

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**Prostaglandina E₂ via EP4/IL-1R inibe a
diferenciação de células Th17 durante a eferocitose
de células infectadas**

Naiara Naiana Dejani

Ribeirão Preto

2016

Naiara Naiana Dejani

**Prostaglandina E₂ via EP4/IL-1R inibe a
diferenciação de células Th17 durante a eferocitose
de células infectadas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Imunologia
Básica e Aplicada
Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo
de Medeiros

Ribeirão Preto

2016

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Dejani, Naiara Naiana

Prostaglandina E₂ via EP4/IL-1R inibe a diferenciação de células Th17 durante a eferocitose de células infectadas

Ribeirão Preto, 2016.

160 p. : Il. ; 30cm

Tese de Doutorado. Apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo – FMRP-USP

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Medeiros, Alexandra Ivo

1. Eferocitose; 2. Prostaglandina E₂; 3. Linfócitos Th17; 4. Colite infecciosa.

Nome: Naiara Naiana Dejani

Título: Prostaglandina E₂ via EP4/IL-1R inibe a diferenciação de células Th17 durante a eferocitose de células infectadas

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Instituição: UNESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Vanessa Carregaro Pereira

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Instituição: FCFRP-USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Aristóblo Mendes da Silva

Instituição: UFMG-ICB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso

Instituição: EPM-UNIFESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular das Infecções Pulmonares na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP de Araraquara e no Laboratório do Dr. C. Henrique Serezani na *Indiana University*, Indianápolis, EUA. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 11/17611-7, 12/23580-0, BEPE - 14/17374-3) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 741509/2006-0) .

Agradecimentos

À Professora Dra. Alexandra Ivo de Medeiros pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, pela orientação, ensinamento e dedicação para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Henrique Serezani pela oportunidade de realizar o estágio no exterior em seu laboratório, pela orientação, apoio e todo ensino.

Aos alunos do laboratório da profa. Dra. Alexandra, pela ajuda durante o desenvolvimento desta tese. Felipe Fortino e Fernanda Dias que contribuíram na etapa inicial da padronização dos experimentos. Allan B. Orlando que ajudou na realização dos experimentos e finalização deste trabalho. Victória Nino, Letícia Penteado, Ana Codo, Júlia Bazano e Alexsander Cássio pela ajuda durante os experimentos *in vivo* e Ana Salina por sempre nos ajudar com os pedidos dos animais e compras do laboratório. À técnica Valéria Mallavolta que nos ajuda na organização do laboratório e biotério. Além de todo o apoio para a realização deste trabalho, agradeço imensamente pelo carinho e pelos momentos alegres e divertidos que compartilhamos e principalmente pelo companherismo e respeito na nossa rotina de trabalho.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Dr. C. Henrique Serezani, Stephanie Brandt, Sue Wang, Nicole Glossoon-Byers e Annie Piñero, por todo apoio durante meu estágio no exterior e ajuda durante a realização dos experimentos. E à Dra. Ana Moreira Serezani pelo apoio e sugestões.

Ao prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira (UNESP) pela colaboração e doação da cepa de *Citrobacter rodentium*.

Aos amigos da Pós-Graduação, em especial Amanda Zangirolamo pela ajuda durante as disciplinas, pela amizade e carinho. À professora Dra. Vânia L. D. Bonato e o pessoal de seu laboratório, Thaís B. Bertolini e Ana Flávia, por toda ajuda e apoio.

À secretária da Pós-Graduação em Imunologia da FMRP-USP, Ana Cristina S. Ferreira por todo apoio e orientação.

As técnicas de citometria Denise Ferraz - FMRP/USP e Cláudia Tavares dos Santos - FCFAR-Unesp, pela ajuda na aquisição das amostras e à Mariana Marchi Santoni Biasioli – FCFAR-Unesp, pelo suporte na técnica de PCR.

A todos amigos e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Unesp e do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP.

Aos professores da comissão julgadora deste trabalho pela disponibilidade e atenção.

À Fapesp pelo apoio financeiro para a realização desta tese e do estágio no exterior (11/17611-7, 12/23580-0 e BEPE-14/17374-3), e ao CNPq (741509/2006-0) e CAPES.

Sumário

Introdução	15
Linfócitos T CD4 ⁺ helper	15
Linfócitos Th17	18
Apoptose, eferocitose e diferenciação de linfócitos Th17.....	20
Prostaglandina E ₂ e vias de sinalização	30
PGE ₂ na resposta imune adaptativa	34
Hipótese.....	38
Objetivos	38
Objetivos específicos:.....	39
Material e Métodos	40
Animais.....	40
Diferenciação de DCs a partir de precursores de medula óssea	40
Bactérias	40
Geração das células apoptóticas infectadas (IACs).....	41
Ensaio de eferocitose	42
Geração do meio de cultura condicionado	42
Obtenção de células Th <i>naive</i>	44
Ensaio de diferenciação de linfócitos Th.....	45
Análise da proliferação celular	46
Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares por citometria de fluxo nos linfócitos diferenciados <i>in vitro</i>	46
Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	48
Análise da expressão de genes por qPCR <i>Array</i>	48
Real Time PCR quantitativo (qPCR).....	49
Modelo de colite infecciosa induzida por <i>C. rodentium</i>	50
UFC de <i>C. rodentium</i>	52
Isolamento de IELs e LPLs no cólon.....	53
Análise estatística	54
Resultados	55
Geração de células apoptóticas infectadas.....	55
PGE ₂ inibe a diferenciação de linfócitos Th17 no conteúdo da fagocitose de IACs	62
PGE ₂ , proveniente da fagocitose de IACs, inibe a diferenciação de Th17	66
PGE ₂ produzida pela eferocitose de células infectadas favorece a expressão de IFN- γ e suprime a expressão de Foxp3 nos linfócitos Th.....	68
EP4 é o principal receptor de PGE ₂ envolvido na supressão da diferenciação de Th17 no contexto da fagocitose de IACs.....	73
PGE ₂ proveniente da fagocitose, por DCs, de IACs inibe a diferenciação de Th17 via ativação de EP4-Adenilato ciclase-PKA	78
PGE ₂ via EP4 modula negativamente a expressão do receptor de IL-1 β em linfócitos Th, no contexto da fagocitose de IACs.....	81

PGE ₂ via EP4 compromete a diferenciação de Th17 e a defesa do hospedeiro contra <i>C. rodentium</i>	90
Discussão.....	103
Conclusão.....	112
Referências.....	114
Anexo 1.	129
Anexo 2.	130
Anexo 3.	131

Lista de Figuras

Fig. 1. Diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺ naïve em subtipos de linfócitos Th.	17
Fig. 2. Ativação de diferentes vias de apoptose	22
Fig. 3. Receptores e moléculas adaptadoras envolvidas no reconhecimento de células apoptóticas	25
Fig. 4. Padrões de morte da celular induzida durante infecções	28
Fig. 5. Receptores de PGE ₂ e vias de sinalização	34
Fig. 6. Estratégias utilizadas para investigar o papel da PGE ₂ na diferenciação de Th17 durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas.	39
Fig. 7. Delineamento experimental das diferentes condições para a obtenção de CM utilizado nos ensaios de diferenciação de linfócitos Th naïve	44
Fig. 8. Delineamento experimental do ensaio de diferenciação de Th naïve.....	46
Fig. 9. Delimitação das populações celulares para análise da expressão de IL-17A em linfócitos T CD4 ⁺	47
Fig. 10. Delineamento experimental do ensaio de colite infecciosa induzida por <i>C. rodentium</i>	52
Fig. 11. Delimitação da população de linfócitos Th isolados do epitélio e lâmina própria do cólon.....	54
Fig. 12. Delineamento experimental da geração de células apoptóticas infectadas.....	55
Fig. 13. Eferocitose de IACs aumenta a expressão de COX-2	57
Fig. 14. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por DCs induz altos níveis de PGE ₂	58
Fig. 15. O tratamento com indometacina não afeta a eferocitose por DCs.....	59
Fig. 16. A fagocitose de IACs induz a síntese de citocinas envolvidas na diferenciação de células Th17	61
Fig. 17. O tratamento de DCs com ibuprofeno reduz a síntese de PGE ₂ e TGF-β	62
Fig. 18. PGE ₂ inibe a diferenciação de Th17, mas não afeta a proliferação de linfócitos Th na presença do CM	63
Fig. 19. A fagocitose de IACs por DCs gera um microambiente favorável à diferenciação de Th17	65
Fig. 20. PGE ₂ inibe a diferenciação de Th17 e a produção de IL-17A, no contexto da fagocitose de IACs por DCs.....	67
Fig. 21. Eferocitose de células infectadas inibe a expressão de Foxp3.....	69
Fig. 22. A fagocitose de IACs por DCs favorece a diferenciação de linfócitos produtores de IFN-γ	71
Fig. 23. Níveis de IL-17A prevalecem aos de IFN-γ no sobrenadante da cultura de linfócitos diferenciados com CM	72
Fig. 24. A diferenciação de células Th17 na presença de CM resulta no aumento da expressão de EP4	73
Fig. 25. EP4 é o principal receptor envolvido na inibição da produção de IL-17A por linfócitos Th diferenciados na presença de CM.....	75
Fig. 26. EP4 modula negativamente a diferenciação de linfócitos Th17 no contexto da eferocitose de células infectadas	77
Fig. 27. A ativação de adenilato ciclase ou PKA inibem a diferenciação de Th17 na presença de CM/Indo	79
Fig. 28. PGE ₂ via EP4-cAMP-PKA inibe a diferenciação de Th17 na presença de CM..	80

Fig. 29. A produção de PGE ₂ durante a fagocitose de IACs modula negativamente a expressão de genes relacionados a Th17.....	82
Fig. 30. Validação da expressão dos principais genes modulados por PGE ₂ identificados pelo PCR Array	83
Fig. 31. PGE ₂ , via EP4-cAMP-PKA, modula negativamente a expressão de il17a e illr em linfócitos Th diferenciados na presença de CM	85
Fig. 32. PGE ₂ , via EP4, inibe a expressão do IL-1R e impede a diferenciação de linfócitos Th17 no contexto de eferocitose de células infectadas	87
Fig. 33. A diferenciação de linfócitos Th17 no contexto de eferocitose de células infectadas depende da sinalização do IL-1R.....	88
Fig. 34. A sinalização via IL-1R é essencial para a diferenciação de linfócitos Th17, no contexto da eferocitose de células infectadas.....	89
Fig. 35. Os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 aumentam a população de linfócitos Th17 na lâmina própria intestinal de animais infectados.....	92
Fig. 36. Os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 favorecem a porcentagem e o número de Th17 no cólon de animais infectados.....	93
Fig. 37. Os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 não modulam a população de IELs produtores de IL-17A	94
Fig. 38. Os tratamentos com indometacina ou antagonista de EP4 não afetam a porcentagem de linfócitos Th17 entre os IELs	95
Fig. 39. A quantificação de PGE ₂ , IL-17A, IL-22 e IFN- γ no cólon dos animais	96
Fig. 40. Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 previnem a perda de peso e o encurtamento do cólon causado pela infecção por <i>C. rodentium</i>	98
Fig. 41. Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 reduzem o número de bactérias <i>C. rodentium</i> no cólon.....	99
Fig. 42. Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 aumentam a expressão de peptídeos antimicrobianos.....	101
Fig. 43. Conclusão	112

LISTA DE SIGLAS

AC - Célula apoptótica
Apaf-1 - *Apoptotic protease activating factor 1*
APC - Célula apresentadora de antígeno
BAI1 - *Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*
cAMP - *Cyclic adenosine monophosphate*
CD28 - Cluster of differentiation 28
CD3 - Cluster of differentiation 3
CD80 - Cluster of differentiation 80
CD86 - Cluster of differentiation 86
CM - Meio Condicionado
COX - Ciclo-oxigenase
cPLA2 - Fosfolipase A2 citosólica
DAMP - *Damage associated molecular pattern*
DC - Célula Dendrítica
DR - *Death receptor*
EAE - Encefalomielite autoimune experimental
EP1, EP2, EP3, EP4 - Receptor de prostanóide E 1, 2, 3 ou 4
EPAC - Proteína de troca de nucleotídeo guanina ativada por AMPc
FADD - *Fas-associated protein with Death Domain*
Foxp3 - *Forkhead box P3*
Gas6 - Growth arrest-specific 6
IAC - Célula apoptótica infectada
IEL - Linfócito intraepitelial
IFN- γ - *Interferon gamma*
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
IL-1R - Receptor de interleucina 1
IL-1Ra - Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-23R - Receptor de interleucina 23
IRF4 - *Interferon regulatory factor 4*
iTreg - Células Treg induzidas
LPL - *Lipoprotein lipase*
LRP (CD91) - *Low density lipoprotein receptor-related protein*
MFG-E8 - *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*
MHC-II - Complexo de histocompatibilidade principal classe II
MIP-1 α - *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*
Myd88 - *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NLR - *Nod-like receptors*
nTreg - Células Treg naturais
PAF - Fator de Agregação Plaquetária
PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno
PC - Fosfatidilcolina
PE - Fosfatidiletanolamina
PG - Prostaglandina

PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGF₂ – Prostaglandina F₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PI3K - Posfatidilinositol-3-quinase
PKA - Proteína quinase A
PLA2 - Fosfolipase A2
PRRs – Receptores de reconhecimento de padrão
PS – Fosfatidilserina
PS-OX – Fosfatidilserina oxidada
PSR – Receptor de fosfatidilserina
Roryt - *RAR-related orphan receptor gamma*
ROS - Espécies reativas do oxigênio
SOCS3 - *Suppressor of cytokine signaling 3*
STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription 3*
TCR – Receptor de célula T
TGF-β – Fator de crescimento tumoral
Th1 – Células T auxiliadora (*helper*) 1
Th17 – Célula T auxiliadora (*helper*) 17
Tim1 - *T-cell immunoglobulin and mucin domain 1*
Tim4 - *T-cell immunoglobulin and mucin domain 4*
TLR – Receptor do tipo *toll*
TNF-α - Fator de necrose tumoral
TNFR - Receptor do Fator de necrose tumoral
TRADD - *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*
Treg – Células T reguladoras
TRIF - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*
TxA2 - Tromboxana A2
UFC – Unidades formadoras de colônia
UV - Ultravioleta

DEJANI, N.N. **Prostaglandina E₂ via EP4/IL-1R inibe a diferenciação de células Th17 durante a eferocitose de células infectadas.** 2016. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Resumo

A fagocitose de células apoptóticas promove a síntese de mediadores como o fator de transformação de crescimento (TGF- β), a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a interleucina-10 (IL-10), importantes para a diferenciação de células T reguladoras (Treg). No entanto, a fagocitose de células apoptóticas infectadas, por células dendríticas, resulta na síntese de citocinas, tais como TGF- β , IL-6 e IL-23, que sabidamente favorecem a diferenciação de linfócitos T *heper* 17 (Th17). Resultados preliminares obtidos por nosso grupo demonstram que, além destas citocinas, a PGE₂ também é produzida durante a eferocitose de células infectadas, no entanto, nada se sabia até o momento quanto ao envolvimento deste prostanóide no processo de diferenciação de linfócitos Th17. Desta forma, a hipótese deste trabalho fundamentou-se no estudo do mecanismo de sinalização intracelular pelo qual a PGE₂ via receptor E prostanóide (EP), estaria envolvida na diferenciação de linfócitos Th17, no contexto da eferocitose. Os resultados apresentados demonstram que além da produção de TGF- β e IL-6, a fagocitose de células apoptóticas infectadas com *Escherichia coli*, por células dendríticas, induz a síntese de altos níveis de PGE₂ e IL-1 β , previamente descritos como indutores de Th17. Entretanto, diferente da nossa hipótese original, a presença da PGE₂ inibiu a diferenciação de linfócitos Th17, uma vez que a ausência deste prostanóide resultou no aumento da porcentagem e número de linfócitos Th17. O tratamento de linfócitos T CD4⁺ *naive* com antagonistas e agonistas de EP2/EP4 demonstrou que o efeito supressor da PGE₂ é mediado primordialmente pelo receptor EP4, via ativação de cAMP e PKA. Além disso, o eixo PGE₂-EP4 modulou negativamente a expressão do receptor de IL-1 β (IL-1R), comprometendo, desta forma, a diferenciação de Th17. Ainda, *in vivo*, no modelo de colite infecciosa por *Citrobacter rodentium*, a inibição da síntese da PGE₂ ou o bloqueio do receptor EP4 resultou no aumento da população de linfócitos Th17 e da expressão de peptídeos antimicrobianos no cólon, além de uma drástica redução na carga bacteriana. Por fim, o conjunto destes resultados demonstram que a PGE₂, via EP4-PKA-IL-1R, suprime a diferenciação de linfócitos Th17, *in vitro* e *in vivo*, e desvenda um mecanismo inédito na modulação da resposta imune adaptativa de linfócitos Th17 promovido pela PGE₂, no contexto da eferocitose.

Palavras-chave: Eferocitose, Prostaglandina E₂, Th17, EP4, Receptor de IL-1 β .

DEJANI, N.N. **Prostaglandin E₂ via EP4/IL-1R inhibits Th17 cell differentiation during the efferocytosis of infected cells.** 2016. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Abstract

Phagocytosis of apoptotic cells promotes the synthesis of mediators such as transforming growth factor (TGF- β), prostaglandin E₂ (PGE₂) and interleukin-10 (IL-10), which are important for the differentiation of regulatory T cells (Treg). However, phagocytosis of infected apoptotic cells by dendritic cells results in the synthesis of cytokines such as TGF- β , IL-6 and IL-23 known to promote T helper 17 cell (Th17) differentiation. Preliminary results obtained by our group showed that, along with these cytokines, PGE₂ is also produced during efferocytosis of infected cells. However, nothing was known regarding the involvement of this prostanoid on Th17 differentiation process. Thus, our hypothesis was based on the study of intracellular signaling mechanism by which PGE₂, via E prostanoid receptor (EP), could be involved in the differentiation of Th17 cells in the context of efferocytosis. Our results show that, besides TGF- β and IL-6 production, phagocytosis of *Escherichia coli*-infected apoptotic cells by dendritic cells induces the synthesis of high levels of PGE₂ and IL-1 β , as previously described as Th17 inducers. However, unlike our original hypothesis, the presence of PGE₂ inhibited the differentiation of Th17 cells, while the absence of this prostanoid resulted in increased percentage and number of this phenotype. Naive CD4⁺ T cells treated with EP2/EP4 agonists and antagonists demonstrated that the suppressive effect of PGE₂ is primarily mediated by the EP4 receptor, via activation of cAMP and PKA. Furthermore, PGE₂-EP4 negatively modulates the expression of IL-1 β receptor (IL-1R), impairing Th17 differentiation. Also, *in vivo*, during *Citrobacter rodentium* infection, inhibition of PGE₂ synthesis or EP4 receptor blockade resulted in increased population of Th17 cells and greater expression of antimicrobial peptides in colon, as well as a drastic reduction in bacterial load. Finally, all these data demonstrate that PGE₂, via EP4-PKA-IL-1R, suppresses Th17 differentiation *in vitro* and *in vivo*, and reveals a novel mechanism in the modulation of adaptive immune response of Th17 cells promoted by PGE₂ in the context of efferocytosis.

Keywords: Efferocytosis, Prostaglandin E₂, Th17, EP4, IL-1 β Receptor.

Introdução

Linfócitos T CD4⁺ helper

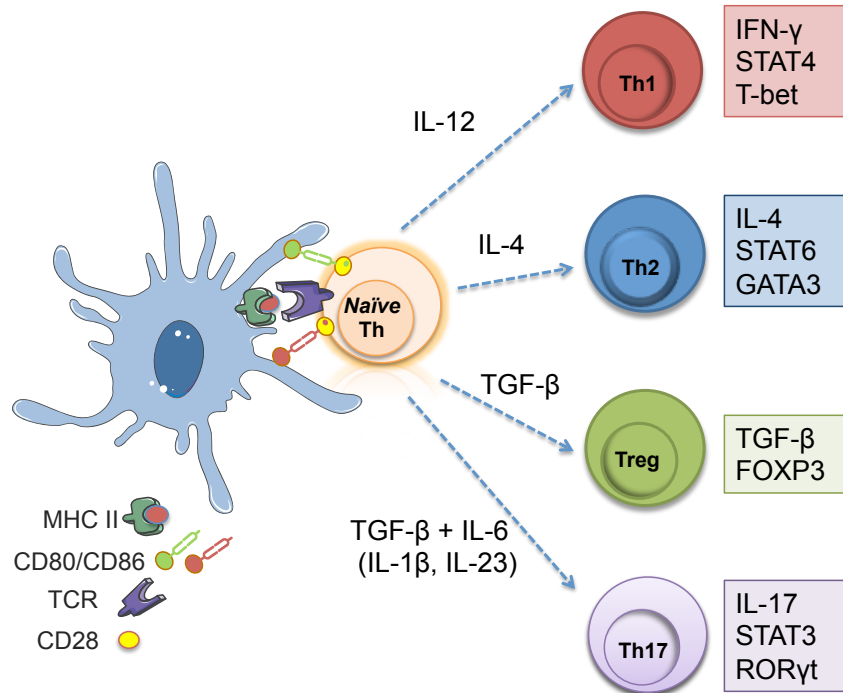
Após estimulação antigênica, linfócitos T CD4⁺ *naive* proliferam e diferenciam-se em subtipos de células T *helper* (Th) produtoras de diferentes perfis de citocinas e funções efetoras (Bettelli, Oukka et al. 2007). Há aproximadamente 30 anos, os pesquisadores Mosmann and Coffman (1986) descreveram pela primeira vez que linfócitos T CD4⁺ poderiam ser caracterizados em 2 subtipos, denominados Th1 e Th2, baseado no perfil de citocinas secretadas (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Posteriormente, outros subtipos de linfócitos Th foram descobertos e melhor caracterizados. Atualmente, além de Th1 e Th2, outros subtipos como Th17, Th9 e Th22, foram descobertos e estão sendo melhor desvendados (Belizario, Brandao et al. 2016).

Os linfócitos Th1 produzem primordialmente IFN- γ , enquanto que os Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 (Mosmann and Coffman 1989). Os linfócitos Th1 diferenciam-se na presença de IL-12, produzida principalmente por células dendríticas (DCs), assim como por outras células apresentadoras de antígenos (APCs), e pela ação de IFN- γ produzida pelo próprio linfócito. O programa de diferenciação de células Th1 depende dos fatores de transcrição STAT-1, STAT-4 e T-bet (Mendoza 2006). Por outro lado, a diferenciação de Th2 é mediada pela citocina IL-4 e requer a expressão dos fatores de transcrição STAT-6 e GATA-3 (Peine, Marek et al. 2016). Os linfócitos Th1, pela produção de IFN- γ , estão envolvidos nas respostas de hipersensibilidade tardia, na produção de IgG por linfócitos B, na ativação de macrófagos e no *clearance* de patógenos intracelulares. Em contraste, os linfócitos Th2, devido à produção de IL-4, IL-5 e IL-13, estão envolvidos primordialmente em inflamações eosinofílicas e produção de

IgE em doenças inflamatórias crônicas como asma e doenças parasitárias (Bettelli, Oukka et al. 2007).

Os linfócitos Th17, foco de estudo deste trabalho, foram descritos como uma população distinta de Th1 e Th2 pela primeira vez em 2005 (Harrington, Hatton et al. 2005). Estes linfócitos produzem principalmente IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, IL-26 e TNF, e são requeridos para o controle de uma variedade de infecções bacterianas e fúngicas (Bettelli, Oukka et al. 2007). As citocinas TGF- β e IL-6 são requeridas para a diferenciação de Th17, assim como IL-1 β , IL-23 e IL-21 são importantes na diferenciação, manutenção e expansão deste fenótipo. Ainda, essas citocinas agem sinergicamente e promovem a ativação dos fatores de transcrição, STAT-3 e ROR γ t, essenciais para a diferenciação de linfócitos Th17 (Hu, Troutman et al. 2011) (Fig. 1).

Adicionalmente vários subtipos de linfócitos T reguladores (Treg), capazes de controlar as respostas de linfócitos Th efetores, tem sido descritos (Shevach 2006). Além dos precursores tímicos de linfócitos Treg naturais (nTreg), os linfócitos Treg induzíveis (iTreg) são diferenciados na periferia, a partir de precursores de linfócitos Th, por meio da ação de diferentes citocinas (Wan and Flavell 2006).



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Fig. 1. Diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naïve* em subtipos de linfócitos Th. As DCs apresentam antígenos, via moléculas de MHC-II, aos linfócitos Th *naïve*, assim como expressam moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) e desta forma, promovem o estímulo antigênico necessário para a ativação dos linfócitos. A diferenciação em Th1, Th2, Th17 ou Treg, depende das citocinas presentes no microambiente. Por exemplo, na presença de IL-6 e TGF- β , os Th *naïve* diferenciam-se em Th17, que são caracterizadas pela expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e STAT3 e da citocina IL-17. Ainda, IL-1 β e IL-23 podem induzir/estabilizar o fenótipo de Th17 (Bettelli, Oukka et al. 2007).

A descoberta dos distintos subtipos de linfócitos Th e suas características particulares, como citocinas e fatores de transcrição de assinatura, alavancou a compreensão do papel de cada um destes subtipos celulares no desenvolvimento e agravamento de diversas doenças inflamatórias crônicas e infecciosas. Ainda, impulsionou a busca de estratégias terapêuticas direcionadas para controlar as respostas de linfócitos Th específicos.

Linfócitos Th17

A diferenciação de Th17 em camundongos ocorre a partir de linfócitos Th *naive* ativados por DCs produtoras principalmente de TGF- β e IL-6 (Waite and Skokos 2012). Os linfócitos Th *naive* expressam um receptor funcional de IL-6, constituído por duas proteínas de membrana funcionais: uma subunidade α de 80 kDa ligante de IL-6 (IL-6R ou CD126) e a subunidade sinalizadora de 130 kDa, gp130. Ainda, durante a diferenciação de Th17, a expressão do IL-6R é favorecida por TGF- β . A sinalização de IL-6 leva a ativação de STAT3, que atua sinergicamente com TGF- β , induzindo fatores de transcrição, tais como ROR γ t, ROR α e RUNX1, imprescindíveis para a diferenciação de linfócitos Th17 (Korn, Bettelli et al. 2009).

O fator de transcrição ROR γ t é considerado uma proteína chave na diferenciação de Th17, entretanto, apesar de sua importância na expressão de IL-17, a deficiência deste fator de transcrição parece não impedir totalmente a síntese de IL-17, sugerindo que outros fatores de transcrição poderiam auxiliar diretamente no aumento tanto da expressão de ROR γ t, como na expressão de IL-17 (Zhang, Fuss et al. 2014). Nesse contexto, outros fatores de transcrição como IRF4, BATF, STAT3 e HIF1 α tem sido descritos durante o processo de ativação, auxiliando na estabilização e na fase final de diferenciação de células Th17 (Muranski and Restifo 2013).

Adicionalmente, a sinalização via IL-6 e TGF- β promove o aumento da expressão dos receptores para IL-21 e IL-23 (Zhou, Ivanov et al. 2007, Waite and Skokos 2012). A citocina IL-21 é produzida pela própria célula Th17 e age autocrinamente, potencializando a diferenciação de Th17, enquanto que a citocina IL-23, produzida principalmente por DCs, está associada com a manutenção e a expansão desse fenótipo

celular (Bettelli, Oukka et al. 2007, Korn, Bettelli et al. 2009, Zhang, Fuss et al. 2014). Ainda, a ativação de STAT3 via IL-6R parece ser a principal via de sinalização envolvida no aumento da expressão do receptor de IL-1 e, embora IL-23 e IL-21 isoladamente não demonstrarem efeito na expressão do IL-1R, na presença de IL-6, estas potencializam a expressão desse receptor (Chung, Chang et al. 2009).

IL-1 β , em associação com IL-6, induz a expressão de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células Th17, como o ROR γ t e IRF4, favorecendo a indução dos primeiros eventos necessários para a diferenciação e expressão de IL-17 (Chung, Chang et al. 2009). Ainda, os linfócitos Th deficientes do receptor de IL-1 β apresentam reduzida expressão do IL-23R e menor capacidade de produzir IL-17A quando diferenciados *in vitro* (Chung, Chang et al. 2009). Além disso, animais deficientes do IL-1R são resistentes ao desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental (EAE), o que foi associado à menor capacidade de induzir resposta de Th17, comparado aos animais selvagens (Sutton, Brereton et al. 2006). Portanto, a IL-1 β possui um papel crítico durante a diferenciação de Th17, bem como na manutenção e expansão deste fenótipo (Santarlaschi, Cosmi et al. 2013).

Em relação as funções efetoras de Th17, tem sido descrito uma importante atuação nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra microrganismos, em especial fungos e bactérias. Por outro lado, a célula Th17 também é uma das principais células envolvidas na patogenia de algumas doenças autoimunes (Bettelli, Oukka et al. 2007, Valdez, Vithayathil et al. 2012, Montgomery, Daniels et al. 2014). Suas funções efetoras estão associadas a produção de IL-17A e IL-17F, além de outras citocinas como IL-21, IL-22 e IL-26. A citocina IL-17A induz a produção de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF

e IL-1) e quimiocinas (CXCL1 e IL-8) em diferentes tipos celulares (Bettelli, Oukka et al. 2007), assim como favorece o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção ou para o tecido acometido pelo processo inflamatório em doenças autoimunes (Bettelli, Oukka et al. 2007, Cho, Pietras et al. 2010, Marwaha, Leung et al. 2012). Ainda, a IL-17A e a IL-22 estimulam a produção de peptídeos antimicrobianos, também conhecidos como defensinas, por queratinócitos e células epiteliais do cólon (Liang 2006, Peric, Koglin et al. 2008). Quanto à IL-26, recentemente, foi demonstrado que esta citocina pode agir como um peptídeo antimicrobiano, capaz de destruir bactérias via formação direta de poros na membrana, ou ainda formar complexos com o DNA bacteriano, gerando complexos IL-26-DNA capazes de ativar TLR9 e induzir a expressão de interferons do tipo I por DCs plasmocitóides (Meller, Di Domizio et al. 2015).

Desta forma, as citocinas derivadas da população de Th17 estão associadas na proteção contra bactérias extracelulares e fungos. Além disso, promovem a migração de neutrófilos, estimulam a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais e potencializam as respostas imunes e destruição dos patógenos, melhorando a defesa do hospedeiro contra infecções (Korn, Bettelli et al. 2009). Por outro lado, respostas exacerbadas de células Th17 são relacionadas a algumas inflamações crônicas, como a doença inflamatória do intestino, e autoimunidades, como artrite, lúpus e EAE (Yang, Sundrud et al. 2014).

Apoptose, eferocitose e diferenciação de linfócitos Th17

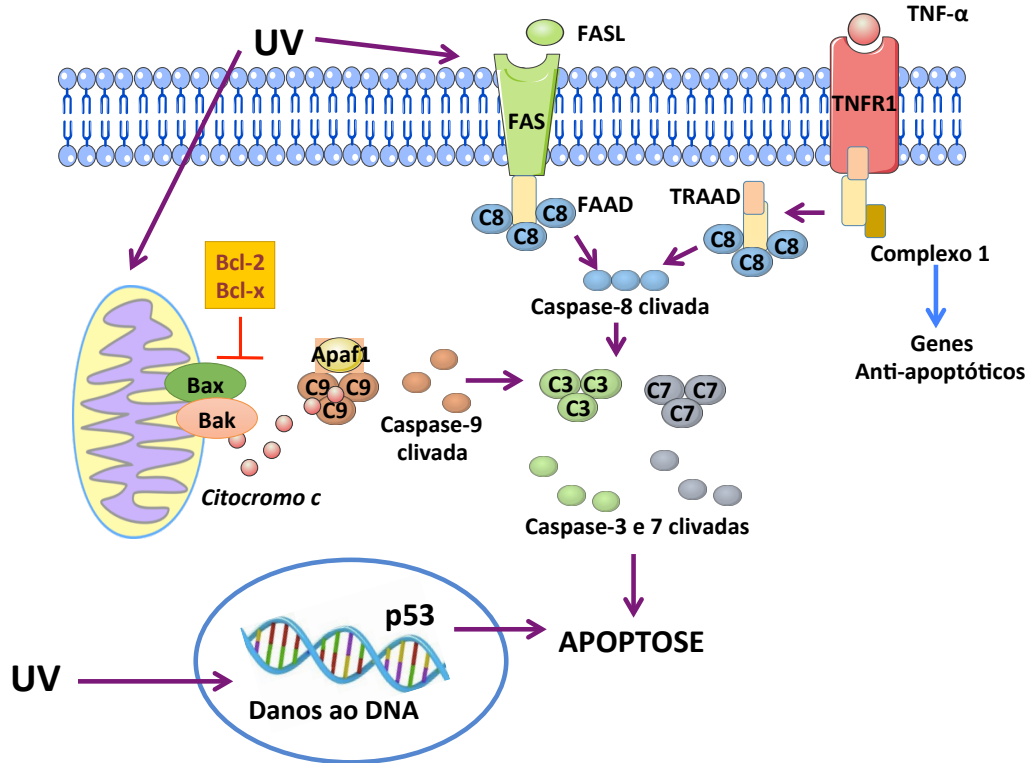
A apoptose, um tipo de morte celular programada, é um processo fisiológico envolvido no desenvolvimento e remodelamento tecidual homeostático (Elmore 2007).

Este tipo de morte é caracterizado por mudanças morfológicas, tais como condensação da cromatina, fragmentação nuclear e redução do volume celular (Galluzzi, Kepp et al. 2012), e também por mudanças bioquímicas que incluem a ativação de *cysteine aspartyl-specific proteases* (caspases), *breakdown* do DNA, e modificações de proteínas e componentes da membrana que permitem o reconhecimento e a remoção das células apoptóticas (Kroemer, Galluzzi et al. 2007).

A apoptose pode ser desencadeada por dois principais mecanismos: ativação de receptores de morte (via extrínseca) como o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR1), FAS (CD95), receptores de morte 4 e 5 (DR4, DR5); ou citotoxicidade, promovida por hipóxia, danos ao DNA, deficiência de fatores de crescimento, radiação, toxinas, infecções, entre outros que iniciam a via intrínseca ou mitocondrial (Ouyang, Shi et al. 2012). Em geral, estas vias convergem na ativação de caspases iniciadoras (caspase-8, -9, -10) que culminam na ativação de uma via efetora comum (caspase-3, -7, -6) (Koff, Ramachandiran et al. 2015) (Fig. 2). Ainda, diferente da necrose, a permeabilidade celular é mantida durante o processo de apoptose, e desta forma, não ocorre extravasamento do conteúdo intracelular (Jeannin, Jaillon et al. 2008).

Um mesmo estímulo também pode ativar mais de um mecanismo de indução de apoptose. Por exemplo, a radiação ultravioleta (UV) é um evento complexo que envolve diferentes vias intracelulares indutoras de apoptose. Entre essas, o dano ao DNA parece ser o fator predominante, entretanto, não é o único. A radiação também ativa os receptores Fas na membrana por induzir *clustering* dos receptores ou liberação dos ligantes (FasL), que agem de maneira autócrina ou parácrina. Alterações na membrana mitocondrial e liberação de citocromo c também estão envolvidos na apoptose induzida

pela UV, porém, ainda não é bem estabelecido se estes fenômenos são efeitos diretos da radiação ou uma consequência dos danos no DNA, causados pela própria UV (Kulms and Schwarz 2000).



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Fig. 2. Ativação de diferentes vias de apoptose. Na via extrínseca, a ativação dos receptores de morte por FasL ou TNF- α levam a 2 mecanismos de sinalização. Fas ligante promove a interação do receptor Fas com *Fas-associated protein with Death Domain* (FADD) e caspase-8 para formar o complexo *Death-inducing signaling complex* (DISC). TNF- α promove o recrutamento do receptor TNFR1 com *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD) e outras moléculas que formam o complexo de sinalização 1, que promove sobrevivência ao induzir a expressão de genes anti-apoptóticos, como por exemplo, genes inibidores da sinalização do TNFR. Entretanto, modificações pós-traducionais do complexo 1, podem promover a dissociação do TRADD do complexo 1, que se liga a caspase-8/-10 para formar o complexo apoptótico. Ambos mecanismos promovem clivagem de caspase-8 e ativação de caspases efetoras. Na via intrínseca, estímulos como o dano ao DNA, levam a ativação de Bax, induzindo a permeabilidade na membrana mitocondrial, que leva a liberação de citocromo c no citoplasma. O citocromo c recruta *Apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) e caspase-9 para promover

autoativação de caspase-9 e subsequente ativação de caspases efetoras (caspase-3 e -7). As caspases efetoras ativam endonucleases citoplasmáticas que degradam o material nuclear e proteases, que degradam proteínas nucleares e do citoesqueleto, promovem condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos. Um mesmo estímulo pode ainda ativar mais de uma via de morte, como por exemplo, a radiação UV (Koff, Ramachandiran et al. 2015).

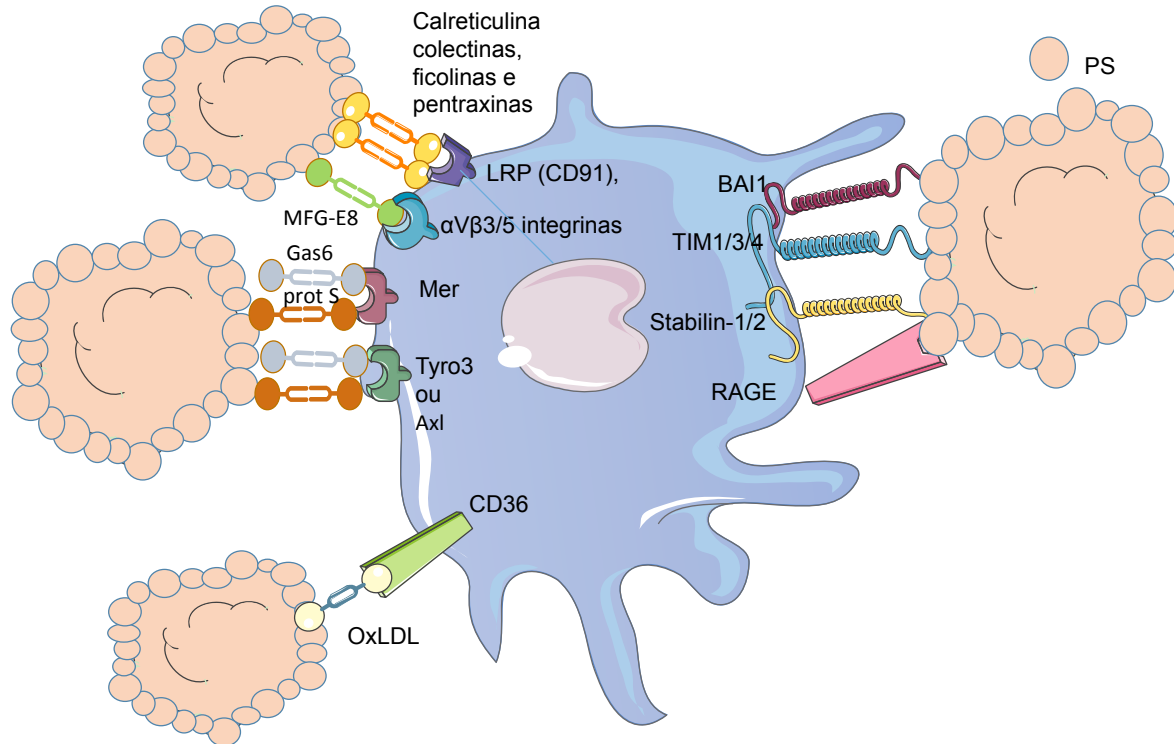
Um dos primeiros eventos no processo apoptótico é a perda da assimetria e consequente exposição de fosfolipídios, que normalmente estão presentes na camada interna da membrana plasmática, como a fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (Roos, Xu et al. 2004). Dentre estes, a PS é a principal molécula envolvida no reconhecimento das células apoptóticas pelos fagócitos (Elliott and Ravichandran 2010). Além das células fagocíticas, como os macrófagos e as DCs, outros tipos celulares, como as células epiteliais também participam na remoção dos corpos apoptóticos (Elliott e Ravichandran 2010).

O reconhecimento e a remoção dos corpos apoptóticos, também denominado eferocitose, é extremamente importante para o controle da homeostase tecidual, prevenção de inflamações e injúria tecidual. Curiosamente, o termo *effere* deriva do Latin e significa carregar ou enterrar os corpos ao túmulo (Vandivier, Henson et al. 2006, Vives-Pi, Rodríguez-Fernández et al. 2015). O processo de eferocitose envolve o reconhecimento, englobamento dos corpos apoptóticos e a formação de um fagossomo (também denominado eferossoma). Posteriormente, ocorre a fusão deste a lisossomos, resultando na digestão do conteúdo presente no interior do eferossoma (Martin, Peters et al. 2014).

Em relação ao reconhecimento das células apoptóticas por fagócitos, sabe-se que este processo envolve a interação de um grande número de receptores, como os

receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes na membrana dos fagócitos ou mesmo em formas solúveis (Jeannin, Jaillon et al. 2008). Ainda, os PRRs solúveis atuam como opsoninas e possuem uma importante função no reconhecimento das células apoptóticas, entre estes, encontram-se os componentes do sistema complemento, colectinas, ficolinas e pentraxinas (Litvack and Palaniyar 2010). Ainda, moléculas com função *bridge* ligam-se à PS exposta e, secundariamente, aos receptores em fagócitos. Por exemplo, a glicoproteína MFG-E8 e as opsoninas, Gas6 e a proteína S, se ligam à PS e secundariamente, as integrinas $\alpha v \beta 3$ ou ao receptor de tirosina kinase Mer, respectivamente, e assim favorecem o reconhecimento e a fagocitose das células apoptóticas (Hall, Obin et al. 2002, Litvack and Palaniyar 2010).

Adicionalmente, duas proteínas transmembranas, Tim1 e Tim4 (Miyanishi, Tada et al. 2007) e três receptores, estabilina-2, BAI1 e RAGE (Park, Tosello-Tramont et al. 2007, Park, Jung et al. 2008), foram descritos como receptores de PS. Além disso, formas oxidadas da PS também contribuem para o reconhecimento e *clerance* das células apoptóticas pelos fagócitos. Por exemplo, as moléculas de PS oxidadas ou mesmo LDL oxidadas podem ser reconhecidas por receptor *scavenger* CD36 (Greenberg, Sun et al. 2006) (Fig. 3).



