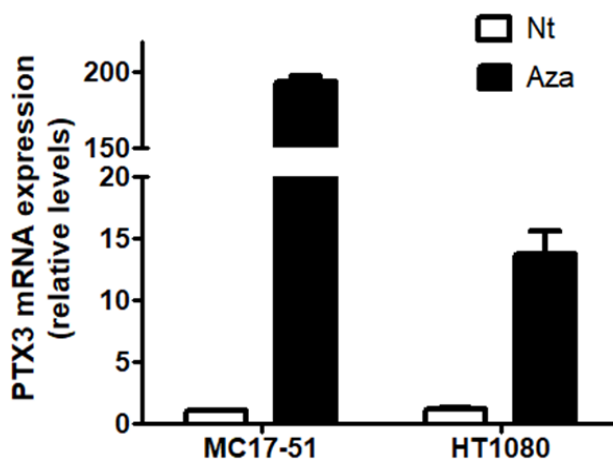
5. Ronca R, Giacomini A, Rusnati M, Presta M. The potential of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* **2015**;19(10):1361-77 doi 10.1517/14728222.2015.1062475.
6. Presta M, Chiodelli P, Giacomini A, Rusnati M, Ronca R. Fibroblast growth factors (FGFs) in cancer: FGF traps as a new therapeutic approach. *Pharmacology & therapeutics* **2017**;179:171-87 doi 10.1016/j.pharmthera.2017.05.013.
7. Akita S, Akino K, Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. *Advances in wound care* **2013**;2(2):44-9 doi 10.1089/wound.2011.0324.
8. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* **2005**;16(2):159-78 doi 10.1016/j.cytogfr.2005.01.004.
9. Moscatelli D, Quarto N. Transformation of NIH 3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the hst/K-fgf oncogene causes downregulation of the fibroblast growth factor receptor: reversal of morphological transformation and restoration of receptor number by suramin. *The Journal of cell biology* **1989**;109(5):2519-27.
10. Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* **1991**;66(6):1095-104.
11. Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, Wang Z, Zhao X, Wetterskog D, *et al.* Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *The Journal of clinical investigation* **2007**;117(10):2766-77 doi 10.1172/JCI32479.
12. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annual review of immunology* **2005**;23:337-66 doi 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115756.
13. Giacomini A, Ghedini GC, Presta M, Ronca R. Long pentraxin 3: A novel multifaceted player in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **2018**;1869(1):53-63 doi 10.1016/j.bbcan.2017.11.004.
14. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S, *et al.* Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* **2004**;104(1):92-9 doi 10.1182/blood-2003-10-3433.

15. Camozzi M, Rusnati M, Bugatti A, Bottazzi B, Mantovani A, Bastone A, *et al.* Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *J Biol Chem* **2006**;281(32):22605-13 doi 10.1074/jbc.M601023200.
16. Doni A, Garlanda C, Mantovani A. Innate immunity, hemostasis and matrix remodeling: PTX3 as a link. *Seminars in immunology* **2016**;28(6):570-7 doi 10.1016/j.smim.2016.10.012.
17. Ronca R, Giacomini A, Di Salle E, Coltrini D, Pagano K, Ragona L, *et al.* Long-Pentraxin 3 Derivative as a Small-Molecule FGF Trap for Cancer Therapy. *Cancer Cell* **2015**;28(2):225-39 doi 10.1016/j.ccell.2015.07.002.
18. Ronca R, Di Salle E, Giacomini A, Leali D, Alessi P, Coltrini D, *et al.* Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. *Mol Cancer Ther* **2013**;12(12):2760-71 doi 10.1158/1535-7163.MCT-13-0487.
19. Ronca R, Alessi P, Coltrini D, Di Salle E, Giacomini A, Leali D, *et al.* Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer. *J Pathol* **2013**;230(2):228-38 doi 10.1002/path.4181.
20. Leali D, Alessi P, Coltrini D, Ronca R, Corsini M, Nardo G, *et al.* Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. *Molecular cancer therapeutics* **2011**;10(9):1600-10 doi 10.1158/1535-7163.MCT-11-0286.
21. Bonavita E, Gentile S, Rubino M, Maina V, Papait R, Kunderfranco P, *et al.* PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. *Cell* **2015**;160(4):700-14 doi 10.1016/j.cell.2015.01.004.
22. Rubino M, Kunderfranco P, Basso G, Greco CM, Pasqualini F, Serio S, *et al.* Epigenetic regulation of the extrinsic oncosuppressor PTX3 gene in inflammation and cancer. *Oncoimmunology* **2017**;6(7):e1333215 doi 10.1080/2162402X.2017.1333215.
23. Nunes JPS, Dias AAM. ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. *BioTechniques* **2017**;62(4):175-9 doi 10.2144/000114535.
24. Giacomini A, Ghedini GC, Presta M, Ronca R. Long pentraxin 3: A novel multifaceted player in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **2017**;1869(1):53-63 doi 10.1016/j.bbcan.2017.11.004.
25. Castelli R, Giacomini A, Anselmi M, Bozza N, Vacondio F, Rivara S, *et al.* Synthesis, Structural Elucidation, and Biological Evaluation of NSC12, an Orally Available Fibroblast Growth Factor (FGF) Ligand Trap for the Treatment of FGF-Dependent

- Lung Tumors. *Journal of medicinal chemistry* **2016**;59(10):4651-63 doi 10.1021/acs.jmedchem.5b02021.
26. Folpe AL. Fibrosarcoma: a review and update. *Histopathology* **2014**;64(1):12-25 doi 10.1111/his.12282.
 27. Picci P MM, Fabbri N, Gambarotti M, Vanel D. Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions. The Rizzoli Case Archive. Volume 1: Springer International Publishing; 2014.
 28. Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CD, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *International journal of cancer* **2006**;119(12):2922-30 doi 10.1002/ijc.22239.
 29. Coindre JM. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Archives of pathology & laboratory medicine* **2006**;130(10):1448-53 doi 10.1043/1543-2165(2006)130[1448:GOSTSR]2.0.CO;2.
 30. Bahrami A, Folpe AL. Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. *The American journal of surgical pathology* **2010**;34(10):1504-13 doi 10.1097/PAS.0b013e3181ef70b6.
 31. Slovak ML, Hoeltge GA, Dalton WS, Trent JM. Pharmacological and biological evidence for differing mechanisms of doxorubicin resistance in two human tumor cell lines. *Cancer research* **1988**;48(10):2793-7.
 32. Giacomini A, Chioldelli P, Matarazzo S, Rusnati M, Presta M, Ronca R. Blocking the FGF/FGFR system as a "two-compartment" antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy. *Pharmacological research* **2016**;107:172-85 doi 10.1016/j.phrs.2016.03.024.
 33. Chudasama P, Renner M, Straub M, Mughal SS, Hutter B, Kosaloglu Z, *et al.* Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor 1 for Treatment of Soft-Tissue Sarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2017**;23(4):962-73 doi 10.1158/1078-0432.CCR-16-0860.
 34. Taurin S, Yang CH, Reyes M, Cho S, Coombs DM, Jarboe EA, *et al.* Endometrial Cancers Harboring Mutated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Protein Are Successfully Treated With a New Small Tyrosine Kinase Inhibitor in an Orthotopic Mouse Model. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **2018**;28(1):152-60 doi 10.1097/IGC.0000000000001129.