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.
 Figura adaptada da Tese de Castaño, V. E. N. (2016).

Fig. 3. Receptores e moléculas adaptadoras envolvidas no reconhecimento de células apoptóticas. A PS exposta na membrana da célula apoptótica, é reconhecida por fagócitos, podendo ser reconhecida diretamente por receptores específicos, tais como BAI1, TIM1, TIM3, TIM4, estabilina-1, estabilina-2 e RAGE. Além disso, as formas oxidadas e não oxidadas da PS podem ser reconhecidas indiretamente através de moléculas *bridge*, como componentes do sistema complemento, colectinas, ficolinas e pentraxinas, e também, por *Milk-fat globule EGF-factor 8* (MFG-E8), *Growth arrest-specific 6* (Gas6) e Proteína S. Estas moléculas *bridge* são reconhecidas por receptores LRP (CD91), Mer, Axl, Tyro3 e $\alpha V\beta 3/5$ integrinas. Ainda, formas oxidadas, de PS ou LDL, podem ser reconhecidas por moléculas CD36 em macrófago e DCs (Castaño 2016).

Algumas etapas são essenciais para o processo de eferocitose, dentre as quais destacam-se: 1) a liberação de sinais *find-me* pelas células apoptóticas, que favorecem a migração dos fagócitos até essas células. Alguns sinais *find-me* liberados são: lisofosfatidilserina, esfingosina-1-fosfato e os nucleotídeos ATP, UTP e algumas

quimiocinas; 2) a exposição de moléculas *eat-me* na membrana celular, que favorecem o reconhecimento e a fagocitose das células apoptóticas, tais como PS, formas oxidadas de PS e ICAM-3; e 3) degradação do corpo apoptótico e liberação de mediadores de perfil principalmente anti-inflamatório (Ravichandran and Lorenz 2007).

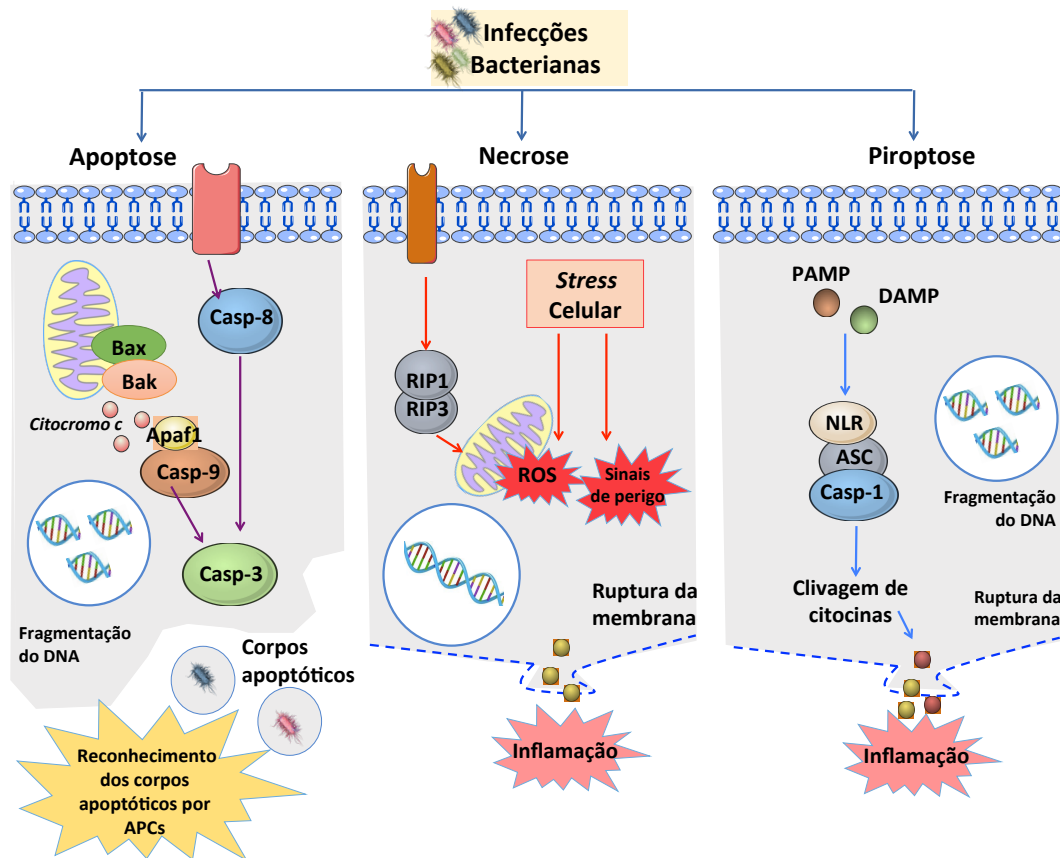
A ingestão de células apoptóticas estéreis, ou mesmo sua ligação na superfície de macrófagos, induz a liberação de mediadores como TGF- β , IL-10, prostaglandina E₂ (PGE₂), fator de ativação plaquetária (PAF), e inibe a secreção de mediadores como TNF- α , IL-1, CXL1, IL-8 e leucotrieno C4 (Fadok, Bratton et al. 1998, Medeiros, Serezani et al. 2009). Esses efeitos anti-inflamatórios parecem estar associados a ação autócrina e parácrina de TGF- β , PGE₂ e PAF (Fadok, Bratton et al. 1998). Entretanto, se a remoção de células apoptóticas for ineficiente, estas podem progredir para o estágio de necrose celular, com liberação de componentes intracelulares, conhecidos como *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs), que favorecem a ativação celular e inflamação (Jeannin, Jaillon et al. 2008).

Ainda, o acúmulo de células apoptóticas nos tecidos, ou uma ineficiência na remoção destas células por fagócitos resulta no desencadeamento de condições patológicas, como doenças degenerativas, desordens autoimunes e câncer (Birge, Boeltz et al. 2016). Adicionalmente, altas taxas de apoptose são observadas em doenças degenerativas como *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) ou após a inalação de agentes tóxicos (Demedts, Demoor et al. 2006).

Além das condições homeostáticas e patológicas, que induzem um grande acúmulo de células apoptóticas, as infecções microbianas também são capazes de promover a morte celular do hospedeiro. Dentre as modalidades de morte, tem sido

demonstrado que os patógenos bacterianos podem induzir apoptose, necrose ou piroptose (Ashida, Mimuro et al. 2011) (Fig. 4). O tipo de morte varia dependendo de uma série de fatores como o tipo de célula do hospedeiro, o estágio de infecção, a carga bacteriana, assim como fatores intrínsecos relacionados ao patógeno (Ashida, Mimuro et al. 2011).

Por exemplo, as bactérias *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC) e *Citrobacter rodentium* usam um sistema de secreção do tipo III (T3SS) para injetar componentes no interior das células epiteliais do intestino. Um desses componentes, EspF, interfere em várias funções celulares, assim como estimula a morte celular pela ruptura da membrana mitocondrial (Brereton and Blander 2010, Brereton and Blander 2011). Por outro lado, alguns patógenos como *Legionella pneumophila* e *Chlamydia* spp. ativam mecanismos que promovem a sobrevivência das células do hospedeiro, favorecendo a replicação e disseminação do patógeno (Rudel, Kepp et al. 2010, Ashida, Mimuro et al. 2011).



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.
 Figura adaptada de Ashida e Mimuro (2011).

Fig. 4. Padrões de morte celular induzido durante infecções. As bactérias podem induzir a morte de células do hospedeiro por meio de diferentes mecanismos, como a apoptose, necrose e a piroptose. A apoptose pode ocorrer pela via extrínseca (caspase-8) ou intrínseca (caspase-9). Este tipo de morte é caracterizado pela vesiculação da membrana, retração celular, fragmentação do DNA e ativação de caspases. Na apoptose, as bactérias ou componentes bacterianos são mantidos dentro dos corpos apoptóticos, que posteriormente serão reconhecidos pelos fagócitos. A necrose é caracterizada pela ruptura da membrana, inchaço celular e liberação do conteúdo celular e é acompanhada de inflamação. A necrose é desencadeada pela produção de ROS ou sinais de perigo, como desestabilização lisossomal e depleção de ATP, desencadeados por infecções bacterianas ou danos físicos. A piroptose é um tipo de morte coordenada pela caspase-1 ativada pelo inflamassoma. Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por *NOD-like receptors* (NLR), esse reconhecimento leva a formação do inflamassoma e ativação da caspase-1, responsável pela indução da piroptose. Este tipo de morte é acompanhado pela ruptura da membrana, fragmentação nuclear e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a IL-18 (Albert 2004).

Estudos demonstram que a apoptose é um mecanismo de defesa contra infecções e promove respostas imunes efetoras que levam a eliminação direta do patógeno ou a ativação de DCs. Estas, ao fagocitar os corpos apoptóticos, contendo bactérias ou produtos bacterianos, garantem o acesso desses antígenos as moléculas de MHC e a ativação de respostas imunes adaptativas protetoras (Elliott and Ravichandran 2010).

Interessantemente, foi demonstrado que o reconhecimento de células apoptóticas infectadas com *Escherichia coli* por DCs promove um microambiente ideal para a diferenciação de células Th17 por promover a produção de IL-23, TGF- β e IL-6. O papel destes mediadores na diferenciação de linfócitos Th17 foi comprovado por meio da diferenciação de linfócitos Th *naive*, na presença do meio condicionado proveniente de DCs incubadas com células apoptóticas infectadas (Torchinsky, Garaude et al. 2009). A importância da presença da bactéria ou componentes bacterianos no interior dessas células apoptóticas foi confirmada utilizando meio condicionado oriundo de DCs deficientes em TRIF e MyD88. Nessas condições, o meio de cultura condicionado, oriundo de DCs deficientes em TRIF e MyD88, impediu a diferenciação de células Th17 e promoveu a diferenciação de células Treg (Torchinsky, Garaude et al. 2009). Além disso, foi demonstrado *in vivo* que durante a colite infecciosa causada por *C. rodentium*, a inibição farmacológica da apoptose diminuiu a diferenciação de Th17, reafirmando a importância da apoptose de células infectadas na indução deste subtipo de linfócito Th (Torchinsky, Garaude et al. 2009, Brereton and Blander 2010).

Prostaglandina E₂ e vias de sinalização

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos oriundos do ácido araquidônico liberado de membranas pela ação das fosfolipases, principalmente pela fosfolipase citosólica tipo 4 (cPLA2) (Burke and Dennis 2009). O ácido araquidônico liberado pode ser metabolizado pela ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) para formar a prostaglandina intermediária PGH₂. A enzima COX-1 é expressa constitutivamente, sendo responsável pelos níveis basais da produção de PGs, enquanto que a enzima COX-2, embora seja fisiologicamente expressa em alguns tecidos, esta é principalmente induzida durante processos inflamatórios e atua potencializando a produção de PGs (Smith, DeWitt et al. 2000). As enzimas que metabolizam a PGH₂ determinam o destino da mesma, podendo ocorrer a formação de PGI₂, PGF₂, PGD₂, PGE₂ ou tromboxanas A₂. Esses prostanóides são liberados pela célula por meio de um transportador de membrana e logo exercem sua função efetora de forma autócrina e parácrina (Schuster 1998).

Particularmente, a PGE₂ é uma das mais abundantes PGs produzida pelas células de nossos tecidos. Vários estímulos como lipopolissacarídeo (LPS), IL-1 β e TNF- α induzem a expressão de COX-2 e promovem aumento na síntese de PGE₂ (Font-Nieves, Sans-Fons et al. 2012). Este prostanóide tem uma importante função em processos inflamatórios assim como na ativação, maturação, migração e secreção de citocinas por células imunes como macrófagos, DCs e neutrófilos (Agard, Asakrah et al. 2013). Além das condições infecciosas que promovem a síntese de PGE₂, também tem sido demonstrado que o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos e DCs, em

condições estéreis, favorece a síntese deste prostanóide (Fadok, Bratton et al. 1998, Medeiros, Serezani et al. 2009).

A PGE₂ pode exercer diferentes funções dependendo do tipo celular e receptor envolvido. A sinalização pode ocorrer por 4 subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses subtipos são receptores associados à proteína G e variam quanto a propriedades de ligação à PGE₂, distribuição tecidual, expressão e tipo de proteínas G e, conseqüentemente, a transdução de sinais (Sugimoto and Narumiya 2007). Dentre esses, EP1, EP2 e EP4 são expressos em altos níveis em células Th *naïve*, enquanto EP3 apresenta uma baixa expressão (Nagamachi, Sakata et al. 2007). Ainda, a ativação de células T humanas favorece o aumento da expressão principalmente dos receptores EP2 e EP4 (Boniface, Bak-Jensen et al. 2009).

EP1 é um receptor acoplado a proteínas G_{αq} e promove o aumento de Ca²⁺ intracelular. EP3 é acoplado a proteínas G_{αi} e sua ativação inibe a enzima adenilato ciclase e a síntese de adenosina mono fosfato cíclica (cAMP). EP2 e EP4 estão acoplados a subunidade α estimuladora da proteína G (G_{αs}) e, portanto, a ligação de PGE₂ a esses receptores promove a ativação da adenilato ciclase, promovendo o aumento da concentração de cAMP (Sugimoto and Narumiya 2007, Serezani, Ballinger et al. 2008).

Os níveis intracelulares de cAMP são regulados pela atividade de dois tipos de enzimas: a adenilato ciclase e as fosfodiesterases. Através de sinais extracelulares recebidos por receptores acoplados à proteína G, o cAMP é sintetizado pela adenilato ciclase, a partir de ATP (Serezani, Ballinger et al. 2008). O aumento intracelular de cAMP, importante segundo mensageiro, pode levar a respostas celulares por meio da ativação de diversas moléculas efetoras, entre essas a proteína quinase A (PKA) e a

proteína de troca diretamente ativada por cAMP (EPAC) (Serezani, Ballinger et al. 2008, Medeiros, Peres-Buzalaf et al. 2012). Dentre os inúmeros processos biológicos mediados pelo cAMP incluem memória, metabolismo, regulação gênica e função imune (Serezani, Ballinger et al. 2008, Gerlo, Kooijman et al. 2011).

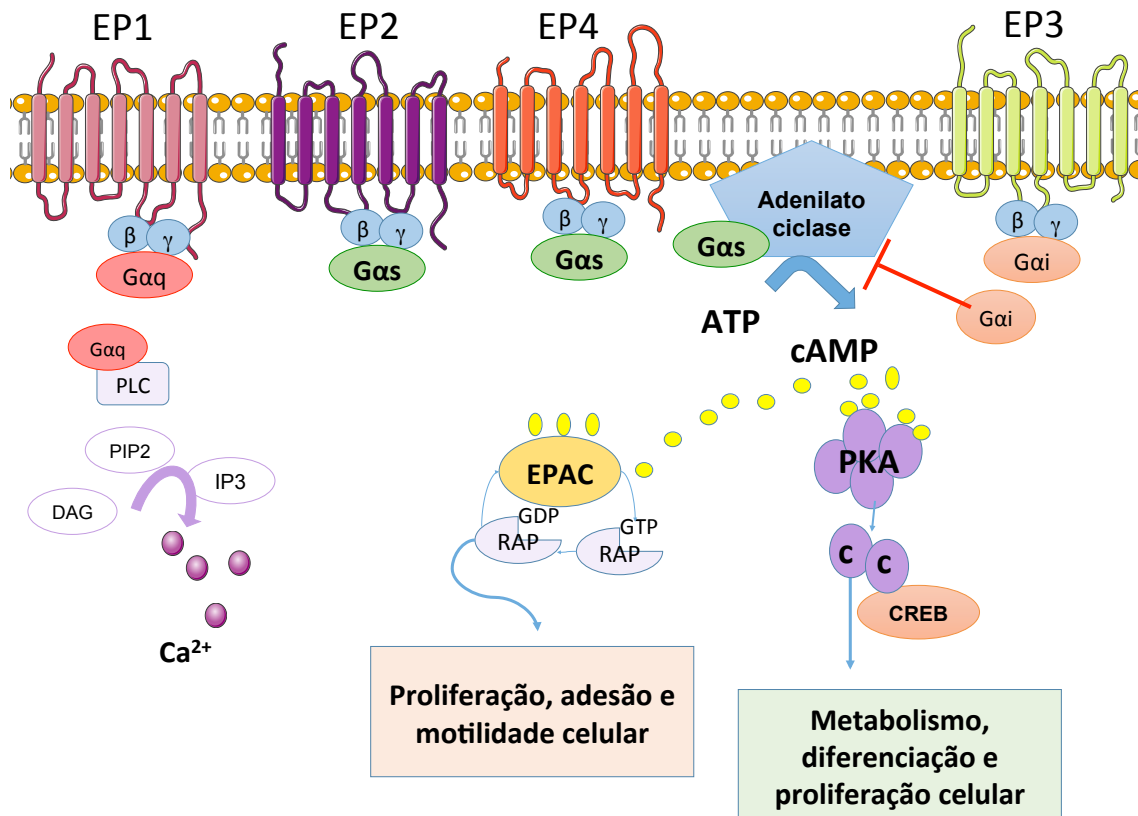
A PKA é um tetrâmero constituído de duas subunidades reguladoras e de duas subunidades catalíticas que, quando unidas, formam a holoenzima inativa presente no citoplasma. A ligação do cAMP à subunidade reguladora de PKA promove uma mudança conformacional que leva à dissociação das subunidades catalíticas, tornando-as ativas com capacidade de fosforilar resíduos de serina e treonina, que possuem sequência de substrato apropriado (Fimia and Sassone-Corsi 2001). Em um mecanismo de *feedback* negativo, a PKA pode também ativar fosfodiesterases e promover a quebra do cAMP (Beene and Scott 2007). Ainda, a fosforilação de substratos nucleares e citoplasmáticos mediada pela PKA está envolvida em múltiplas funções celulares, incluindo metabolismo, diferenciação, transmissão sináptica, atividade de canais iônicos, crescimento e desenvolvimento celular (Feliciello, Gottesman et al. 2005, Serezani, Ballinger et al. 2008, Gerlo, Kooijman et al. 2011).

Entre os alvos de PKA, está o fator de transcrição de proteína de ligação ao elemento de resposta à cAMP (CREB) (Delghandi, Johannessen et al. 2005), que se destaca por ser um dos principais substratos nucleares para essa quinase. Entre os genes regulados pela via cAMP-PKA-CREB, está o da IL-10, importante na regulação da resposta imune por suas propriedades anti-inflamatórias (Platzer, Fritsch et al. 1999). O CREB também tem sido relacionado na indução da expressão de IL-2, IL-6, TNF- α e COX-2 (Brenner, Prosch et al. 2003, Hughes-Fulford, Sugano et al. 2005). A ativação de

CREB em linfócitos está envolvida na proliferação e sobrevivência, como também na geração de Treg e regulação das respostas de Th1, Th2 e Th17 (Wen, Sakamoto et al. 2010).

A EPAC contém um domínio de ligação ao cAMP semelhante à subunidade reguladora de PKA, além de um domínio de fator de troca (GEF). Após a ligação do cAMP, a EPAC induz respostas intracelulares via ativação seletiva de pequenas GTPases, como uma proteína da superfamília Ras, chamada de Rap1 (Breckler, Berthouze et al. 2011). Assim, a EPAC ativa Rap1 ao promover a troca de GDP para GTP (Bos 2006, Grandoch, Roscioni et al. 2010). Estudos tem demonstrado que a via EPAC/Rap1 está envolvida em um grande número de funções celulares, tais como divisão celular, diferenciação, secreção, crescimento, adesão celular e formação de junções celulares (Grandoch, Roscioni et al. 2010, Breckler, Berthouze et al. 2011).

Portanto, vias que induzem aumento nos níveis intracelulares de cAMP, como a ativação de EP2 e EP4, podem resultar na ativação tanto de PKA quanto de EPAC, o que depende da concentração e localização dessas duas enzimas dentro das células. Ainda, estudos prévios tem demonstrado que PKA e EPAC podem ter efeitos redundantes, independentes e até mesmo opostos dentro da mesma célula (Aronoff, Canetti et al. 2005, Huang, Wettlaufer et al. 2008, Serezani, Ballinger et al. 2008) (Fig. 5).



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Fig. 5. Receptores de PGE₂ e vias de sinalização. A PGE₂ sinaliza por meio dos receptores EP1, EP2, EP3 e EP4, os quais são acoplados à proteína G. A sinalização de EP3 libera a subunidade Gαi, inibidora de adenilato ciclase, enquanto a sinalização de EP1 libera a sub-unidade Gαq. A liberação da sub-unidade Gαq promove o aumento de Ca²⁺ intracelular. EP2 e EP4 são associados à liberação da sub-unidade Gαs, que é capaz de se ligar à adenilato ciclase, ativando-a e promovendo a geração do cAMP, o qual ativa moléculas efetoras como a PKA e/ou EPAC, que possuem diversas funções celulares (Serezani, Ballinger et al. 2008).

PGE₂ na resposta imune adaptativa

A PGE₂ regula uma variedade de funções nos linfócitos Th, como ativação, diferenciação e expansão. O efeito ativador ou inibidor varia dependendo do microambiente da célula, do estado de maturação e ativação, do tipo de receptor

envolvido e da concentração local da PGE₂ (Kalinski 2012, Sreeramkumar, Fresno et al. 2012).

Os primeiros estudos relacionados ao envolvimento da PGE₂ na diferenciação de células da imunidade adaptativa, desenvolvidos principalmente nas décadas de 70 e 80, relatam um papel supressor da PGE₂. Vários mecanismos foram propostos para explicar como a PGE₂ poderia inibir a ativação de linfócitos Th. Por exemplo, dentre os efeitos supressores da PGE₂, destaca-se o efeito inibitório direto na produção de IL-2, assim como na expressão do receptor para esta citocina (Rincon, Tugores et al. 1988, Kolenko, Rayman et al. 1999). Além disso, altas concentrações de PGE₂ induzem anergia de linfócitos T (Wu, Wang et al. 1998), assim como comprometem a proliferação, ao aumentar os níveis de cAMP intracelular, via ativação de EP4 nos linfócitos T (Baratelli, Lin et al. 2005). Em um modelo de reação linfocitária mista, também foi demonstrado que a PGE₂ inibe a capacidade proliferativa de células T por meio da ativação de EP2 (Nataraj, Thomas et al. 2001). Além disso, foi demonstrado que os efeitos *downstream* de EP2 e EP4, levam a ativação de PKA que ativa a *tyrosine-protein kinase* (Csk), a qual age inibindo a atividade da *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck), comprometendo, desta forma, a sinalização do TCR e a ativação das células T (Mustelin and Tasken 2003, Vang, Abrahamsen et al. 2003).

Posteriormente, foi demonstrado que, em baixas concentrações, a PGE₂ altera o padrão de diferenciação de linfócitos Th e induz a expressão de IL-4 e IL-5, enquanto inibe a expressão de IFN- γ , favorecendo a diferenciação de Th2 (Betz and Fox 1991). Por outro lado, trabalhos demonstram que a PGE₂ promove a diferenciação e expansão de células T reguladoras (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺) inibindo, desta forma, as respostas de outros

subtipos de linfócitos Th efetores (Sharma, Yang et al. 2005, Bergmann, Strauss et al. 2007). Ainda, a presença de PGE₂ facilita a expressão do fator de transcrição Foxp3 mesmo em linfócitos T CD4⁺CD25⁻, favorecendo uma atividade supressora nessas células (Baratelli, Lin et al. 2005).

Atualmente, diferente dos efeitos supressores da PGE₂ previamente descritos na ativação de linfócitos Th, recentes trabalhos destacam uma relevante função facilitadora deste mediador lipídico no desenvolvimento de células Th produtoras de IFN- γ e IL-17, em vários modelos de infecção e autoimunidade (Yao, Sakata et al. 2009, Kalinski 2012). Por exemplo, foi demonstrado que a forte interação mediada por TCR e o complexo CD3 podem superar o efeito inibidor da PGE₂. A adição de altas concentrações de anti-CD3/anti-CD28 na presença de PGE₂ aumenta a porcentagem de células com perfil Th1, produtoras de IFN- γ (Yao, Hirata et al. 2013). Além disso, EP4 foi o principal receptor envolvido na expressão de IL-12R β 2 e IFN- γ R1, favorecendo assim a diferenciação em Th1 (Yao, Hirata et al. 2013). Entretanto, outro trabalho demonstrou que EP1 é majoritariamente expresso em linfócitos Th1, e também está envolvido na diferenciação de células Th *naive* em Th1, uma vez que o uso de agonistas deste receptor promoveu a diferenciação neste subtipo de linfócito Th (Nagamachi et al. 2007).

Em relação aos linfócitos Th17, tem sido demonstrado que a PGE₂ age sinergicamente com IL-23 e favorece a expressão de IL-17A (Valdez, Vithayathil et al. 2012). Em DCs, a PGE₂ aumenta a produção de IL-23 e indiretamente facilita a expansão de Th17 (Myer, Mezayen et al. 2010, Schirmer, Klein et al. 2010). Ainda, foi demonstrado em modelo de artrite que a PGE₂ promove a expressão de IL-17 enquanto

inibe o eixo IL-12/IFN- γ , e assim indiretamente promove o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular (Lemos, Grespan et al. 2009).

Sabe-se que a PGE₂, via EP2 e EP4, aumenta a expressão dos receptores de IL-1 e IL-23, favorecendo a expansão de células Th17 humanas. A ativação de EP2 e EP4 promove diferentes efeitos nas células Th17 humanas. Por exemplo, a expressão de IL-17 ocorreu principalmente via EP2, enquanto EP4 regulou negativamente a produção de IFN- γ e inibiu a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Entretanto, quando células Th17 humanas foram geradas pela combinação de IL-1 β e IL-23, a PGE₂ não foi capaz de inibir a secreção de IFN- γ (Boniface, Bak-Jensen et al. 2009), demonstrando que a habilidade da PGE₂ em inibir a produção de IFN- γ e favorecer a expressão de IL-17 é complexa e depende do tipo de citocina presente no meio.

Portanto, a PGE₂ é capaz de modular o padrão de resposta da imunidade adaptativa, podendo agir tanto como um mediador supressor como ativador, o que depende de uma série de fatores como, por exemplo, a concentração da PGE₂, o estado de maturação das células T e as citocinas presentes no microambiente. Além disso, a concentração local da PGE₂ varia dependendo do tipo ou estágio da condição patológica em questão. Desta forma, o presente trabalho avaliou a atuação da PGE₂, no contexto da fagocitose de células apoptóticas infectadas, na diferenciação de linfócitos Th17, assim como os receptores e as vias de sinalização envolvidos neste processo.

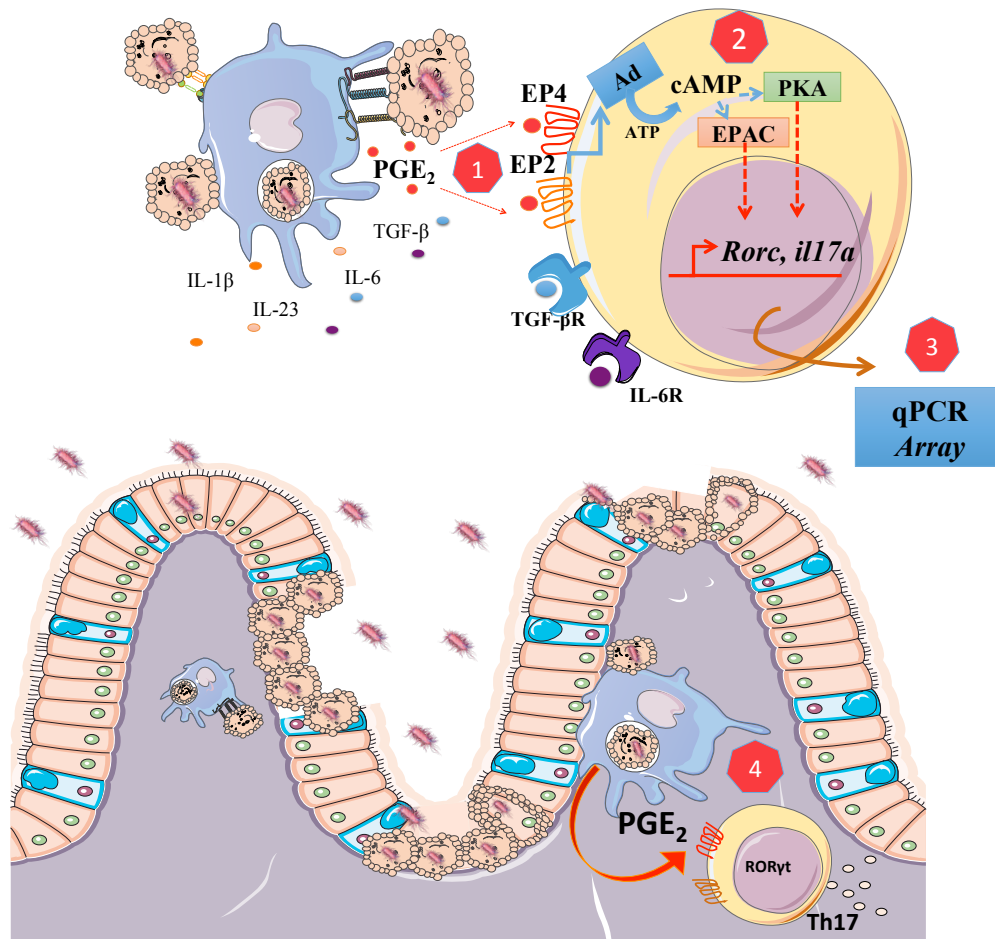
Hipótese

O reconhecimento de células apoptóticas infectadas por DCs direciona a síntese simultânea das citocinas TGF- β e IL-6. A presença destes mediadores promove a condição básica necessária para a diferenciação de linfócitos Th17 e desvenda um mecanismo inédito na diferenciação desta subpopulação de linfócitos Th. Tem sido demonstrado que a eferocitose, em condições estéreis, induz a síntese de PGE₂, entretanto, durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas, a produção e o papel deste mediador na diferenciação de Th17 ainda é desconhecido. A função da PGE₂ na diferenciação de Th17 é controversa, porém estudos recentes descrevem um papel imunestimulador deste prostanóide na diferenciação destes linfócitos.

Portanto, a hipótese deste estudo fundamenta-se no entendimento da atuação da PGE₂ *in vitro* e *in vivo* na diferenciação de células Th17, a partir da fagocitose de células apoptóticas infectadas com *E. coli* ou *C. rodentium*. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por DCs levaria a síntese de citocinas envolvidas na diferenciação de Th17, assim como PGE₂. A presença de PGE₂ e consequente interação com seus respectivos receptores (EP2 e EP4) levaria a ativação de cAMP-PKA e/ou EPAC, resultando na estimulação da diferenciação de células Th17.

Objetivos

O objetivo desse estudo foi investigar o mecanismo pelo qual a PGE₂, proveniente da fagocitose de células apoptóticas infectadas, participa na diferenciação de células Th17. Para isso, avaliou-se os receptores e as vias de sinalização que culminam na expressão de genes envolvidos na diferenciação e ativação desta subpopulação celular.



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Fig. 6. Estratégias utilizadas para investigar o papel da PGE₂ na diferenciação de Th17 durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas. Em (1), inibir o efeitos da PGE₂ utilizando-se antagonistas de EP2 e EP4; (2) inibir ou ativar Adenilato ciclase, PKA e EPAC para entender vias *downstream* dos receptores de PGE₂ que poderiam modular a diferenciação de Th17; (3) analisar a expressão gênica dos linfócitos por qPCR Array e (4) avaliar em modelo de colite infecciosa por *C. rodentium*, os efeitos da inibição da síntese ou sinalização PGE₂ na diferenciação de Th17 *in vivo*.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar a participação da PGE₂, proveniente da eferocitose de células infectadas, e de seus receptores (EP2 e EP4) na diferenciação de linfócitos Th17;
- 2) Caracterizar os efeitos da ativação da PKA e/ou EPAC na diferenciação de linfócitos Th17, no contexto da eferocitose de células infectadas;
- 3) Avaliar o papel da PGE₂ na modulação da expressão gênica de linfócitos Th diferenciados na presença de sobrenadante da eferocitose de células infectadas;
- 4) Determinar *in vivo* a participação da PGE₂ na diferenciação de linfócitos Th17.

Material e Métodos

Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 14 semanas de idade, foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores com temperatura, umidade, fluxo de ar, ciclo de luz claro/escuro controlado e livre acesso à água e ração esterilizadas. Todos os procedimentos experimentais foram julgados e autorizados pelo comitê de ética local. Parecer nº 24/2012 e nº 06/2016.

Diferenciação de DCs a partir de precursores de medula óssea

As DCs foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea do fêmur e tibia dos animais C57BL/6. As células precursoras foram cultivadas na presença de 40 ng/mL de GMCSF (Preprotech) em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e 10 µg/mL de antibiótico gentamicina, segundo protocolo preconizado por Lutz et al. (1999). No décimo dia de cultura, as células semi-aderentes foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de CD11c, MHCII, CD80 e CD86 por citometria de fluxo e posteriormente utilizadas para os ensaios de eferocitose e geração do meio condicionado.

Bactérias

As amostras de bactérias *Escherichia coli-GFP*, *Escherichia coli* (cepa ATCC 259992) ou *Citrobacter rodentium* (cepa ICC168) foram armazenadas a -80 °C. Para o crescimento bacteriano, inicialmente uma colônia foi isolada em meio LB de cultivo sólido (Difco LB Agar, Miller Luria-Bertani) e, posteriormente, foi realizado o crescimento bacteriano em meio LB líquido (Difco LB, Broth Luria-Bertani), sob agitação por 24 h, a 37 °C. No dia seguinte, as bactérias foram diluídas 100x em novo

meio LB líquido e cultivadas sob agitação a 37 °C por aproximadamente 3 h. A quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi feita por leitura da densidade óptica a 600nm. Após o crescimento, as bactérias foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C, lavadas 2x com PBS gelado e então ressuspensas em meio RPMI para infecção *in vitro* ou em PBS para infecção *in vivo*.

Geração das células apoptóticas infectadas (IACs)

Como fonte de IACs, utilizamos as células da linhagem RAW 264-7 infectadas com *E. coli* (1:10). A RAW 264-7 (ATCC TIB-71) é uma linhagem de monócito-macrófago transformado com o vírus de leucemia murino Abelson. Estas células foram adquiridas diretamente do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM 10% FBS com antibiótico gentamicina (10 µg/mL). As trocas de meio de cultura foram realizadas em dias alternados. Para a infecção das células com *E. coli*, as mesmas foram coletadas, centrifugadas a 300 g por 5 minutos, lavadas em PBS, e 1×10^6 células/mL foram ressuspensas em DMEM 10% FBS, sem antibiótico. Para a infecção, 1×10^7 células RAW 264-7 foram incubadas com 10^8 *E. coli*-GFP ou *E. coli* vivas (proporção 1:10). Após 2 h, as células foram coletadas e lavadas em PBS gelado, contendo antibiótico gentamicina (10 µg/mL). Para avaliar a eficiência de infecção, utilizamos *E. coli*-GFP e a porcentagem de células infectadas foi determinada por citometria de fluxo, analisando a porcentagem de células RAW 264-7 (CD11b) positivas para GFP. Para a indução da apoptose, as células infectadas ou estéreis foram irradiadas com 5 mJ de ultravioleta C (UVC), conforme protocolo adaptado de Torchinsky et al. (2009). Após 4 h de irradiação, a porcentagem de morte celular foi confirmada por

citometria de fluxo pela marcação com Anexina-V e 7-AAD, marcadores de apoptose e necrose, respectivamente.

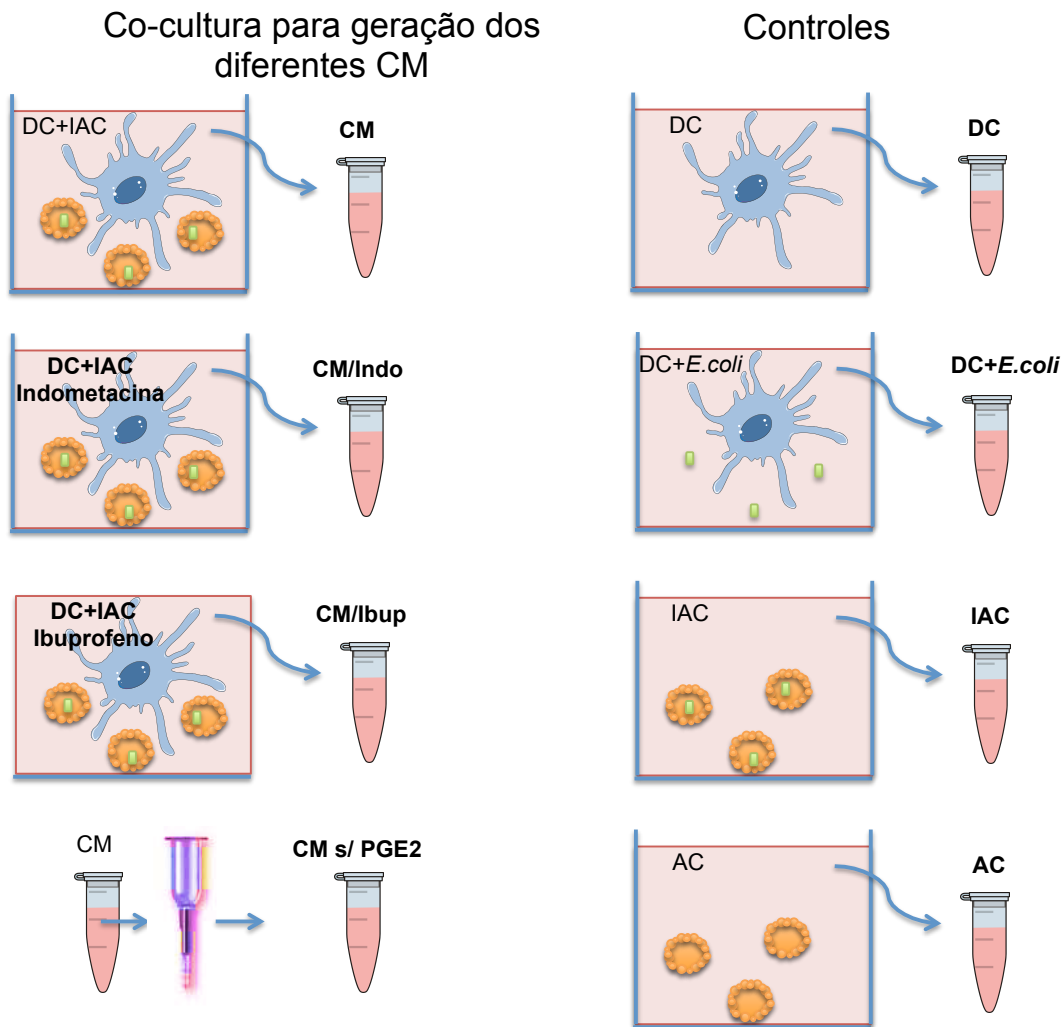
Ensaio de eferocitose

Para determinar a porcentagem de eferocitose, as DCs foram incubadas por 18 h com IACs, na proporção 1:3. Apenas as IACs foram previamente marcadas com CFSE, de acordo com as instruções do fabricante (*CellTrace CFSE Kit*, Life). Ainda, em alguns ensaios, as ACs ou IACs foram incubadas com Anexina-V recombinante para o recobrimento da PS exposta, comprometendo, desta forma, o reconhecimento das ACs e IACs pelas DCs. Para a ligação da Anexina à PS, as células foram incubadas com Anexina-V na presença de 2.5 mM de Ca^{2+} , de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi, Biotec). Posteriormente, 1×10^6 DCs incubadas na presença ou ausência de indometacina (10 μ M) foram co-cultivadas com 3×10^6 ACs e IACs, previamente marcadas com CFSE e incubadas ou não com Anexina-V, em placa de 24 poços no volume final de 1 mL de RPMI sem soro. Após o tempo de co-cultura, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD16/CD32 (*Fc-Block*), anti-CD11c-PeCy7 e analisadas por citometria de fluxo. As DCs que fagocitaram as IACs adquirem a marcação do CFSE e desta forma, a porcentagem de eferocitose foi determinada pela análise da população de DCs (CD11c) positivas para CFSE.

Geração do meio de cultura condicionado

As DCs foram incubadas na presença ou ausência de inibidores de COX e cultivadas na presença de IACs. Assim, 1×10^6 DCs foram incubadas com 10 μ M de indometacina, ibuprofeno (Cayman) ou inibidor seletivo de COX-2 (NS-398, Tocris), e co-cultivadas com 3×10^6 IACs. A co-cultura foi feita em placa de 24 poços em 1 mL de

RPMI sem soro. Após 18 h, o meio condicionado (CM) oriundo do sobrenadante da cocultura foi coletado, centrifugado para remoção de células, armazenado em alíquotas de 1 mL, e mantido a -80 °C até a realização dos ensaios de diferenciação de células Th *naive*. A proporção de 1 DC para 3 IACs ou ACs foi utilizada em todos os experimentos. Como controles experimentais, foi utilizado o sobrenadante de DCs cultivada na ausência de IACs, DCs cultivadas com *E. coli* (proporção 1:3), ou ativadas com 1 µg/mL de LPS (Sigma), assim como o sobrenadante de 3×10^6 IACs e ACs na ausência de DCs. O CM também foi tratado em coluna de purificação para a remoção de PGE₂ (*Prostaglandin E2 affinity column*, Cayman). A seguir, encontra-se esquematizada a geração dos diferentes CMs e sobrenadantes de controles experimentais (Fig. 7).



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Fig. 7. Delineamento experimental das diferentes condições para a obtenção de CM utilizado nos ensaios de diferenciação de linfócitos Th *naive*. Após 18 h de co-cultura, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior uso nos ensaios de diferenciação de Th.

Obtenção de células Th *naive*

Os linfócitos Th *naive* foram isolados a partir de células do baço de animais C57BL/6 utilizando-se *beads* magnéticas (*CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II mouse*, Miltenyi Biotech) de acordo com instruções do fabricante.

Ensaio de diferenciação de linfócitos Th

As células Th *naive* foram diferenciadas na presença de CM, oriundo das diferentes condições experimentais como descrito acima: CM, CM/Indo, CM/Ibup, CM s/ PGE₂, DC+*E.coli*, IAC, AC ou na presença de sobrenadante de DCs contendo apenas meio de cultura (Fig. 8). Assim, 5×10^5 linfócitos Th *naive* foram adicionados em placas de 48 poços com 4 µg/mL de anti-CD3, 2 µg/mL anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN-γ (BD) em 0.5 mL de IMDM suplementado com 20% de FBS, aminoácido não-essencial, 2 mM L-glutamina, 1 nM piruvato de sódio e 50 µM de 2-βmercaptoetanol. Posteriormente, 0.5 mL de CM obtido das diferentes condições experimentais foi adicionados aos poços. Como controles de diferenciação, as células Th *naive* foram cultivadas em condições polarizantes para Th17 (controle positivo) (IL-6: 20 ng/mL, TGF-β: 2.5 ng/mL e IL-1β: 10 ng/mL) ou apenas meio IMDM (controle negativo). Para avaliar o envolvimento da PGE₂, as células Th *naive* foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de agonistas/antagonistas de receptores de PGE₂ (Butaprost, Cay10598 (Cayman); SC19220, SC51089, AH6869, PF04418948 e L-161,982 (Tocris), ativadores e inibidores de adenilato ciclase, PKA e Epac (Forskolin, 8-Bromo-cAMP, 8-CPT-2Me-cAMP, SQ22536, H89, KT520 e ESI-09 (Tocris), assim como anticorpos neutralizantes de IL-1β (BD) e antagonista do receptor de IL-1β (IL-1Ra, Preprotech). Após 3-4 dias do início do ensaio de diferenciação, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas por ELISA e os linfócitos foram lavados com PBS e estimulados com PMA, Ionomicina e Brefeldina A em meio IMDM 10% FBS, para a determinação da expressão de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células Th1, Treg e Th17.

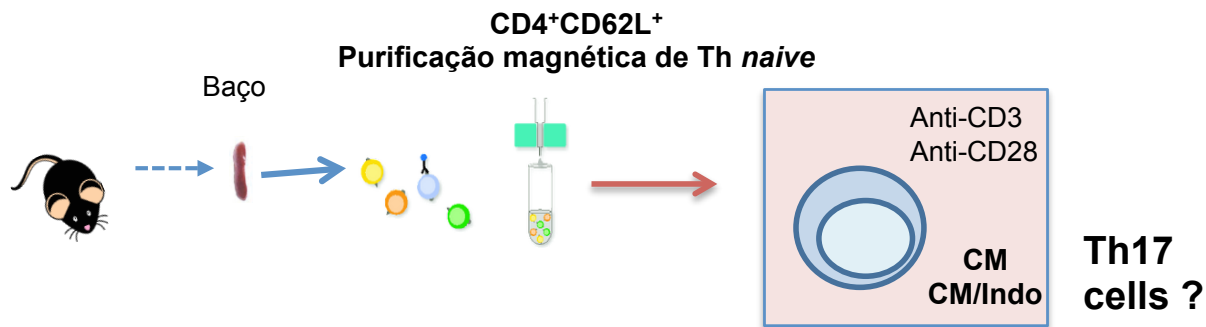


Fig. 8. Delineamento experimental do ensaio de diferenciação de Th *naive*. Linfócitos Th *naive* foram diferenciados por 3-4 d na presença dos diferentes CMs, sobrenadantes controles, apenas meio para C- ou coquetel polarizante de Th17 para C+. Anticorpos ativadores anti-CD3, CD28 ou bloqueadores anti-IL-2, anti-IFN- γ e anti-IL-4 foram adicionados na cultura.

Análise da proliferação celular

Os linfócitos (10^6 células/mL) foram incubados com 0.5 μ M de CFSE em PBS por 15 min, em estufa a 37 °C. Em seguida, os mesmos foram centrifugados e mantidos em meio IMDM 10% FBS, por 30 min. antes de serem utilizados nos ensaios de diferenciação celular. A proliferação foi avaliada por histograma, observando a diferença na intensidade de fluorescência obtida por citometria de fluxo.

Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares por citometria de fluxo nos linfócitos diferenciados *in vitro*

Após a diferenciação, as células Th obtidas das diferentes condições experimentais, como descrito previamente, foram estimuladas por 4 h com 0.1 μ g/mL de PMA (Sigma) e 0.5 μ g/mL de Ionóforo do cálcio (A23187) na presença de 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma). Posteriormente, as mesmas foram incubadas com corante para determinar a viabilidade celular (*Fixable Viability Dye*, eBioscience), fixadas e permeabilizadas, conforme descrito pelo fabricante (*Foxp3 Transcription Factor Staining*

Buffer Set, eBioscience). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti-IL-17A-PECy7 ou APC, anti-CD4-FITC ou PE, anti-Foxp3-APC, anti-Roryt-PE, APC ou PerCP-Cy5 e anti-IFN- γ -APC ou FITC (BD e eBioscience). As células foram adquiridas em citômetro FACSCantoII (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) e analisadas pelo programa *FCS Express* (De NovoTM Software). As células mortas foram excluídas da análise e a porcentagem da expressão das citocinas e fatores de transcrição intracelulares foi determinada na população CD4⁺. A seguir, encontra-se descrita a estratégia de seleção da população analisada (Fig. 9).

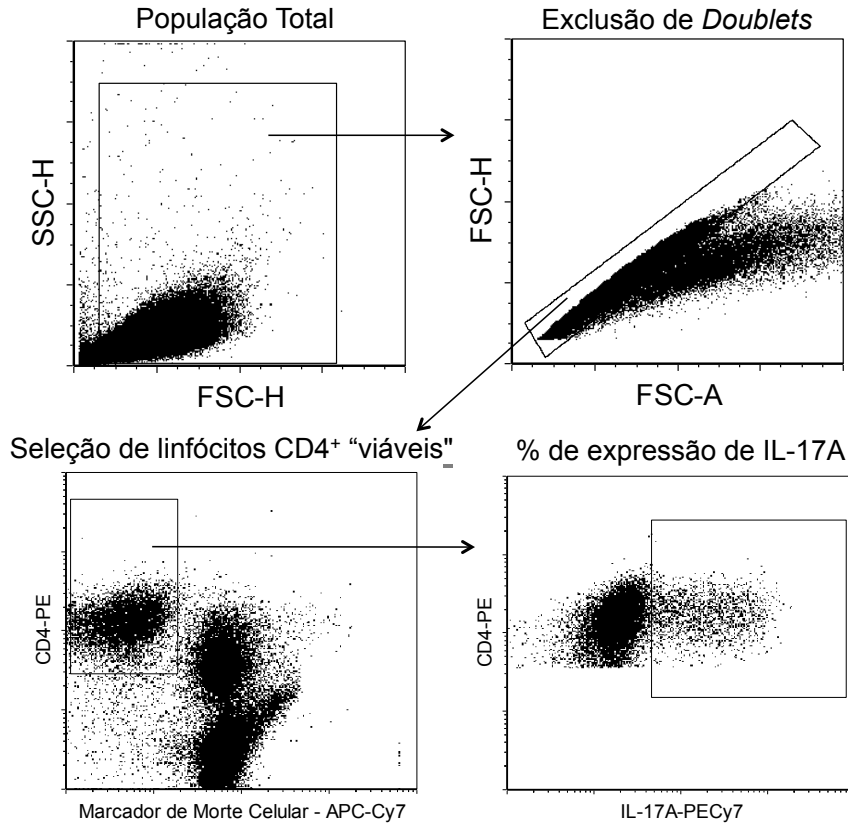


Fig. 9. Delimitação das populações celulares para análise da expressão de IL-17A em linfócitos T CD4⁺. As células T positivas para CD4 e negativas para APC-Cy7 (marcador de morte celular) foram analisadas quanto a porcentagem e MFI da expressão de citocinas e fatores de transcrição.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os diferentes meios condicionados e os sobrenadantes dos ensaios de diferenciação de linfócitos Th foram avaliados quanto à presença de citocinas e PGE₂. O limite de detecção dos ensaios foram: 31,25 pg/mL para IL-6, IL-1 β e IL-10 (BD); 15,6 pg/mL para IFN- γ e TGF- β (R&D); 4 pg/mL para IL-17A (eBioscience); 7.8 pg/mL para PGE₂ (PGE₂ EIA Kit, Cayman Chemicals) e 8 pg/mL para IL-23 e IL-22 (Biolegend). Nos experimentos *in vivo*, o tecido foi armazenado em tampão PBS na presença de inibidor de protease e indometacina. Em seguida, o mesmo foi homogeneizado e centrifugado para a obtenção do sobrenadante para quantificação de citocinas e PGE₂. A quantidade de citocinas e PGE₂ no cólon foi normalizada pela concentração de proteína total, determinada de acordo com as instruções do fabricante (*Protein Assay kit*, Bio-Rad).

Análise da expressão de genes por qPCR Array

A expressão diferenciada de genes relacionados à diferenciação e ativação de Th17 foram avaliados por PCR Array de acordo com as instruções do fabricante (*Th17 Response PCR Array*, Qiagen). Os genes analisados encontram-se descritos a seguir.

Tabela 1. Genes do *Th17 Response PCR Array PAMM-073Z* - Qiagen

Moléculas de Superfície: *Cd2, Cd28, Cd34, Cd4, Cd8a, Icam1, Icos, Isg20, Tlr4.*

Citocinas: *Csf2 (GM-CSF), Csf3 (GCSF), Ifng, Il10, Il12b, Il13, Il15, Il17a, Il17c, Il17d, Il17f, Il18, Il1b, Il2, Il21, Il22, Il23a, Il25 (Il17e), Il27, Il3, Il4, Il5, Il6, Il9, Tgfb1, Tnf.*

Quimiocinas: *Ccl1, Ccl2 (Mcp-1), Ccl20 (Mip-3a), Ccl22 (Mdc), Ccl7 (Mcp-3), Cx3cl1, Cxcl1, Cxcl12 (Sdf1), Cxcl2, Cxcl5 (Ena78/Lix).*

Receptores de Citocinas: *Ccr2, Ccr4, Ccr6, Il1r1, Il12rb1, Il12rb2, Il17ra, Il17rb, Il17rc, Il17re, Il23r, Il6ra, Il7r.*

Fatores de Transcrição e Moléculas de Vias de Sinalização: *Cd40lg (Tnfsf5), Cebpb, Clec7a (Dectin-1), Foxp3, Gata3, Irf4, Jak1, Jak2, Mmp3, Mmp9, Myd88, Nfatc2, Nfkb1, Rora, Rorc, Runx1 (Aml1), S1pr1, Socs1, Socs3, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat6, Syk, Tbx21, Traf6.*

Para a realização do ensaio, linfócitos Th *naïve* foram cultivados com anticorpos ativadores anti-CD3 (4 µg/mL), anti-CD28 (2 µg/mL) e anticorpos bloqueadores anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN-γ (5 µg/mL) na presença de CM, oriundo da fagocitose de IACs por DCs, tratadas ou não com 10 µM de indometacina ou ibuprofeno (CM, CM/Indo e CM/Ibup). Após 48 h, os linfócitos foram coletados para a extração de RNA e posterior síntese de cDNA, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). A diferença na expressão dos 89 genes, descritos anteriormente, foi avaliada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e representada em *Scatter Plot* utilizando-se ferramenta *on line* de análise da Qiagen-RT2 *Profile PCR Array* (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). A modulação, negativa ou positiva dos genes, encontrada no *Array* foi confirmada individualmente por qPCR convencional, utilizando-se *primers* específicos.

Real Time PCR quantitativo (qPCR)

O RNA obtido das amostras de cólon ou da cultura de DCs ou Th, nas diferentes condições descritas anteriormente, foi isolado de acordo com as instruções do fabricante (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen) e transcrito para cDNA (*iScript cDNA Synthesis Kit*, BioRad). Posteriormente, a análise da expressão de genes específicos foi determinada por

quantificação da amplificação, utilizando-se *SybrGreen* (Life) e *primers* específicos para os genes de interesse (Sigma) por meio da técnica de qPCR. A expressão relativa do gene de interesse, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, foi calculada através do método de controle (Ct) comparativo. Para realização do qPCR foi utilizado o termociclador ABI Prim 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os *primers* utilizados encontram-se descritos no Anexo 1.

Modelo de colite infecciosa induzida por *C. rodentium*

Os camundongos fêmeas C57BL/6, de 8 semanas de idade, foram infectados pela via oral gástrica (gavagem) com 2×10^9 UFC de *C. rodentium* em 200 μ L de PBS ou, como controle, tratados pela mesma via apenas com o PBS. Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais:

- **Controle:** grupo não infectado e tratado com veículo;
- **Controle+Indo:** grupo não infectado e tratado com indometacina (5 mg/kg);
- **Controle+EP4 Ant:** grupo não infectado e tratado com antagonista de EP4 (L-161,982) (10 mg/kg);
- **Infectado:** animais foram infectados e tratados apenas com veículo;
- **Infectado+Indo:** animais foram infectados e tratados com indometacina (5 mg/kg);
- **Infectado+EP4 Ant:** animais foram infectados e tratados com L-161,982 (10 mg/kg).

O tratamento dos animais com indometacina foi feito pela via intraperitoneal (i.p.) nos dias 1, 3, 5 e 7 após a infecção. O tratamento com L-161,982 foi realizado

diariamente, via i.p., durante 7 dias. Os demais animais receberam apenas o veículo (PBS+2%DMSO). O peso dos animais foi avaliado diariamente durante 8 dias (Fig. 10).

No oitavo dia de infecção, os animais foram eutanasiados para a coleta do cólon e fezes. As fezes foram armazenadas em meio LB líquido para determinação do número de UFC, e o cólon, após ser medido e fotografado, foi dividido em 4 partes para determinação de diferentes parâmetros:

- Número de UFC - uma porção do cólon foi armazenada em meio LB;
- Quantificação de citocinas e PGE₂ - uma porção do cólon foi armazenada em solução de PBS contendo inibidor de protease e 10 µM de indometacina,
- Avaliação da expressão gênica - uma porção do cólon foi armazenada em tampão de lise (Qiagen), para posterior extração de RNA.
- Linfócitos da lâmina própria (LPLs) e intraepiteliais (IELs) - uma porção do cólon foi lavada e digerida com colagenase para obtenção destes linfócitos.

Grupos infectados

Infectado

Infectado+Indo *

Infectado+EP4 Ant #

Grupos não infectados

Controle

Controle+Indo *

Controle+EP4 Ant #

Infecção (oral)

2×10^9 UFC

C. rodentium



Tratamento (i.p.)

* 5 mg/Kg Indometacina

10 mg/Kg L-161,982 (Antagonista de EP4)

Fig. 10. Delineamento experimental do ensaio de colite infecciosa induzida por *C. rodentium*.

Um dia após a infecção iniciou-se o tratamento dos animais com indometacina, antagonista de EP4 ou veículo, e após 8 dias de infecção, as amostras de fezes e cólon foram coletadas para análises posteriores.

UFC de *C. rodentium*

O número de UFC de *C. rodentium* no cólon e fezes foi determinado após a maceração do tecido em meio líquido LB e diluições seriadas semeadas em ágar LB sólido, contendo 50 µg/mL de antibiótico ácido nalidíxico (NAL, Sigma), para a seleção específica das bactérias *C. rodentium*, que possuem gene de resistência a este antibiótico.

Isolamento de IELs e LPLs no cólon

O cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais foi coletado 8 d após a infecção com *C. rodentium*. Para isolar IELs e LPLs, o tecido foi cortado longitudinalmente e então lavado com PBS 2% FBS, para remoção de fezes. Posteriormente, o tecido foi processado em fragmentos menores e então transferidos para tubos cônicos contendo 20 mL de PBS 2% FBS, com 1 mM de DTT (Sigma) e incubados por 20 min., a 37 °C, em agitador orbital. Este procedimento foi realizado 2x. Em seguida, a suspensão foi transferida para novo tubo e armazenada a 4 °C. O sobrenadante foi centrifugado, o sedimento celular foi lavado com PBS, ressuspensão em PBS 2% FBS e mantido a 4 °C até o momento do isolamento dos IELs utilizando o gradiente de Percoll (Sigma). Ainda, o tecido residual foi transferido para placas de 6 poços com 5 mL de RPMI 5% FBS com 1.6 mg/mL de colagenase D (Roche) e incubado por 1 h a 37 °C para digestão e obtenção dos LPLs. Após o período de digestão, o tecido foi homogeneizado com auxílio de seringa com agulha de 20 g e passado em peneira de 70 µM (Corning). As células obtidas foram ressuspensas em 4 mL de Percoll a 44% (GE Healthcare) e transferidas para tubos com 4 mL de Percoll a 66%. Os tubos foram centrifugados por 20 min. a 2800 rpm. Em seguida, a interface celular foi coletada, lavada com PBS e ressuspensa em IMDM 10% FBS contendo PMA, Ionomicina e Brefeldina A. Em seguida, as mesmas foram cultivadas por 4 h em estufa a 37 °C para posterior marcação de moléculas de superfície, citocinas intracelulares e fatores de transcrição. A análise da população de linfócitos Th, isolados da lâmina própria e ou epitélio, foi feita por meio da seleção da população positiva para CD4 e TCRβ, como descrito a seguir (Fig. 11).

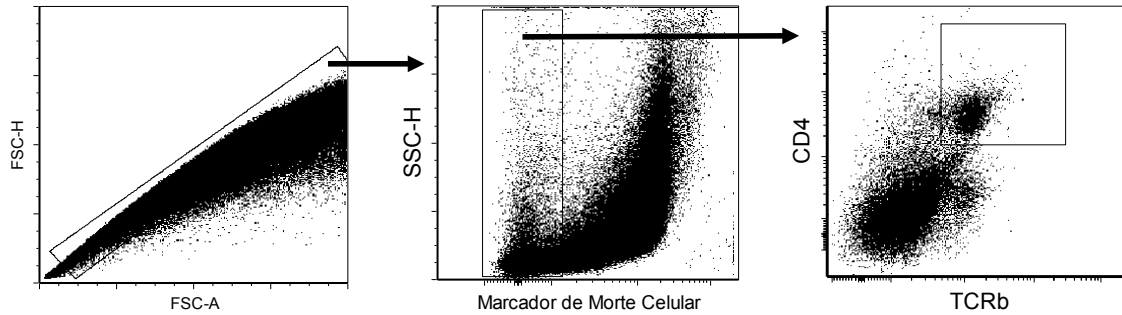


Fig. 11. Delimitação da população de linfócitos Th isolados do epitélio e lâmina própria do cólon. A expressão de citocinas e fatores de transcrição foi avaliada por citometria de fluxo na população linfócitos T CD4⁺TCRβ⁺.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm SEM e foram analisados utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A análise da variância (ANOVA) foi realizada com pós-teste de Bonferroni ou Tukey seguido de múltiplas comparações do grupos experimentais entre si. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas se o valor de p foi <0.05 .

Resultados

Geração de células apoptóticas infectadas

As células da linhagem RAW 264-7 infectadas com *E. coli* foram utilizadas como fonte de IACs. A porcentagem de células que fagocitaram as bactérias foi de aproximadamente 90% (Fig. 12a). Posteriormente, as células infectadas ou não infectadas foram irradiadas com UVC e, após 4 h, a porcentagem de morte celular foi confirmada por citometria de fluxo pela marcação com Anexina-V e 7-AAD (Fig. 12b).

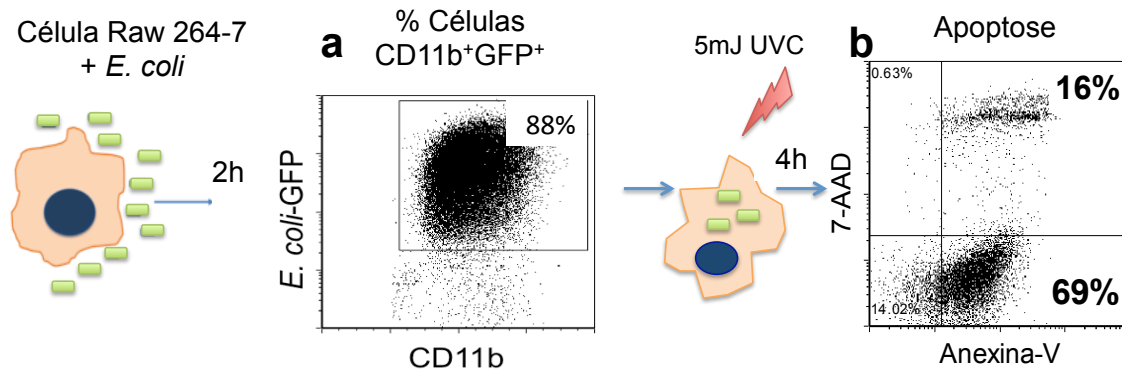


Fig. 12. Delineamento experimental da geração de células apoptóticas infectadas. Após 2 h de cultura das células RAW 264-7 na presença de *E. coli*-GFP (1:10), a fagocitose foi determinada pela % de RAW 264-7 (CD11b⁺) positivas para GFP, por meio de análise por citometria de fluxo (a). Após a fagocitose, as células foram lavadas e irradiadas com UVC para a indução da apoptose, que foi confirmada pela marcação de Anexina-V e 7-AAD (b).

Eferocitose de células infectadas leva a síntese de citocinas polarizantes de Th17 e PGE₂

Tem sido demonstrado que o reconhecimento de IACs leva a síntese de citocinas, tais como TGF- β , IL-6 e IL-23, que induzem a diferenciação de Th17. Por outro lado, a fagocitose de ACs estéreis por DCs leva a produção de IL-10, TGF- β e PGE₂, promovendo a diferenciação de células Treg (Torchinsky, Garaude et al. 2009). A presença deste prostanóide no contexto de eferocitose parece ter um papel chave na diferenciação de células Treg e manutenção da homeostase tecidual. No entanto, nada se sabe quanto a produção de PGE₂ e tão pouco o papel deste mediador lipídico na diferenciação de linfócitos Th *naive* em Th17 no contexto de eferocitose de células infectadas. Portanto, inicialmente foi avaliado se a PGE₂ seria produzida durante a eferocitose de células infectadas com *E. coli*, por DC, e ainda qual seria o papel deste mediador lipídico na diferenciação de Th17.

Como demonstrado na Fig. 13, a eferocitose não afetou a expressão da enzima constitutivamente expressa COX-1 (*Ptgs1*) (Fig. 13a), entretanto a fagocitose de IACs aumentou a expressão do mRNA da enzima COX-2 (*Ptgs2*) em DCs (Fig. 13b). Para confirmar se o aumento da expressão de COX-2 estava diretamente relacionada a eferocitose, as ACs e IACs foram previamente incubadas com Anexina-V purificada. A ligação da Anexina-V à PS promoveu uma redução de aproximadamente 30% na eferocitose por DCs (dados não demonstrados) e resultou na diminuição da expressão de COX-2 (Fig. 13b), comprovando que o reconhecimento das IACs é essencial para a indução da expressão de COX-2.

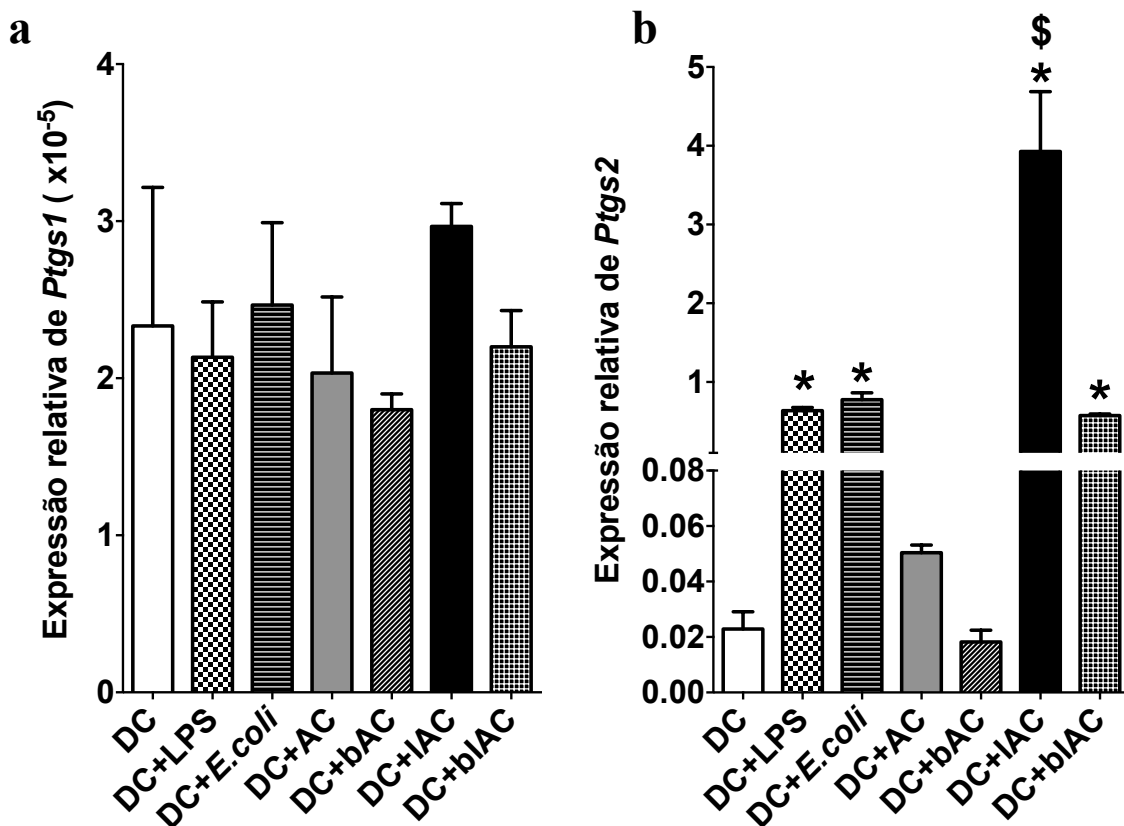


Fig. 13. Eferocitose de IACs aumenta a expressão de COX-2. A expressão do mRNA de *Ptgs1* (a) ou *Ptgs2* (b) foi avaliada após 18 h de cultura em células DCs na presença de meio (DC) ou ativadas com LPS (DC+LPS) ou *E. coli* (1:3) (DC+*E. coli*), assim como em DCs co-cultivadas com ACs (DC+AC), ACs recoberta com Anexina-V purificada (DC+bAC) ou DCs co-cultivadas com IACs (DC+IAC) ou IACs recobertas com Anexina-V purificada (DC+bIAC). Os resultados estão expressos com média \pm SEM. Resultado de 3 experimentos independentes. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs DC, DC+AC e DC+bAC. \$ $p < 0.05$ vs DC+LPS, DC+*E. coli* e DC+bIAC.

Considerando que a fagocitose de IACs promoveu um aumento da expressão de COX-2, a próxima etapa foi avaliar se os níveis de PGE₂ também estariam elevados nesta condição. Como demonstrado na Fig. 14, a fagocitose de IACs promoveu aumento significativo na síntese de PGE₂ por DCs, quando comparado as demais condições avaliadas. Além disso, os tratamentos das DCs com inibidores não seletivos de COX,

indometacina ou ibuprofeno (CM/Indo, CM/Ibup), ou inibidor seletivo de COX-2 (CM/NS), assim como o tratamento do CM em coluna de afinidade para PGE₂ (CM s/PGE₂), reduziram significativamente a detecção de PGE₂ quando comparado ao CM sem tratamento (Fig. 14 e Fig. 17d).

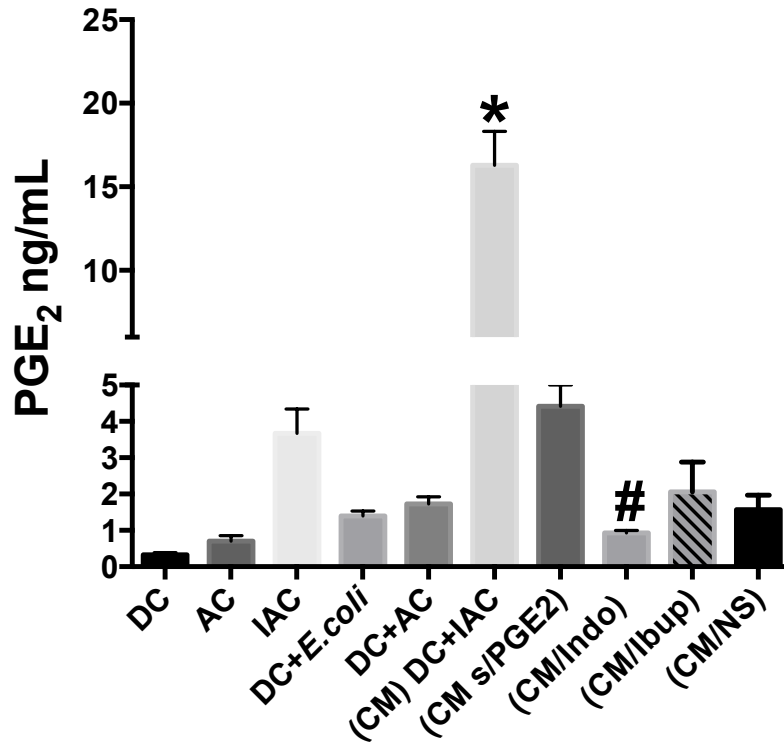


Fig. 14. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por DCs induz altos níveis de PGE₂. Após 18 h de cultura, o sobrenadante das diferentes condições experimentais foi coletado para a quantificação de PGE₂ por ELISA. As condições testadas foram: DC, sobrenadante de DC cultivadas apenas na presença de meio de cultura; AC, sobrenadante de AC; IAC, sobrenadante de IAC; CM, meio condicionado de DCs cultivadas na presença de IACs; CM-PGE₂, CM tratado em coluna de purificação para remoção de PGE₂ ou CM/Indo, DCs tratadas com 10 μM de indometacina e cultivadas com IACs. CM/Ibup, DCs tratadas com 10 μM de ibuprofeno e cultivadas com IACs. CM/NS, DCs tratadas com 10 μM de NS-398 (inibidor seletivo de COX-2) e cultivadas com IACs. Os resultados estão expressos com média ± SEM de 3 experimentos independentes. N=6. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. **p*<0.05 vs DC, AC, IAC, DC+E. coli, DC+AC, CM s/PGE₂ e CM/Indo. #*p*<0.05 vs IAC e CM s/PGE₂.

Tem sido demonstrado que a PGE_2 pode afetar a capacidade de eferocitose de macrófagos (Korns, Frasch et al. 2011), entretanto, nos ensaios de fagocitose de IACs, por DCs, o tratamento com indometacina não afetou a porcentagem de eferocitose (Fig. 15b). Como demonstrado na Fig. 15, na ausência do tratamento, a porcentagem de eferocitose por DCs foi de aproximadamente de 63%. O tratamento de DCs com indometacina, por sua vez, não alterou a eficiência da eferocitose (aproximadamente 63%), quando comparado as DCs não tratadas com inibidor de COX.

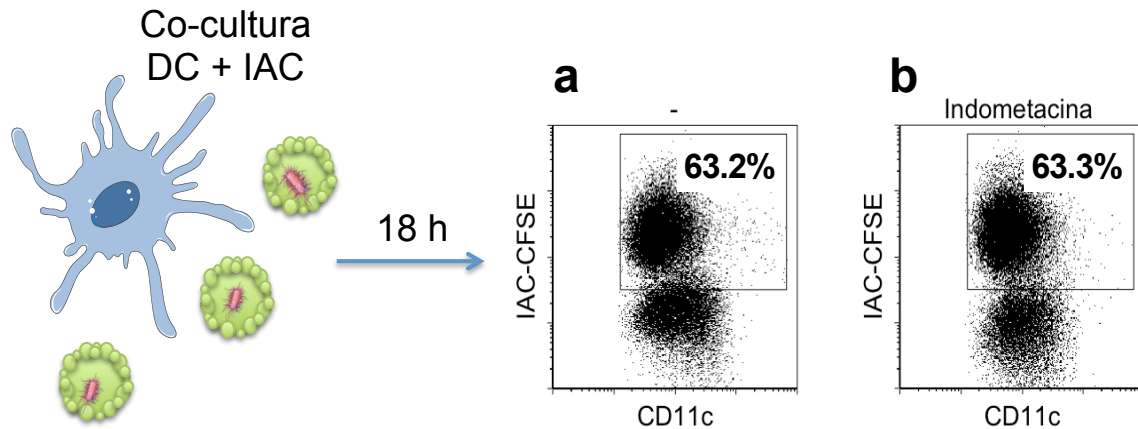


Fig. 15. O tratamento com indometacina não afeta a eferocitose por DCs. As IACs foram previamente marcadas com CFSE e incubadas com DCs sem tratamento (a) ou tratadas com 10 μ M de indometacina (b). Após 18 h, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD16/CD32 e anti-CD11c-PECy7 e avaliou-se por citometria de fluxo a positividade das DCs para CFSE. Células $CD11c^+CFSE^+$ indicam a % de DCs que fagocitaram IACs (respectivo à % de eferocitose). Para a análise, as células foram selecionadas na população $CD11c^+$. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Em relação a produção de citocinas induzidas pela fagocitose de IACs, pode ser observado na Fig. 16 e Fig. 17 que, além de $TGF-\beta$, IL-6 e IL-23, já descritas previamente na literatura, a eferocitose de IACs por DCs também induziu a produção de IL-1 β . Ainda, quando o CM foi submetido a coluna de afinidade para a remoção de PGE_2

(CM s/ PGE₂), observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na detecção de TGF-β (Fig. 16b), IL-6 (Fig. 16a) e IL-23 (Fig. 16d), entretanto, os níveis de IL-1β não foram alterados (Fig. 16c). Pode-se observar também que o tratamento com inibidor não seletivo de COX (indometacina, CM/Indo) reduziu significativamente a produção de TGF-β (Fig. 16b), IL-6 (Fig. 16a), IL-1β (Fig. 16c) e IL-23 (Fig. 16d), enquanto que o tratamento com ibuprofeno (CM/Ibup) reduziu significativamente a produção apenas de TGF-β (Fig. 17a).

Na cultura de DCs cultivadas unicamente na presença do meio de cultura, apenas os níveis de TGF-β foram detectados no sobrenadante (Fig. 16b). No entanto, corroborando com dados da literatura (Fadok, Bratton et al. 1998), as DCs cultivadas na presença de ACs (DC+AC) produziram TGF-β (Fig. 16b) e baixos níveis de IL-6, IL-1β e IL-23 (Fig. 16b-d). Ainda, os níveis das citocinas TGF-β, IL-1β, IL-6 e IL-23 foram detectados no sobrenadante de IACs ou DCs cultivadas com *E. coli* (DC+*E.coli*), entretanto, em concentrações significativamente menores quando comparado aos níveis detectados no CM (Fig. 16a-d), o que sugere que a eferocitose seja um processo fundamental para produção destas citocinas.

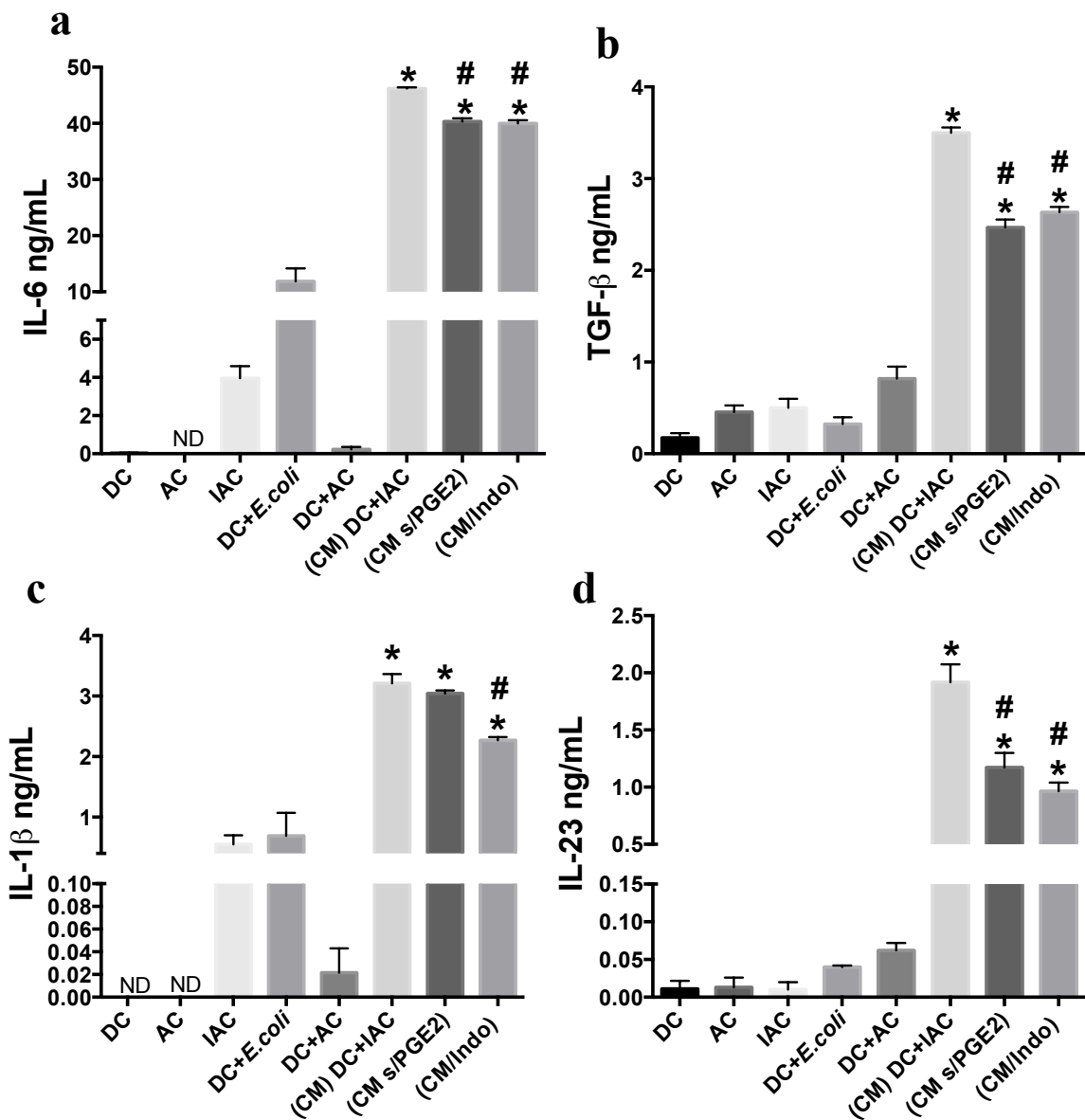


Fig. 16. A fagocitose de IACs induz a síntese de citocinas envolvidas na diferenciação de células Th17. Após 18 h de cultura, o sobrenadante das diferentes condições foi coletado para a quantificação de IL-6 (a), TGF-β (b), IL-1β (c) e IL-23 (d) por ELISA. As condições testadas foram: DC, sobrenadante de DCs cultivadas apenas na presença de meio de cultura; AC, sobrenadante de ACs; IAC, sobrenadante de IACs; CM, meio condicionado de DCs cultivadas na presença de IACs; CM-PGE₂, CM tratado em coluna de purificação para remoção de PGE₂ ou CM/Indo, DCs tratadas com 10 μM de indometacina e cultivadas com IACs. Os resultados estão expressos com média ± SEM. Resultado de 3 experimentos independentes. N=6. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs DC, AC, IAC, DC+E. coli, DC+AC. # $p < 0.05$ vs CM.

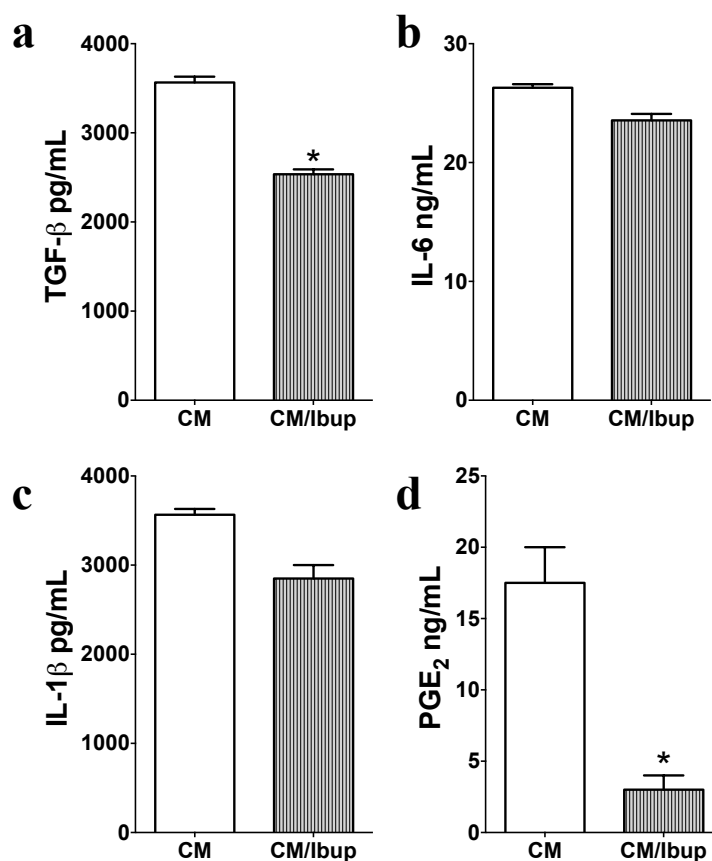


Fig. 17. O tratamento de DCs com ibuprofeno reduz a síntese de PGE₂ e TGF- β . As DCs foram incubadas com IACs na presença ou não de 10 μ M de ibuprofeno. Após 18 h, o sobrenadante foi coletado para a quantificação de TGF- β (a), IL-6 (b), IL-1 β (c) e PGE₂ (d). CM, DCs cultivadas por na presença de IACs. CM/Ibup, DCs foram tratadas com ibuprofeno e cultivadas na presença de IACs. Os resultados, de 2 experimentos independentes, estão expressos com média \pm SEM. N=3. * $p < 0.05$, utilizando análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni.