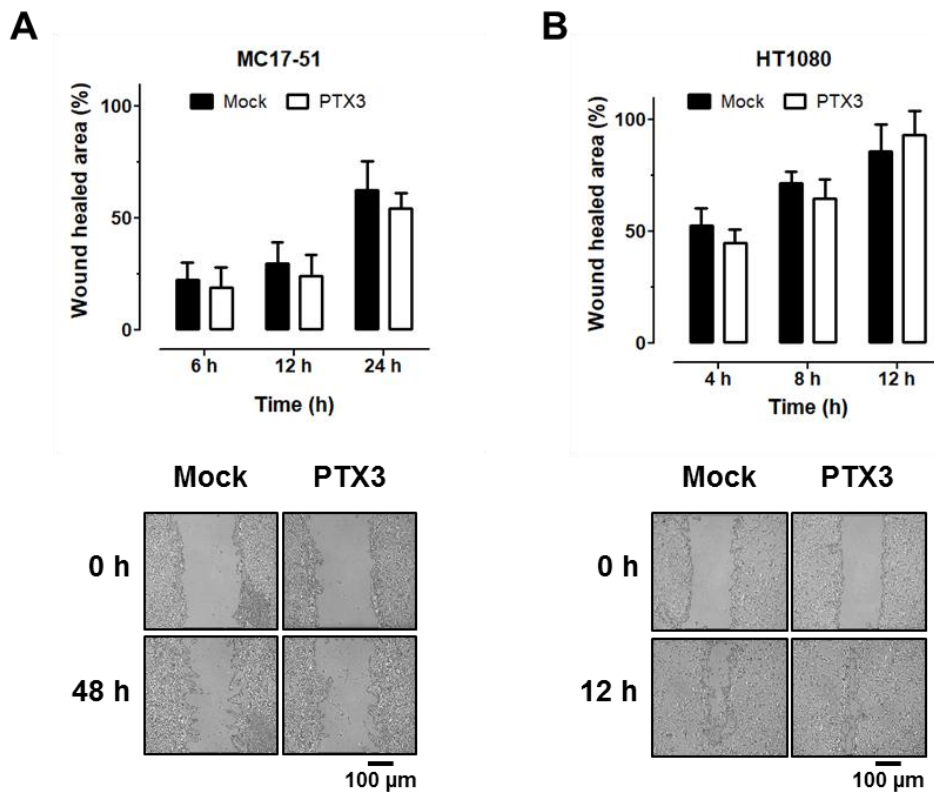
35. Leali D, Alessi P, Coltrini D, Rusnati M, Zetta L, Presta M. Fibroblast growth factor-2 antagonist and antiangiogenic activity of long-pentraxin 3-derived synthetic peptides. *Curr Pharm Des* **2009**;15(30):3577-89.
36. Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *Journal of cellular and molecular medicine* **2007**;11(4):723-38 doi 10.1111/j.1582-4934.2007.00061.x.
37. Romagnoli R, Baraldi PG, Salvador MK, Prencipe F, Lopez-Cara C, Schiaffino Ortega S, *et al.* Design, synthesis, in vitro, and in vivo anticancer and antiangiogenic activity of novel 3-arylaminobenzofuran derivatives targeting the colchicine site on tubulin. *Journal of medicinal chemistry* **2015**;58(7):3209-22 doi 10.1021/acs.jmedchem.5b00155.

SUPPLEMENTAL MATERIALS



Supplementary Figure 1. PTX3 expression is silenced by methylation in fibrosarcoma cells.

MC17-51 and HT-1080 cells were treated with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) at the concentration of 1 μ M and 6 μ M, respectively. Total RNA was extracted, retro-transcribed and cDNA used as template in quantitative PCR reaction to measure *PTX3* expression levels in respect to untreated cells (Nt).



Supplementary Figure 2. PTX3 overexpression does not affect the motility of fibrosarcoma cells.

Confluent monolayers of mock and PTX3-transfected MC17-51 (A) and HT-1080 (B) cells were seeded in 24 well plates in medium without fetal bovine serum and were scraped with a 200 μ l tip to obtain two 2 mm thick denuded areas in each well. At different time points, wounds were photographed and the percentage of healed area was measured with the ImageJ support and WH_NJ algorithm [1]. Black bars: mock cells; white bars: PTX3-overexpressing cells. Representative images of the corresponding wounds are shown in the lower panels.

1. Nunes, J.P.S. and A.A.M. Dias, ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. *Biotechniques*, 2017. 62(4): p. 175-179.

Supplementary Table 1. Primer sequences.

	Primer forward	Primer reverse
mouse PTX3	GACCTCGGATGACTACGAG	CTCCGAGTGCTCCTGGCG
human PTX3	GGTCTGCAGTGTTGGCCGAGAA	TCGTCCGTGGCTTGCAGCAG
mouse FGF2	TTCAAGGACCCCAAGCGG	TGCCCAGTTCGTTTCAGTG
human FGF2	TCAAACACTACAACCTCCAAGCAGAA	GTAACACACTTAGAAGCCAGCA
mouse FGFR1	CAGATAACACCAAACCAAACCG	GACCGCTCCACGACATC
human FGFR1	GGAGGCTACAAGGTTTCGCTAT	CATACGGCAAGTTGTCTGGC
mouse FGFR2	ACAAAGACAAGCCCAAGGAG	CGAAGGACCAGACATCACTC
human FGFR2	TCCATGAACTCCAACACCCC	TAGAGAGGTCCATCCTGCGT
mouse FGFR3	CAGGAGCAGTTGGTCTTCG	CCGCAGCTTGATGCCT
human FGFR3	CACAAGGTCTCTCGCTTCC	AGTCGCATCATCTTTCAGCAT
mouse FGFR4	GCTGTGAGAAGGAGATGCG	GTGTCCAGTAGGGTGCTTG
human FGFR4	GGGGTGTATCATCGGCAAGT	GTCGGAGGCATTGTCTTTCAG
mouse GAPDH	CTCTCTGCTCCTCCTGTT	GATGATGACCCTTTTGGCTC
human GAPDH	TTGTGGAAGGGCTCATGACCA	CGTATTCATTGTCATACCAGG

10.2 ARTIGO SOBRE O EFEITO DO TRATAMENTO COM rmPtX3 SOBRE AS CÉLULAS DE FIBROSSARCOMA

Artigo em preparação.

PENTRAXIN 3 EXERTS A PROLIFERATIVE EFFECT OVER FIBROSARCOMA CELLS *IN VITRO*

Priscila Fabiana Rodrigues e Adriana Abalen Martins Dias.

Laboratory of Experimental Genetics, General Biology Department – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

KEYWORDS: Pentraxin 3; Fibrosarcoma; Cells line; Proliferation.

CORRESPONDING AUTHOR: Adriana Abalen Martins Dias, Laboratory of Experimental Genetics, General Biology Department – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, MG, Brasil - 31270-901. Phone: +55 3134093025. E-mail: abalen@ufmg.br

FINANCIAL SUPPORT: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLICTS OF INTEREST: The authors disclose no potential conflicts of interest.