PGE₂ inibe a diferenciação de linfócitos Th17 no conteúdo da fagocitose de IACs

Para avaliar se a fagocitose de IACs por DCs favorece um microambiente propício à diferenciação de Th17 e, ainda, qual seria a importância da PGE₂ nestas condições, ensaios de diferenciação de Th *naive* foram realizados na presença dos diferentes CMs. Diferente da hipótese inicial, o CM, que possui altas concentrações de

PGE₂ inibiu a diferenciação de Th17 em relação ao CM/Indo, no qual os níveis de PGE₂ estão reduzidos (Fig. 18a). Ainda, não foram observadas diferenças em relação a viabilidade celular (dados não demonstrados) ou a proliferação dos linfócitos (Fig. 18b) entre os meios condicionados testados (CM e CM/Indo).

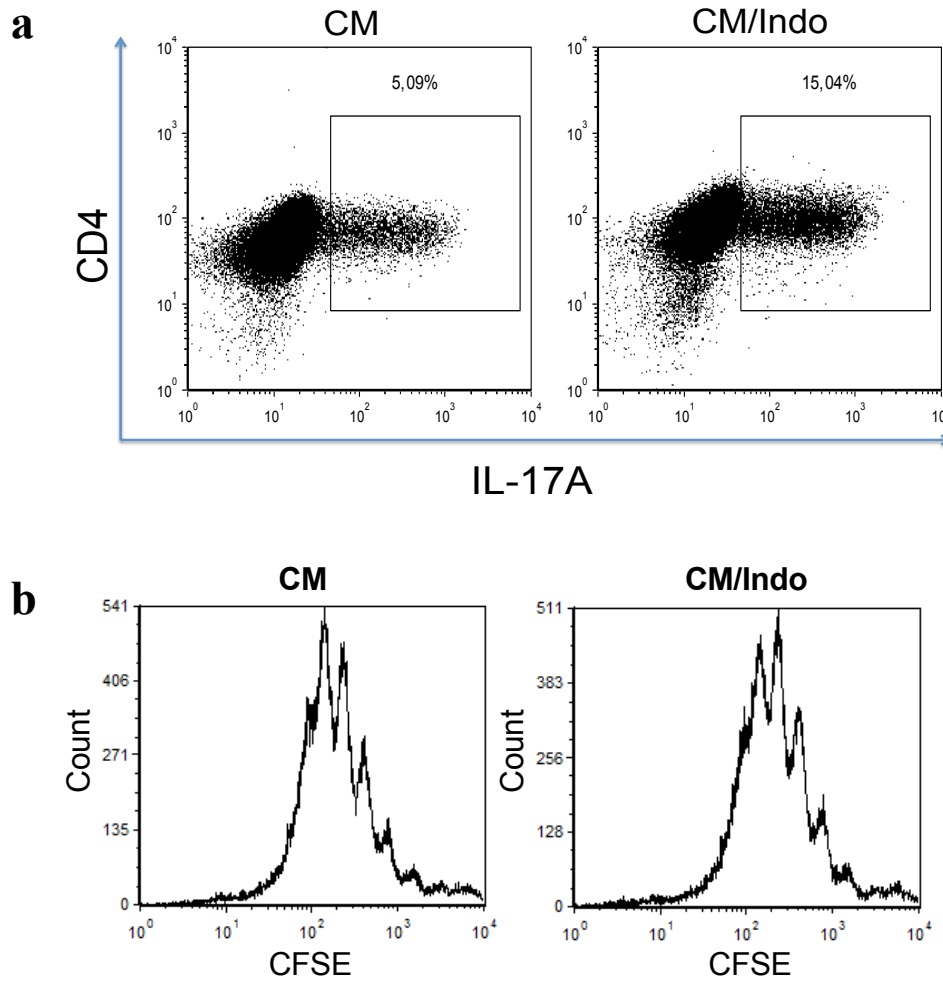


Fig. 18. PGE₂ inibe a diferenciação de Th17, mas não afeta a proliferação de linfócitos Th na presença do CM. Os linfócitos Th *naive* foram marcados com CFSE e diferenciados com CM ou CM/Indo, na presença de anti-CD3, anti-CD28, anti-IL-2, anti-IFN- γ e anti-IL-4. Após 4 d de cultura, os linfócitos foram fixados, permeabilizados e marcados intracelularmente com corante de viabilidade celular-APC-Cy7 e anticorpos anti-CD4-FITC e anti-IL-17A-PE-Cy7. O resultado da porcentagem de linfócitos expressando IL-17A (*dotplots*) é representativo de 6 experimentos independentes (a). A proliferação celular analisada pela intensidade de CFSE em histograma é representativa de 2 experimentos independentes (b).

Adicionalmente, foi investigado se os sobrenadantes oriundos das condições experimentais controles seriam capazes de induzir a diferenciação de Th17. Como demonstrado na Fig. 19, o cultivo de linfócitos Th *naive* na presença de sobrenadante oriundo de IACs, DC+LPS ou DC+*E. coli* resultou na diferenciação de uma baixa porcentagem de Th17 (Fig. 19a, b), assim como baixos níveis de IL-17A, detectados por ELISA (Fig. 19c). As porcentagens obtidas nestas condições experimentais foram significativamente menores, comparado ao CM e CM/Indo. Ainda, não foi observado diferenciação de Th17 no controle negativo (-) e tão pouco quando os sobrenadantes de DCs e ACs foram utilizados (Fig. 19). Estes dados demonstram que a eferocitose, de IACs por DCs, é o principal evento envolvido na indução de um microambiente favorável à diferenciação de Th17.

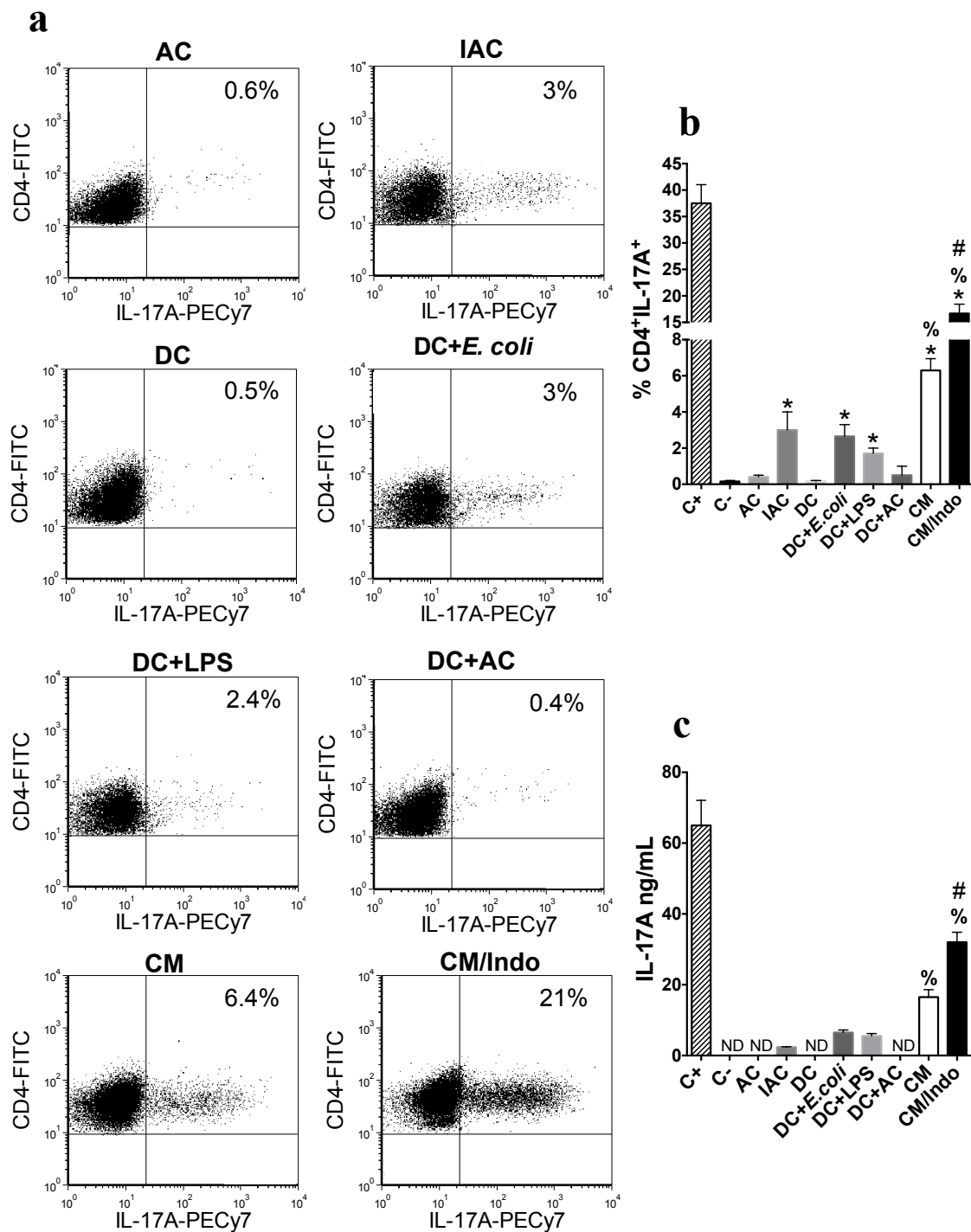


Fig. 19. A fagocitose de IACs por DCs gera um microambiente favorável à diferenciação de Th17. Os linfócitos Th *naive* foram diferenciados na presença de anti-CD3, anti-CD28, anti-IL-2, anti-IFN- γ e anti-IL-4 com sobrenadante de: DC, DCs cultivadas apenas na presença de meio de cultura; AC, sobrenadante de ACs; IAC, sobrenadante de IACs; CM, meio condicionado de DCs cultivadas na presença de IACs; CM-PGE₂, CM tratado em coluna de purificação para remoção de PGE₂ ou CM/Indo, DCs tratadas com 10 μ M de indometacina e cultivadas com IACs. Após 4

d de cultura, a % de linfócitos expressando de IL-17A foi determinada por citometria de fluxo com seleção na população CD4⁺ (a, b). *Dotplots* representativos de 3 experimentos independentes (a). Os níveis de IL-17A também foram detectados no sobrenadante dos linfócitos Th por ELISA (c). Os resultados estão expressos com média ± SEM de 3 experimentos independentes. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs DC. # $p < 0.05$ vs IAC, DC+E. coli e DC+LPS. # $p < 0.05$ vs CM.

PGE₂, proveniente da fagocitose de IACs, inibe a diferenciação de Th17

Embora a PGE₂ seja uma das mais abundantes prostaglandinas produzidas, outros tipos de prostanóides também são sintetizados pelas enzimas COX-1 e COX-2. Assim, a utilização de inibidores não seletivos de COX não inibe seletivamente a produção de PGE₂. Uma alternativa encontrada para a remoção deste prostanóide foi a utilização de uma coluna de afinidade específica para PGE₂. Desta forma, os linfócitos Th *naive* foram cultivados na presença de CM previamente submetido a colunas de purificação de PGE₂ (CM s/ PGE₂). Os baixos níveis de PGE₂ no CM s/ PGE₂ resultaram em um aumento significativo da produção de IL-17A, semelhante aos resultados obtidos na condição em que os linfócitos foram cultivados na presença de CM/Indo ou CM/Ibup (Fig. 20b). Além disso, a adição exógena de PGE₂ promoveu inibição na produção de IL-17A (Fig. 20a,b). Desta forma, os resultados sugerem que, dentre os possíveis prostanóides produzidos por DCs durante a fagocitose de IACs, a PGE₂ é a principal responsável pelo o efeito inibitório na diferenciação de linfócitos Th *naive* em Th17.

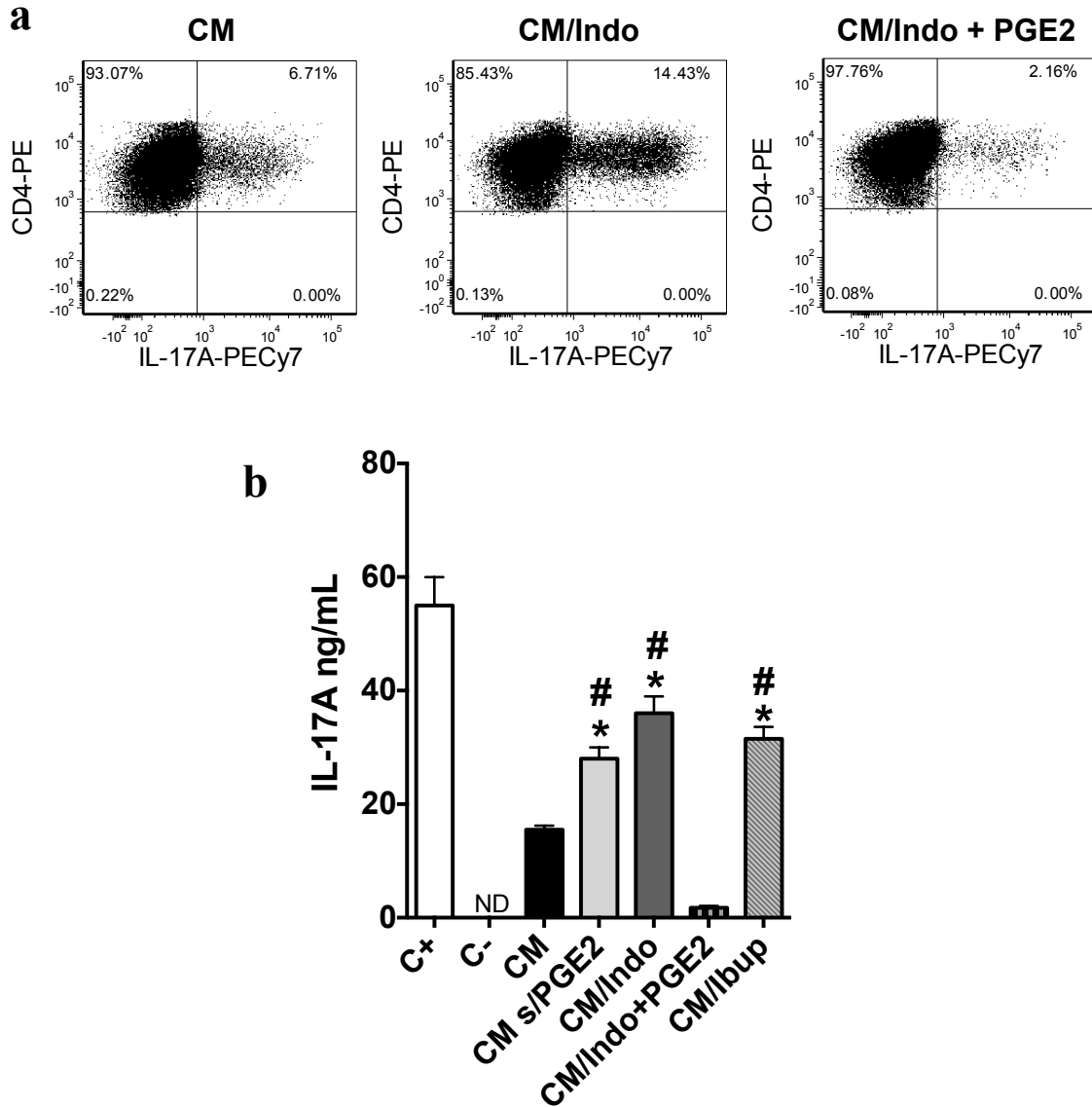


Fig. 20. PGE₂ inibe a diferenciação de Th17 e a produção de IL-17A, no contexto da fagocitose de IACs por DCs. Os linfócitos Th *naive* foram diferenciados em condições polarizantes para Th17 (C+), na presença apenas de meio (C-) ou na presença dos CMs: CM, sobrenadante da co-cultura de DC+IAC; CM s/ PGE₂, CM tratado em coluna de remoção de PGE₂; CM/Indo, sobrenadante da co-cultura de DC tratada com indometacina+IAC; CM/Indo+PGE₂, sobrenadante CM/Indo com adição exógena de 10 nM de PGE₂ ou CM/Ibup, sobrenadante da co-cultura de DC tratada com ibuprofeno+IAC. Após 4 d de cultura, a expressão de IL-17A foi analisada por citometria de fluxo (**a**) ou detectada por ELISA no sobrenadante dos linfócitos (**b**). Os resultados estão representados em *dotplots* (**a**) ou como média ± SEM de 3 experimentos independente (**b**). N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs CM. # $p < 0.05$ vs CM/Indo+PGE₂.

PGE₂ produzida pela fagocitose de células infectadas favorece a expressão de IFN- γ e suprime a expressão de Foxp3 nos linfócitos Th

Para determinar se além da IL-17A, a fagocitose de IACs por DCs poderia induzir a expressão de citocinas e fatores de transcrição relacionados a outros subtipos de Th, como Treg e Th1, a expressão de Foxp3 e IFN- γ foi investigada nos linfócitos diferenciados na presença dos diferentes CMs, assim como foi determinado o envolvimento de PGE₂ neste processo.

Em relação a expressão de Foxp3, pode-se observar que o CM oriundo da fagocitose de IACs promoveu uma redução na expressão de Foxp3 em linfócitos Th quando comparado a condição AC ou DC+AC (sobrenadante da fagocitose estéril) (Fig. 21a,b). Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo (C-) e as demais condições avaliadas. Estes dados demonstram que a fagocitose de células infectadas induz preferencialmente a diferenciação de Th17, enquanto que a fagocitose em condições estéreis favorece a diferenciação de Treg, como previamente já foi descrito na literatura.

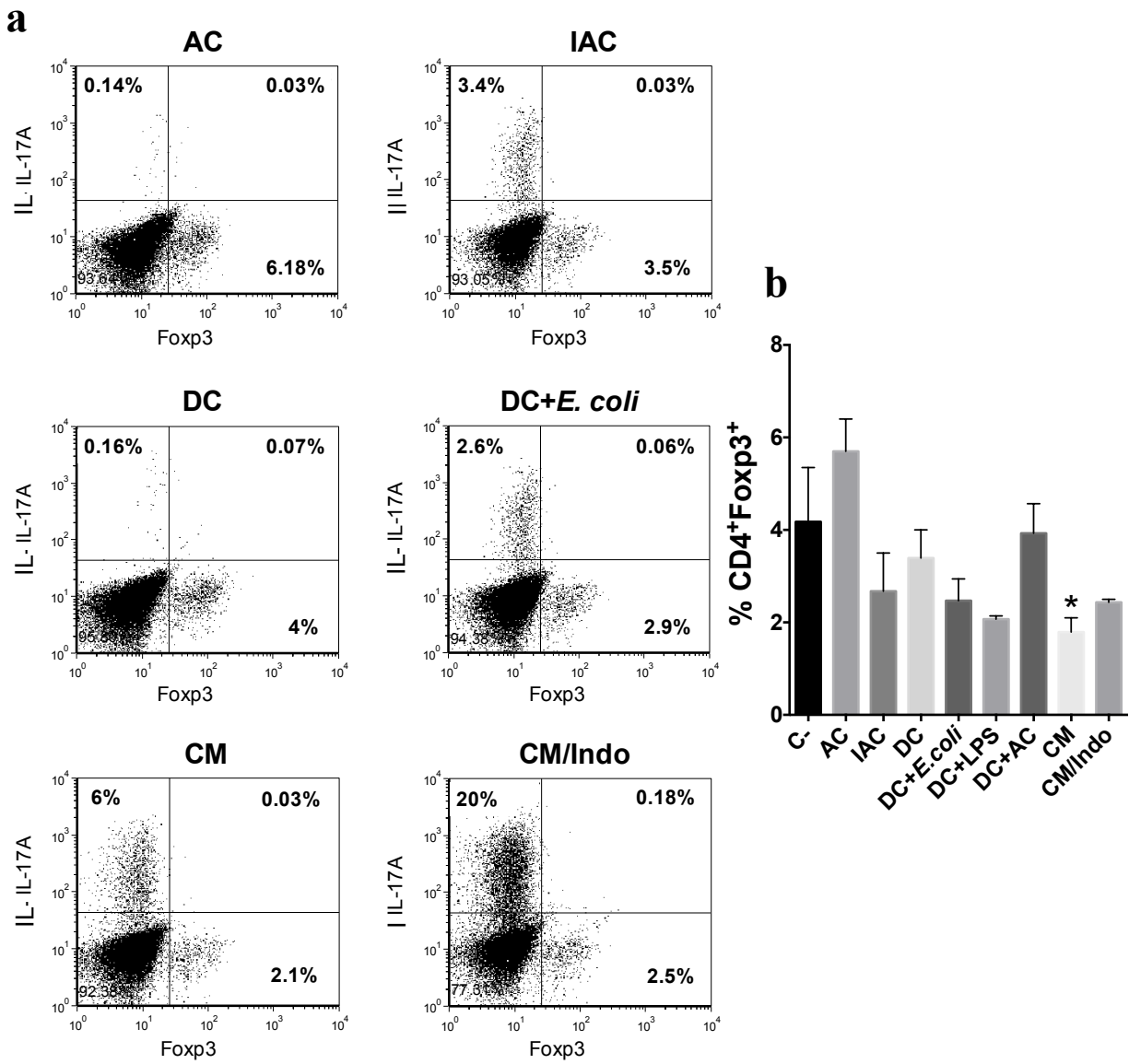


Fig. 21. Eferocitose de células infectadas inibe a expressão de Foxp3. Os linfócitos Th *naive* foram diferenciados na presença de sobrenadantes de AC, IAC, DC, DC ativada com *E. coli* (DC+E. coli) ou com os CMs: CM, sobrenadante da co-cultura de DC+IAC ou CM/Indo, sobrenadante da co-cultura de DC tratada com indometacina+IAC. Após 4 d de cultura, os linfócitos foram marcados com anti-CD4-FITC, anti-IL-17A-PECy7 e anti-Foxp3-APC e corante de viabilidade. Os *dotplots* são representativos de 3 experimentos independentes (a). Porcentagem de expressão de Foxp3 analisada por citometria de fluxo (b). Os resultados estão representados como média \pm SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs AC e DC+AC.

Em relação a expressão de IFN- γ , os linfócitos Th *naive* incubados na presença do sobrenadante oriundo de DC+LPS apresentaram um aumento significativo na expressão de IFN- γ , comparado as condições DC e DC+AC (Fig. 22a-c). Ainda, os linfócitos diferenciados na presença do CM apresentaram uma maior porcentagem de células positivas para IFN- γ , em relação a expressão de IL-17A. No entanto, a inibição da PGE₂ causada pelo tratamento com indometacina (CM/Indo) resultou na inversão deste fenótipo de diferenciação de linfócitos, ou seja, favoreceu a expressão de IL-17A enquanto inibiu a expressão de IFN- γ (Fig. 22a-c).

Embora a porcentagem de linfócitos positivos para IFN- γ tenha sido maior que a de linfócitos positivos para IL-17A na condição CM, a quantificação destas citocinas no sobrenadante dos linfócitos demonstrou que na condição CM a concentração de IL-17A é 2x maior do que a quantidade de IFN- γ (Fig. 23). Estes dados sugerem que a PGE₂, oriunda da fagocitose de IACs leva a um aumento na porcentagem de linfócitos Th1. Por outro lado, dentre as citocinas secretadas, os níveis de IL-17A ainda são superiores aos de IFN- γ , indicando que a produção de IL-17A é favorecida no contexto da fagocitose de IACs.

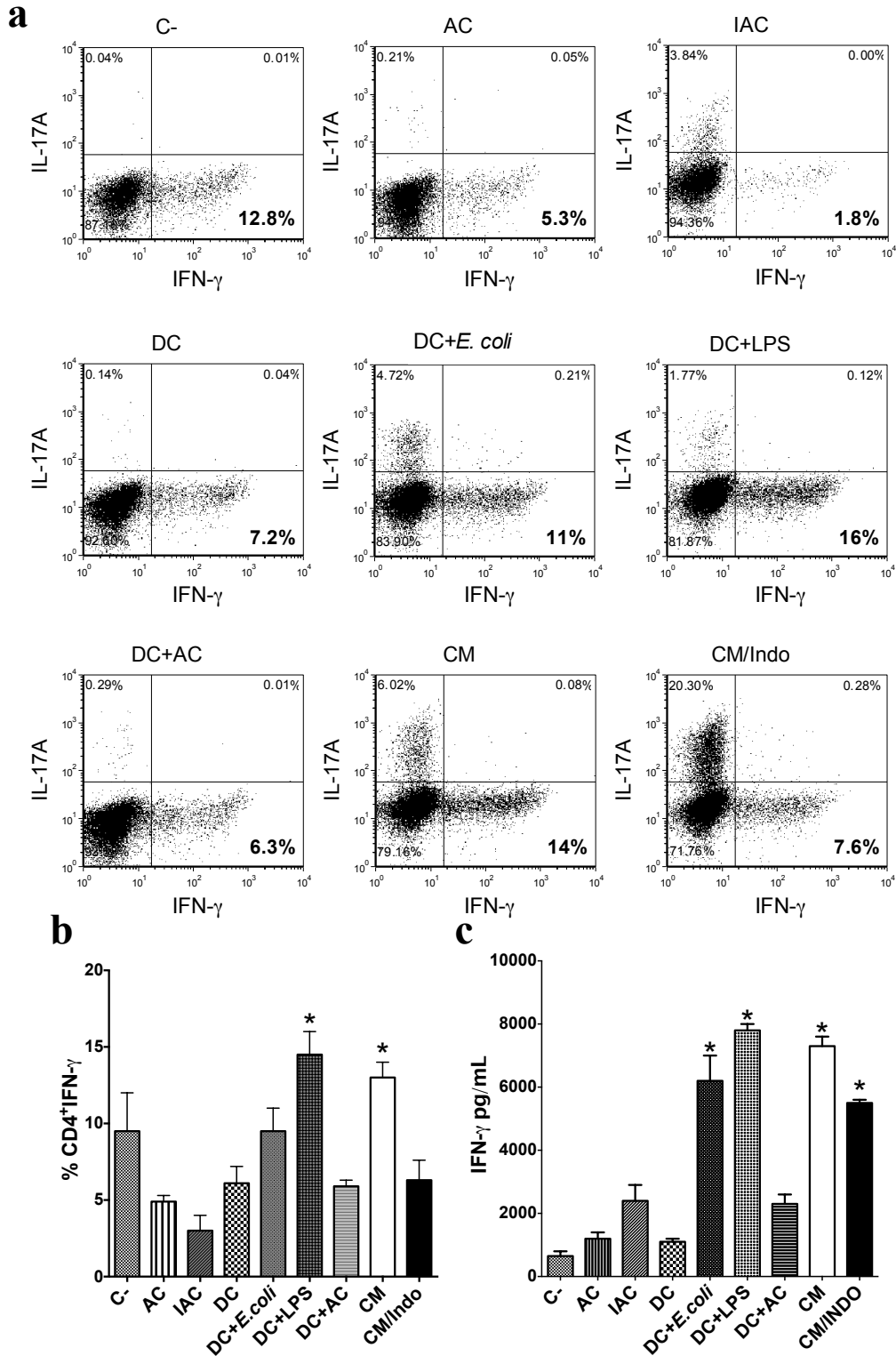


Fig. 22. A fagocitose de IACs por DCs favorece a diferenciação de linfócitos produtores de IFN- γ . Linfócitos Th *naive* foram diferenciados na presença de meio de cultura apenas (C-) ou de sobrenadantes de AC, IAC, DC, DC ativada com *E. coli* (DC+E. coli) ou LPS (DC+LPS); ou com

os CMs: CM, sobrenadante da co-cultura de DC+IAC ou CM/Indo, sobrenadante da co-cultura de DC tratada com indometacina+IAC. Após 4 d de cultura, os linfócitos foram marcados com anti-CD4-FITC, anti-IL-17A-PECy7 e anti-IFN- γ -APC. Os *dotplots* são representativos de 3 experimentos independentes (a). A porcentagem da expressão de IFN- γ foi analisada por citometria de fluxo (b). O sobrenadante da cultura de linfócitos foi utilizado para a quantificação de IFN- γ por ELISA (c). Os resultados estão representados como média \pm SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs AC, IAC, DC e DC+AC.

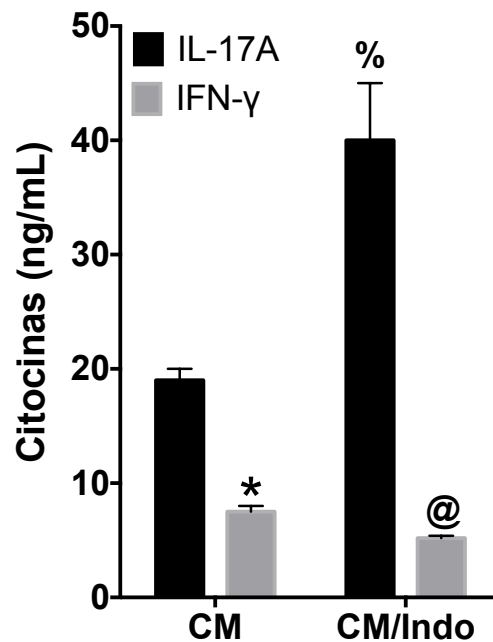


Fig. 23. Níveis de IL-17A prevalecem aos de IFN- γ no sobrenadante da cultura de linfócitos diferenciados com CM. Linfócitos Th *naive* foram diferenciados na presença de CM, sobrenadante da co-cultura de DC+IAC ou CM/Indo, sobrenadante da co-cultura de DC tratada com indometacina + IAC. Após 4 d de diferenciação, o sobrenadante da cultura dos linfócitos foi utilizado para a quantificação de IL-17A e IFN- γ por ELISA. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs CM IL-17A. @ $p < 0.05$ vs CM/Indo IL-17A. % $p < 0.05$ vs CM IL-17A e IFN- γ .

EP4 é o principal receptor de PGE₂ envolvido na supressão da diferenciação de Th17 no contexto da fagocitose de IACs

Para investigar quais receptores estariam envolvidos no efeito supressor da PGE₂ na diferenciação de Th17, utilizamos diferentes agonistas e antagonistas de EP2 e EP4, e agonista de EP1 durante os ensaios de diferenciação de linfócitos Th *naive*, na presença do CM ou CM/Indo. O foco em EP1, EP2 e EP4 deve-se ao fato destes receptores de PGE₂ serem predominantemente expressos em linfócitos Th *naive*, enquanto que EP2 e EP4 são principalmente expressos em linfócitos Th17, como pode ser observado na Fig. 24.

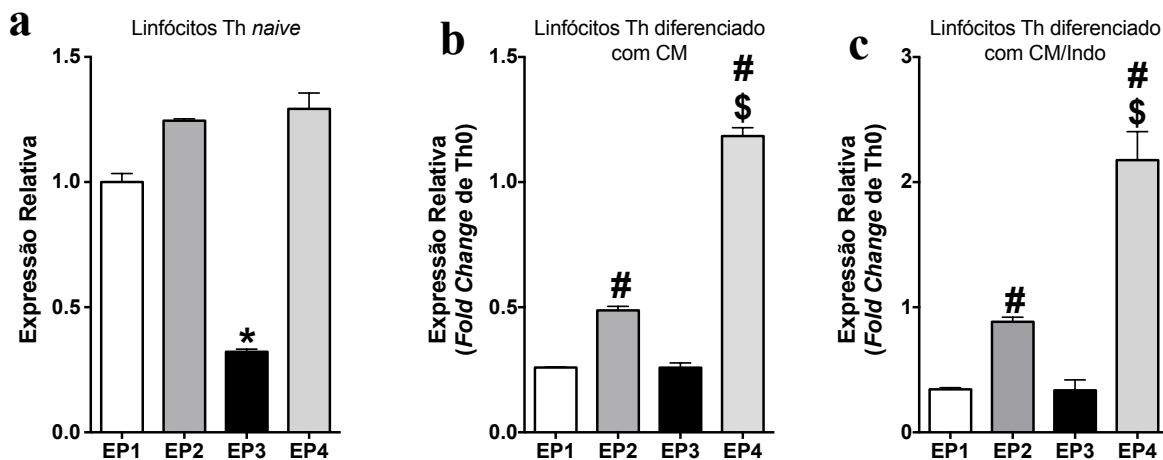


Fig. 24. A diferenciação de células Th17 na presença de CM resulta no aumento da expressão de EP4. Linfócitos Th *naive* (a) ou após 24 h na presença de CM (b) ou CM/Indo (c) foram analisados quanto a expressão dos receptores de PGE₂ (EP1-EP4) por qPCR. A expressão relativa foi calculada a partir da expressão do gene endógeno *gapdh*. Os resultados estão representados como média ± SEM de 3 experimentos independentes. N=3. * $p < 0.05$ vs EP1, EP2 e EP4. # $p < 0.05$ vs EP1 e EP3. \$ $p < 0.05$ vs EP2.

Em relação ao uso dos agonistas e antagonistas dos receptores da PGE₂, foi demonstrado que o efeito inibidor da PGE₂ ocorreu preferencialmente via EP4 (Fig. 25a). Ainda, o efeito supressor da PGE₂ foi mimetizado pelo agonista de EP4 (1 μM), enquanto

que o agonista de EP2 não apresentou efeito nesta mesma concentração (Fig. 25a). No entanto, o agonista de EP2 em concentrações 10x maiores (10 μ M) à utilizada pelo agonista de EP4 (1 μ M) inibiu a produção de IL-17A (Fig. 25c).

Quanto ao envolvimento dos receptores EP1 e EP2, o tratamento de linfócitos com os respectivos antagonistas não foi capaz de restaurar a produção de IL-17A na presença de CM. Por outro lado, a adição dos antagonistas de EP4, L-161,982 (Fig. 25a, b) ou ONO-AE3-208 (não demonstrado) no CM resultou em um acentuado aumento da produção de IL-17A, em níveis semelhantes ao obtido na condição de CM/Indo, restaurando, desta forma, a capacidade de diferenciação em linfócitos Th17 (Fig. 25a, b).

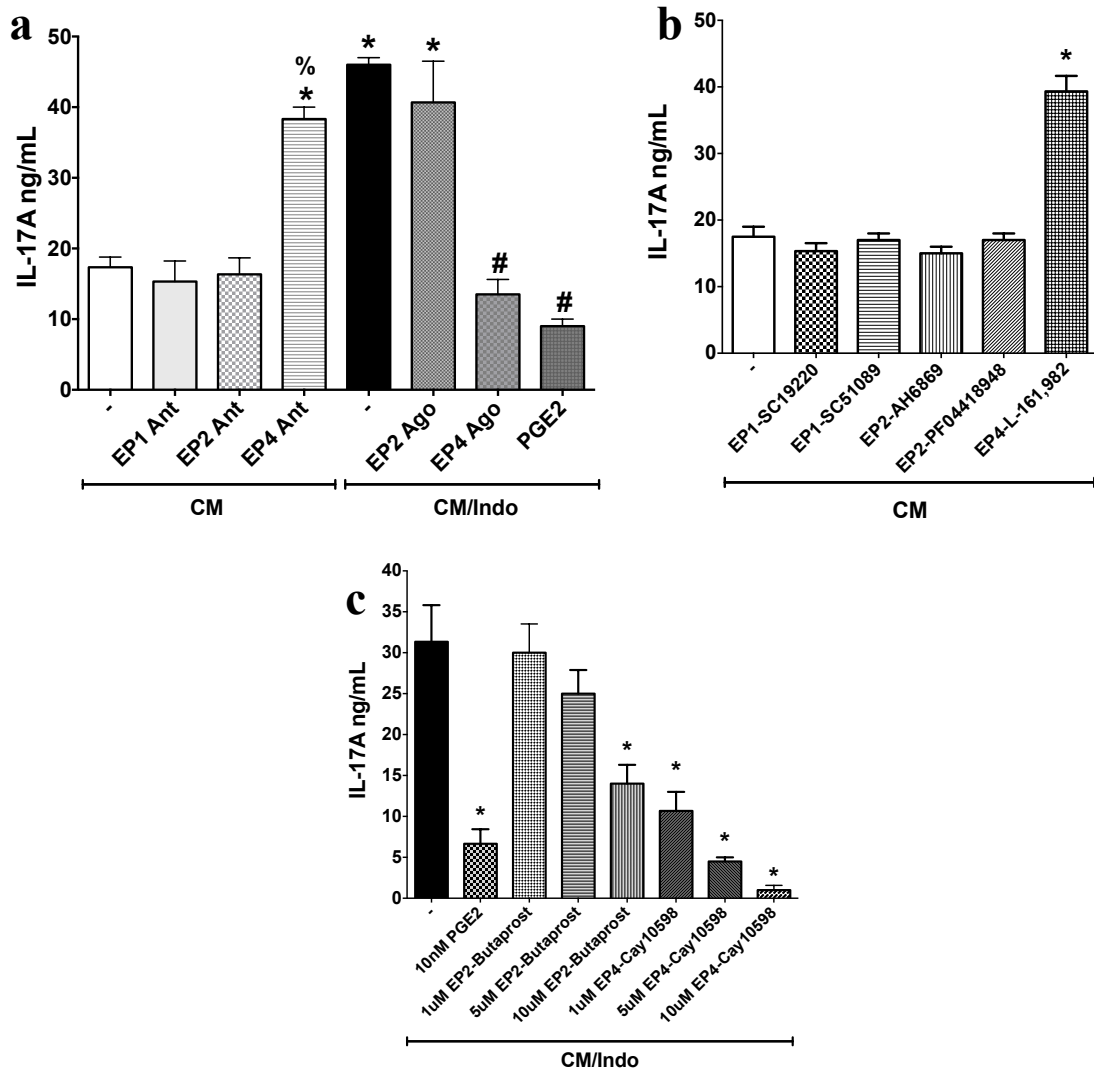


Fig. 25. EP4 é o principal receptor envolvido na inibição da produção de IL-17A por linfócitos Th diferenciados na presença de CM. Linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de: **(a) Esquerda:** CM apenas (-) ou CM na presença de 1 μ M de antagonista de EP1 (SC1910); EP2 (AH6869) ou EP4 (L-161,982) e, **Direita:** CM/Indo (-); CM/Indo na presença de 1 μ M de agonista de EP2 (Butaprost); CM/Indo com 1 μ M de agonista de EP4 (Cay10598) ou CM/Indo na presença de 10 nM de PGE₂ exógena, **(b)** CM apenas (-) ou CM na presença de 5 μ M de antagonista de EP1 (SC19220 ou SC51089); EP2 (AH6869 ou PF04418948) ou EP4 (L-161,982) e **(c)** CM/Indo (-); CM/Indo com PGE₂ (10 nM); CM/Indo com diferentes concentrações (1, 5 e 10 μ M) de agonista de EP2 (Butaprost) ou na presença diferentes concentrações (1, 5 e 10 μ M) de agonista EP4 (Cay10598). Após 4 d de cultura o sobrenadante foi coletado e IL-17A foi quantificada por ELISA. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 3 experimentos independente. N=5. Análise da variância

ANOVA, pós-teste Bonferroni. (a) $*p < 0.05$ vs CM (-). $^{\%}p < 0.05$ vs EP1 Ant e EP2 Ant. $^{\#}p < 0.05$ vs CM/Indo (-). (b, c) $*p < 0.05$ vs (-).

Além da detecção da citocina IL-17A por ELISA, foi também determinada a participação de EP4 na inibição da diferenciação de Th17, por citometria de fluxo. Como demonstrado a seguir, apenas o antagonista de EP4 foi capaz de aumentar a expressão de IL-17A em linfócitos diferenciados na presença do CM, ao passo que o agonista de EP4 mimetizou os efeitos diretos da PGE₂ e reduziu a expressão de IL-17A nos linfócitos diferenciados na presença de CM/Indo (Fig. 26a-d).

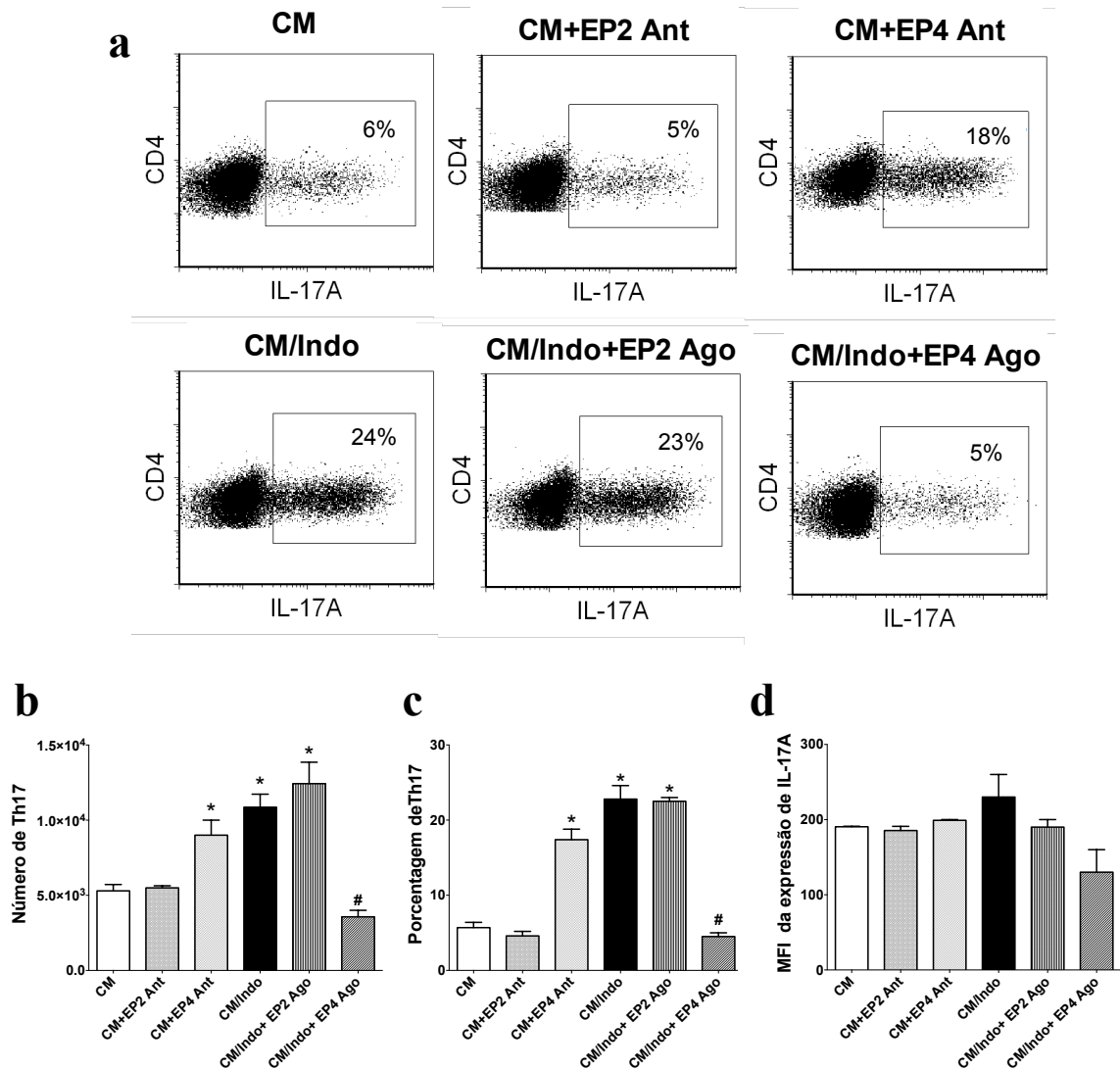


Fig. 26. EP4 modula negativamente a diferenciação de linfócitos Th17 no contexto da eferocitose de células infectadas. Os linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de CM apenas ou CM com 5 μ M de antagonista de EP2 (AH6869) ou EP4 (L-161,982); ou CM/Indo e CM/Indo na presença de 5 μ M de agonista de EP2 (Butaprost) ou agonista de EP4 (Cay10598). Após 4 d de cultura as células foram ativadas com PMA, Ionomicina na presença de Brefeldina A e posteriormente fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-CD4-FITC e anti-IL-17A-PECy7. A porcentagem de células positivas para IL-17A foi determinada a partir de pré-*gate* na população de linfócitos CD4⁺ viáveis. *Dotplots* representativos de 5 experimentos independentes (a). O número de linfócitos positivos para IL-17A (b), assim como a porcentagem (c) e a mediana da intensidade (MFI) (d) da expressão de IL-17A foi determinada a partir de pré-*gate* na população de linfócitos CD4⁺, por citometria de

fluxo. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs CM. # $p < 0.05$ vs CM/Indo.