ABSTRACT

The soluble pattern recognition receptor long Pentraxin-3 (PTX3) is an acute phase inflammatory protein, with an important and non-redundant role in innate immunity, matrix deposition, female fertility, angiogenesis and inflammation. PTX3 have a dual role in cancer. The tumor promoter mechanisms are still unclear. At least in part, the PTX3 oncosuppressor effect is mediated by the inhibition of the Fibroblast Growth Factor (FGF) proliferative, proangiogenic and protumoral activities. Fibrosarcoma is a malignant soft tissue mesenchymal tumor composed by fibroblasts in which FGF pathway play a pivotal role in onset and progression. The objective of this work was to evaluate the PTX3 effect in fibrosarcoma cell *in vitro*. Murine fibrosarcoma cell lines MC17-51 and SaI/N and the murine fibroblast NIH/3T3 were treated with the murine recombinant Ptx3 and cell proliferation in low and high fetal bovine serum (FBS) conditions, anchorage-independent growth, and cell migration were evaluated. Ptx3 increased MC17-51 cell proliferation in the presence of low and high FBS concentration in medium and SaI/N only in low FBS medium. The number of MC17-51 colonies able to growth independent of anchorage improved after the Ptx3 treatment, but the area of the colonies was not affected. Ptx3 does not change the migratory rate. Fibrosarcoma

cells MC17-51 and SaI/N express constitutively Ptx3, Fgf2 and Vascular endothelial growth factor A (Vegfa). Ptx3 treatment downregulated *Fgf2* gene expression in MC17-51 fibrosarcoma cell, upregulated *Fgf2* and *Ptx3* and downregulated *Vegfa* in SaI/N. In conclusion, PTX3 treatment *in vitro* promoted fibrosarcoma cell proliferation and anchorage-independent growth and the candidate mechanism is the FGF signaling pathway modulation.

INTRODUCTION

Fibrosarcomas are malignant mesenchymal tumors, composed mainly by fibroblasts that produce variable levels of collagen (Folpe, 2014). The incidence of this type of tumor has decreased dramatically in recent decades mainly as a consequence of the evolution of the classification of soft tissue tumors, increased understanding of other mesenchymal and non-mesenchymal tumors that may mimic fibrosarcomas and clinical, morphological and genetic recognition of subtypes of these tumors. Today fibrosarcoma is still considered the most common sarcoma in adults, its incidence accounts for 5% of cases of soft tissue sarcomas and it remains as a difficult tumor to diagnose and treat (Wibmer *et al.*, 2010).

Pentraxin 3 (PTX3) is a 381 amino acid glycoprotein that was identified and characterized in the early 1990s (Lee *et al.*, 1990; Breviario *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993). It is a member of the pentraxin family, a superfamily of phylogenetically conserved proteins from arachnids to mammals that are essential components of the innate immune system (Garlanda *et al.*, 2018).

According to the size of the primary structure of its protomers, the members of the pentraxin family are divided into two groups: short pentraxins and long pentraxins (Goodman *et al.*, 1996). C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P protein (SAP) are representatives of short pentraxins, while pentraxin 3 is the prototype of long pentraxins. All members of the family have the pentraxin domain in the C-terminal portion, however, they differ in that they have a single N-terminal moiety (Garlanda *et al.*, 2018).

Pentraxin 3 is a multifunctional protein that plays a key role in the humoral arm of innate immunity, where it plays a non-redundant role as a soluble molecule (Garlanda *et al.*, 2002) that recognizes motifs present in some pathogens such as fungi, gram-positive and gram-negative bacteria and some types of viruses (Garlanda *et al.*, 2018). PTX3 also plays an essential role in inflammation, where it behaves as an acute phase protein. Plasma levels of PTX3 are low under normal conditions and increase rapidly and dramatically during

endotoxic shock, sepsis and inflammatory or/and infectious conditions (Mantovani, Garlanda, *et al.*, 2008; Deban *et al.*, 2011).

PTX3 has been shown to play an important role in the development of neoplasias (Magrini *et al.*, 2016; Giacomini *et al.*, 2018). Among the sarcomas, increased plasma and local PTX3 expression has been reported in Kaposi's sarcoma (Klouche *et al.*, 2002) and liposarcoma (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010), and correlated with degree of tumor malignancy (Germano *et al.*, 2010). However, there are no reports about the biological effect of PTX3 in the development of fibrosarcomas. In order to fill this gap, we investigated the role played by pentraxin 3 in characteristics that favor the tumor profile of fibrosarcoma cells *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Murine Recombinant Pentraxin-3 Protein

Murine recombinant Pentraxin-3 protein (rmPtx3) was gently provided by C. Garlanda (Humanitas Clinical Institute, Milan, Italy). This protein was produced in Chinese hamster ovary cells (CHO) (Garlanda *et al.*, 2002).

Cell Culture

Murine MC-TGS17-51 (MC17-51) and SaI/N fibrosarcoma and murine fibroblast NIH/3T3 from American Type Culture Collection (ATCC) were routinely grown in DMEM (Gibco) containing penicillin/streptomycin (100 U and 10 mg/mL respectively; Sigma) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco) at 37°C with 5% CO₂.

Cell Proliferation Assay

Cells were seeded (1×10^4) in 96-well cell culture plates in medium containing 10% FBS for 24 hours followed by 24 h of serum starvation (0,5% FBS). After the serum-starved conditions, FBS was returned in low (2%) or high (10%) concentration and the cell culture was treated with rmPtx3 (5 µg/ml). At 0, 24, 48 and 72 h, was added 0,5 µg/ml of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Mosmann, 1983) and the cell culture incubated 2h at 37 °C and 5% CO₂. Medium was aspirated, replaced by dimethylformamid + SDS 20% (1:1 v/v) and the plates incubated 2h at room temperature. Solution absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader (Thermo Fisher Scientific).

Anchorage-Independent Growth Assay

Murine cells ($2,5 \times 10^2$) were suspended in 200 μ l of medium containing 0.35% agarose and quickly seeded on 200 μ l of pre-solidified 0.5% in 48-well plate. After the solidification, on the top of agarose was added 100 μ l of medium with 5 μ g/ml of rmPTX3 and the plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere saturation. Twice a week, the medium on the top was added again. After 3 weeks of incubation, colonies were counted and photographed under a phase contrast microscope (Motic AE31 attached to a Moticom 2300 camera). The colonies area was measured using the Image J Software and the SA_NJ algorithm (Nunes e Dias, 2017).

Wound Healing Assay

Confluent monolayers of murine fibrosarcoma or fibroblast cell in 24-well plate were scraped with a 200 μ l tip to obtain two denuded areas in each well and the monolayers were quickly washed with pre-warmed PBS 1X. In 300 μ l of fresh medium, cells were treated with rmPtx3 (5 μ g/ml) and the plate was kept at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and in some experiments, cells were previously treated or not with 1 μ g/ml of mitomycin C (MMC). At different time points, wounds were photographed and the percentage of the healed area was measured with the Image J support and WH_NJ algorithm (Nunes e Dias, 2017).