PGE₂ proveniente da fagocitose, por DCs, de IACs inibe a diferenciação de Th17 via ativação de EP4-Adenilato ciclase-PKA

O EP4 é um receptor acoplado a proteína G α s e sua ativação promove aumento de cAMP intracelular e consequente ativação das proteínas efetoras PKA e ou EPAC (Serezani, Ballinger et al. 2008). Desta forma, para investigar o mecanismo intracelular envolvido na inibição de Th17 via EP4, utilizou-se ativadores ou inibidores de Adenilato ciclase (enzima que catalisa a conversão de ATP em cAMP), PKA e EPAC.

O aumento de cAMP intracelular, promovido pelo tratamento com o ativador de Adenilato ciclase (Forskolin), levou a redução da produção de IL-17A em linfócitos diferenciados com CM/Indo (Fig. 27). Ainda, o aumento de cAMP parece mediar a supressão da diferenciação de Th17, principalmente via proteína efetora PKA. Ou seja, a ativação de PKA, utilizando-se 8-Bromo-cAMP, diminuiu a produção de IL-17A na condição de CM/Indo, enquanto que a ativação de EPAC não afetou a produção de IL-17A (Fig. 27).

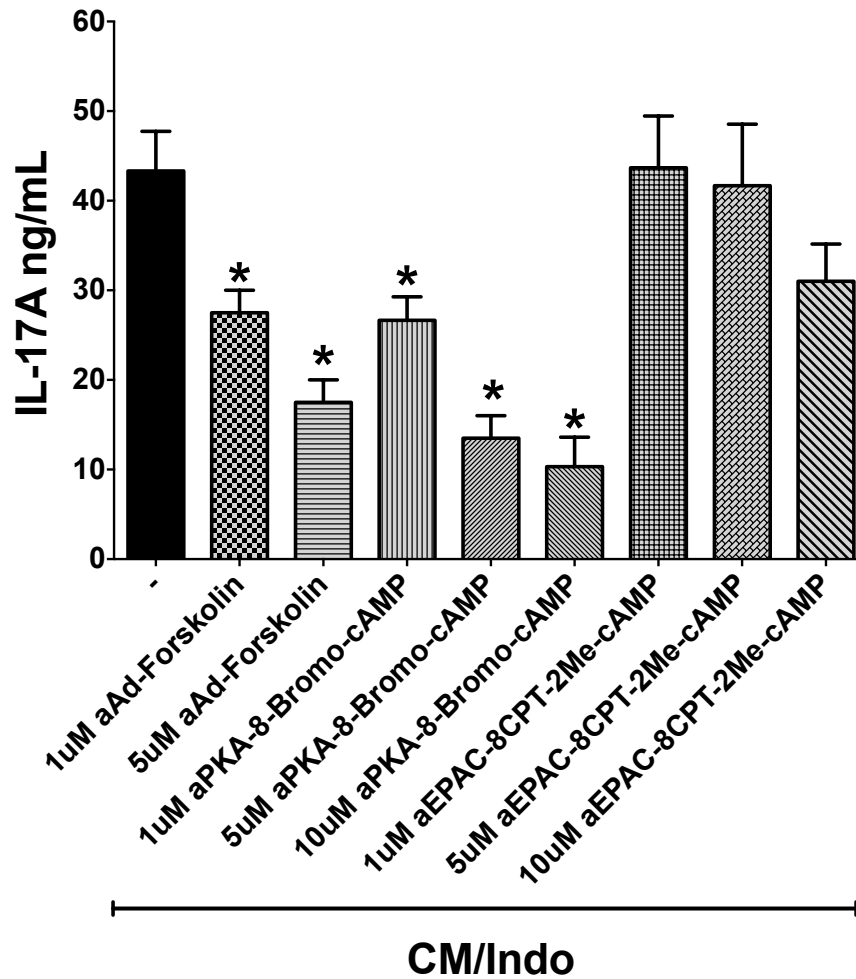


Fig. 27. A ativação de adenilato ciclase ou PKA inibem a diferenciação de Th17 na presença de CM/Indo. Os linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de CM/Indo; CM/Indo com 1 ou 5µM de ativador de Adenilato de ciclase Forskolin, 1, 5 ou 10 µM de ativador de PKA 8-Bromo-cAMP ou ativador de EPAC 8CPT-2Me-cAMP. Após 4 d de cultura o sobrenadante foi coletado e os níveis de IL-17A foram quantificados por ELISA. Os resultados equivalem a média ± SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs CM/Indo.

O uso de inibidores de Adenilato ciclase (SQ22536), PKA (H89 e KT520) e EPAC (ESI-09) também foram utilizados, porém não foram observadas diferenças nos níveis de IL-17A detectados por ELISA (dados não demonstrados). Por outro lado, a análise por citometria de fluxo demonstrou que a presença de inibidores de Adenilato ciclase e PKA aumentaram a porcentagem de expressão da IL-17A nos linfócitos diferenciados na presença de CM (Fig. 28).

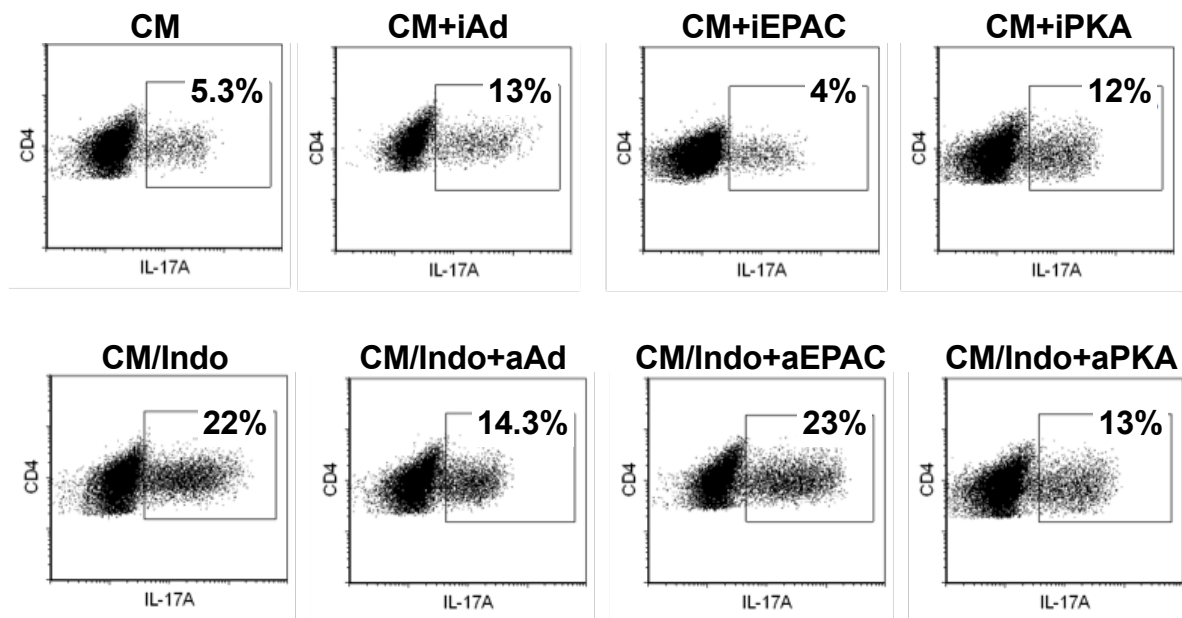


Fig. 28. PGE₂ via EP4-cAMP-PKA inibe a diferenciação de Th17 na presença de CM. Os linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de CM apenas, ou CM com 5µM de inibidor de adenilato ciclase SQ22536 (CM+iAd); inibidor de EPAC ESI-09 (CM+iEPAC) ou inibidor de PKA H89 (CM+iPKA). Ou ainda, na presença de CM/Indo; CM/Indo com 5µM de ativador de adenilato de ciclase Forskolin (CM/Indo+aAd), ativador de EPAC 8-CPT-2Me-cAMP (CM/Indo+aEPAC) ou ativador de PKA 8-Bromo-cAMP (CM+aPKA). Após 4 d de cultura as células foram ativadas com PMA e Ionomicina na presença de Brefeldina A e posteriormente fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-CD4-PE e anti-IL-17A-PECy7. A porcentagem de células positivas para IL-17A foi determinada a partir de pré-gate na população de linfócitos CD4⁺ vivos. Os *dotplots* são de 1 experimento.

PGE₂ via EP4 modula negativamente a expressão do receptor de IL-1 β em linfócitos Th, no contexto da fagocitose de IACs

Nesta etapa foi investigado se os genes relacionados à diferenciação de células Th17 poderiam ser regulados pela PGE₂ proveniente da fagocitose de IACs. Assim, a expressão de 84 genes de linfócitos Th foi avaliada por PCR *Array* em linfócitos diferenciados na presença de CM, CM/Indo ou CM/Ibup. A expressão de 21 genes foi positivamente regulada em linfócitos diferenciados com CM/Indo, comparado aqueles diferenciados com CM (Fig. 29b e Anexo 2). Os genes *il17f*, *il17a*, *illr*, *ccl2* e *ccl7* apresentaram uma modulação positiva superior a 4x em linfócitos Th diferenciados nas condições CM/Indo e CM/Ibup, quando comparados a condição CM (Fig. 29a, b, d). Além disso, não foram encontradas diferenças entre CM/Indo e CM/Ibup (Fig. 29d).

Os genes que se apresentaram positivamente regulados nas condições CM/Indo e CM/Ibup, comparado ao CM, foram validados isoladamente por qPCR convencional, como demonstrado na Fig. 30.

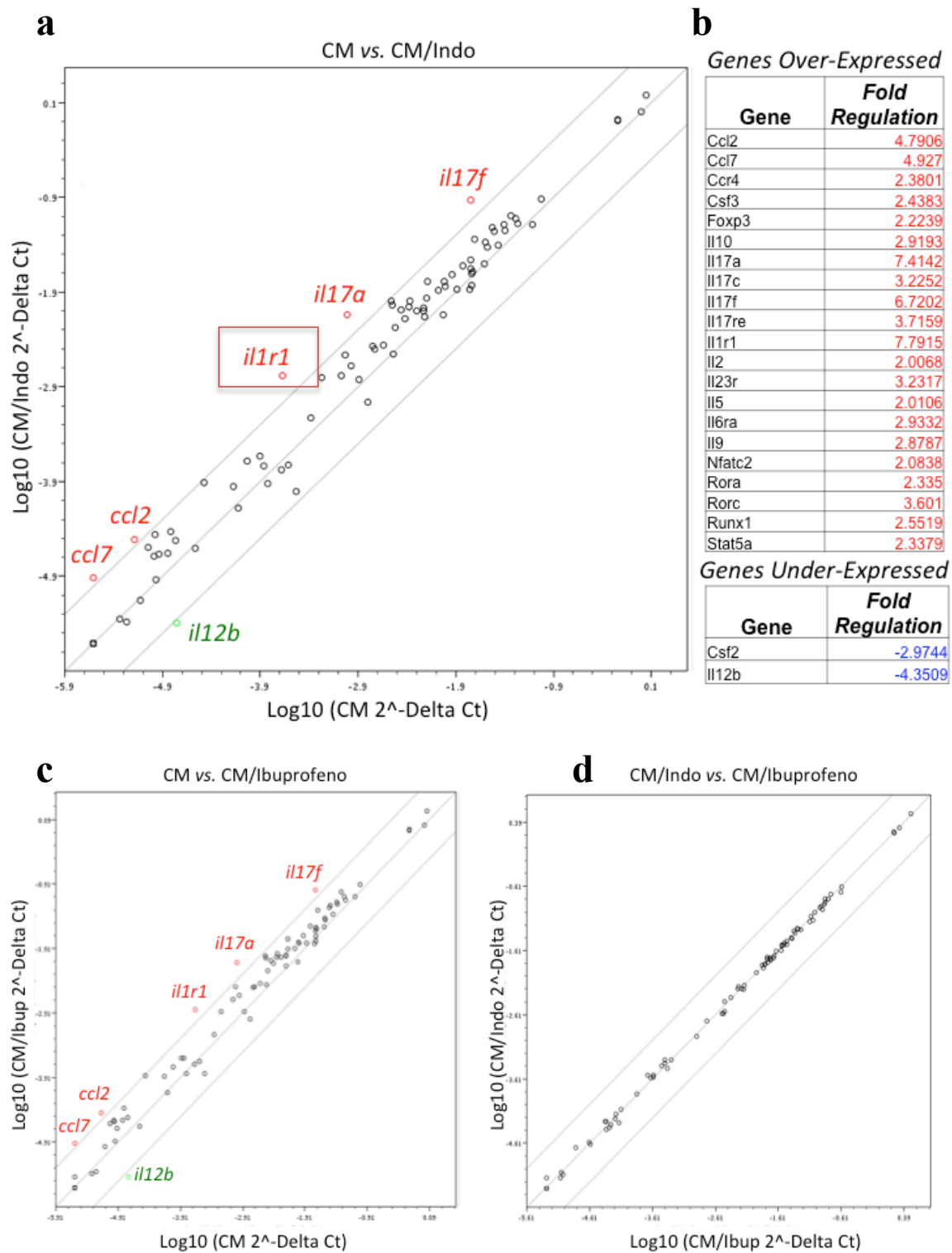


Fig. 29. A produção de PGE_2 durante a fagocitose de IACs modula negativamente a expressão de genes relacionados a Th17. Os linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de CM; CM/Indo ou CM/Ibup. Após 48 h, as células foram coletadas para a análise da expressão gênica por PCR Array (*Th17 Response*, Qiagen). Genes modulados

positivamente (vermelho) ou negativamente (verde) foram comparados entre as condições CM vs CM/Indo (a, b); CM vs CM/Ibup (c) e CM/Indo vs CM/Ibup (d). Os genes modulados na comparação entre CM vs CM/Indo estão representados na tabela com os respectivos valores de *Fold change* (b). Análise e gráficos de expressão foram realizados por meio de ferramenta *on line* disponibilizada pelo fabricante do *Array* (Qiagen).

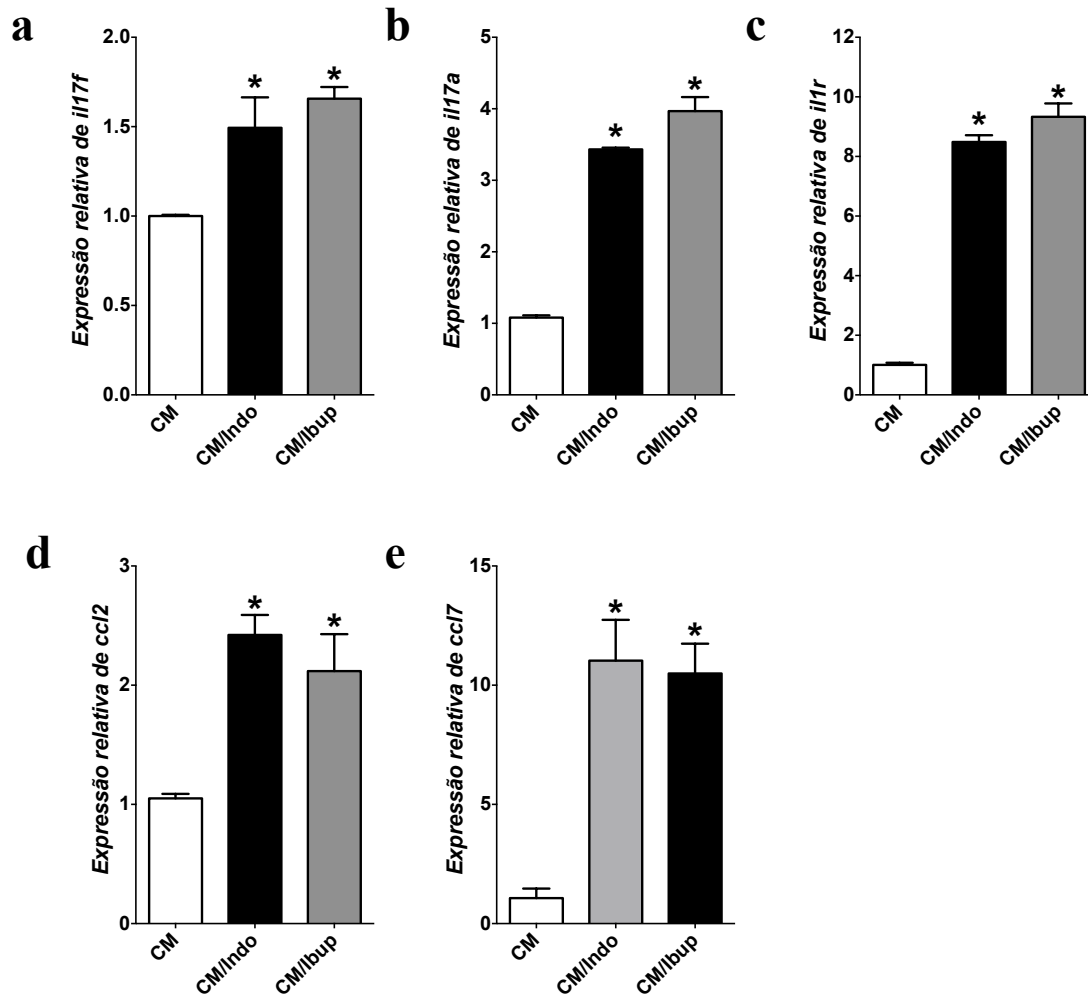


Fig. 30. Validação da expressão dos principais genes modulados por PGE₂ identificados pelo PCR Array. Os linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de CM; CM/Indo ou CM/Ibup. Após 48 h, as células foram coletadas para a análise da expressão gênica por qPCR. A expressão de *il17f* (a); *il17a* (b); *il1r* (c); *ccl2* (d) e *ccl7* (e) foram determinadas pela expressão relativa ao gene endógeno *gapdh*. Os resultados estão representados como média ± SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs CM.

Considerando que a expressão do receptor de IL-1 β , durante o processo de diferenciação de Th17, é fundamental para a efetiva diferenciação deste subtipo celular, foi investigado se a PGE₂, por meio de sinalização intracelular via ativação de EP4, controlaria a inibição da expressão do receptor de IL-1 β (IL-1R) e ainda, quão importante seria a sinalização de IL-1R na diferenciação de linfócitos Th17, no contexto da eferocitose de células infectadas.

A expressão do mRNA do IL-1R foi aumentada em linfócitos Th diferenciados na presença de CM com antagonista de EP4, assim como a expressão foi reduzida na presença de CM/Indo com agonista de EP4 (Fig. 31b). Paralelamente, a expressão de *il17a* seguiu o mesmo padrão da expressão de *il1r*, ou seja, a expressão de ambos os genes foi restaurada pelo tratamento dos linfócitos com antagonista de EP4, na condição CM ou inibida pelo agonista de EP4, na condição CM/Indo (Fig. 31a).

Ainda, a ativação de Adenilato ciclase ou PKA em linfócitos diferenciados na presença de CM/Indo resultou na diminuição da expressão de *il17a* e *il1r*, sugerindo que o eixo PGE₂-EP4-cAMP-PKA controla a expressão do receptor de IL-1 β e, conseqüentemente, afeta a diferenciação em Th17 (Fig. 31c, d).

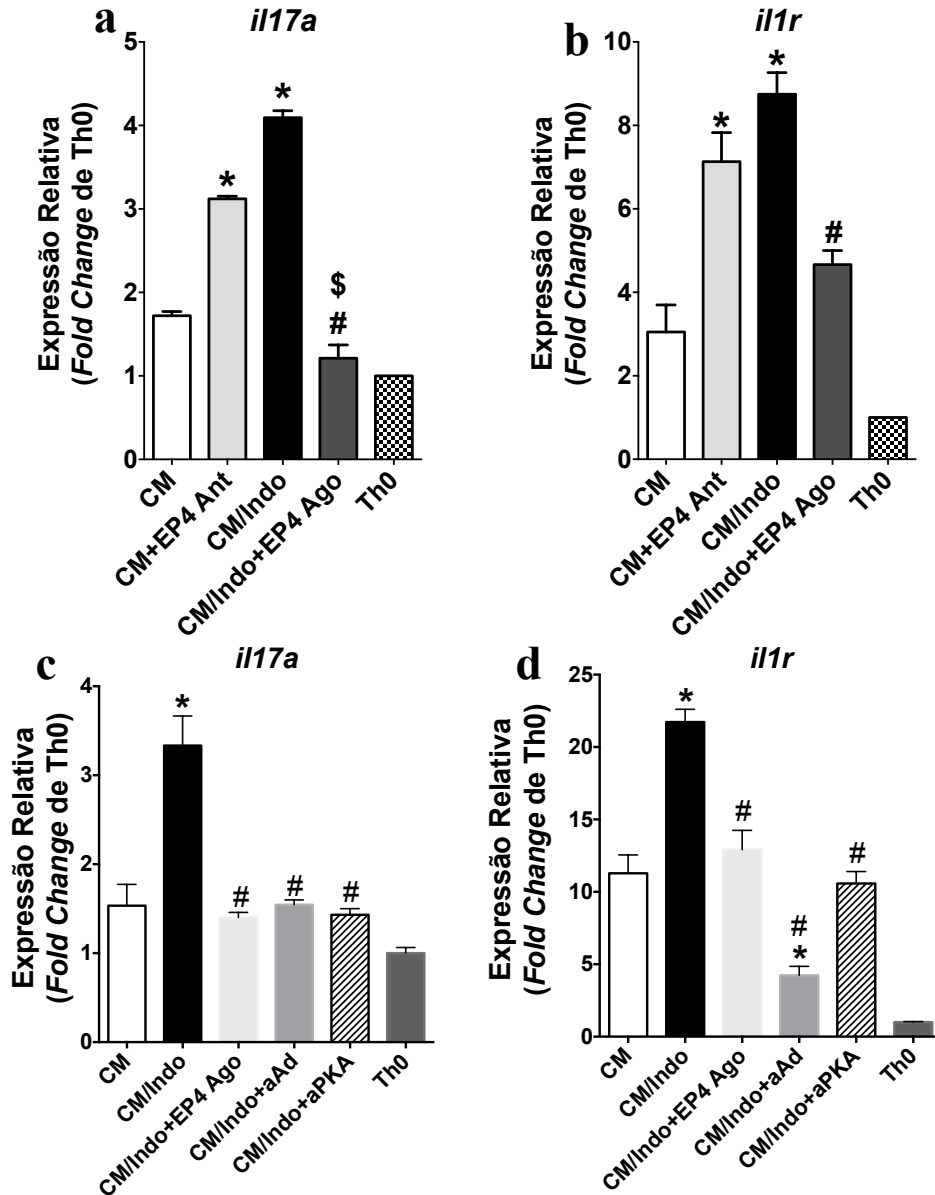


Fig. 31. PGE₂, via EP4-cAMP-PKA, modula negativamente a expressão de *il17a* e *il1r* em linfócitos Th diferenciados na presença de CM. Os linfócitos Th *naive* foram cultivados com anti-CD3 e anti-CD28 na presença de CM; CM com antagonista de EP4 (CM+EP4 Ant); CM/Indo ou CM/Indo com agonista de EP4 (CM/Indo+EP4 Ago), ativador de Ad (CM/Indo+aAd) ou ativador de PKA (CM/Indo+aPKA). Após 24 h (**a**, **b**, **c**) ou 48 h (**d**), as células foram coletadas para a análise da expressão de *il17a* (**a**, **c**) e *il1r* (**b**, **d**) por qPCR. A expressão relativa foi determinada pelo *fold change* da expressão nos linfócitos Th diferenciados comparado com os linfócitos Th *naive*. Os resultados estão representados como média ± SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs CM. # $p < 0.05$ vs CM/Indo. \$ $p < 0.05$ vs CM+EP4 Ant.

Adicionalmente, para comprovar que a PGE₂, produzida durante a fagocitose de IACs, poderia exercer suas funções supressoras na diferenciação de Th17 via inibição da expressão do receptor de IL-1 β , foram utilizados anticorpos bloqueadores de IL-1 β (anti-IL-1 β), assim como o antagonista do receptor de IL-1 β (IL-1Ra). A presença do antagonista de EP4 foi capaz de restaurar a deficiência na diferenciação de Th17 na presença do CM (Fig. 32 e 34). Entretanto, a adição de anticorpos neutralizantes de IL-1 β ou do IL-1Ra na condição CM, mesmo na presença do antagonista de EP4, impediu a diferenciação de Th17. Estes dados sugerem que a expressão do IL-1R, bem como a sinalização dependente de sua ativação, estariam envolvidos na diferenciação destas células (Fig. 32 e Fig. 34). Corroborando com estes dados, a diferenciação de Th17 na presença de CM/Indo, contendo baixas concentrações de PGE₂, foi comprometida quando anticorpos anti-IL-1 β ou antagonista do IL-1R foram adicionados à cultura de linfócitos (Fig. 33 e Fig. 34). Ou seja, a ausência da sinalização via IL-1R, devido a inibição da expressão deste receptor por PGE₂, leva a uma drástica supressão da diferenciação de linfócitos Th *naive* em Th17, no contexto de fagocitose de células infectadas (Fig. 32 - 34).

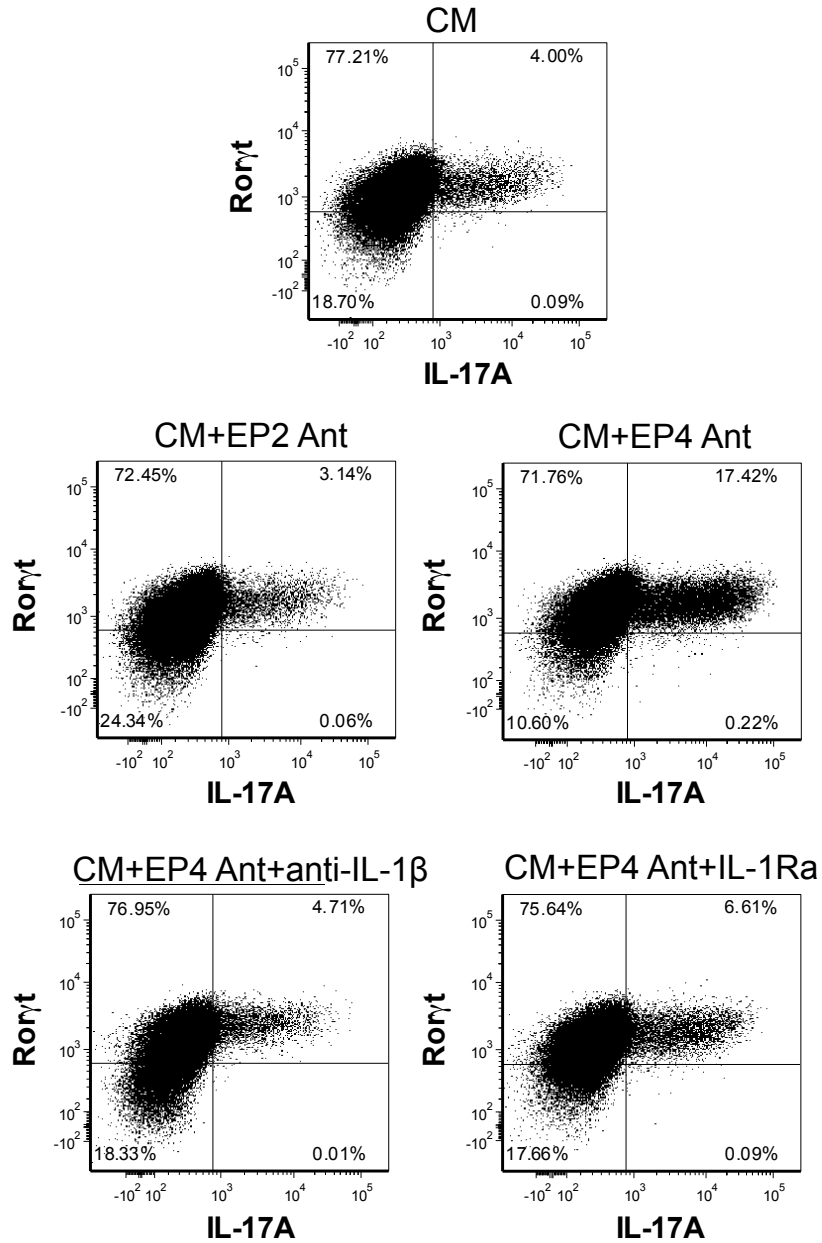


Fig. 32. PGE₂, via EP4, inibe a expressão do IL-1R e impede a diferenciação de linfócitos Th17 no contexto de eferocitose de células infectadas. Os linfócitos Th *naïve* foram diferenciados na presença de CM, CM com antagonista de EP2 (CM+EP2 Ant); antagonista de EP4 (CM+EP4 Ant) ou antagonista de EP4 com anti-IL-1β (CM+EP4 Ant+anti-IL-1β), ou antagonista de EP4 e do receptor de IL-1β (CM+EP4 Ant+IL-1Ra). Após 4 d de cultura as células foram marcadas com anti-CD4-PE, Rorγt-PerCPCy5.5 e anti-IL-17A-PECy7. A porcentagem de células positivas para IL-17A foi determinada a partir de pré-gate na população de linfócitos CD4⁺. Os *dotplots* são representativos de 3 experimento independentes.

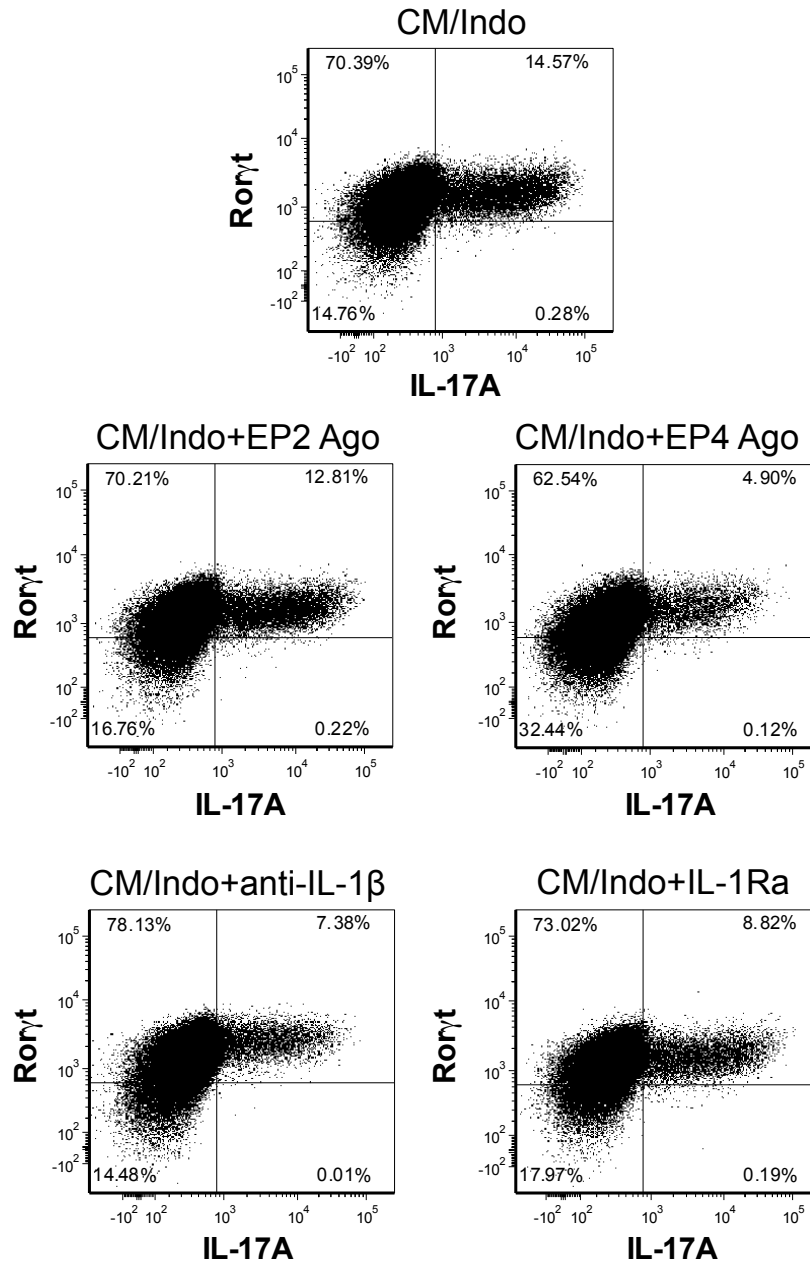


Fig. 33. A diferenciação de linfócitos Th17 no contexto de eferocitose de células infectadas depende da sinalização do IL-1R. Os linfócitos Th *naïve* foram diferenciados na presença de CM/Indo, CM/Indo com antagonista de EP2 (CM/Indo+EP2 Ant); antagonista de EP4 (CM/Indo+EP4 Ant) ou anti-IL-1β (CM/Indo+anti-IL-1β), ou antagonista do receptor de IL-1β (CM/Indo+IL-1Ra). Após 4 d de cultura as células foram marcadas com anti-CD4-PE, Rorγt-PerCPCy5.5 e anti-IL-17A-PECy7. A porcentagem de células positivas para IL-17A foi determinada a partir de pré-*gate* na população de linfócitos CD4⁺. *Dotplots* representativos de 3 experimento independentes.

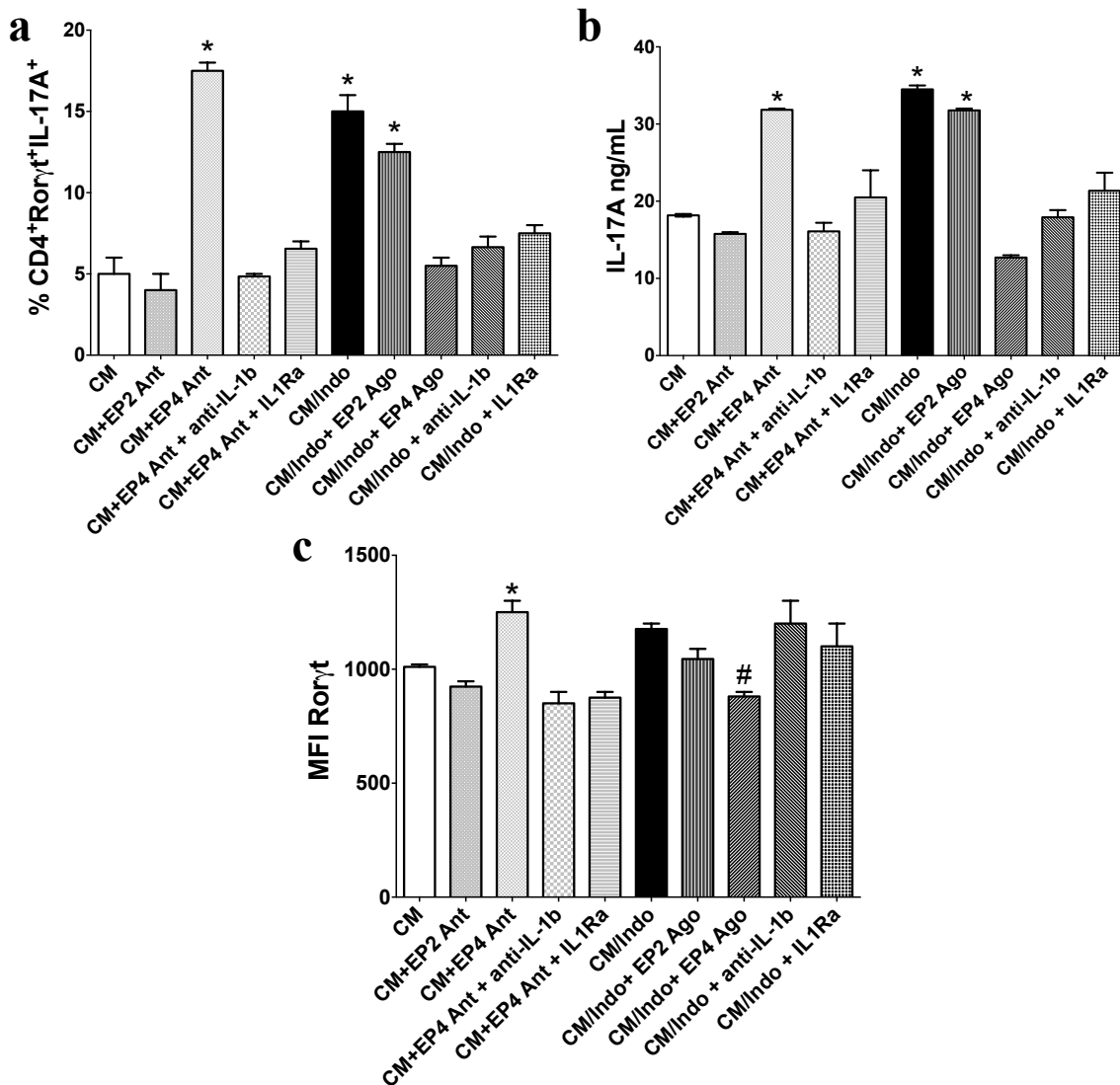


Fig. 34. A sinalização do IL-1R é essencial para a diferenciação de Th17, no contexto da eferocitose de células infectadas. Os linfócitos Th *naive* foram diferenciados na presença de CM, CM com antagonista de EP2 (CM+EP2 Ant); antagonista de EP4 (CM+EP4 Ant) ou antagonista de EP4 com anti-IL-1 β (CM+EP4 Ant+anti-IL-1 β), ou antagonista de EP4 e do receptor de IL-1 β (CM+EP4 Ant+IL-1Ra) ou, ainda com CM/Indo, CM/Indo com antagonista de EP2 (CM/Indo+EP2 Ant); antagonista de EP4 (CM/Indo+EP4 Ant) ou anti-IL-1 β (CM/Indo+anti-IL-1 β), ou antagonista do receptor de IL-1 β (CM/Indo+IL-1Ra). Após 4 d a porcentagem de células positivas para IL-17A e Ror γ t foi determinada por citometria de fluxo na população de linfócitos CD4⁺ (a). A IL-17A foi quantificada por ELISA no sobrenadante dos linfócitos (b). A mediana da intensidade de fluorescência da expressão de Ror γ t foi avaliada por citometria de fluxo (c). Os resultados estão representados como média \pm SEM de 3 experimentos independente. N=3. Análise da variância ANOVA, pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ vs as demais condições.

PGE₂ via EP4 compromete a diferenciação de Th17 e a defesa do hospedeiro contra *C. rodentium*

Considerando os achados *in vitro* que demonstram que a fagocitose de IACs controla a diferenciação de Th17 via produção de altos níveis de PGE₂, a próxima etapa foi compreender qual seria a relevância deste fenômeno *in vivo*. Para isto, foi utilizado o modelo de colite infecciosa por *C. rodentium*.

A colite infecciosa causada pela bactéria *C. rodentium* em camundongos mimetiza a infecção por *E. coli* enteropatogênica e enterohemorrágica em humanos (Brereton and Blander 2010). Sabidamente a infecção causada por *C. rodentium* induz elevada apoptose de células do epitélio, que resulta na diferenciação de linfócitos Th17 devido ao microambiente gerado pela eferocitose (Torchinsky, Garaude et al. 2009). A importância das respostas de linfócitos Th17 neste modelo são relacionados a defesa do hospedeiro contra a infecção. Sabe-se que a principal citocina produzida pela Th17, a IL-17A, está envolvida no recrutamento de neutrófilos e na indução da produção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais do intestino. Desta forma, para determinar se a inibição da síntese de PGE₂ ou mesmo o bloqueio da sinalização de EP4 *in vivo* poderiam ter um efeito positivo na diferenciação de Th17, assim como na defesa do hospedeiro contra a infecção, os animais foram infectados com *C. rodentium* e tratados ou não com indometacina ou antagonista de EP4 (L-161,982).

A lâmina própria intestinal, de animais infectados com *C. rodentium* que receberam indometacina ou antagonista de EP4, apresentou um aumento tanto na porcentagem (Fig. 35 e 36a) como no número (Fig. 36c) de linfócitos Th17, quando comparado com o grupo infectado ou os demais grupos experimentais. Em relação aos

linfócitos intraepiteliais, a porcentagem de Th produtores de IL-17A não foi diferente entre os grupos experimentais (Fig. 37 e 38a). Entretanto, o número de linfócitos intraepiteliais $Roryt^+IL-17A^+$ foi significativamente maior nos grupos de animais infectados e tratados com indometacina ou antagonista de EP4, comparado aos demais grupos experimentais (Fig. 38c).