Gene Expression

Total RNA from murine fibrosarcoma cell lines MC17-51 and SaI/N were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) and 2 μ g of total RNA were retro-transcribed using ImProm-II™ reverse transcriptase kit (Invitrogen) and oligo(dT)20 primers (IDT). The cDNA was used as template in PCR reactions using specific primers (**Supplementary Table 1**). *Ptx3*, *Fgf2* and *Vegfa* basal expression was evaluated by RT-PCR in agarose gel 1%. Real time PCR was utilized to evaluate the *Ptx3*, *Fgf2*, *Vegfa*, *Il1b* and *Tnfa* expression after the rmPtx3 treatment. MC17-51 and SaI/N were treated with 10 μ g/ml for 3 h before de RNA extracted. The reactions was performed in ABI 7900 HT Real Time PCR (*Applied Biosystems*) and the expression calculated by Hellemans equation, used *Gapdh* and *Hprt1* housekeeping genes (Hellemans *et al.*, 2007).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the statistical Software Prism 6 (GraphPad Software) for Microsoft Windows. Student's t test was used to analyse two groups of samples and for more than two groups, we used Analysis of Variance 2-way (ANOVA). P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Pentraxin 3 Improves Fibrosarcoma Cells Proliferation in vitro

Murine recombinant Ptx3 increases significantly the MC17-51 cell proliferation in medium-low (2%) and high-FBS (10%) (Fig. 1A). The onset of the Ptx3 effect was earlier in low-FBS medium (at 24 h) than in high medium (at 48 h). In fibrosarcoma murine cell line SaI/N, Ptx3 stimulated the cell proliferation in medium-low FBS, but not in high-FBS (Fig. 1B). Demonstrating that FBS can mask the Ptx3 proliferative effect. Despite this Ptx3 proliferative effect in fibrosarcoma cells line, the murine fibroblast NIH/3T3 does not respond to Ptx3 stimulus in low or high-FBS medium (Fig. 1C).

The number of Anchorage independent colonies from fibrosarcoma cells are increased in the presence of Pentraxin 3

Soft agar assay was used to evaluate if Ptx3 treatment promotes morphophysiological changes that would interfere with the pattern of anchorage independent growth of the cell lines. Recombinant murine Ptx3 increased significantly the number of colonies formed from fibrosarcoma MC17-51 line treated with rmPtx3 (149 ± 6.0) compared to the untreated group (112 ± 3.0) (Fig. 2D). Fibrosarcoma SaI/N and fibroblast NIH/3T3 colonies number are not affected by Ptx3 treatment. Ptx3 did not influence the size of the colonies s formed in any cell type (Fig. 2A, B e C).

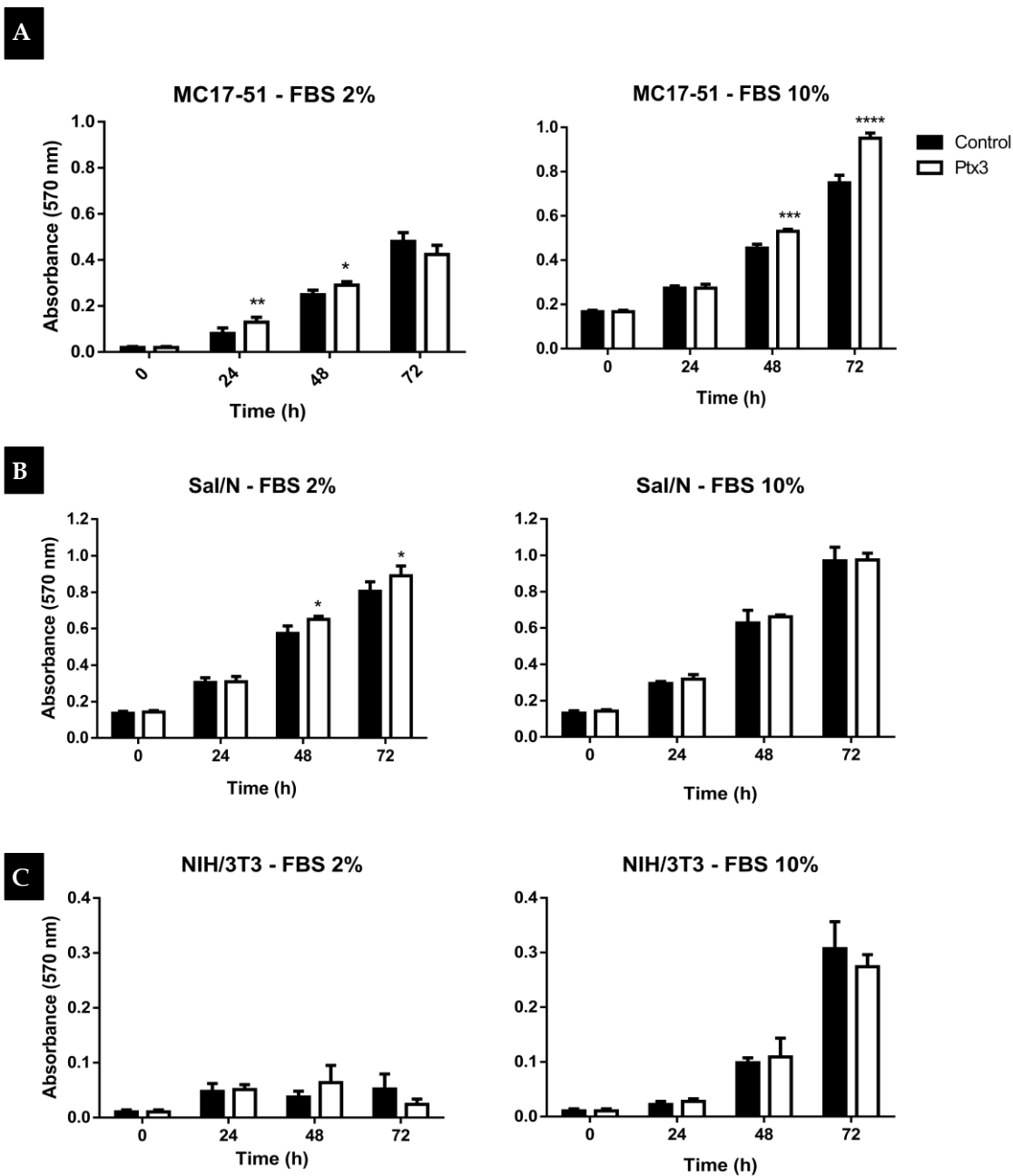


Figure 1 – Ptx3 improved murine fibrosarcoma cell proliferation *in vitro*.

Murine fibrosarcoma, MC17-51 and Sal / N, and murine fibroblast NIH / 3T3 cells were plated in 96-well culture plates in medium containing 10% FBS for 24 hours followed by 24 h of serum starvation (0,5% FBS). FBS was added in low (2%) or high (10%) concentration and the cell culture was treated with rmPtx3 (5 µg/ml). At 0, 24, 48 and 72 h, cell proliferation was estimated by MTT colorimetric assay. Cells were incubated with MTT (0,5 µg/ml) for 2 h. The crystals formed were solubilized with dimethylformamid + SDS 20% (1:1 v/v) for 2 h and the solution absorbance was measured at 570 nm. A) Fibrosarcoma MC17-51; B) Murine cell Sa/N; C) Murine fibroblast NIH/3T3.

Two-way ANOVA test, * p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

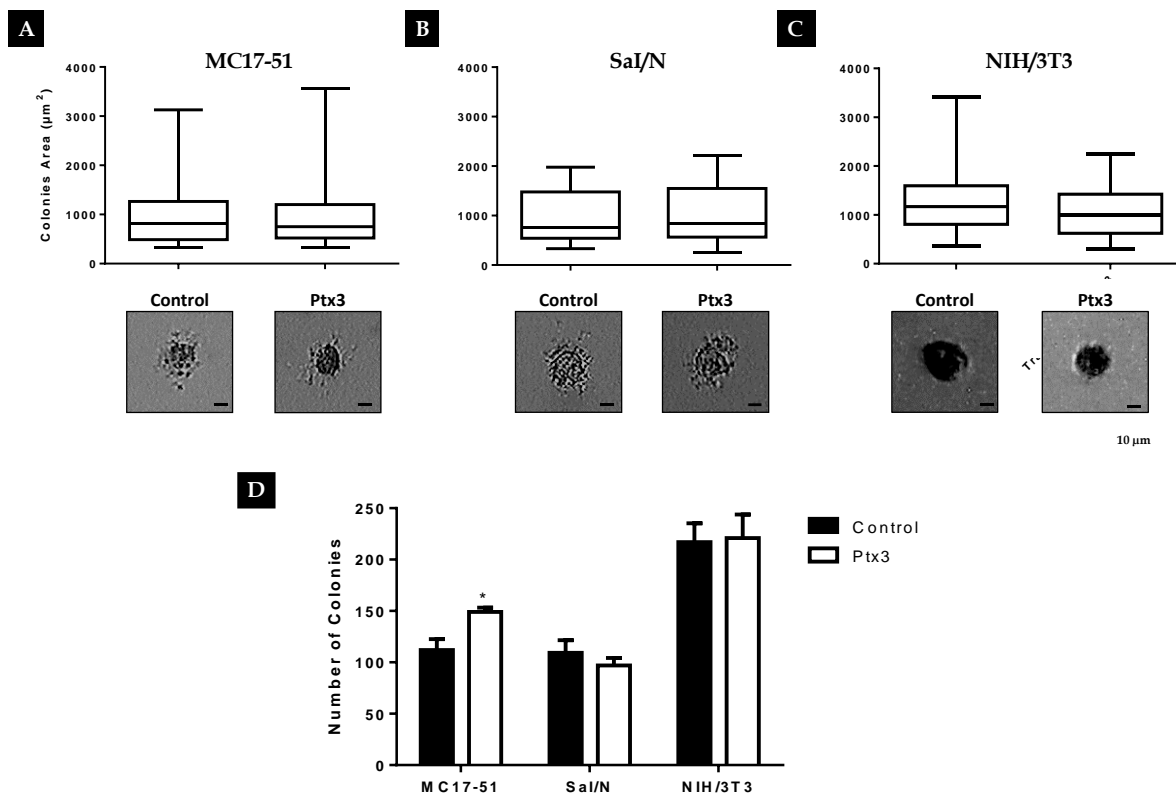


Figure 2 – The number of Anchorage Independent colonies from Fibrosarcoma Cells are Increased in the Presence of Pentraxin 3.

Murine fibrosarcoma cells MC17-51 and SaI/N and the fibroblast murine NIH/3T3 were suspended in 200 µl of medium containing 0.35% agarose and quickly seeded on 200 µl of pre-solidified 0.5% in 48-well plate. After the solidification, on the top of agarose was added 100 µl of medium with 5 µg/ml of rmPTX3, reset twice a week. After 3 weeks of incubation, colonies were counted and photographed under a phase contrast microscope. The colonies areas was measured using the ImageJ Software and the SA_NJ algorithm. A) Murine fibrosarcoma MC17-51; B) Fibrosarcoma SaI/N; C) Fibroblast NIH/3T3; D) Colonies number.

Student-t test, * p < 0,05

Ptx3 do not interfere with the migration of fibrosarcoma cells

Comparison between Ptx3 treated groups and respective control groups shows that Ptx3 does not interfere with the migration rate of the murine fibrosarcoma MC17-51 (Fig. 3A) and SaI/N (Fig. 3B), and murine fibroblast NIH/3T3 (Fig. 3C). MMC treatment reduces cell migration of these lines relative to untreated cells, however, even the MMC treated wells did not show migratory response to Ptx3 treatment.

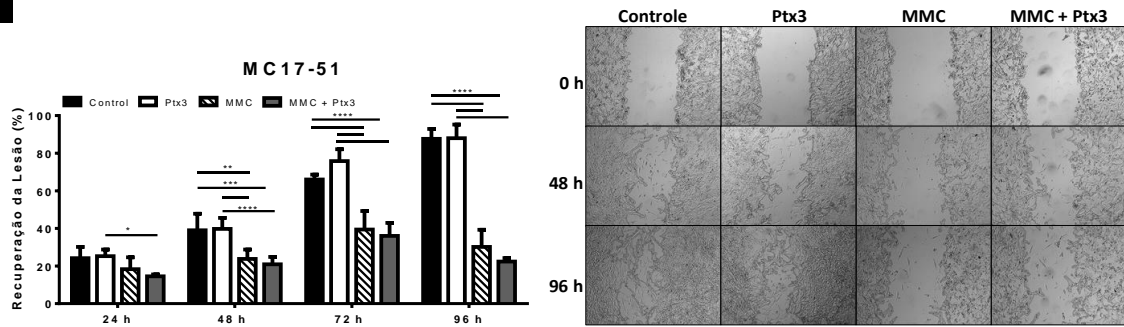
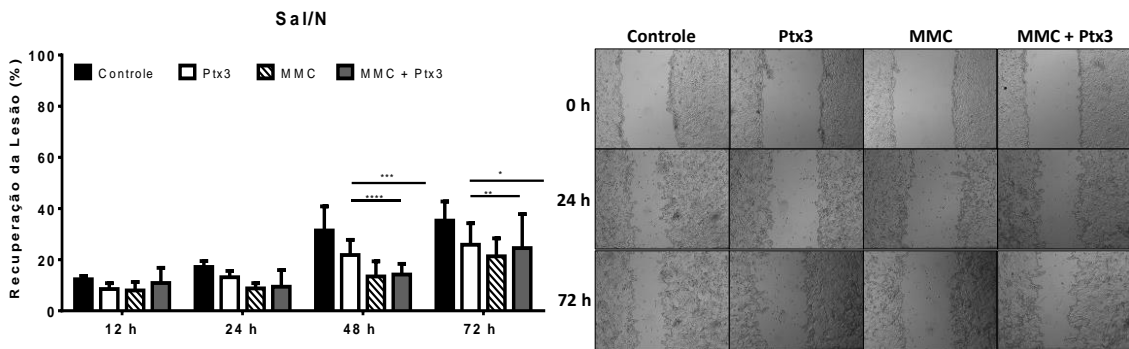
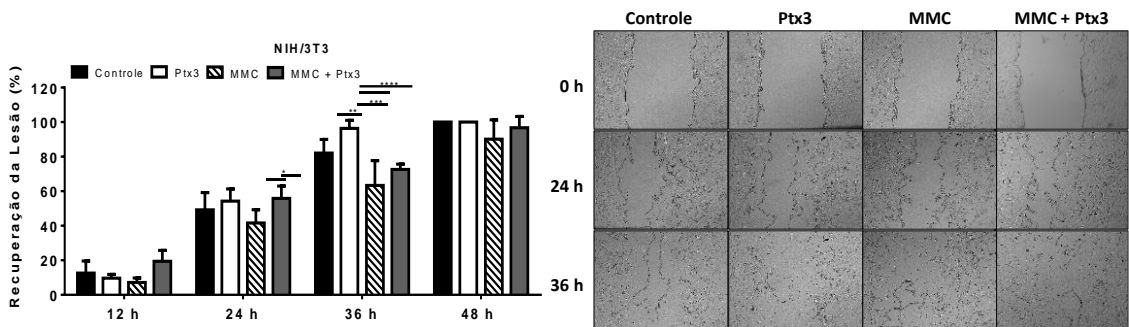
A**B****C**

Figure 3 - Fibrosarcoma Cells Migration is not Affected by Pentraxin-3.