Como esperado, a infecção promoveu aumento nos níveis de PGE_2 , enquanto que o tratamento dos animais com indometacina reduziu significativamente os níveis deste prostanóide no cólon dos animais infectados (Fig. 39a). Embora a porcentagem e o número de linfócitos Th17 estejam aumentados no cólon dos animais infectados e tratados com indometacina ou antagonista de EP4, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IL-17A, IL-22 e IFN- γ nos homogenatos do cólon dos animais pertencentes aos diferentes grupos (Fig. 39b-d). Por outro lado, a expressão do mRNA de IL-17A, no cólon dos animais infectados e tratados com indometacina ou antagonista de EP4, foi significativamente maior comparado aos animais infectados que receberam apenas veículo (Fig. 42g).

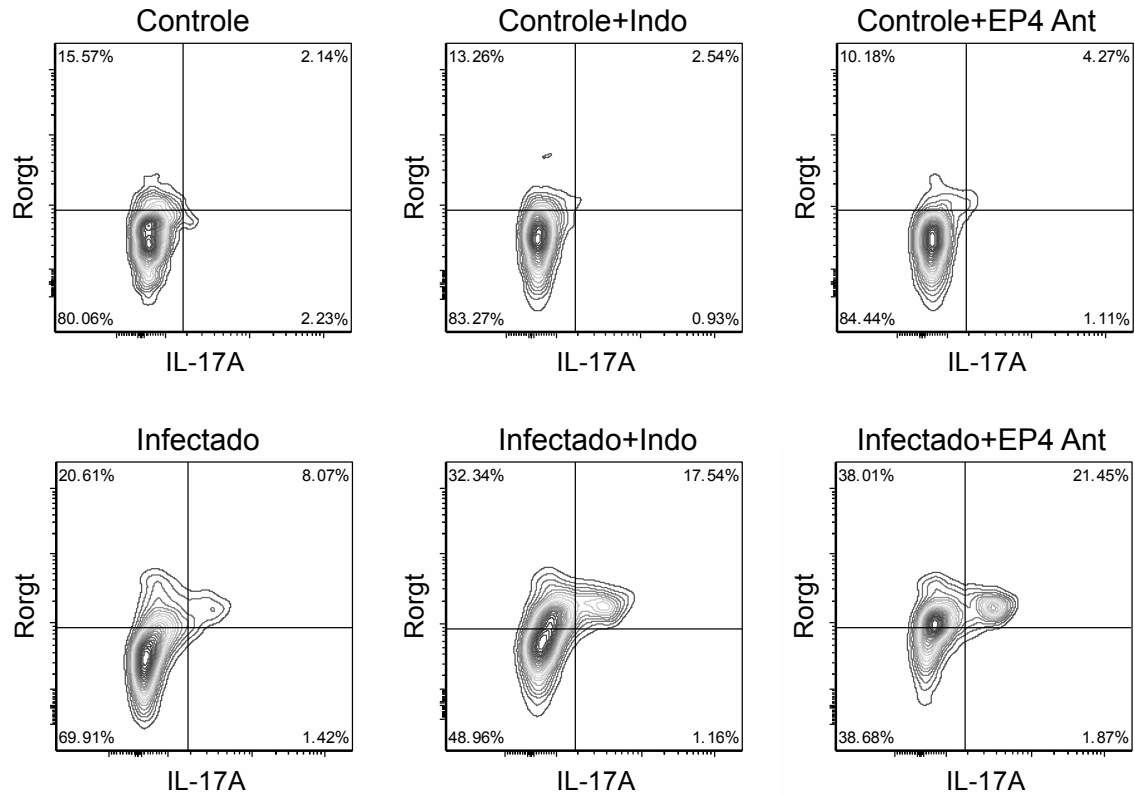


Fig. 35. Os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 aumentam a população de linfócitos Th17 na lâmina própria intestinal de animais infectados. Os animais nos grupos infectados receberam 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Um dia após a infecção os animais nos diferentes grupos foram tratados i.p. com indometacina (5 mg/kg), L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. 8 dias após a infecção, o cólon foi coletado para digestão com colagenase e isolamento dos linfócitos da lâmina própria. Após a digestão, as células isoladas foram estimuladas com PMA, Ionomicina e Brefeldina A e posteriormente fixadas, permeabilizadas e marcadas com corante de viabilidade e anticorpos anti-TCR β -FITC, anti-CD4-PE, anti-Ror γ t-PerCPCy5.5 e anti-IL-17A-PECy7. A porcentagem de células positivas, para IL-17A e Ror γ t, foi determinada a partir de pré-gate na população de linfócitos TCR β^+ CD4 $^+$. Grupos: Controle, não infectado/veículo; Controle+Indo, não infectado/tratado com indometacina; Controle+EP4 Ant, não infectado/tratado com L-161,982; Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Dotplots representativos de 2 experimentos independentes.

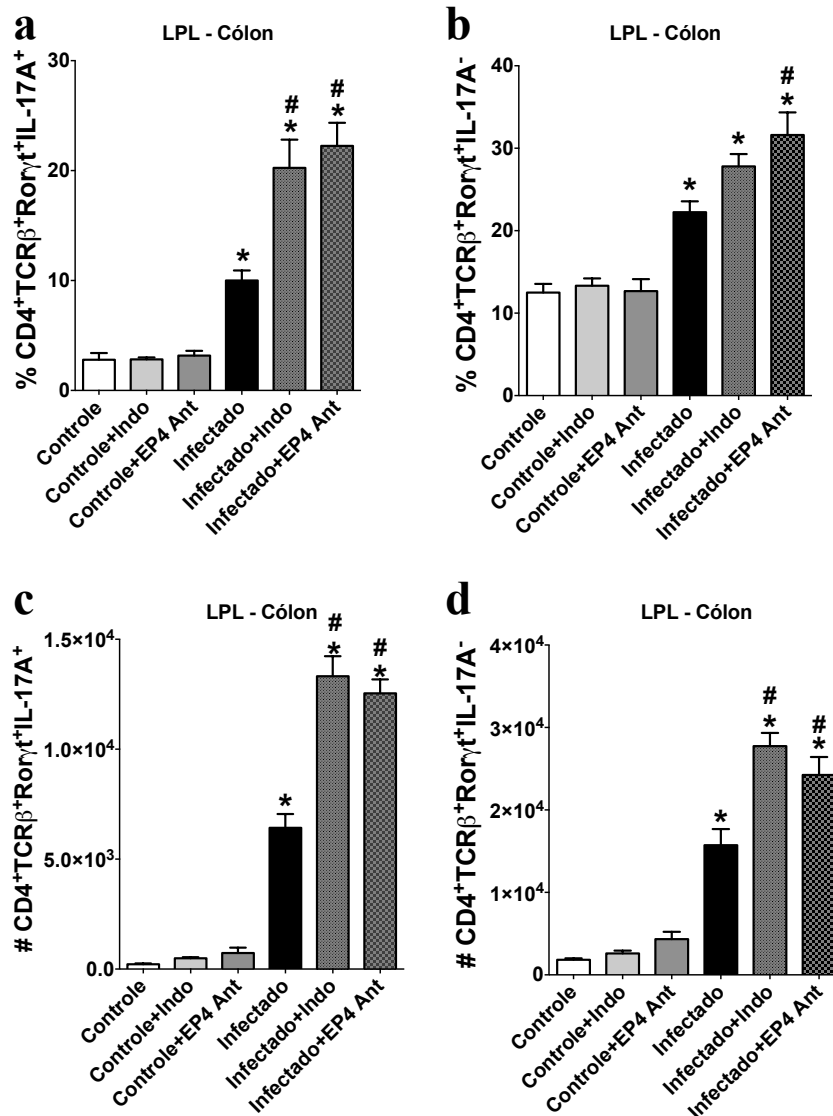


Fig. 36. Os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 favorecem a porcentagem e o número de Th17 no cólon de animais infectados. Os animais foram infectados ou não com *C. rodentium* e tratados i.p. com indometacina (5 mg/kg), L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. 8 dias os LPL foram isolados do cólon. A porcentagem e número de linfócitos positivos para, IL-17A e Rorγt (a, c) ou Rorγt mas IL-17A negativo (b, d) foram determinados a partir de pré-gate na população TCRβ⁺CD4⁺. Grupos: Controle, não infectado/veículo; Controle+Indo, não infectado/tratado com indometacina; Controle+EP4 Ant, não infectado/tratado com L-161,982; Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Os resultados estão representados como média ± SEM de 2 experimentos independente. N=5-7. Análise da variância ANOVA, pós-teste Tukey. * $p < 0.05$ vs controles. # $p < 0.05$ vs Infectado.

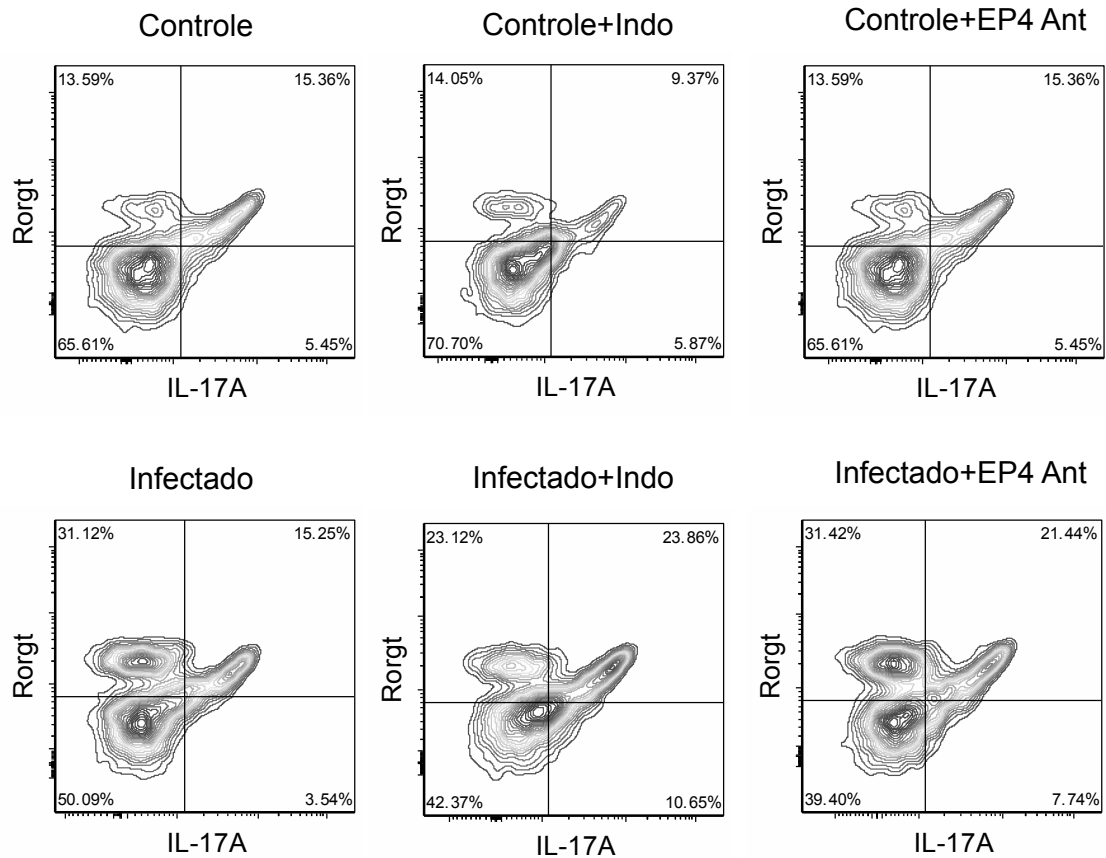


Fig. 37. Os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 não modulam a população de IELs produtores de IL-17A. Os animais foram infectados ou não com *C. rodentium* e um dia após a infecção os animais nos diferentes grupos foram tratados i.p. com indometacina (5 mg/kg), L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. 8 dias após a infecção, o cólon foi coletado para o isolamento dos linfócitos intraepiteliais. Os IEL isolados foram estimulados e marcados para análise da expressão de IL-17A e Rorgt. A porcentagem da expressão foi determinada a partir de pré-gate na população TCR β^+ CD4 $^+$. Grupos: Controle, não infectado/veículo; Controle+Indo, não infectado/tratado com indometacina; Controle+EP4 Ant, não infectado/tratado com L-161,982; Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Dotplots representativos de 2 experimentos independentes.

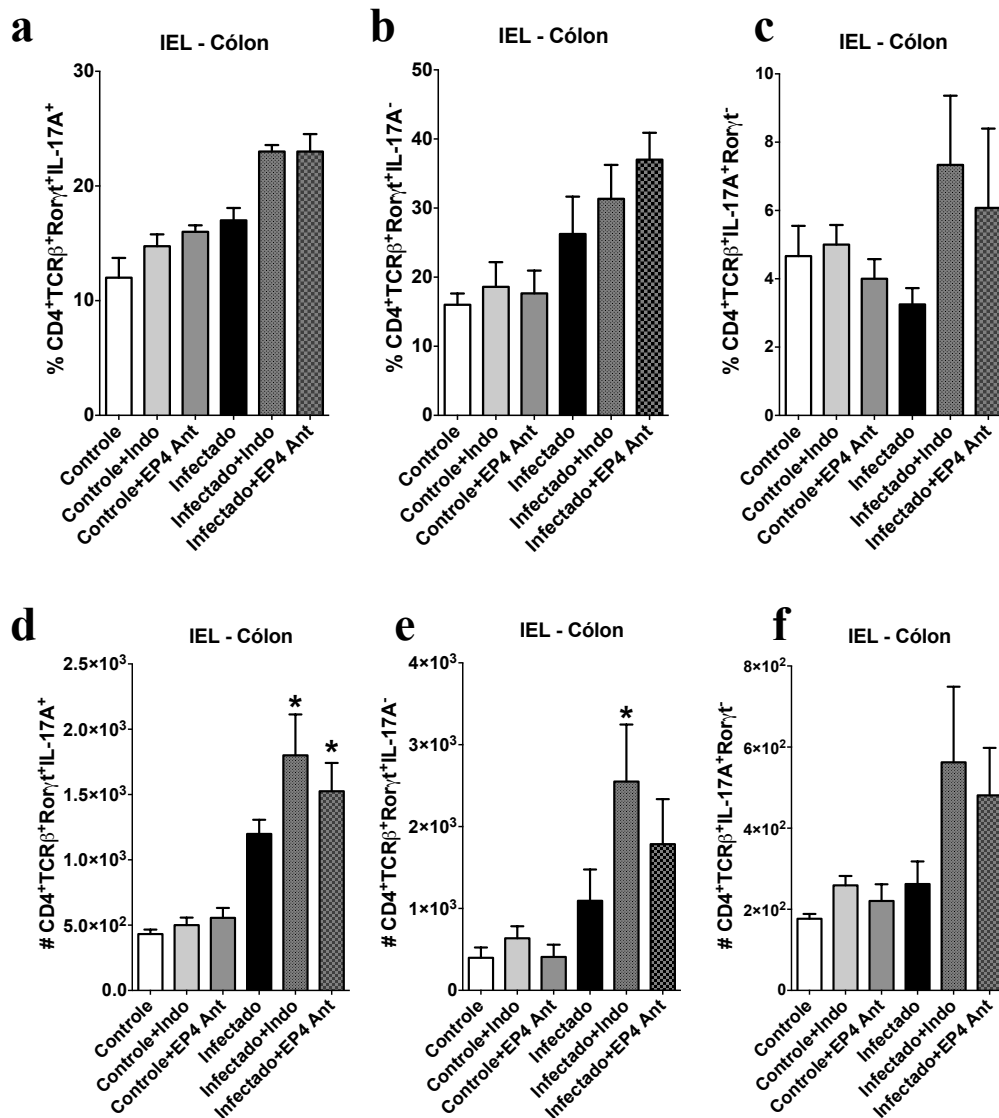


Fig. 38. Os tratamentos com indometacina ou antagonista de EP4 não afetam a porcentagem de linfócitos Th17 entre os IELs. Os animais foram infectados ou não com *C. rodentium* e tratados ou não via i.p. com indometacina (5 mg/kg), L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. 8 dias após a infecção, IEL foram isolados do cólon, estimulados e marcados para análise por citometria de fluxo. Porcentagem e número de linfócitos TCRβ⁺CD4⁺Rorγt⁺IL-17A⁺ (**a, d**); TCRβ⁺CD4⁺Rorγt⁺IL-17A⁻ (**b, e**) e TCRβ⁺CD4⁺Rorγt⁻IL-17A⁺ (**c, f**). Grupos: Controle, não infectado/veículo; Controle+Indo, não infectado/tratado com indometacina; Controle+EP4 Ant, não infectado/tratado com L-161,982; Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Os resultados estão representados como média ± SEM de 2 experimentos independente. N=5. Análise da variância ANOVA, pós-teste Tukey. * $p < 0.05$ vs Controle.

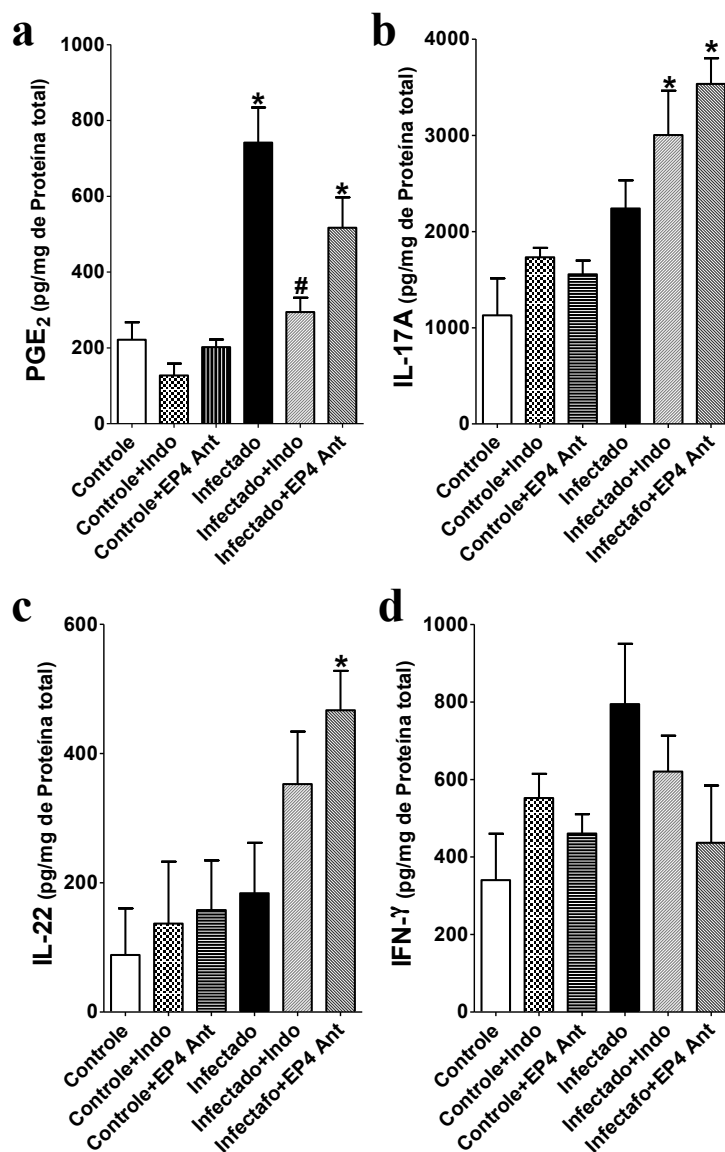


Fig. 39. Quantificação de PGE₂, IL-17A, IL-22 e IFN- γ no cólon dos animais. Os animais foram infectados ou não com *C. rodentium* e tratados i.p. com indometacina (5 mg/kg), L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. Após 8 dias de infecção, PGE₂ (**a**), IL-17A (**b**), IL-22 (**c**) e IFN- γ (**d**) foram quantificadas nas amostras de cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, não infectado/veículo; Controle+Indo, não infectado/tratado com Indometacina; Controle+EP4 Ant, não infectado/tratado com L-161,982; Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 2 experimentos independente. N=5. Análise da variância ANOVA, pós-teste Tukey.* $p < 0.05$ vs Controle, Controle+Indo e Controle+EP4 Ant.. # $p < 0.05$ vs Infectado.

Os tratamentos dos animais não infectados com indometacina ou antagonista de EP4 não causaram alterações no peso (Fig. 40a) ou no comprimento do cólon dos animais não infectados (Fig. 40b), quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, os animais do grupo infectado que receberam apenas veículo apresentaram uma redução no comprimento do cólon, em comparação ao grupo controle (Fig. 40b, c). Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4, por sua vez, preveniram a redução do comprimento do cólon causada pela infecção, sendo este comprimento equivalente aos valores obtidos no cólon de animais do grupo Controle (Fig. 40b, c). Os animais infectados apresentaram uma perda significativa de peso comparado ao grupo controle (Fig. 40a). No entanto, os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4, resultaram em uma menor perda de peso no dia 2 após a infecção, comparado com os animais infectados que receberam apenas veículo (Fig. 40a).

Em relação a carga bacteriana, os tratamentos dos animais infectados, com indometacina ou antagonista de EP4, promoveram uma drástica redução no número de UFC de *C. rodentium* no cólon, quando comparado aos infectados que receberam apenas veículo (Fig. 41a). Entretanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa no número de bactérias recuperadas nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais (Fig. 41b). Desta forma, estes resultados sugerem que o aumento da população de Th17, promovido pelos tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4, podem ter contribuído para a melhora da resposta do hospedeiro contra a infecção, como demonstrado pelo reduzido número de bactérias recuperadas no cólon, assim como a menor perda de peso e encurtamento do cólon, provocados pela infecção.

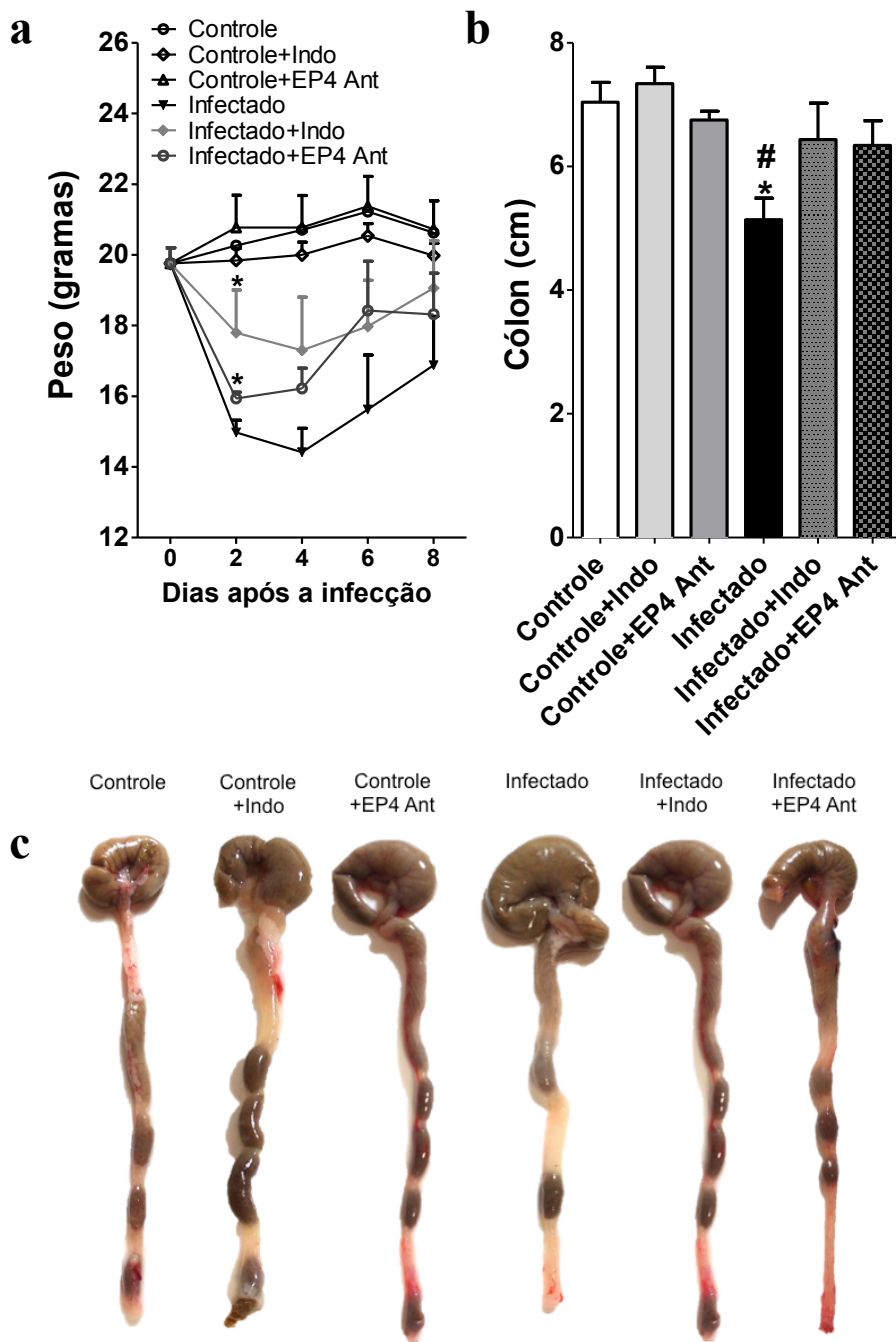


Fig. 40. Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 previnem a perda de peso e o encurtamento do cólon causados pela infecção por *C. rodentium*. Os animais nos grupos infectados receberam 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Um dia após a infecção, os animais nos diferentes grupos foram tratados i.p. com indometacina (5 mg/kg), L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. O peso foi monitorado a cada 2 dias (a). No oitavo dia de infecção, o cólon foi coletado para a determinação do comprimento (b) assim como foi fotografado. Imagem demonstrativa do cólon dos animais nos diferentes grupos experimentais

(c). Grupos: Controle, não infectado/veículo; Controle+Indo, não infectado/tratado com indometacina; Controle+EP4 Ant, não infectado/tratado com L-161,982; Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 2 experimentos independente. N=5-7. Análise da variância ANOVA, pós-teste Tukey.* representa $p < 0.05$ vs grupo Infectado em gráfico a. * representa $p < 0.05$ vs grupo controle e # representa $p < 0.05$ vs grupo Controle+Indo em gráfico b.

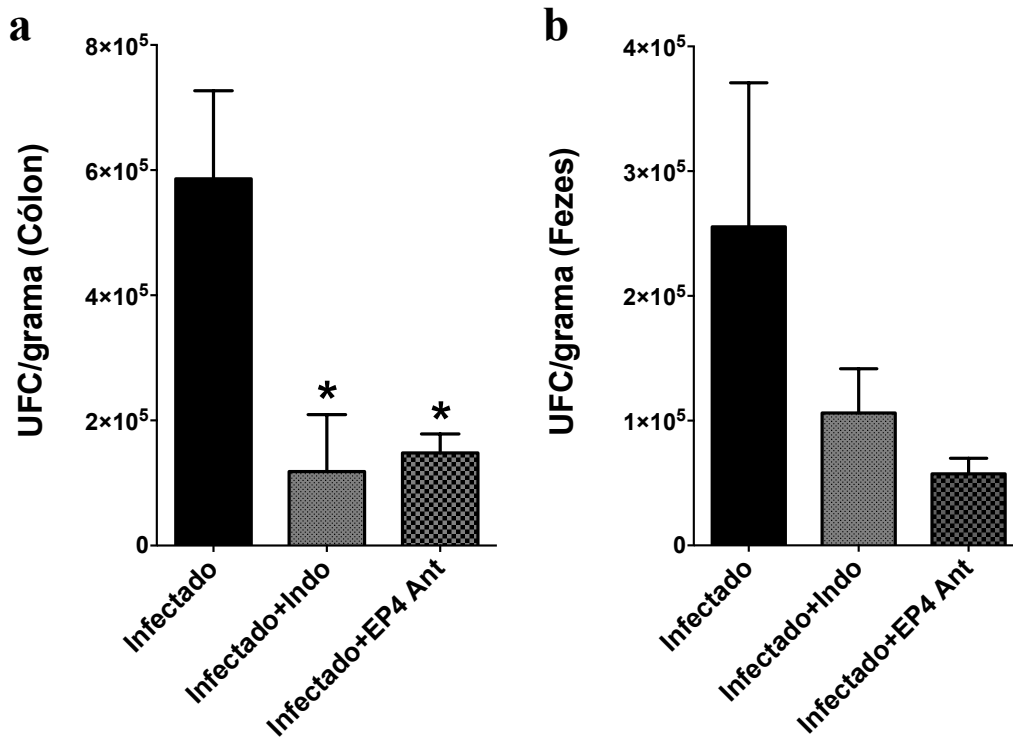


Fig. 41. Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 reduzem o número de bactérias *C. rodentium* no cólon. Os animais receberam 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Um dia após a infecção os animais nos diferentes grupos foram tratados i.p. com indometacina (5 mg/kg), antagonista de EP4 - L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. O número de UFC, no cólon (a) e nas fezes (b), foi avaliado 8 dias após a infecção. Grupos: Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 2 experimentos independente. N=5-7. Análise da variância ANOVA, pós-teste Tukey.* $p < 0.05$ vs grupo Infectado.

Os linfócitos Th17 contribuem na resposta imune da mucosa contra agentes patogênicos devido a produção de citocinas, como IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, que por sua vez induzem a produção de quimiocinas e peptídeos antimicrobianos. Enquanto os receptores de IL-17A são expressos em vários tipos celulares, os receptores de IL-22 são preferencialmente expressos nas células epiteliais. Ainda, a ativação destes receptores está envolvida na secreção de peptídeos antimicrobianos, como defensinas, catelicidinas e lectinas do tipo c, capazes de danificar as membranas celulares de bactérias e favorecer a eliminação dos patógenos (Blaschitz and Raffatellu 2010).

Interessantemente, os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 induziram um aumento na expressão de peptídeos antimicrobianos no cólon destes animais quando comparado aos animais infectados que receberam apenas veículo (Fig. 42). A expressão do mRNA para CRAMP, β -defensina 2 e 3 foi significativamente elevada nos animais infectados e tratados com indometacina ou antagonista de EP4, quando comparado aos animais infectados tratados apenas com veículo (Fig. 42a, c e d). Portanto, o aumento de células Th17, promovidas pelo tratamento dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4, pode estar associada a uma melhor defesa do hospedeiro contra a infecção devido ao aumento da produção de peptídeos antimicrobianos.

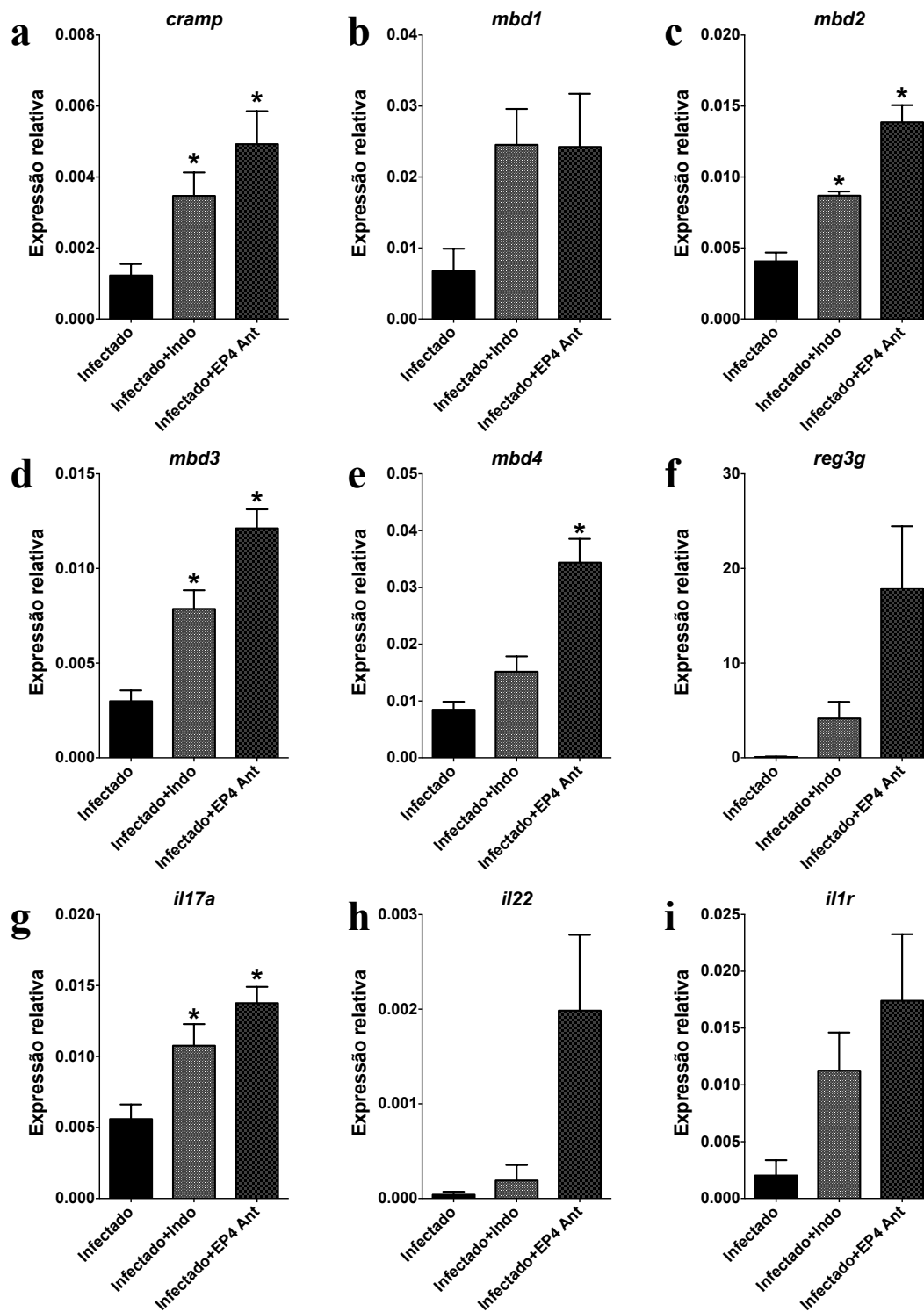


Fig. 42. Os tratamentos dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 aumentam a expressão de peptídeos antimicrobianos. Os animais receberam 2×10^9 UFC de *C. rodentium*. Um dia após a infecção os animais nos diferentes grupos foram tratados i.p. com

indometacina (5 mg/kg), antagonista de EP4 - L-161,982 (10 mg/kg) ou veículo. Após 8 dias de infecção a expressão relativa do mRNA, de CRAMP (*cramp*) **(a)**; β -defensina 1 (*mbd1*) **(b)**; 2 (*mbd2*) **(c)**; 3 (*mbd3*) **(d)**; 4 (*mbd4*) **(e)**; REG3 (*reg3g*) **(f)**; IL-17A (*il17a*) **(g)**; IL-22 (*il22*) **(h)** e IL-1R (*il1r*) **(i)**, foi determinada em relação a expressão do endógeno *gapdh* nas amostras de cólon dos animais dos diferentes grupos experimentais. Grupos: Infectado, infectado/veículo; Infectado+Indo, infectado/tratado com indometacina e Infectado+EP4 Ant, infectado/ tratado com L-161,982. Os resultados estão representados como média \pm SEM de 2 experimentos independente. N=5-7. Análise da variância ANOVA, pós-teste Tukey. * $p < 0.05$ vs grupo Infectado.

Discussão

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a eferocitose de células infectadas com *E. coli*, por DCs, induziu, além das citocinas TGF- β , IL-6 e IL-23, altos níveis de PGE₂ e IL-1 β , os quais foram imprescindíveis na modulação da diferenciação de linfócitos Th17. A PGE₂, via EP4, suprimiu a diferenciação de Th17 de maneira dependente de cAMP e PKA. Ainda, a ativação desta via resultou na redução da expressão do IL-1R nos linfócitos em diferenciação, comprometendo o fenótipo Th17. Adicionalmente, durante a colite infecciosa por *C. rodentium*, a presença de PGE₂ interferiu na geração de linfócitos Th17 e, conseqüentemente, afetou a resposta do hospedeiro contra a infecção. Por outro lado, os tratamentos dos animais com indometacina ou antagonista de EP4 levaram a um aumento na população de células Th17 e na expressão de peptídeos antimicrobianos, resultando na redução da carga bacteriana no cólon dos animais infectados.

A fagocitose de células apoptóticas por fagócitos vem sendo descrita como capaz de modular diferentes células do sistema imune, resultando tanto na supressão como na ativação destas células (Devitt and Marshall 2011). A fagocitose de células apoptóticas estéreis por DCs ou mesmo por macrófagos leva a síntese de mediadores anti-inflamatórios como TGF- β , PAF e PGE₂ (Fadok, Bratton et al. 1998, Medeiros, Serezani et al. 2009). Os resultados aqui apresentados demonstraram que a eferocitose de células infectadas com *E. coli*, por DCs, promoveu não apenas a síntese de TGF- β , IL-6 e IL-23, mas também altos níveis de IL-1 β e um expressivo aumento da expressão de COX-2, assim como da produção de PGE₂.

A IL-1 β está envolvida em diversos eventos inflamatórios, bem como na indução de células Th17 (Ikeda, Saijo et al. 2014). Ao contrário de outras citocinas pró-inflamatórias, a liberação da forma ativa da IL-1 β depende da clivagem de seu precursor via caspase-1 ou serina proteases (Netea, van de Veerdonk et al. 2015). Para que ocorra a produção de IL-1 β , é necessário a ativação de dois sinais. O primeiro sinal induz a expressão de pró-IL-1 β , em parte pela ativação de TLR (Bauernfeind, Horvath et al. 2009) ou mesmo pela sinalização de PGE₂ via EP2 e EP4 (Zoccal, Sorgi et al. 2016). O segundo sinal, por sua vez, pode ser induzido por diversos mecanismos como: efluxo de potássio, formação de ROS, liberação de DNA mitocondrial ou catepsina liberada no citoplasma após desestabilização lisossomal, bem como pelo reconhecimento intracelular de PAMPs e DAMPs, entre outros (Guo, Callaway et al. 2015). Estes estímulos, desencadeados por patógenos ou liberados pelas células do hospedeiro danificadas, ativam a formação do complexo inflamassoma, que resulta na clivagem da pró-caspase-1 em uma forma ativa de caspase-1, que exerce sua função catalítica em pró-IL-1 β , gerando a forma madura desta citocina (Guo, Callaway et al. 2015). Em nosso modelo, o mecanismo pelo qual a eferocitose de células infectadas com *E. coli* poderia induzir os 2 sinais necessários para a produção de IL-1 β ainda é desconhecido. No entanto, considerando que DCs deficientes em TRIF ou MyD88 não induzem a diferenciação de Th17 durante a fagocitose de IACs por DCs (Torchinsky, Garaude et al. 2009), os dados obtidos sugerem que, durante a fagocitose de IACs, ocorre o reconhecimento de componentes bacterianos, possivelmente, via TLR presente em compartimentos intracelulares.

Sabe-se que os TLRs são expressos na membrana plasmática, assim como ao longo da via endocítica. Os diferentes TLRs (1-9) reconhecem distintos PAMPs e a sinalização intracelular destes receptores depende de proteínas adaptadoras como MyD88 e TRIF. TRIF é exclusivo de TLR3, enquanto todos os outros TLRs dependem de MyD88, e TLR4 requer ambos. Embora o TLR4 seja expresso na membrana plasmática, estudos sugerem que este tipo de receptor pode ser internalizado e ativado intracelularmente (Hornef, Normark et al. 2003, Han, Melichar et al. 2014). Além disso, uma possível hipótese é que a ativação do TLR4 induz a expressão de COX-2 e aumento da síntese de PGE₂, a qual agiria sinergicamente com TLR, favorecendo a indução do primeiro sinal via NF-κB e ativação da expressão de *il1b e nlrp3*. Além disso, em relação ao 2º sinal ainda é desconhecido se a fagocitose de IACs poderia induzir ROS ou liberação de catepsina, as quais ativariam o inflamassoma. No entanto, vale ressaltar que nas condições experimentais *in vitro*, durante a co-cultura de DCs com IACs, exista a presença de IACs extracelulares, ou seja, que não foram eferocitadas. Estas células poderiam progredir para um estágio de necrose com liberação de componentes intracelulares, como DAMPs, os quais poderiam também ativar o inflamassoma em DCs.

Além da produção de IL-1β, a eferocitose de células infectadas com *E. coli*, por DCs, resultou na produção de ao menos 10x mais PGE₂ comparado aos níveis obtidos na condição de fagocitose de ACs estéreis. A elevada produção de PGE₂ pode estar relacionada ao reconhecimento de componentes bacterianos, como o LPS, por TLR4, uma vez que a expressão de COX-2 é aumentada pela sinalização deste tipo de TLR (Fukata, Chen et al. 2006, Kuper, Beck et al. 2012). A eferocitose por DCs, em condições estéreis, leva a diferenciação de Treg, enquanto que a eferocitose de células infectadas

com *E. coli* promove a síntese de citocinas indutoras de células Th17 (Torchinsky, Garaude et al. 2009). Entretanto, até o momento, nada se tinha descrito quanto ao envolvimento da PGE₂ na diferenciação de linfócitos Th17 durante a fagocitose de IACs.

A participação da PGE₂ na diferenciação de Th17, *in vitro* ou em modelos experimentais *in vivo*, é bastante controversa na literatura. Alguns estudos demonstram uma atuação facilitadora da PGE₂ na expansão de células Th17 (Boniface, Bak-Jensen et al. 2009, Napolitani, Acosta-Rodriguez et al. 2009, Yao, Sakata et al. 2009), enquanto outros demonstram um efeito supressor nesta sub-população (Chen, Qin et al. 2009, Duffy, Pindjakova et al. 2011, Valdez, Vithayathil et al. 2012). Por exemplo, Valdez e cols. (2012) demonstraram que a PGE₂ inibe a expressão de IL-17A em linfócitos Th *naive* ativados *in vitro* com IL-6 e TGF- β . Ainda, foi demonstrado que a produção de PGE₂ por células tronco mesenquimais prejudica a diferenciação de linfócitos Th17, sendo este efeito revertido quando EP4 é bloqueado, utilizando-se antagonista específico deste receptor (Duffy et al. 2011). Os resultados aqui apresentados corroboram com estes estudos, relacionando a PGE₂ a uma função supressora na diferenciação de células Th17. Ou seja, a PGE₂ apresenta um efeito inibitório na diferenciação de células Th17, no contexto de fagocitose de células infectadas com *E. coli*.