Murine fibrosarcoma MC17-51 (A) or SaI/N (B) or murine fibroblast NIH/3T3 (C) cells were seeded in 24 well plates and confluent monolayers were scraped with a 200 μ l tip to obtain a denuded area. Monolayer was treated with rmPtx3 (5 μ g/ml) and the plate was kept at 37 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and in some experiments, cells were previously treated with 1 μ g/ml of mitomycin C (MMC). At different time points, wounds were photographed and the percentage of the healed area was measured with the ImageJ support and WH_NJ algorithm. Representative images of the corresponding wounds are shown in the right panels.

ANOVA Two-way. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Ptx3 downregulates *Fgf2* expression in MC17-51 Fibrosarcoma

Fibrosarcoma cell lines MC17-51 and SaI/N constitutively express *Ptx3* and *Fgf2* and vascular endothelial growth factor (*Vegfa*), factors that promote cell proliferation (Fig. 4A). PTX3 treatment modulates negatively *Fgf2* expression in MC17-51 cells. *Ptx3*, *Vegfa*, *Il1b* and *Tnfa* expression were not altered by the treatment (Fig. 4B). In SaI/N cell line, *Fgf2* and *Ptx3* were modulated positively, while *Vegfa* was modulated negatively. *Il1b* and *Tnfa* expression are not affected by *Ptx3* treatment.

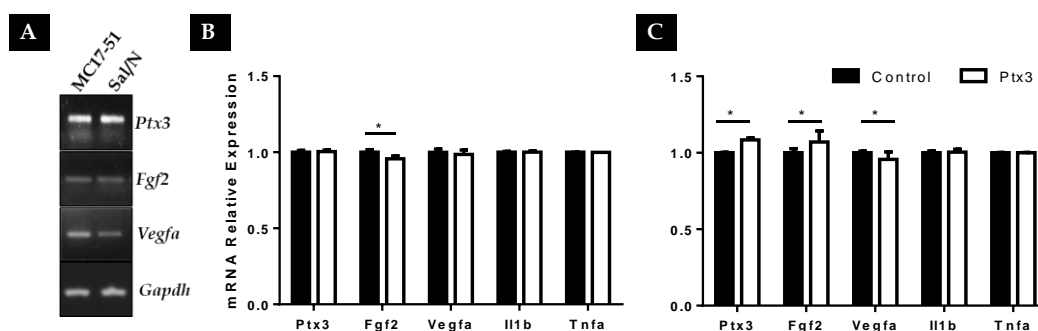


Figure 4 – Modulation of Gene Expression by Ptx 3 in murine fibrosarcoma cells.

Murine fibrosarcoma MC17-51 and SaI/N express constitutively *Ptx3*, *Fgf2*, and *Vegfa* by RT-PCR (A). Cell lines MC17-51 (A) and SaI/N (B) were treated with murine recombinant *Ptx3* (5 μ g/ml) for 3 h and *Ptx3*, *Fgf2*, *Vegfa*, *Il1b* and *Tnfa* gene expression was evaluated by RT-qPCR.

Student-t Test, * $p < 0,05$.

DISCUSSION

Cancer develops through a multi-step process resultant from accumulation of mutations in normal cells that progressively acquire a set of specific marks and characteristics that transform them into highly malignant cells (Hanahan e Weinberg, 2011). Self-sufficiency in the production of growth signals, insensitivity to anti-proliferative signals, evasion of apoptosis and unlimited replicative potential, contribute to the uncontrolled proliferation of cancer cells. In addition, neoplastic cells also acquire the ability to invade adjacent normal tissue and promote metastasis to distant organs. Angiogenesis, besides aiding the process of hematogenous metastasis, promotes neoplastic development, by supplying the tumor in progression of nutrients and oxygen (Hanahan e Weinberg, 2011). Inflammation associated with the tumor may contribute to the acquisition of a number of characteristics favoring tumor progression by promoting delivery of bioactive molecules to the tumor microenvironment, including growth factors that support proliferative signaling, survival factors that limit death

cellular, pro-angiogenic factors, extracellular matrix modifying enzymes that facilitate angiogenesis, invasion and metastasis, and signals that lead to the activation of the epithelial-mesenchymal (EMT) transition (Mantovani *et al.*, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011). The understanding of the biology of the different types of tumors is a way of rationalizing the complexity of the disease and enabling the development of strategies for controlling its progression (Hanahan e Weinberg, 2000).

Here we evaluated cell characteristics that favors the tumor growth, invasion and metastasis processes such as cellular proliferation, cell migration and anchorage independent growth, in murine fibrosarcoma cells lines MC17-51 and SaI/N in response to the treatment with the recombinant Pentraxin 3 protein. We have shown that the Pentraxin 3 protein promoted increased cell proliferation of murine fibrosarcomas *in vitro*, both in medium containing low FBS concentration (2%), and in high (10%) serum concentrations in MC17-51 cell line. However, Ptx3 did not interfere with the proliferative index of the non malignant NIH/3T3 murine fibroblast. Ptx3 treatment also increased the number of colonies formed from the fibrosarcoma line MC17-51 that were able to grow independently of the anchorage, but the fibrosarcoma cell migration is not affected by Ptx3. These findings are indicative of a positive role of PTX3 in the progression of this type of tumor.

Although we observed the PTX3 proliferative effect in fibrosarcomas cells, PTX3 does not interfere in fibroblast NIH/3T3 cell proliferation. Which points to a preponderant impact of Ptx3 on malignant cells over non malignant ones.

High local and systemic levels of PTX3 were detected in patients bearing some types of sarcomas, such as Kaposi's sarcomas (Klouche *et al.*, 2002), non-lipomatous soft tissue sarcoma (Willeke *et al.*, 2006) and liposarcomas (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010). A decrease in PTX3 levels was associated with a positive clinical response and tumor decrease in response to treatment of liposarcoma (Germano *et al.*, 2010). Corroborating with the expression and production of Ptx3 in sarcomas, in an unprecedented way, we verified that the murine fibrosarcoma MC17-51 and SaI/N also express Ptx3 at baseline. However, although the presence of PTX3 has been identified in sarcomas, its role, both physiologically and pathologically, has not yet been elucidated and therefore needs to be better studied.

A dual role for PTX3 has been attributed in tumorigenesis, since in some tumor types the pentraxin exerts a pro-tumorigenic effect and in other types an anti-tumoral action (Magrini *et*

al., 2016); (Giacomini *et al.*, 2018). Inflammation is an essential component of the tumor microenvironment supporting, in many aspects, tumor development and growth (Mantovani, Allavena, *et al.*, 2008). PTX3 have an important role in controlling the inflammatory process (Bottazzi *et al.*, 2006) and at least part of the role of PTX3 in tumorigenesis has been attributed to its regulatory action of the inflammatory response. In agreement with this hypothesis, Bonavita *et al.*, in 2015, demonstrated that PTX3 is able to inhibit carcinogenesis by regulating the complement cascade and mediating tumor inflammation (Bonavita *et al.*, 2015).

PTX3 gene hypermethylation and consequent reduction of its expression has been reported in human squamous cell carcinomas of the esophagus (Wang *et al.*, 2011), leiomyosarcoma, chordoma, desmoid tumor, colorectal cancer and squamous cell carcinoma of the skin, which caused the PTX3 gene to be targeted as an oncosuppressor gene (Bonavita *et al.*, 2015). In contrast, in other types of tumors, such as angiosarcoma and synovial sarcoma, the PTX3 gene is not found to be hypermethylated compared to normal tissues (Bonavita *et al.*, 2015).