Por outro lado, a redução da concentração da PGE₂, utilizando-se inibidores de COX, durante a fagocitose de IACs, ou pela remoção deste prostanóide em coluna de afinidade, resultou em um expressivo aumento na diferenciação de linfócitos Th17. Vale ressaltar que o tratamento das DCs com indometacina reduziu, além da síntese de PGE₂, os níveis de citocinas importantes para a diferenciação de Th17, como IL-6, IL-23 e IL-1 β . Este resultado corrobora com dados da literatura que demonstram que a PGE₂ age

autocrina e paracrinamente em DCs, favorecendo a síntese destes mediadores (Hinson, Williams et al. 1996, Park, Kang et al. 2004, Shi, Yin et al. 2015). Entretanto, mesmo com a inibição destas citocinas, sabidamente envolvidas na diferenciação de Th17, a baixa concentração da PGE₂ favoreceu a diferenciação de Th17 nesta condição.

A PGE₂ exerce suas funções efetoras via 4 receptores, EP1, EP2, EP3 e EP4, sendo EP1, EP2 e EP4 expressos em células Th *naive* humanas (Boniface et al. 2009, Napolitani et al. 2009, Yao et al. 2009) e, EP2 e EP4 preferencialmente expressos em linfócitos Th17 (Valdez et al. 2012). Em células T CD4⁺ humanas, foi demonstrado que a indução de ROR γ t, durante a diferenciação em Th17, age inibindo a expressão de EP2, entretanto não afeta a expressão de EP4 nestes linfócitos (Kofler, Marson et al. 2014). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com dados da literatura, visto que a expressão de EP4 foi majoritária em linfócitos Th17 diferenciados, quando comparado aos demais receptores de PGE₂.

Sabe-se que os receptores EP2 e EP4 sinalizam via adenilato ciclase e aumento de cAMP, resultando na ativação de proteínas efetoras, como a PKA e EPAC (Aronoff, Canetti et al. 2005). Os resultados aqui apresentados demonstram que a PGE₂ atua exclusivamente via EP4, suprimindo a diferenciação de células Th17, enquanto que o antagonista de EP2 não interferiu na diferenciação de células Th17, no contexto da eferocitose. Desta forma, mediante aos resultados obtidos sugere-se que o efeito inibitório da diferenciação de Th17 ocorre preferencialmente via EP4, em parte, pelo fato deste ser o receptor de PGE₂ predominantemente expresso nos linfócitos Th durante o processo de diferenciação em Th17.

Quando investigado os possíveis genes relacionados à diferenciação de células Th17, que poderiam ser regulados pela PGE₂ proveniente da fagocitose de IACs, foi observado que a baixa concentração de PGE₂, devido ao tratamento com inibidores de COX, resultou no aumento da expressão de *il17a* e *il17f*. Além disso, interessante, a reduzida concentração de PGE₂ favoreceu um expressivo aumento na expressão do gene que codifica o receptor da IL-1. Para a expressão deste receptor, a STAT-3 é um dos fatores de transcrição imprescindíveis, uma vez que células T CD4⁺ deficientes de STAT-3 apresentaram uma drástica redução da expressão do IL-1R (Chung, Chang et al. 2009). A sinalização do IL-1R inibe a expressão de Foxp3 induzida por TGF-β (Ikeda, Saijo et al. 2014) e aumenta a expressão de IRF4 e RORγt (Chung, Chang et al. 2009), facilitando a expressão de IL-17A. Ainda, a IL-1β pode induzir um perfil mais patogênico de células Th17, ao reduzir a expressão de IL-10 e favorecer a expressão de IFN-γ (Koenders, Devesa et al. 2008, Zielinski, Mele et al. 2012). Corroborando com dados da literatura, os resultados aqui apresentados demonstram que a inibição da sinalização do IL-1R, por neutralização de IL-1β ou uso do IL-1Ra, comprometeu a diferenciação em Th17, comprovando que a expressão do IL-1R é funcionalmente importante para a diferenciação de Th17, no contexto da eferocitose de células infectadas.

Além disso, os resultados apresentados demonstram que a PGE₂ atua exclusivamente via EP4-cAMP-PKA e inibe a diferenciação de células Th17, no contexto de eferocitose de células infectadas. Sabe-se que PGE₂ via ativação de PKA, age sinergicamente à sinalização de IL-10 e aumenta a expressão de *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) em células de linhagem monocítica humana (THP-1). Por sua vez, a expressão de SOCS3 inibe sinais intracelulares dependentes da fosforilação e ativação de

STAT-3 e favorece a expressão do receptor antagonista de IL-1 β (Cheon, Rho et al. 2006). Ainda, tem sido demonstrado, em células de linhagens tumorais, que a ativação de PKA ou EPAC inibe a fosforilação de STAT-3, atenuando, por exemplo, a sinalização de IL-6, ao passo que aumenta a expressão de SOCS-3 nestas células (Song, Li et al. 2001, Naviglio, Di Gesto et al. 2010, Piao, Park et al. 2014). Embora este estudo não tenha desvendado o mecanismo pelo qual o eixo EP4-cAMP-PKA inibe a expressão do IL-1R no contexto da fagocitose de IACs, uma das possíveis vias de sinalização propostas neste estudo seria que a PGE₂ aumentaria a expressão de SOCS-3, a qual impediria a ativação de STAT-3 e por sua vez a expressão do IL-1R. No entanto, futuros estudos são necessários para comprovar o mecanismo pelo qual a PGE₂, via EP4-cAMP-PKA, inibe a expressão do IL-1R em linfócitos Th, no contexto da fagocitose de IACs.

As respostas proeminentes de células Th17 são relacionadas as inflamações crônicas e autoimunidades, tais como artrite reumatóide, psoríase e esclerose múltipla. No entanto, as células Th17 também são importantes na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos, como certos fungos e bactérias extracelulares (Korn et al. 2009). Em relação a bactéria *C. rodentium*, vários trabalhos tem demonstrado que a proteção contra a infecção correlaciona com a produção de IL-17A e IL-22 (Rubino, Geddes et al. 2012, Collins, Keeney et al. 2014). Além das células Th17, outras células como *innate lymphoid cells* (ILCs), $\gamma\delta$ T, NK e NK-T podem produzir IL-17A (Colonna 2009, Takatori, Kanno et al. 2009). Por outro lado, a depleção de células CD3⁺, durante infecção por *C. rodentium*, reduz drasticamente a defesa do hospedeiro e agrava a infecção (Simmons, Clare et al. 2003, Bry and Brenner 2004), demonstrando a relevância dos linfócitos CD3⁺ neste contexto. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a

literatura, visto que, durante a colite infecciosa induzida por *C. rodentium*, há um aumento na porcentagem de células Th17 no colón dos animais infectados comparado aos animais controle. No entanto, o tratamento dos animais infectados com indometacina ou antagonista de EP4 resultou em um expressivo aumento de células Th17, elevada expressão de peptídeos antimicrobianos e redução drástica da carga bacteriana no cólon. A importância da Th17 na defesa do hospedeiro, contra fungos e bactérias, baseia-se principalmente no aumento da granulopoiese e no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. A produção de IL-17A e IL-22, pelas células Th17, também induz a expressão de defensinas e catelicidinas. Ainda, foi demonstrado que a IL-26, também produzida pela Th17, age como um peptídeo antimicrobiano, com capacidade de destruir diferentes bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Meller et al. 2015).

Sabe-se que, além de linfócitos T CD4⁺, outras células imunes e mesmo células de diferentes tecidos também expressam EP4 (Yokoyama, Iwatsubo et al. 2013). Desta forma, a modulação da sinalização deste receptor pode afetar diversas funções celulares. Entretanto, as doses de indometacina ou antagonista de EP4 utilizadas não promoveram redução de peso ou alteração significativa na expressão de IL-17 nos animais não infectados. Por outro lado, os animais infectados e tratados, com indometacina ou antagonista de EP4, apresentaram um evidente aumento da diferenciação de células Th17. Portanto, os resultados *in vivo* corroboram com os resultados obtidos *in vitro*, comprovando o papel supressor da PGE₂ via EP4 na diferenciação de células Th17 e sugerem que o uso de inibidores de COX ou antagonistas de EP4 poderiam ser utilizados para favorecer respostas imunológicas dependentes de linfócitos Th17.

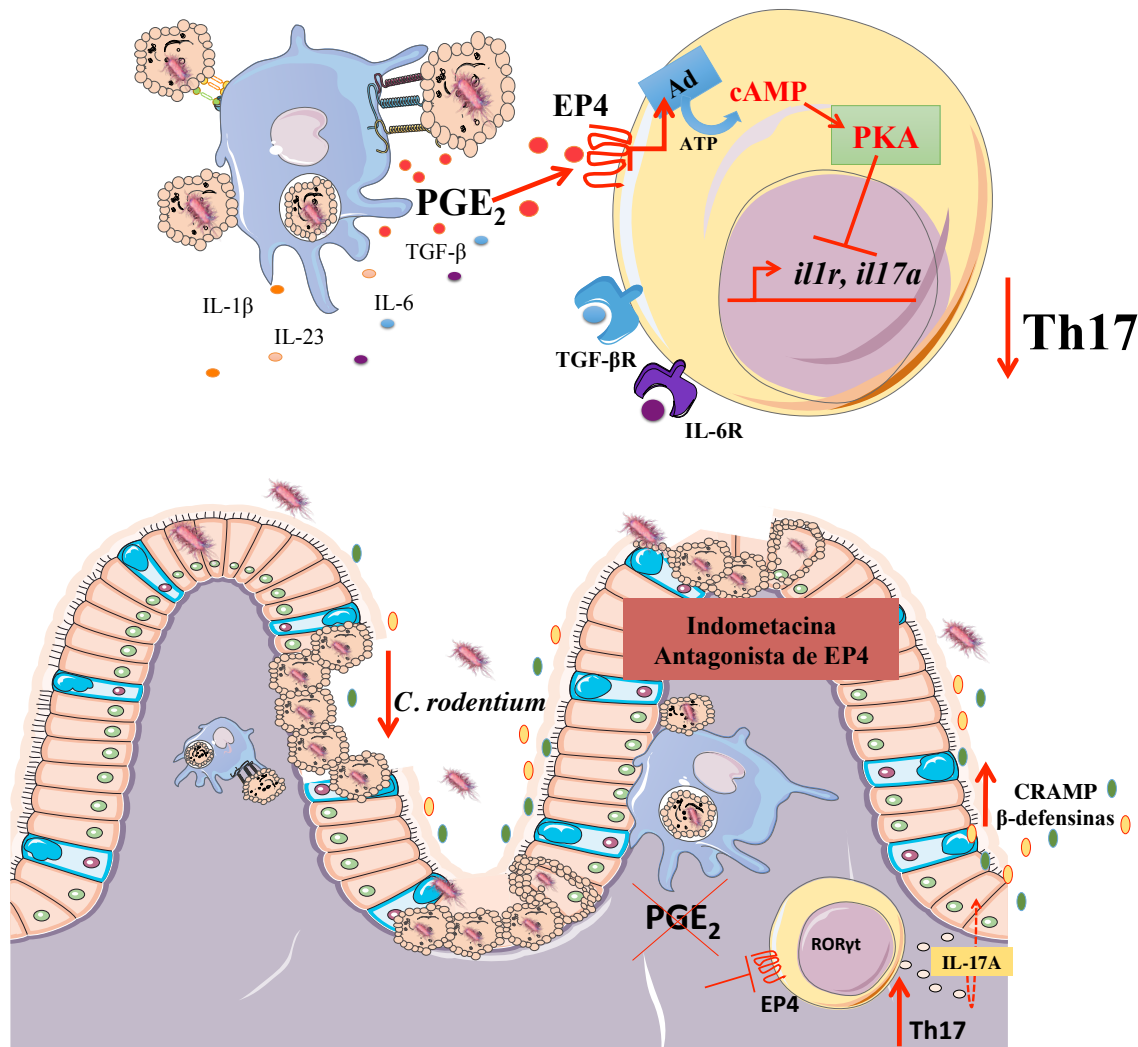
A habilidade de alguns patógenos de induzir a apoptose e, conseqüentemente, favorecer a produção de PGE₂, traz uma intrigante possibilidade destes microrganismos utilizarem esta via para manipular ou suprimir aspectos específicos da resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, a produção de PGE₂ durante a eferocitose de células infectadas também poderia ser uma forma de autocontrole da resposta imune, uma vez que antígenos próprios e não próprios estarão sendo apresentados em um contexto inflamatório, o que poderia ativar clones autorreativos. Desta forma, estudos posteriores serão importantes para a compreensão do impacto dos tratamentos com inibidores de COX, atualmente utilizados indiscriminadamente, assim como antagonistas de EP4, na diferenciação de células Th17 em diferentes modelos de infecção e autoimunidade.

Portanto, o conjunto dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* demonstram um papel supressor da PGE₂ na diferenciação de Th17 durante a eferocitose de células infectadas com bactérias Gram-negativas. A inibição da PGE₂ ou o bloqueio da sinalização via EP4 *in vivo* melhoraram as respostas de Th17, assim como a defesa do hospedeiro contra *C. rodentium*. Estes dados sugerem que o uso de inibidores de COX ou antagonistas de EP4 podem ser, futuramente, estratégias promissoras para favorecer respostas imunológicas dependentes de linfócitos Th17. Por outro lado, uma das possíveis conseqüências do aumento de respostas de células Th17 poderia ser o desenvolvimento de doenças autoimunes, uma vez que respostas exacerbadas de Th17 estão relacionadas a diversas autoimunidades, como lúpus, psoríase, entre outras.

Conclusão

Conclusão Geral

A PGE₂, oriunda da eferocitose de células infectadas, via EP4-cAMP-PKA e inibição do IL-1R, suprime a diferenciação de linfócitos Th17 e compromete a defesa do hospedeiro contra *C. rodentium*.



A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Fig. 43. Conclusão. PGE₂ proveniente da fagocitose de IACs inibe a diferenciação de Th17 *in vitro* e *in vivo*.

Conclusões Específicas:

- A concentração da PGE₂, proveniente da eferocitose de células infectadas, por DCs, suprime a diferenciação de Th17;
- Dentre os receptores de PGE₂, o EP4 é o principal responsável pela supressão da diferenciação de Th17, no contexto da eferocitose de células infectadas;
- O comprometimento da diferenciação de Th17, no contexto da fagocitose de IACs, deve-se, em parte, pela inibição da expressão do IL-1R, promovida pelo eixo PGE₂-EP4-PKA;
- A inibição da síntese da PGE₂ ou de sua sinalização, via EP4, *in vivo*, aumenta a diferenciação de Th17, favorece a produção de peptídeos antimicrobianos e melhora a defesa do hospedeiro no modelo de colite infecciosa por *C. rodentium*.

Referências

- Agard, M., S. Asakrah and L. A. Morici (2013). "PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection." Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 3: 45.
- Alba-Loureiro, T. C. (2007). "Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus." Braz. J. Med. Biol. Res. 40: 1037-1044.
- Albert, M. L. (2004). "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?" Nat Rev Immunol 4(3): 223-231.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, C. H. Serezani, M. Luo and M. Peters-Golden (2005). "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1." J Immunol 174(2): 595-599.
- Aronoff, D. M. and Z. D. Mulla (2006). "Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Group A Streptococcal Infection." Emerging Infectious Diseases 12(8): 1291-1291.
- Ashida, H., H. Mimuro, M. Ogawa, T. Kobayashi, T. Sanada, M. Kim and C. Sasakawa (2011). "Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival." J Cell Biol 195(6): 931-942.
- Baratelli, F., Y. Lin, L. Zhu, S. C. Yang, N. Heuze-Vourc'h, G. Zeng, K. Reckamp, M. Dohadwala, S. Sharma and S. M. Dubinett (2005). "Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells." J Immunol 175(3): 1483-1490.
- Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung and E. Latz (2009). "Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression." J Immunol 183(2): 787-791.
- Becker, R. E. N., B. J. Berube, G. R. Sampedro, A. C. DeDent and J. B. Wardenburg (2014). "Tissue-specific Patterning of the Host Innate Immune Response by Staphylococcus aureus α -toxin." Journal of innate immunity 6(5): 619-631.
- Beene, D. L. and J. D. Scott (2007). "A-kinase anchoring proteins take shape." Curr Opin Cell Biol 19(2): 192-198.
- Belizario, J. E., W. Brandao, C. Rossato and J. P. Peron (2016). "Thymic and Postthymic Regulation of Naive CD4(+) T-Cell Lineage Fates in Humans and Mice Models." Mediators Inflamm 2016: 9523628.

Bergmann, C., L. Strauss, R. Zeidler, S. Lang and T. L. Whiteside (2007). "Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res 67(18): 8865-8873.

Bernard, J. J. and R. L. Gallo (2010). "Cyclooxygenase-2 enhances antimicrobial peptide expression and killing of Staphylococcus aureus." J Immunol 185(11): 6535-6544.

Bettelli, E., M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity." Nat Immunol 8(4): 345-350.

Betz, M. and B. S. Fox (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." J Immunol 146(1): 108-113.

Birge, R. B., S. Boeltz, S. Kumar, J. Carlson, J. Wanderley, D. Calianese, M. Barcinski, R. A. Brekken, X. Huang, J. T. Hutchins, B. Freimark, C. Empig, J. Mercer, A. J. Schroit, G. Schett and M. Herrmann (2016). "Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer." Cell Death Differ 23(6): 962-978.

Blaschitz, C. and M. Raffatellu (2010). "Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier." Journal of Clinical Immunology 30(2): 196-203.

Boniface, K., K. S. Bak-Jensen, Y. Li, W. M. Blumenschein, M. J. McGeachy, T. K. McClanahan, B. S. McKenzie, R. A. Kastelein, D. J. Cua and R. de Waal Malefyt (2009). "Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling." The Journal of Experimental Medicine 206(3): 535-548.

Bos, J. L. (2006). "Epac proteins: multi-purpose cAMP targets." Trends Biochem Sci 31(12): 680-686.

Breckler, M., M. Berthouze, A. C. Laurent, B. Crozatier, E. Morel and F. Lezoualc'h (2011). "Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications." Cell Signal 23(8): 1257-1266.

Brenner, S., S. Prosch, K. Schenke-Layland, U. Riese, U. Gausmann and C. Platzer (2003). "cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation." J Biol Chem 278(8): 5597-5604.

Brereton, C. F. and J. M. Blander (2010). "Responding to infection and apoptosis — a task for TH17 cells." Annals of the New York Academy of Sciences 1209(1): 56-67.

Brereton, C. F. and J. M. Blander (2011). "The unexpected link between infection-induced apoptosis and a Th17 immune response." Journal of Leukocyte Biology 89(4): 565-576.

Bry, L. and M. B. Brenner (2004). "Critical role of T cell-dependent serum antibody, but not the gut-associated lymphoid tissue, for surviving acute mucosal infection with *Citrobacter rodentium*, an attaching and effacing pathogen." J Immunol 172(1): 433-441.

Burke, J. E. and E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 biochemistry." Cardiovasc Drugs Ther 23(1): 49-59.

Casqueiro, J., J. Casqueiro and C. Alves (2012). "Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis." Indian Journal of Endocrinology and Metabolism 16(Suppl1): S27-S36.

Castaño, V. E. N. (2016). "Eferocitose de neutrófilos apoptóticos infectados por *Streptococcus pneumoniae* na polarização das células Th1 e Th17: Papel de PGE2 " Tese de Doutorado Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho(Faculdade de Ciências Farmacêuticas): 83.

Chen, H., J. Qin, P. Wei, J. Zhang, Q. Li, L. Fu, S. Li, C. Ma and B. Cong (2009). "Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 80(4): 195-200.

Cheon, H., Y. H. Rho, S. J. Choi, Y. H. Lee, G. G. Song, J. Sohn, N. H. Won and J. D. Ji (2006). "Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function." J Immunol 177(2): 1092-1100.

Cho, J. S. (2010). "IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice." J. Clin. Invest. 120: 1762-1773.

Cho, J. S., E. M. Pietras, N. C. Garcia, R. I. Ramos, D. M. Farzam, H. R. Monroe, J. E. Magorien, A. Blauvelt, J. K. Kolls, A. L. Cheung, G. Cheng, R. L. Modlin and L. S. Miller (2010). "IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice." The Journal of Clinical Investigation 120(5): 1762-1773.

Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. Jetten, Q. Tian and C. Dong (2009). "Critical regulation of early Th17 cell differentiation by IL-1 signaling." Immunity 30(4): 576-587.

Collins, J. W., K. M. Keeney, V. F. Crepin, V. A. Rathinam, K. A. Fitzgerald, B. B. Finlay and G. Frankel (2014). "*Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota." Nat Rev Microbiol 12(9): 612-623.

Collins, P. W. (1990). "Misoprostol: Discovery, development, and clinical applications." Medicinal Research Reviews 10(2): 149-172.

Colonna, M. (2009). "Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity." Immunity 31(1): 15-23.

Delghandi, M. P., M. Johannessen and U. Moens (2005). "The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells." Cell Signal 17(11): 1343-1351.

Demedts, I. K., T. Demoor, K. R. Bracke, G. F. Joos and G. G. Brusselle (2006). "Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema." Respiratory Research 7(1): 53-53.

Devitt, A. and L. J. Marshall (2011). "The innate immune system and the clearance of apoptotic cells." J Leukoc Biol 90(3): 447-457.

Dryden, M., M. Baguneid, C. Eckmann, S. Corman, J. Stephens, C. Solem, J. Li, C. Charbonneau, N. Baillon-Plot and S. Haider (2015). "Pathophysiology and burden of infection in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease: focus on skin and soft-tissue infections." Clinical Microbiology and Infection 21, Supplement 2: S27-S32.

Dryden, M. S. (2010). "Complicated skin and soft tissue infection." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65(suppl 3): iii35-iii44.

Duffy, M. M., J. Pindjakova, S. A. Hanley, C. McCarthy, G. A. Weidhofer, E. M. Sweeney, K. English, G. Shaw, J. M. Murphy, F. P. Barry, B. P. Mahon, O. Belton, R. Ceredig and M. D. Griffin (2011). "Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor." Eur J Immunol 41(10): 2840-2851.

Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol 189(7): 1059-1070.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." Toxicologic pathology 35(4): 495-516.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott and P. M. Henson (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest 101(4): 890-898.

Feliciello, A., M. E. Gottesman and E. V. Avvedimento (2005). "cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases." Cell Signal 17(3): 279-287.

Filgueiras, L. R., S. L. Brandt, S. Wang, Z. Wang, D. L. Morris, C. Evans-Molina, R. G. Mirmira, S. Jancar and C. H. Serezani (2015). "Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes." Sci Signal 8(361): ra10.

Fimia, G. M. and P. Sassone-Corsi (2001). "Cyclic AMP signalling." Journal of Cell Science 114(11): 1971-1972.

Font-Nieves, M., M. G. Sans-Fons, R. Gorina, E. Bonfill-Teixidor, A. Salas-Pédomo, L. Márquez-Kisinousky, T. Santalucia and A. M. Planas (2012). "Induction of COX-2 Enzyme and Down-regulation of COX-1 Expression by Lipopolysaccharide (LPS) Control Prostaglandin E(2) Production in Astrocytes." The Journal of Biological Chemistry 287(9): 6454-6468.

Fukata, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A. S. Vamadevan, L. S. Thomas, R. Xu, H. Inoue, M. Arditi, A. J. Dannenberg and M. T. Abreu (2006). "Cox-2 is regulated by toll-like receptor-4 (TLR4) signaling and is important for proliferation and apoptosis in response to intestinal mucosal injury." Gastroenterology 131(3): 862-877.

Galluzzi, L., O. Kepp, C. Trojel-Hansen and G. Kroemer (2012). "Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins." EMBO Reports 13(4): 322-330.

Gerlo, S., R. Kooijman, I. M. Beck, K. Kolmus, A. Spooren and G. Haegeman (2011). "Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action." Cell Mol Life Sci 68(23): 3823-3841.

Gin, H., E. Brottier and J. Aubertin (1984). "Influence of glycaemic normalisation by an artificial pancreas on phagocytic and bactericidal functions of granulocytes in insulin dependent diabetic patients." J Clin Pathol 37(9): 1029-1031.

Grandoch, M., S. S. Roscioni and M. Schmidt (2010). "The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function." Br J Pharmacol 159(2): 265-284.

Greenberg, M. E., M. Sun, R. Zhang, M. Febbraio, R. Silverstein and S. L. Hazen (2006). "Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells." J Exp Med 203(12): 2613-2625.

Guo, H., J. B. Callaway and J. P. Ting (2015). "Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics." Nat Med 21(7): 677-687.

Hall, M. O., M. S. Obin, A. L. Prieto, B. L. Burgess and T. A. Abrams (2002). "Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro." Exp Eye Res 75(4): 391-400.

Han, S. J., H. J. Melichar, J. L. Coombes, S. W. Chan, A. A. Koshy, J. C. Boothroyd, G. M. Barton and E. A. Robey (2014). "Internalization and TLR-dependent type I interferon production by monocytes in response to *Toxoplasma gondii*." Immunol Cell Biol 92(10): 872-881.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol 6(11): 1123-1132.

Hauser, M. A., K. Schaeuble, I. Kindinger, D. Impellizzeri, W. A. Krueger, C. R. Hauck, O. Boyman and D. F. Legler (2016). "Inflammation-Induced CCR7 Oligomers Form Scaffolds to Integrate Distinct Signaling Pathways for Efficient Cell Migration." Immunity 44(1): 59-72.

Hinson, R. M., J. A. Williams and E. Shacter (1996). "Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(10): 4885-4890.

Hornef, M. W., B. H. Normark, A. Vandewalle and S. Normark (2003). "Intracellular Recognition of Lipopolysaccharide by Toll-like Receptor 4 in Intestinal Epithelial Cells." The Journal of Experimental Medicine 198(8): 1225-1235.

Hu, W., T. D. Troutman, R. Edukulla and C. Pasare (2011). "Priming microenvironments dictate cytokine requirements for T helper 17 cell lineage commitment." Immunity 35(6): 1010-1022.

Huang, S. K., S. H. Wettlaufer, C. M. Hogaboam, K. R. Flaherty, F. J. Martinez, J. L. Myers, T. V. Colby, W. D. Travis, G. B. Toews and M. Peters-Golden (2008). "Variable prostaglandin E2 resistance in fibroblasts from patients with usual interstitial pneumonia." Am J Respir Crit Care Med 177(1): 66-74.

Hughes-Fulford, M., E. Sugano, T. Schopper, C. F. Li, J. B. Boonyaratanakornkit and A. Cogoli (2005). "Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits." Cell Signal 17(9): 1111-1124.

Ikeda, S., S. Saijo, M. A. Murayama, K. Shimizu, A. Akitsu and Y. Iwakura (2014). "Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-beta-induced Foxp3 expression." J Immunol 192(4): 1449-1458.

Jansen, A., M. van Hagen and H. A. Drexhage "Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes." The Lancet 345(8948): 491-492.

Jeannin, P., S. Jaillon and Y. Delneste (2008). "Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells." Curr Opin Immunol 20(5): 530-537.

Joshi, N., G. M. Caputo, M. R. Weitekamp and A. W. Karchmer (1999). "Infections in patients with diabetes mellitus." N Engl J Med 341(25): 1906-1912.

Kabashima, K., D. Sakata, M. Nagamachi, Y. Miyachi, K. Inaba and S. Narumiya (2003). "Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells." Nat Med 9(6): 744-749.

Kalinski, P. (2012). "Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2." The Journal of Immunology 188(1): 21-28.

Kämpfer, H., R. Schmidt, G. Geisslinger, J. Pfeilschifter and S. Frank (2005). "Wound Inflammation in Diabetic ob/ob Mice : Functional Coupling of Prostaglandin Biosynthesis to Cyclooxygenase-1 Activity in Diabetes-Impaired Wound Healing." Diabetes 54(5): 1543-1551.

Koenders, M. I., I. Devesa, R. J. Marijnissen, S. Abdollahi-Roodsaz, A. M. Boots, B. Walgreen, F. E. di Padova, M. J. Nicklin, L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2008). "Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice." Arthritis Rheum 58(11): 3461-3470.

Koff, J. L., S. Ramachandiran and L. Bernal-Mizrachi (2015). "A time to kill: targeting apoptosis in cancer." Int J Mol Sci 16(2): 2942-2955.

Kofler, D. M., A. Marson, M. Dominguez-Villar, S. Xiao, V. K. Kuchroo and D. A. Hafler (2014). "Decreased RORC-dependent silencing of prostaglandin receptor EP2 induces autoimmune Th17 cells." The Journal of Clinical Investigation 124(6): 2513-2522.

Kolenko, V., P. Rayman, B. Roy, M. K. Cathcart, J. O'Shea, R. Tubbs, L. Rybicki, R. Bukowski and J. Finke (1999). "Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E2 and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway." Blood 93(7): 2308-2318.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 cells." Annu. Rev. Immunol. 27: 485-517.

Korns, D., S. C. Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli, P. M. Henson and D. L. Bratton (2011). "Modulation of Macrophage Efferocytosis in Inflammation." Frontiers in Immunology 2: 57.

Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev 87(1): 99-163.

Kulms, D. and T. Schwarz (2000). "Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis." Photodermatol Photoimmunol Photomed 16(5): 195-201.

Kuper, C., F. X. Beck and W. Neuhofer (2012). "Toll-like receptor 4 activates NF-kappaB and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells." Am J Physiol Renal Physiol 302(1): F38-46.

Lecube, A., G. Pachón, J. Petriz, C. Hernández and R. Simó (2011). "Phagocytic Activity Is Impaired in Type 2 Diabetes Mellitus and Increases after Metabolic Improvement." PLoS ONE 6(8): e23366.

Legler, D. F., P. Krause, E. Scandella, E. Singer and M. Groettrup (2006). "Prostaglandin E2 Is Generally Required for Human Dendritic Cell Migration and Exerts Its Effect via EP2 and EP4 Receptors." The Journal of Immunology 176(2): 966-973.

Lemos, H. P., R. Grespan, S. M. Vieira, T. M. Cunha, W. A. Verri, Jr., K. S. Fernandes, F. O. Souto, I. B. McInnes, S. H. Ferreira, F. Y. Liew and F. Q. Cunha (2009). "Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production." Proc Natl Acad Sci U S A 106(14): 5954-5959.

Liang, S. C. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." J. Exp. Med. 203: 2271-2279.

Litvack, M. L. and N. Palaniyar (2010). "Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation." Innate Immun 16(3): 191-200.

Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. J. Ogilvie, S. Röβner, F. Koch, N. Romani and G. Schuler (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." Journal of Immunological Methods 223(1): 77-92.

Martin, Constance J., Matthew G. Booty, Tracy R. Rosebrock, C. Nunes-Alves, Danielle M. Desjardins, I. Keren, Sarah M. Fortune, Heinz G. Remold and Samuel M. Behar "Efferocytosis Is an Innate Antibacterial Mechanism." Cell Host & Microbe 12(3): 289-300.

Martin, C. J., M. G. Booty, T. R. Rosebrock, C. Nunes-Alves, D. M. Desjardins, I. Keren, S. M. Fortune, H. G. Remold and S. M. Behar (2012). "Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism." Cell host & microbe 12(3): 289-300.

Martin, C. J., K. N. Peters and S. M. Behar (2014). "Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control." Current opinion in microbiology 0: 17-23.

Martinez, P. J., C. Mathews, J. K. Actor, S.-A. Hwang, E. L. Brown, H. K. De Santiago, S. P. Fisher Hoch, J. B. McCormick and S. Mirza "Impaired CD4+ and T-helper 17 cell memory response to *Streptococcus pneumoniae* is associated with elevated glucose and percent glycated hemoglobin A1c in Mexican Americans with type 2 diabetes mellitus." Translational Research 163(1): 53-63.

Marwaha, A. K., N. J. Leung, A. N. McMurchy and M. K. Levings (2012). "TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic?" Frontiers in Immunology 3: 129.

Mathers, A. R., B. M. Janelins, J. P. Rubin, O. A. Tkacheva, W. J. Shufesky, S. C. Watkins, A. E. Morelli and A. T. Larregina (2009). "Differential Capability of Human Cutaneous Dendritic Cell Subsets to Initiate Th17 Responses." The Journal of Immunology 182(2): 921-933.

Medeiros, A., C. Peres-Buzalaf, F. Fortino Verdan and C. H. Serezani (2012). Mediators of Inflammation 2012: 13.

Medeiros, A., C. Peres-Buzalaf, F. Fortino Verdan and C. H. Serezani (2012). "Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs." Mediators Inflamm 2012: 327568.

Medeiros, A. I., C. H. Serezani, S. P. Lee and M. Peters-Golden (2009). "Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE(2)/EP2 signaling." The Journal of Experimental Medicine 206(1): 61-68.

Meller, S., J. Di Domizio, K. S. Voo, H. C. Friedrich, G. Chamilos, D. Ganguly, C. Conrad, J. Gregorio, D. Le Roy, T. Roger, J. E. Ladbury, B. Homey, S. Watowich, R. L. Modlin, D. P. Kontoyiannis, Y. J. Liu, S. T. Arold and M. Gilliet (2015). "T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26." Nat Immunol 16(9): 970-979.

Mendoza, L. (2006). "A network model for the control of the differentiation process in Th cells." Biosystems 84(2): 101-114.

Miller, L. S. and J. S. Cho (2011). "Immunity against Staphylococcus aureus cutaneous infections." Nat Rev Immunol 11(8): 505-518.

Minegishi, Y. (2007). "Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome." Nature 448: 1058-1062.

Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura and S. Nagata (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." Nature 450(7168): 435-439.

Montgomery, C. P., M. Daniels, F. Zhao, M.-L. Alegre, A. S. Chong and R. S. Daum (2014). "Protective Immunity against Recurrent Staphylococcus aureus Skin Infection Requires Antibody and Interleukin-17A." Infection and Immunity 82(5): 2125-2134.

Mori, K., I. Tanaka, M. Kotani, F. Miyaoka, T. Sando, S. Muro, Y. Sasaki, O. Nakagawa, Y. Ogawa, T. Usui, S. Ozaki, A. Ichikawa, S. Narumiya and K. Nakao (1996). "Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP4 subtype: differential regulation in

monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester." J Mol Med (Berl) 74(6): 333-336.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol 136(7): 2348-2357.

Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol 7: 145-173.

Muller, L. M. A. J., K. J. Gorter, E. Hak, W. L. Goudzwaard, F. G. Schellevis, A. I. M. Hoepelman and G. E. H. M. Rutten (2005). "Increased Risk of Common Infections in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus." Clinical Infectious Diseases 41(3): 281-288.

Muranski, P. and N. P. Restifo (2013). "Essentials of Th17 cell commitment and plasticity." Blood 121(13): 2402-2414.

Mustelin, T. and K. Tasken (2003). "Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases." Biochem J 371(Pt 1): 15-27.

Myer, R. G., R. E. Mezayen and K. P. High (2010). "Prostaglandin E2-dependent IL-23 production in aged murine dendritic cells." Experimental gerontology 45(11): 834-841.

Nagamachi, M., D. Sakata, K. Kabashima, T. Furuyashiki, T. Murata, E. Segi-Nishida, K. Soontrapa, T. Matsuoka, Y. Miyachi and S. Narumiya (2007). "Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1." J Exp Med 204(12): 2865-2874.

Napolitani, G., E. V. Acosta-Rodriguez, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2009). "Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells." Eur J Immunol 39(5): 1301-1312.

Nataraj, C., D. W. Thomas, S. L. Tilley, M. T. Nguyen, R. Mannon, B. H. Koller and T. M. Coffman (2001). "Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse." J Clin Invest 108(8): 1229-1235.

Naviglio, S., D. Di Gesto, F. Illiano, E. Chiosi, A. Giordano, G. Illiano and A. Spina (2010). "Leptin potentiates antiproliferative action of cAMP elevation via protein kinase A down-regulation in breast cancer cells." Journal of Cellular Physiology 225(3): 801-809.

Netea, M. G., F. L. van de Veerdonk, J. W. van der Meer, C. A. Dinarello and L. A. Joosten (2015). "Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines." Annu Rev Immunol 33: 49-77.

Novelli, M., P. Savoia, I. Cambieri, R. Ponti, A. Comessatti, F. Lisa and M. G. Bernengo (2000). "Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas." Clin Exp Dermatol 25(5): 423-431.

Ouyang, L., Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu and J. K. Bao (2012). "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis." Cell Prolif 45(6): 487-498.

Park, D., A. C. Tosello-Tramont, M. R. Elliott, M. Lu, L. B. Haney, Z. Ma, A. L. Klivanov, J. W. Mandell and K. S. Ravichandran (2007). "BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module." Nature 450(7168): 430-434.

Park, S. Y., M. Y. Jung, H. J. Kim, S. J. Lee, S. Y. Kim, B. H. Lee, T. H. Kwon, R. W. Park and I. S. Kim (2008). "Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor." Cell Death Differ 15(1): 192-201.

Park, Y. G., S. K. Kang, S. H. Noh, K. K. Park, Y. C. Chang, Y. C. Lee and C. H. Kim (2004). "PGE2 induces IL-1beta gene expression in mouse osteoblasts through a cAMP-PKA signaling pathway." Int Immunopharmacol 4(6): 779-789.

Peine, M., R. M. Marek and M. Lohning (2016). "IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis." Trends Immunol 37(5): 321-333.

Peleg, A. Y., T. Weerathna, J. S. McCarthy and T. M. Davis (2007). "Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control." Diabetes Metab Res Rev 23(1): 3-13.

Peric, M., S. Koglin, S.-M. Kim, S. Morizane, R. Besch, J. C. Prinz, T. Ruzicka, R. L. Gallo and J. Schaubert (2008). "IL-17A Enhances Vitamin D(3)-Induced Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide in Human Keratinocytes." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 181(12): 8504-8512.

Piao, L., J. Park, Y. Li, S. Shin, S. Shin, G. Kong, R. Shrestha, Q. Tran, G. M. Hur, J. L. Kim and J. Park (2014). "SOCS3 and SOCS6 are required for the risperidone-mediated inhibition of insulin and leptin signaling in neuroblastoma cells." Int J Mol Med 33(5): 1364-1370.

Platzer, C., E. Fritsch, T. Elsner, M. H. Lehmann, H. D. Volk and S. Prosch (1999). "Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells." Eur J Immunol 29(10): 3098-3104.

Qvist, R. and R. G. Larkins (1983). "Diminished production of thromboxane B2 and prostaglandin E by stimulated polymorphonuclear leukocytes from insulin-treated diabetic subjects." Diabetes 32(7): 622-626.

Ravichandran, K. S. and U. Lorenz (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." Nat Rev Immunol 7(12): 964-974.

Rincon, M., A. Tugores, A. Lopez-Rivas, A. Silva, M. Alonso, M. O. De Landazuri and M. Lopez-Botet (1988). "Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells." Eur J Immunol 18(11): 1791-1796.

Roos, A., W. Xu, G. Castellano, A. J. Nauta, P. Garred, M. R. Daha and C. van Kooten (2004). "Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells." Eur J Immunol 34(4): 921-929.

Rubino, S. J., K. Geddes and S. E. Girardin (2012). "Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens." Trends in Immunology 33(3): 112-118.

Rudel, T., O. Kepp and V. Kozjak-Pavlovic (2010). "Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways." Nat Rev Microbiol 8(10): 693-705.

Santarasci, V., L. Cosmi, L. Maggi, F. Liotta and F. Annunziato (2013). "IL-1 and T Helper Immune Responses." Frontiers in Immunology 4: 182.

Scandella, E., Y. Men, S. Gillessen, R. Förster and M. Groettrup (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." Blood 100(4): 1354-1361.

Schauber, J. and R. L. Gallo (2009). "Antimicrobial peptides and the skin immune defense system." J. Allergy Clin. Immunol. 124: R13-R18.

Schirmer, C., C. Klein, M. von Bergen, J. C. Simon and A. Saalbach (2010). "Human fibroblasts support the expansion of IL-17-producing T cells via up-regulation of IL-23 production by dendritic cells." Blood 116(10): 1715-1725.

Schuster, V. L. (1998). "Molecular mechanisms of prostaglandin transport." Annu Rev Physiol 60: 221-242.

Serezani, C. H., M. N. Ballinger, D. M. Aronoff and M. Peters-Golden (2008). "Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function." Am J Respir Cell Mol Biol 39(2): 127-132.

Sharma, S., S. C. Yang, L. Zhu, K. Reckamp, B. Gardner, F. Baratelli, M. Huang, R. K. Batra and S. M. Dubinett (2005). "Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer." Cancer Res 65(12): 5211-5220.

Shevach, E. M. (2006). "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells." Immunity 25(2): 195-201.

Shi, Q., Z. Yin, B. Zhao, F. Sun, H. Yu, X. Yin, L. Zhang and S. Wang (2015). "PGE2 Elevates IL-23 Production in Human Dendritic Cells via a cAMP Dependent Pathway." Mediators of Inflammation 2015: 7.

Simmons, C. P., S. Clare, M. Ghaem-Maghami, T. K. Uren, J. Rankin, A. Huett, R. Goldin, D. J. Lewis, T. T. MacDonald, R. A. Strugnell, G. Frankel and G. Dougan (2003). "Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*." Infect Immun 71(9): 5077-5086.

Smith, W. L., D. L. DeWitt and R. M. Garavito (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annu Rev Biochem 69: 145-182.

Song, J., Y. Li and B. Shen (2001). "[Activation of PKA pathway inhibits reactivity of human myeloma cell line-U266 to IL-6]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 23(4): 278-280.

Sreeramkumar, V., M. Fresno and N. Cuesta (2012). "Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes?" Immunol Cell Biol 90(6): 579-586.

Stevens, D. L. (1995). "Could nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) enhance the progression of bacterial infections to toxic shock syndrome?" Clin Infect Dis 21(4): 977-980.

Stockwin, L. H., D. McGonagle, I. G. Martin and G. E. Blair (2000). "Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease." Immunol Cell Biol 78(2): 91-102.

Sugimoto, Y. and S. Narumiya (2007). "Prostaglandin E receptors." J Biol Chem 282(16): 11613-11617.

Sutton, C., C. Brereton, B. Keogh, K. H. G. Mills and E. C. Lavelle (2006). "A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis." The Journal of Experimental Medicine 203(7): 1685-1691.

Syeda, M. M., X. Jing, R. H. Mirza, H. Yu, R. S. Sellers and Y. Chi (2012). "Prostaglandin Transporter Modulates Wound Healing in Diabetes by Regulating Prostaglandin-Induced Angiogenesis." The American Journal of Pathology 181(1): 334-346.