An inhibitory role of PTX3 on cell proliferation and angiogenesis in prostate tumors (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013) and melanoma (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013) has been reported. Despite this inhibitory effect of PTX3 on tumorigenesis, some studies suggest a pro-tumorigenic effect of this protein. Elevation of plasma or systemic levels of PTX3 has been observed in several types of tumors, including breast cancer (Tafani *et al.*, 2010; Pavlou *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Player *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017), glioma (Locatelli *et al.*, 2013; Tung *et al.*, 2016), glioblastoma (Tafani *et al.*, 2011), liposarcoma (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010), lung cancer (Diamandis *et al.*, 2011; Infante *et al.*, 2016), prostate carcinoma (Ravenna *et al.*, 2009; Stallone *et al.*, 2014), pancreatic (Kondo *et al.*, 2013), gastric cancer (Choi *et al.*, 2016), human cervical cancer (Ying *et al.*, 2016) and ovarian cancer (Tothill *et al.*, 2008). The high levels have been associated with a worse prognosis.

An increase *in vitro* cell migration and invasion of human pancreatic tumor cells, breast carcinoma, head and squamous cell carcinomas of the neck in response to PTX3 has also been reported (Kondo *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015). In addition, treatment with the cisplatin or 5-fluorouracil drugs in human and murine M2 macrophages and tumor associated fibroblasts promoted the activation of the PTX3 gene which, once active, promoted cell growth, invasion and metastasis of human breast cancer cells resistant to drugs in

immunodeficient mice (Chi *et al.*, 2015). These data indicate a pro-tumorigenic role of Ptx3 and corroborate our findings in fibrosarcomas.

One of the mechanisms of action reported by which PTX3 acts inhibiting cell proliferation is through its binding to Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), which prevents the engagement of this factor to its specific receptors (Rusnati *et al.*, 2004). Thus, PTX3 is pointed as being molecular a trap for FGF2, capable of inhibiting the pro-proliferative and pro-angiogenic effects of this factor (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013; Ronca *et al.*, 2015).

Despite being considered as an important mitogenic factor, some studies pointed that FGF2 can also inhibit the proliferation of some cell types (Liu *et al.*, 1998; Oesterle *et al.*, 2000). Liu *et al.*, in 1998, found that FGF2 can both stimulate cell proliferation in MCF-7 murine breast cancer cells and inhibits in MCF-7ras (stable RAS transfected cell) and the dual FGF2 effect is dependent of MAPK activation. Ras protein acts in FGF signaling and is a signal transducing protein that activated the MAPK mitogenic pathway signaling. Cell proliferation is stimulated when the MAPK is transiently activated by FGF2 in MCF-7 and inhibited by MAPK activation in a constant manner FGF2-promoted in MCF7-Ras cells. Therefore, FGF2 is able to increases the Ras in the MCF-7Ras cell and stimulate the constant MAPK pathway activation and this inhibits the cell proliferation (Liu *et al.*, 1998).

Breast cancer is reported as one of the tumor types in which PTX3 plays a pro-tumorigenic role (Giacomini *et al.*, 2018). Local and serum levels of PTX3 have been observed in patients with breast tumors and have been associated with improvement of migration and invasion (Choi *et al.*, 2014). Although there are no reports on the expression of RAS in murine fibrosarcoma MC17-51 and SaI/N lines, they, in addition to Ptx3, also express Fgf2 and Ptx3 treatment increases cell proliferation. One hypothesis for such a finding is that FGF2 would inhibit cell proliferation of these lines and that after treatment with Ptx3, FGF2/PTX3 interaction would prevent the possible inhibitory effect of FGF2 on cell cultures, which would culminate in an increased cell proliferation.

In a similar study, we transfected the fibrosarcoma cells for expression of higher amounts of PTX3. We observed that PTX3 overexpression in murine MC17-51 and human HT-1080 fibrosarcoma transfected cells leads to an impaired cell proliferation *in vitro* and inhibits tumor growth in mice. The underlined mechanism was the inhibition of the FGF signaling

(submitted paper). The apparent discrepancy between these findings can be attributed, at least in part, by the higher amounts of PTX3 present in the context of the transfected cells in comparison with WT ones. In this case, the different levels of the protein could lead to a different kinetics of activation and inhibition of cell signaling resulting in a diverse gene expression profile that impacted in the divergent biological effects found. The difference between the two models; treatment of the cells with exogenous Ptx3 and superexpression by transfection in fibrosarcoma cells demonstrated that PTX3 can exert a dual effect in dependence of the context and signaling pathway activated.

Here, we show a pro-proliferative effect of Ptx3 on cell proliferation and independent anchorage growth of murine fibrosarcoma cell. Despite this, the mechanism of action responsible for this effect of PTX3 is not known. The FGF signaling pathway appears as a candidate, since we have also shown the modulatory effect of PTX3 treatment on this pathway.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) to AAMD and PFR was supported Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship.

BIBLIOGRAPHY

- BONAVITA, E.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. PTX3 acts as an extrinsic oncosuppressor. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32309-10, Oct 2015. ISSN 1949-2553.
- BOTTAZZI, B. et al. The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 5, p. 909-12, May 2006. ISSN 0741-5400.
- BREVIARIO, F. et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22190-7, Nov 1992. ISSN 0021-9258.
- CAMOZZI, M. et al. Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. **J Biol Chem**, v. 281, n. 32, p. 22605-13, Aug 2006. ISSN 0021-9258.
- CHEN, W. Y. et al. Analyzing the differentially expressed genes and pathway cross-talk in aggressive breast cancer. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 41, n. 1, p. 132-40, Jan 2015. ISSN 1447-0756.
- CHI, J. Y. et al. Targeting chemotherapy-induced PTX3 in tumor stroma to prevent the progression of drug-resistant cancers. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p. 23987-4001, Sep 2015. ISSN 1949-2553.
- CHOI, B. et al. Pentraxin-3 Silencing Suppresses Gastric Cancer-related Inflammation by Inhibiting Chemotactic Migration of Macrophages. **Anticancer Res**, v. 35, n. 5, p. 2663-8, May 2015. ISSN 1791-7530.
- _____. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor in advanced gastric cancer contributes to bone metastatic osteolysis by inducing long pentraxin 3. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55506-55517, Aug 2016. ISSN 1949-2553.

- _____. Elevated Pentraxin 3 in bone metastatic breast cancer is correlated with osteolytic function. **Oncotarget**, v. 5, n. 2, p. 481-92, Jan 2014. ISSN 1949-2553.
- DEBAN, L. et al. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 1, p. 237-49, Jan 2011. ISSN 1432-0878.
- DIAMANDIS, E. P. et al. Pentraxin-3 is a novel biomarker of lung carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 8, p. 2395-9, Apr 2011. ISSN 1078-0432.
- FOLPE, A. L. Fibrosarcoma: a review and update. **Histopathology**, v. 64, n. 1, p. 12-25, Jan 2014. ISSN 1365-2559.
- GARLANDA, C. et al. PTX3, a Humoral Pattern Recognition Molecule, in Innate Immunity, Tissue Repair, and Cancer. **Physiol Rev**, v. 98, n. 2, p. 623-639, Apr 2018. ISSN 1522-1210.
- _____. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 182-6, Nov 2002. ISSN 0028-0836.
- GERMANO, G. et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. **Cancer Res**, v. 70, n. 6, p. 2235-44, Mar 2010. ISSN 1538-7445.
- GIACOMINI, A. et al. Long pentraxin 3: A novel multifaceted player in cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1869, n. 1, p. 53-63, Jan 2018. ISSN 0006-3002.
- GOODMAN, A. R. et al. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 2, p. 191-202, Aug 1996. ISSN 1359-6101.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674.
- _____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172.
- HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007. ISSN 1474-760X.
- INFANTE, M. et al. Prognostic and diagnostic potential of local and circulating levels of pentraxin 3 in lung cancer patients. **Int J Cancer**, v. 138, n. 4, p. 983-91, Feb 2016. ISSN 1097-0215.
- KLOUCHE, M. et al. Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells. **AIDS**, v. 16, n. 8, p. F9-18, May 2002. ISSN 0269-9370.
- KONDO, S. et al. Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. **Br J Cancer**, v. 109, n. 3, p. 739-46, Aug 2013. ISSN 1532-1827.
- 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.
- 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.
- LIU, J. F. et al. Fibroblast growth factor-2 has opposite effects on human breast cancer MCF-7 cell growth depending on the activation level of the mitogen-activated protein kinase pathway. **Eur J Biochem**, v. 258, n. 1, p. 271-6, Nov 1998. ISSN 0014-2956.
- LOCATELLI, M. et al. The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation and prognosis of malignancy in gliomas. **J Neuroimmunol**, v. 260, n. 1-2, p. 99-106, Jul 2013. ISSN 1872-8421.
- MAGRINI, E.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. The Dual Complexity of PTX3 in Health and Disease: A Balancing Act? **Trends Mol Med**, v. 22, n. 6, p. 497-510, Jun 2016. ISSN 1471-499X.
- MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, Jul 2008. ISSN 1476-4687.
- MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; ALLAVENA, P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. **Ann Med**, v. 42, n. 3, p. 161-70, Apr 2010. ISSN 1365-2060.

- MANTOVANI, A. et al. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 1, p. 1-13, Jan 2008. ISSN 0271-9142.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759.
- NUNES, J. P. S.; DIAS, A. A. M. ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. **Biotechniques**, v. 62, n. 4, p. 175-179, Apr 2017. ISSN 1940-9818.
- OESTERLE, E. C.; BHAVE, S. A.; COLTRERA, M. D. Basic fibroblast growth factor inhibits cell proliferation in cultured avian inner ear sensory epithelia. **J Comp Neurol**, v. 424, n. 2, p. 307-26, Aug 2000. ISSN 0021-9967.
- PAVLOU, M. P.; DIMITROMANOLAKIS, A.; DIAMANDIS, E. P. Coupling proteomics and transcriptomics in the quest of subtype-specific proteins in breast cancer. **Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1083-95, Apr 2013. ISSN 1615-9861.
- PLAYER, A. et al. Identification of candidate genes associated with triple negative breast cancer. **Genes Cancer**, v. 8, n. 7-8, p. 659-672, Jul 2017. ISSN 1947-6019.
- RAVENNA, L. et al. Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. **Prostate**, v. 69, n. 11, p. 1245-55, Aug 2009. ISSN 1097-0045.
- RONCA, R. et al. Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer. **J Pathol**, v. 230, n. 2, p. 228-38, Jun 2013. ISSN 1096-9896.
- _____. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2760-71, Dec 2013. ISSN 1538-8514.
- _____. Long-Pentraxin 3 Derivative as a Small-Molecule FGF Trap for Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v. 28, n. 2, p. 225-39, Aug 2015. ISSN 1878-3686.
- 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.
- STALLONE, G. et al. Pentraxin 3: a novel biomarker for predicting progression from prostatic inflammation to prostate cancer. **Cancer Res**, v. 74, n. 16, p. 4230-8, Aug 2014. ISSN 1538-7445.
- TAFANI, M. et al. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 32, Apr 2011. ISSN 1742-2094.
- _____. Up-regulation of pro-inflammatory genes as adaptation to hypoxia in MCF-7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. **Cancer Sci**, v. 101, n. 4, p. 1014-23, Apr 2010. ISSN 1349-7006.
- THOMAS, C. et al. Pentraxin-3 is a PI3K signaling target that promotes stem cell-like traits in basal-like breast cancers. **Sci Signal**, v. 10, n. 467, Feb 2017. ISSN 1937-9145.
- TOTHILL, R. W. et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 16, p. 5198-208, Aug 2008. ISSN 1078-0432.
- TUNG, J. N. et al. Inhibition of pentraxin 3 in glioma cells impairs proliferation and invasion in vitro and in vivo. **J Neurooncol**, v. 129, n. 2, p. 201-9, 09 2016. ISSN 1573-7373.
- WANG, J. X. et al. Aberrant methylation of the 3q25 tumor suppressor gene PTX3 in human esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 37, p. 4225-30, Oct 2011. ISSN 2219-2840.
- WIBMER, C. et al. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. **Ann Oncol**, v. 21, n. 5, p. 1106-11, May 2010. ISSN 1569-8041.
- WILLEKE, F. et al. Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 15, p. 2639-46, Oct 2006. ISSN 0959-8049.
- YING, T. H. et al. Knockdown of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 29385, Jul 2016. ISSN 2045-2322.

SUPPLEMENTARY TABLE

Table 1: Primers sequences for RT-PCR.

TARGET	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
<i>PTX3</i>	CCT.GCT.TTG.TGC.TCT.CTG.GT	TCT.CCA.GCA.TGA.TGA.ACA.GC
<i>FGF2</i>	TCA.AAC.TAC.AAC.TCC.AAG.CAG.AA	GTA.ACA.CAC.TTA.GAA.GCC.AGC.A
<i>VEGFA</i>	AGA.CAG.AAC.AAA.GCC.AGA.AAA.TCA.C	CAC.GTC.TGC.GGA.TCT.TGG.AC
<i>GAPDH</i>	TTG.TGG.AAG.GGC.TCA.TGA.CCA	CGT.ATT.CAT.TGT.CAT.ACC.AGG

Table 2: Primer sequences for RT-qPCR.

TARGET	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
<i>PTX3</i>	TGC.CCG.CAG.GTT.GTG.AAA.C	ATA.CAT.CTG.TGG.CTT.TGA.CCC.AA
<i>FGF2</i>	CGA.CCC.ACA.CGT.CAA.ACT.ACA	TTG.GCA.CAC.ACT.CCC.TTG.AT
<i>VEGFA</i>	AGA.CAG.AAC.AAA.GCC.AGA.AAA.TCA.C	CAC.GTC.TGC.GGA.TCT.TGG.AC
<i>IL1B</i>	TCC.ACC.TCA.ATG.GAC.AGA.ATA.TCA	GGT.TCT.CCT.TGT.ACA.AAG.CTC.ATG
<i>TNFA</i>	CCA.CGC.TCT.TCT.GTC.TAC.TGA.ACT.T	CAG.CTG.CTC.CTC.CAC.TTG.GT
<i>HPRT1</i>	CAG.TCC.CAG.CGT.CGT.GAT.TA	CAC.TTT.TTC.CAA.ATC.CTC.GGC.A
<i>GAPDH</i>	AGG.TCG.GTG.TGA.ACG.GAT.TT	TGC.CGT.GAG.TGG.AGT.CAT.AC