Takatori, H., Y. Kanno, W. T. Watford, C. M. Tato, G. Weiss, Ivanov, II, D. R. Littman and J. J. O'Shea (2009). "Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22." J Exp Med 206(1): 35-41.

Tan, J. S., J. L. Anderson, C. Watanakunakorn and J. P. Phair (1975). "Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus." J Lab Clin Med 85(1): 26-33.

Torchinsky, M. B., J. Garaude, A. P. Martin and J. M. Blander (2009). "Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation." Nature 458(7234): 78-82.

Ueno, Y., N. Yamada, H. Koike and S. Nishio (1996). "Effects of beraprost sodium and prostaglandin E1 on skin blood flow in diabetic rats and normal dogs." General Pharmacology: The Vascular System 27(2): 333-335.

Valdez, P. A., P. J. Vithayathil, B. M. Janelsins, A. L. Shaffer, P. R. Williamson and S. K. Datta (2012). "Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 function and interleukin-17 expression in T cells." Immunity 36(4): 668-679.

Vallerskog, T., G. W. Martens and H. Kornfeld (2010). "Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to Mycobacterium tuberculosis." The Journal of Immunology 184(11): 6275-6282.

Vandivier, R. W., P. M. Henson and I. S. Douglas (2006). "Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease." Chest 129(6): 1673-1682.

Vang, T., H. Abrahamsen, S. Myklebust, V. Horejsi and K. Tasken (2003). "Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein kinase a inhibits T cell receptor signaling." J Biol Chem 278(20): 17597-17600.

Vives-Pi, M., S. Rodríguez-Fernández and I. Pujol-Autonell (2015). "How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review." Apoptosis 20(3): 263-272.

Waite, J. C. and D. Skokos (2012). "Th17 response and inflammatory autoimmune diseases." Int J Inflam 2012: 819467.

Walt, R. P. (1992). "Misoprostol for the Treatment of Peptic Ulcer and Antiinflammatory-Drug-Induced Gastroduodenal Ulceration." New England Journal of Medicine 327(22): 1575-1580.

Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2006). "The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells." Immunol Rev 212: 114-130.

Weinreb, M., M. Machwate, N. Shir, M. Abramovitz, G. A. Rodan and S. Harada (2001). "Expression of the prostaglandin E2 (PGE2) receptor subtype EP4 and its regulation by PGE2 in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue1." Bone 28(3): 275-281.

Wen, A. Y., K. M. Sakamoto and L. S. Miller (2010). "The role of the transcription factor CREB in immune function." J Immunol 185(11): 6413-6419.

Wu, C.-Y., K. Wang, J. F. McDyer and R. A. Seder (1998). "Prostaglandin E2 and Dexamethasone Inhibit IL-12 Receptor Expression and IL-12 Responsiveness." The Journal of Immunology 161(6): 2723-2730.

Yang, J., M. S. Sundrud, J. Skepner and T. Yamagata (2014). "Targeting Th17 cells in autoimmune diseases." Trends in Pharmacological Sciences 35(10): 493-500.

Yao, C., T. Hirata, K. Soontrapa, X. Ma, H. Takemori and S. Narumiya (2013). "Prostaglandin E(2) promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase." Nature Communications 4: 1685.

Yao, C., D. Sakata, Y. Esaki, Y. Li, T. Matsuoka, K. Kuroiwa, Y. Sugimoto and S. Narumiya (2009). "Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion." Nat Med 15(6): 633-640.

Yokoyama, U., K. Iwatsubo, M. Umemura, T. Fujita and Y. Ishikawa (2013). "The Prostanoid EP4 Receptor and Its Signaling Pathway." Pharmacological Reviews 65(3): 1010-1052.

Zhang, F., I. J. Fuss, Z. Yang and W. Strober (2014). "Transcription of ROR γ in developing Th17 cells is regulated by E-proteins." Mucosal Immunol 7(3): 521-532.

Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard and D. R. Littman (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." Nat Immunol 8(9): 967-974.

Zielinski, C. E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2012). "Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β ." Nature 484(7395): 514-518.

Zoccal, K. F., C. A. Sorgi, J. I. Hori, F. W. G. Paula-Silva, E. C. Arantes, C. H. Serezani, D. S. Zamboni and L. H. Faccioli (2016). "Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality." Nat Commun 7.

Anexo 1.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados.

<i>III7a</i>	F:AGGCAGCAGCGATCATCC	R:GTGGAACGGTTGAGGTAGTC
<i>III7f</i>	F:TTGATGCAGCCTGAGTGTCT	R:AATTCCAGAACCGCTCCAGT
<i>IIIr</i>	F:ACCGTGAACACAAATGG	R:GAGGCACCATGAGACAAATG
<i>Ccl2</i>	F:AACTCTCACTGAAGCCAGCTCT	R:CGTTAACTGCATCTGGCTGA
<i>Ccl7</i>	F:CAATGCATCCACATGCTGC	R:CTTCCCAGGGACACCGAC
<i>Ptges1</i>	F:AGGAGATGGCTGCTGAGTTGG	R:AATCTGACTTTCTGAGTTGCC
<i>Ptges2</i>	F:GGGCCCTTCCTCCCGTAGCA	R:TGAGCCTTGGGGGTCAGGGA
<i>Cramp</i>	F:CTTCAACCAGCAGTCCCTAGACA	R:TCCAGGTCCAGGAGACGGTA
<i>Mbs1</i>	F:CCAGATGGAGCCAGGTGTTG	R:AGCTGGAGCGGAGACAGAATCC
<i>Mbd2</i>	F:AAGTATTGGATACGAAGCAG	R:TGGCAGAAGGAGGACAAATG
<i>Mbd3</i>	F:GCATTGGCAAACTCGTCAGA	R:CGGGATCTTGGTCTTCTCTA
<i>Mbd4</i>	F:GCAGCCTTTACCCAAATTATC	R:ACAATTGCCAATCTGTGCGAA
<i>Reg3g</i>	F:TCAGGTGCAAGGTGAAGTTG	R:GGCCACTGTTACCACTGCTT
<i>Gapdh</i>	F:AACTTTGGCATTGTGGAAGG	R:ACACATTGGGGGTAGGAACA

Anexo 2.

Tabela 3. Expressão gênica de linfócitos Th diferenciados com CM ou CM/Indo.

Genes	Fold Change (CM/Indo vs CM)		
Ccl1	1	Il23r	3.23
Ccl2	4.79	Il25	1
Ccl20	-1.03	Il27	1.95
Ccl22	-1.23	Il3	1.13
Ccl7	4.93	Il4	1.88
Ccr2	1.34	Il5	2.01
Ccr4	2.38	Il6	-1.3
Ccr6	1.33	Il6ra	2.93
Cd2	1.29	Il7r	1.51
Cd28	1.63	Il9	2.88
Cd34	1	Irf4	1.74
Cd4	1.44	Isg20	-1.3
Cd40lg	1.24	Jak1	1.15
Cd8a	1.49	Jak2	1.16
Cebpb	1.97	Mmp3	1
Clec7a	1.09	Mmp9	-1.09
Csf2	-2.97	Myd88	1.68
Csf3	2.44	Nfatc2	2.08
Cx3cl1	1.87	Nfkb1	1.22
Cxcl1	-1.29	Rora	2.33
Cxcl12	1	Rorc	3.6
Cxcl2	1.67	Runx1	2.55
Cxcl5	-1.05	S1pr1	1.57
Foxp3	2.22	Socs1	1.59
Gata3	-1.27	Socs3	1.59
Icam1	1.05	Stat3	1.78
Icos	1.44	Stat4	1.01
Ifng	-1.18	Stat5a	2.34
Il10	2.92	Stat6	1.88
Il12b	-4.35	Syk	-1.04
Il12rb1	1.77	Tbx21	1.45
Il12rb2	1.07	Tgfb1	1.4
Il13	-1.85	Tlr4	-1.23
Il15	-1.23	Tnf	1.71
Il17a	7.41	Traf6	1.68
Il17c	3.23	Actb	1.36
Il17d	1	B2m	1
Il17f	6.72	Gapdh	1.44
Il17ra	1.73	Gusb	1.49
Il17rb	1.76	Hsp90ab1	1.44
Il17rc	1.52		
Il17re	3.72		
Il18	1.18		
Il1b	1.42		
Il1r1	7.79		
Il2	2.01		
Il21	1.73		
Il22	1.66		
Il23a	-1.14		

Anexo 3

Manuscrito

Topical prostaglandin E analog restores defective dendritic cell-mediated Th17 host defense against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the skin of diabetic mice

Naiara N. Dejani^{1,2,3}, Stephanie L. Brandt¹, Annie Piñeros^{1,2}, Nicole L. Glosson-Byers¹, Sue Wang¹, Young min Son¹, Alexandra I. Medeiros^{2,3}, C. Henrique Serezani¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN; ²University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil ³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

Short title: Topical PGE restores skin host defense in diabetic mice

*Address correspondence: Dr. C. Henrique Serezani, Department of Medicine, Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, 950 West Walnut Street, Room 379, Indianapolis, IN 46202. E-mail address: hserezan@iu.edu

Abstract

Diabetics are more prone to *Staphylococcus aureus* skin infection than healthy individuals. Control of *S. aureus* infection is dependent on dendritic cell (DC)-induced Th17-mediated neutrophil recruitment and bacterial clearance. DC ingestion of infected apoptotic cells (IAC) drive prostaglandin E₂ (PGE₂) secretion to generate Th17 cells. We speculated that hyperglycemia inhibits skin DC migration to the lymph nodes (LNs) and impairs Th17 differentiation that accounts for poor skin host defense in diabetic mice. Diabetic mice show increased skin lesion size, bacterial load, decreased PGE₂ and Th17 cells compared to nondiabetic mice after Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infection. Bone marrow-derived DCs (BMDC) cultured in high glucose (25 mM) exhibit decreased PGE₂ production, *Ptges* mRNA expression, lower CCR7-dependent DC migration, and diminished maturation after recognition of MRSA-IAC than BMDCs cultured in low glucose (5 mM). Similar events were observed in DCs from diabetic mice infected with MRSA. Topical treatment of diabetic mice with the PGE analog Misoprostol improved host defense against MRSA skin infection by restoring dendritic cell migration to draining lymph nodes, Th17 differentiation, and increased antimicrobial peptide

expression. These findings identify a novel mechanism involved in poor skin host defense in diabetes and propose a targeted strategy to restore skin host defense in diabetes.

Introduction

Diabetes mellitus is a clinical syndrome associated with deficiency in insulin secretion or action. As a consequence, diabetes causes hyperglycemia, which has been associated with undermined host defense and increased susceptibility to localized and systemic infections (Muller, Gorter et al. 2005). Skin and soft tissues are sites of prevalent infections primarily caused by *Staphylococcus aureus* in diabetics (Peleg, Weerarathna et al. 2007, Dryden, Baguneid et al. 2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a frequent causative pathogen of complicated skin and soft tissue infections in diabetics (Dryden, Baguneid et al. 2015) that can be difficult to treat and often require hospitalization and surgery (Dryden 2010).

Innate immune recognition of *S. aureus* promotes pro-inflammatory signals that lead to neutrophil recruitment and abscess formation, a hallmark of *S. aureus* infection (Miller and Cho 2011). Extensive neutrophil apoptosis is also a hallmark of *S. aureus* infections (Miller and Cho 2011). An additional complication in diabetes is that neutrophils from diabetic patients have defective antimicrobial effector functions (Tan, Anderson et al. 1975, Gin, Brottier et al. 1984).

Clearance of apoptotic cells (efferocytosis) has long been associated with resolution of inflammation (Martin, Peters et al. 2014). However, efferocytosis of infected apoptotic cells has been proposed to be an innate antimicrobial mechanism that results in pathogen destruction (Martin, Booty et al. 2012), and comprises a critical link to adaptive immune responses (Torchinsky, Garaude et al. 2009). Considering the increased neutrophil recruitment and apoptosis at sites of MRSA infection, we speculate that the uptake of infected apoptotic neutrophils by dendritic cells (DCs) dictate the type of host defense produced against *S. aureus* in skin infections.

In the skin, DCs are prompted to respond to intracellular and extracellular modifications that induce a rapid change in their function and phenotype, accompanied by their migration into secondary lymphoid tissues (Stockwin, McGonagle et al. 2000). During this process, DCs require maturation, a process associated with up-regulation of class II MHC and costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) (Legler, Krause et al. 2006) and consequent migration to lymph nodes in a CC-chemokine receptor 7 (CCR7)-dependent response to its ligands CCL19 and CCL21 (Hauser, Schaeuble et al. 2016). In addition, it has been shown that the lipid mediator prostaglandin E₂ (PGE₂) is a key factor for DC maturation and migration via CCR7 (Kabashima, Sakata et al. 2003). Moreover, PGE₂ is required to initiate skin immunity by increasing maturation and

migration of Langerhans cells, a subtype of skin resident dendritic cells (Kabashima, Sakata et al. 2003).

Prostaglandins are derived from arachidonic acid (AA) metabolism via the activation of the cyclooxygenase-1 or -2 (COX-1 or -2) pathways (Medeiros, Peres-Buzalaf et al. 2012). PGE₂ acts through four G protein-coupled receptors, designated EP1-4, which display different tissue distribution and deliver distinct intracellular signals (Medeiros, Peres-Buzalaf et al. 2012). Moreover, efferocytosis has been shown to trigger PGE₂ production (Medeiros, Serezani et al. 2009), although the role of PGE₂ on DC functions during efferocytosis remains to be determined.

While efferocytosis leads to secretion of anti-inflammatory mediators that promote expansion of regulatory Foxp3 T cells, efferocytosis of *E. coli*-infected neutrophils by DCs induces IL-6, IL-23, and TGF- β production, which triggers Th17 differentiation (Korn, Bettelli et al. 2009, Torchinsky, Garaude et al. 2009).

Th17 cells are fundamental players in host defense against *S. aureus* infection (Cho 2010) by activating keratinocytes, and resulting in the induction of neutrophil chemoattractants and antimicrobial peptides (Miller and Cho 2011). Patients with defective Th17 responses exhibit increased susceptibility to *S. aureus* skin infections (Miller and Cho 2011), however whether diabetics also exhibit defective Th17 during *S. aureus* skin infection is unknown. Reduced frequencies of IL-17-producing memory CD4⁺ T cells associated with elevated glucose and increased glycated hemoglobin A1c have been observed in response to *Streptococcus pneumoniae* in diabetic patients (Martinez, Mathews et al.).

Here, we found that localized deficient PGE₂ production impairs DC migration and maturation, which impairs generation of Th17 T cells and drives poor skin host defense against infection. Our data show that topical PGE₂ treatment restores immune responsiveness and increases microbial clearance in diabetic mice.

Methods

Animals

WT C57BL/6 mice (8-12 weeks old) were obtained from The Jackson Laboratory. Mice were maintained according to NIH guidelines for the use of experimental animals in the Laboratory Animal Resource Center (LARC) at Indiana University School of Medicine in Indianapolis. Experiments were performed under a protocol approved by Indiana University School of Medicine Animal Care and Use Committee.

Induction of diabetes

Diabetes was induced by 5 daily intraperitoneal injections of low dose (40 mg/kg) Streptozotocin (STZ) as described (Filgueiras, Brandt et al. 2015). Mice with blood glucose >300 mg/dl were considered diabetic. Experiments were performed using mice at 30 days after diabetes onset.

MRSA-skin infection and misoprostol topical treatment

Control and diabetic mice were anesthetized (Ketamine/xylazine), and the backs were shaved and the MRSA USA300 LAC strain (5×10^6 CFU) was injected subcutaneously in 50 μ L PBS. Lesion and abscess size were monitored daily and determined by affected area calculated using a standard formula for area ($A = [\pi/2] \times l \times w$) (Becker, Berube et al. 2014). Mice were topically treated at the site of infection twice a day for 7 days with 0.03% misoprostol (prepared by emulsifying 150 μ g misoprostol in 0.5 g petroleum gel or vehicle control).

***In vivo* DC migration**

Control and diabetic mice were injected subcutaneously with 5×10^6 CFU of MRSA plus 50 μ g of CellTrace FarRed DDAO-SE as suggested by the vendor (Invitrogen). Brachial lymph nodes were harvested 36 h or 48 h post-infection. Migrating dendritic cells were identified as FarRed⁺CD11c⁺ cells detected by flow cytometry.

Skin biopsies and bacterial load

Punch biopsies (8 mm) from noninfected or infected skin were harvested at different time points and used for determining bacterial counts, cytokine production, RNA extraction, and cell isolation (Novelli, Savoia et al. 2000). For bacterial counts, skin biopsies were collected at day 7 post-infection, processed and homogenized in TSB media and serial dilutions were plated on TSB agar. Colonies were counted after incubation overnight at 37°C.

MRSA-Infected Apoptotic Cells (MRSA-IAC)

DMSO-differentiated neutrophil like-cells were incubated with GFP-MRSA (MOI 50) for 2 h. We observed by FACS that 90% of neutrophil-like cells were infected after 2 h of MRSA infection (not shown). After phagocytosis, cells were washed and apoptosis of infected and noninfected cells was induced using an ultraviolet irradiation crosslinker (5 mJ) and confirmed by Annexin-V and 7-AAD staining (Figure S2).

Co-culture of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) with infected apoptotic cells

Bone marrow cells from control or diabetic mice were differentiated into DCs as previously described (Lutz, Kukutsch et al. 1999) in either 5 mM or 25 mM glucose. After differentiation, BMDCs were co-cultured with infected apoptotic cells (ratio 1:3) for 18 hours in DMEM containing 5 or 25 mM glucose. Supernatants were then collected and inflammatory mediators were detected by ELISA or EIA; and maturation of BMDCs were analysed by FACS.

***In vitro* BMDC migration**

After 18 h of co-culture with MRSA-infected apoptotic cells, BMDCs were isolated using CD11c microbeads (Miltenyi, Biotec) and cells (1×10^6) were suspended in serum-free DMEM with 5 mM or 25 mM glucose and plated into the upper chamber of a 24-well Corning Costar Transwell plate – 5 μ M (Corning Inc., USA). To study CCR7-dependent directional migration, CCL19 (100 ng/mL) and CCL21 (100 ng/mL) were placed into the lower chamber in free-serum medium with 5 mM or 25 mM glucose. Cells that had migrated into the lower chamber 8 h later were photographed, harvested, and counted by FACS.

Skin cell isolation and staining for flow cytometry

Skin biopsies were digested with collagenase and processed to obtain a single-cell suspension. For lymphocyte staining, skin and lymph node cells were stimulated for 5 h with 0.1 μ g/ml PMA (Sigma), 0.5 μ g/ml Ionomycin calcium salt, and 10 μ g/ml Brefeldin A. In all circumstances, prior to staining with antibodies, cells were treated with anti-Fc γ R antibodies to prevent nonspecific antibody binding. For lymphocyte staining, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/CytoPerm (BD) and were stained with the antibodies indicated in the figure legends. For dendritic cell staining, cells were fixed in 1% paraformaldehyde and stained with fluorescent labeled antibodies for 20 minutes.

Detection of cytokines and PGE₂

Cytokines including IL-6, IL-1 β , IL-17A, IL-10, TGF- β (Ebioscience or R&D), production of PGE₂, PGE metabolites, 6-keto prostaglandin F1 α and cytokines (Cayman Chemicals) were detected by ELISA or EIA in skin biopsy homogenates or supernatants from cultured BMDCs. In all circumstances, the sensitivity limit of the assays were ~ 4-5 pg/mL.

RNA isolation, reverse transcription, quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from skin biopsies using lysis buffer (RLT, Qiagen). cDNA and real time PCR were performed as previously published (Filgueiras, Brandt et al. 2015) using primers indicated in the legends on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Primers were purchased from Integrated DNA technologies. Relative expression was calculated as described (Filgueiras, Brandt et al. 2015).

Statistics Analysis

Results are shown as mean \pm SEM and were analyzed using the software Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). For comparisons between two experimental groups Student's t-test was used, and for comparisons among three or more experimental groups, we used One-way Anova followed by Bonferroni multiple comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Decreased Th17 response during MRSA-skin infection in diabetic mice

Initially, we aimed to characterize the events involved in enhanced susceptibility to MRSA skin infection during diabetes. Mice that were diabetic for at least 30 days were more susceptible to MRSA skin infection than non-diabetic mice as seen by increased lesion size and bacterial load measured at day 7 after infection (Figure 1 A-C and data not shown). We observed that MRSA skin infection in diabetic mice led to increased number of neutrophil in the infected skin by 18 h post infection, an event that lasted for at least 7 days (Supplementary information, Figure S1). After ingestion and killing of bacteria, neutrophils become apoptotic and are eliminated by macrophages and dendritic cells (Martin, Booty et al.). When clearance is not effective, infected apoptotic neutrophils become necrotic, releasing danger-associated molecular patterns that elicit inflammatory response. Initially, we determined the numbers of dead cells in the infected skin of diabetic and nondiabetic mice. We observed similar increased numbers of apoptotic cells among skin cells isolated 18 h or 7 days after MRSA-skin infection in both control and diabetic mice (Supplementary information, Figure S2 A-C) and increased apoptosis in a human neutrophil-like cell line (HL-60) cultured with MRSA for 18 h (Supplementary information, Figure S2 C-E).

Bacterial infections that are associated with significant induction of apoptosis in host tissues preferentially induce Th17 immunity (Miller and Cho 2011). Thus, we first determined the profile of the T cell subsets in the skin of diabetic mice 7 days after infection. Diabetic mice showed decreased percentages of Th17, but no significant differences were observed in the percentage of regulatory T cells (Treg) or Th1 cells when compared with infected nondiabetic mice (Figure 1 D-G).

Next, we assessed the production of PGE₂, an inflammatory mediator involved in Th17 differentiation, as well as IL-17A and IL-10 in the skin of control and diabetic mice at various time points after infection. Diabetic mice showed significantly reduced PGE₂ levels at day 2 and decreased levels of IL-17A and IL-10 in the skin at day 7 post-infection compared with infected nondiabetic controls (Figure 1 H-J). Next, we determined whether decreased PGE₂ levels in DCs cultured in low or high glucose or infected skin of diabetic mice correlated with decreased expression of enzymes involved in PGE₂ synthesis, such as cyclooxygenase (COX)-1 and -2 and Ptges. Our data clearly show that Ptges but not COX1 and 2 expression is decreased in *in vivo* and *in vitro*. We then studied the presence of PGE metabolites in the infected skin of diabetic and nondiabetic mice. While we did not detect the expression of the enzyme (PTG) in the skin of all

groups tested, MRSA infection increased the production of PGE metabolites in a similar manner in both diabetic and nondiabetic mice 48 h after infection (Supplementary information, Figure S4 A-C and S5 A-C and data not shown).

Together, these findings show that decreased PGE₂ foreshadows the production of IL-17A and IL-10 suggesting a temporal relationship between PGE₂ and the generation of Th17 in the infected skin of diabetic mice.

Dendritic cell migration to skin-draining lymph nodes is impaired in diabetic mice

We next studied whether impaired DC migration to skin-draining lymph nodes is associated with the decrease in Th17 subsets during MRSA skin infection in diabetic mice. We tracked DC migration *in vivo* during MRSA-skin infection and determined the numbers and percentages of migrating DCs (FarRed⁺CD11c⁺) and Th17 cells in the skin draining lymph nodes. Diabetic mice exhibited decreased percentages and numbers of migrating DCs and Th17 cells in the lymph nodes compared to infected nondiabetic mice (Figure 2 A-F).

Langerhans cells have been described as the main cutaneous DC subset capable of inducing a Th17 response (Mathers, Janelins et al. 2009). Whereas migrating DCs were decreased in the lymph nodes, we observed an increased percentage of Langerin⁺ DCs in the infected skin of diabetic mice (Figure 3 A-C), suggesting that these cells are retained in the skin and cannot properly migrate to the LNs. While no differences were observed in numbers or expression levels of maturation markers in Langerin⁺ DCs (data not shown) in the naïve skin of control and diabetic mice, MRSA infection induced MHC II expression in about the same number of Langerin⁺ DCs in diabetic and control skin (Figure 3D), but Langerin⁺ DCs in diabetic skin had lower levels (median fluorescence intensity - MFI) than in control skin (Figure 3E). MRSA infection also induced a similar frequency of Langerin⁺ DCs expressing CD86 (Figure 3F) and at similar MFI in diabetic and control (Figure 3G). Interestingly, following MRSA infection, CCR7 was expressed by fewer Langerin⁺ DCs with reduced MFI in diabetic skin than in control skin (Figure 3 H-K), indicating that Langerhans cells from infected diabetic mice fail to express the machinery necessary to efficiently activate T cells in the draining lymph node.

High glucose impairs BMDC migration and maturation after recognition of MRSA-infected apoptotic cells

Next, we investigated whether a high glucose environment influenced maturation, migration, and generation of cytokines by DCs involved in Th17 commitment after engulfment of MRSA-infected apoptotic neutrophils.

Initially, BMDCs from control (nondiabetic) and diabetic mice were differentiated in the presence of 5 mM or 25 mM of glucose. We did not detect differences in spontaneous changes in

the phenotype or production of cytokines by immature BMDCs from diabetic and nondiabetic mice under resting conditions (Supplementary information, Figure S3 A-E). However, after recognition of MRSA-infected apoptotic cells, under high glucose conditions BMDCs showed decreased expression of the maturation markers MHC II, CD86, and CCR7 expression (Figure 4 A, C, D) and decreased ability to migrate via CCR7 towards a gradient of CCL19/CCL21, compared to cells under normal glucose conditions (Figure 5 B-C).

In 5 mM or 25 mM glucose, BMDCs showed similar capacities to recognize MRSA-IAC, and no changes in efferocytosis index (Supplementary information, Figure S3 F-G) or cytokine production (Supplementary information, Figure S3 H-J) were observed. Moreover, BMDCs from control or diabetic mice cultured in either 5 mM or 25 mM glucose after recognition of MRSA-IAC produced increased amounts of Th17-driving cytokines IL-6, TGF- β , and IL-1 β when compared to the control BMDCs before efferocytosis (Supplementary information, Figure S3 K-N). On the other hand, we observed decreased PGE₂ levels in BMDCs cultured in high glucose and challenged with MRSA-IAC (Figure 5 A). Efferocytosis of MRSA-IAC in BMDCs enhanced *Cox-2*, but not *Cox-1* mRNA expression in cells cultured in 5 mM or 25 mM glucose (Supplementary information, Figure S4 A-B). However, we observed that efferocytosis of MRSA-IAC in 25 mM glucose led to decreased *Ptger4* levels and no changes were seen in *Ptger 1, 2, and 3* expression by BMDCs than efferocytosis in 5 mM glucose (Supplementary information, Figure S4 E-F), suggesting that high glucose milieu decreases PGE₂ production and signaling in DCs.

Next, we sought to determine whether decreased PGE₂ levels in high glucose might be responsible for impaired maturation and migration of BMDCs. To test this hypothesis, we added PGE₂ in BMDC co-cultures in high glucose, and observed that exogenous PGE₂ restored BMDC migration (Figure 5 B-C) and CD86 and CCR7 (Figure 4 C, D, G, H) expression. Together these data show that deficient PGE₂ production accounts for inadequate DC maturation and chemotaxis during efferocytosis of infected apoptotic cells, which influences later events involved in MRSA skin infection in diabetics.

Topical treatment with PGE analog (misoprostol) improves DC migration to skin-draining lymph nodes in diabetic mice

Considering that exogenous PGE₂ *in vitro* improved BMDC migration in diabetic mice, we investigated whether topical treatment with PGE₂ *in vivo* improved DC migration to skin-draining lymph nodes, as well as Th17 differentiation and host defense after MRSA skin infection in diabetic mice. For these studies, we used misoprostol, which is a PGE₁ analog with agonist

activity for EP2, EP3, and EP4 receptors (Walt 1992) used therapeutically in humans (Collins 1990).

At two days post-infection we detected increased percentages of migrating DCs (FarRed⁺CD11c⁺) in lymph nodes from misoprostol treated-diabetic mice compared to untreated diabetics (Figure 6 A, C). We also observed that misoprostol treatment in diabetics increased the Th17 population in skin-draining lymph nodes (Figure 6 B, D) but did not significantly alter Treg and Th1 cells (Figure 6 E, F).

Misoprostol attenuates infection and improves host defense against MRSA-skin infection in diabetic mice

Given that misoprostol improved DC migration and increased differentiation of Th17 in the lymph nodes, we speculated that misoprostol topical treatment could restore skin host defense in diabetic mice. Diabetic mice treated with misoprostol had smaller lesion and abscess size (Figure 7 A) and lower bacterial load (Figure 7 B) than vehicle-treated diabetic mice. Indeed, the treatment of diabetic mice with misoprostol promoted increased percentage (Figure 7 C, D) and number (Figure 7 E) of Th17 cells in the skin compared with vehicle-treated diabetic mice, but not Treg and Th1 percentages (Figure 7 F, H) or numbers (Figure 7 G, I) compared with vehicle-treated diabetic and control mice.

Next we determined whether increased skin host defense in misoprostol-treated diabetic mice was accompanied by changes in production of antimicrobial peptides, which are key mediators involved in controlling MRSA skin infection (Schauber and Gallo 2009). We found that misoprostol-treated diabetic mice expressed significantly increased *mbd2* and *mbd3* in the skin compared to vehicle-treated diabetic and nondiabetic mice (Figure 7 K-L), and expressed increased, albeit not significantly, *mbd1*, *4*, *5*, and *cramp* (Figure 7 J, M-O). Together, these data suggest that misoprostol treatment improves skin host defense in diabetic mice by increasing Th17 generation and expression of antimicrobial peptides.

Discussion

Skin and soft tissue infections are the most important chronic complications of diabetes, and may lead to hospitalization, amputation, osteomyelitis, and death (Joshi, Caputo et al. 1999). The higher incidence of infections in diabetic patients is related to hyperglycemia, which is known to cause immune dysfunction (Casqueiro, Casqueiro et al. 2012). In the current study, we provide evidence that reduced PGE₂ in the skin of diabetic mice compromises DC maturation and migration to lymph nodes, which inhibits the development of Th17 cells and host defense. These effects correlate with inefficient bacterial clearance and progressive skin infection in diabetics. These findings suggest new therapeutic opportunities for treating skin infections in diabetics.

After being activated by infectious or inflammatory stimuli, DCs upregulate the expression of maturation marks as they migrate to lymph nodes in a CCR7-dependent manner (Legler, Krause et al. 2006). Migrating mature DCs initiate adaptive immune responses through presentation of peripherally acquired antigens to T cells. PGE₂ signaling in Langerhans cells promotes skin immune responses by supporting maturation and migration to skin-draining lymph nodes (Kabashima, Sakata et al. 2003). Notably, initiation of skin immune responses and DC homing is severely impaired in mice lacking the PGE₂ receptor EP4 (Kabashima, Sakata et al. 2003), highlighting the importance of PGE₂ in DC-mediated skin immunity.

The influence of hyperglycemia on inhibition of PGE₂ by endothelial cells and defective maturation and function of DCs in diabetes has been reported (Jansen, van Hagen et al. , Kämpfer, Schmidt et al. 2005). It has been shown, as well, that during wound healing, diabetic mouse skin exhibits a decreased capacity to produce PGE₂ (Syeda, Jing et al. 2012). Moreover, diminished production of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism have been described as an abnormality of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in diabetes (Qvist and Larkins 1983). In the current study, we sought to determine if such effects were responsible for decreased skin DC actions and inefficient host defense in diabetes. Consistent with this hypothesis, at a late time point diabetic mice maintained an open lesion, higher bacterial load, and diminished Th17 population in the infected skin compared to nondiabetic mice.

The finding of increased apoptosis during MRSA skin infection directed us to investigate whether efferocytosis by DCs was involved in PGE₂ production and Th17 differentiation during infection. Efferocytosis induces PGE₂ production (Medeiros, Serezani et al. 2009) and is a condition for restricting *M. tuberculosis* replication (Martin, Booty et al. 2012). In addition, it has been shown that, in the absence of microbial signals, efferocytosis induces the differentiation of regulatory T cells; whereas, the phagocytosis of *E. coli*-infected apoptotic neutrophils by DCs induces Th17 cell differentiation (Torchinsky, Garaude et al. 2009). Thus, apoptosis during bacterial infection has been shown to create a proper cytokine microenvironment promoted by efferocytosis that triggers a Th17 response (Brereton and Blander 2011). Here, we extend these findings to show that efferocytosis of MRSA-infected skin cells in a hyperglycemic environment impairs PGE₂ production, which affects maturation and migration of DCs, and consequently prevents Th17 development.

However, after efferocytosis of MRSA-IAC, we observed a specific reduction of PGE₂ levels in the supernatant of BMDCs cultured in high glucose, which correlated with decreased *Ptges* expression, but not COX enzymes. The possibility that high glucose might influences PGE metabolism or other immunomodulatory prostanoid (PGI₂) was excluded, since we did not detect

any changes in the production of PGE metabolites and 6-keto prostaglandin F_{1a} in the skin of diabetic mice infected with MRSA. These data contrast with previous reports showing that hyperglycemia enhances prostaglandin degradation by increasing the expression and activity of prostaglandin transporter (PGT), leading to diminished PGE₂ levels and angiogenic signaling in diabetic skin (Syeda, Jing et al. 2012). The reasons for such discrepancies are unknown, but it could be due to differences in animal models or cells involved in the inflammatory response during angiogenesis and infection. In addition to reduced PGE₂ production, decreased expression of EP4 by BMDCs after efferocytosis under hyperglycemic conditions has been observed. This effect may be related to the capacity of PGE₂ to enhance its own receptor expression, as it has been previously shown that PGE₂ increases the levels of both *Pgter4* mRNA and protein expression in monocytoid cell lines (Weinreb, Machwate et al. 2001) and bone marrow stromal cells, pointing to a mechanism of autoamplification of PGE₂ action (Mori, Tanaka et al. 1996).

The fact that our results show that a high glucose environment causes similar maturation and migration defects in BMDC from control and diabetic mice suggests that high glucose is the sole driver of the PGE₂/CCR7/Th17 axis during MRSA infection in diabetes. The role of PGE₂ in CCR7 expression has been controversial. Recently, it has been shown that PGE₂ induces CCR7 receptor oligomerization, rather than expression, resulting in an efficient signaling pathway that enhances migration (Hauser, Schaeuble et al. 2016). However, together with other soluble mediators such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, it has been shown that PGE₂ increases CCR7 expression (Scandella, Men et al. 2002). Our data showed that exogenous addition of PGE₂ to medium containing high glucose restored BMDC migration to CCL19/CCL21 chemoattractants and induced CCR7 and CD86 expression, which prompted us to investigate the *in vivo* effects of PGE₂ treatment on host defense against MRSA skin infection in diabetes.

Because of their roles in angiogenesis and wound healing, PGE₂ analogs have been used to treat patients with diabetic neuropathy (Ueno, Yamada et al. 1996). Here, we found that diabetic mice receiving topical misoprostol treatment had decreased lesions and bacterial counts as a consequence of improved dendritic cell migration to skin-draining lymph nodes and enhanced Th17 immunity.

Th17-derived cytokines, such as IL-17A and IL-22, induce secretion of antimicrobial peptides by neutrophils and keratinocytes (Minegishi 2007). We found that topical misoprostol treatment in diabetic mice increased expression of *mbd2* and *mbd3* antimicrobial peptides, which correlates with increased skin Th17 cells after infection. Although we did not explore the mechanism by which misoprostol promotes higher antimicrobial peptide expression or determine the cell source, it has been shown that keratinocytes have a stronger dependence on IL-17 for

expression of antimicrobial peptides than do other cell types (Minegishi 2007). On the other hand, it might be possible that misoprostol directly upregulate anti-microbial peptides expression on keratinocytes, without a particular dependence of IL-17. Therefore, further investigations are needed to fully elucidate the role of PGE₂ in the anti-microbial peptides machinery. Furthermore, it has been shown that COX-2 activity is important for optimal production of human β -defensin 1 and 2 by human keratinocytes *in vitro* (Bernard and Gallo 2010). Therefore, we suggest that improving Th17 responses in diabetic mice promotes skin host defense against MRSA via induction of antimicrobial peptide expression. Indeed, considering the known effects of hyperglycemia in impairing macrophage and neutrophil phagocytosis and killing, which is associated with resistance to antibiotics, it is becoming attractive to consider endogenous antimicrobial peptides as sources of more sustainable antimicrobial agents.

Our data show that PGE₂ equilibrium is a key player in skin host defense. Reduced PGE₂ in diabetic skin impairs DC activation and migration to skin draining lymph nodes compromising the development of adaptive immunity. Delayed priming of Th1 responses against *M. tuberculosis* in pulmonary infections has been previously demonstrated in diabetic mice, although no association with decreased PGE₂ levels or dendritic cell migration were observed (Vallerskog, Martens et al. 2010). In addition, PGE₂ has been shown to direct IL-23 secretion by DCs and be crucial for Th17 development (Boniface, Bak-Jensen et al. 2009).

PGE₂ may have both positive and negative immune regulatory roles, showing opposite effects depending on its concentration, microenvironment, cell type, and receptor subtype (Stevens 1995, Aronoff and Mulla 2006, Medeiros, Peres-Buzalaf et al. 2012). It has been previously described that PGE₂ affects mainly macrophages phagocytosis and killing of bacteria and fungus (Serezani, Ballinger et al. 2008). On the other side, the effects of PGE₂ on macrophage functions in the skin microenvironment are still unclear. Indeed, neutrophils and macrophages in diabetics already have poor phagocytosis and killing capacities, which lead to defective bacterial clearance compared to cells from controls (Alba-Loureiro 2007, Lecube, Pachón et al. 2011). Thus, enhancing endogenous anti-microbial machinery could be an attractive strategy to control bacterial growth when effector functions of innate cells are impaired. Thus, the use of PGE analog may have some limitations as well as delineating levels and mechanisms by which PGE₂ improves skin host defense in diabetics may provide an avenue toward development of an attractive therapeutic target.

In summary, our study provides evidence that PGE₂ production was compromised during recognition of MRSA-IAC by DCs in a hyperglycemic environment. Moreover, topical treatment with misoprostol improved host defense against MRSA by enhancing dendritic cell-mediated

Th17 responses, and expression of antimicrobial peptides. Based on these results, targeting pathways to restore PGE₂ balance in the diabetic skin may be a strategy to improve innate and adaptive immune responses in diabetics skin infections. Identifying and delineating levels and mechanisms by which PGE₂ improves skin host defense in diabetics may provide an avenue toward development of an attractive therapeutic target.

References

- Becker REN, Berube BJ, Sampedro GR, DeDent AC, Wardenburg JB: Tissue-specific Patterning of the Host Innate Immune Response by Staphylococcus aureus α -toxin. *Journal of innate immunity* 2014;6:619-631
- Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R: Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine* 2009;206:535-548
- Brereton CF, Blander JM: The unexpected link between infection-induced apoptosis and a Th17 immune response. *Journal of Leukocyte Biology* 2011;89:565-576
- Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C: Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2012;16:S27-S36
- Cho JS: IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice. *J Clin Invest* 2010;120:1762-1773
- Collins PW: Misoprostol: Discovery, development, and clinical applications. *Medicinal Research Reviews* 1990;10:149-172
- Dryden M, Baguneid M, Eckmann C, Corman S, Stephens J, Solem C, Li J, Charbonneau C, Baillon-Plot N, Haider S: Pathophysiology and burden of infection in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease: focus on skin and soft-tissue infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2015;21, Supplement 2:S27-S32
- Dryden MS: Complicated skin and soft tissue infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010;65:iii35-iii44
- Filgueiras LR, Brandt SL, Wang S, Wang Z, Morris DL, Evans-Molina C, Mirmira RG, Jancar S, Serezani CH: Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes. *Science signaling* 2015;8:ra10
- Gin H, Brottier E, Aubertin J: Influence of glycaemic normalisation by an artificial pancreas on phagocytic and bactericidal functions of granulocytes in insulin dependent diabetic patients. *Journal of clinical pathology* 1984;37:1029-1031
- Hauser MA, Schaeuble K, Kindinger I, Impellizzieri D, Krueger WA, Hauck CR, Boyman O, Legler DF: Inflammation-Induced CCR7 Oligomers Form Scaffolds to Integrate Distinct Signaling Pathways for Efficient Cell Migration. *Immunity* 2016;44:59-72
- Jansen A, van Hagen M, Drexhage HA: Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes. *The Lancet* 345:491-492
- Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW: Infections in patients with diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 1999;341:1906-1912
- Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S: Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* 2003;9:744-749
- Kämpfer H, Schmidt R, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S: Wound Inflammation in Diabetic ob/ob Mice : Functional Coupling of Prostaglandin Biosynthesis to Cyclooxygenase-1 Activity in Diabetes-Impaired Wound Healing. *Diabetes* 2005;54:1543-1551
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK: IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517
- Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E, Groettrup M: Prostaglandin E2 Is Generally Required for Human Dendritic Cell Migration and Exerts Its Effect via EP2 and EP4 Receptors. *The Journal of Immunology* 2006;176:966-973

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie ALJ, Rößner S, Koch F, Romani N, Schuler G: An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 1999;223:77-92

Martin CJ, Booty MG, Rosebrock TR, Nunes-Alves C, Desjardins DM, Keren I, Fortune SM, Remold HG, Behar SM: Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell host & microbe* 2012;12:289-300

Martin CJ, Peters KN, Behar SM: Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control. *Current opinion in microbiology* 2014;0:17-23

Martin Constance J, Booty Matthew G, Rosebrock Tracy R, Nunes-Alves C, Desjardins Danielle M, Keren I, Fortune Sarah M, Remold Heinz G, Behar Samuel M: Efferocytosis Is an Innate Antibacterial Mechanism. *Cell Host & Microbe* 12:289-300

Martinez PJ, Mathews C, Actor JK, Hwang S-A, Brown EL, De Santiago HK, Fisher Hoch SP, McCormick JB, Mirza S: Impaired CD4+ and T-helper 17 cell memory response to *Streptococcus pneumoniae* is associated with elevated glucose and percent glycated hemoglobin A1c in Mexican Americans with type 2 diabetes mellitus. *Translational Research* 163:53-63

Mathers AR, Janelins BM, Rubin JP, Tkacheva OA, Shufesky WJ, Watkins SC, Morelli AE, Larregina AT: Differential Capability of Human Cutaneous Dendritic Cell Subsets to Initiate Th17 Responses. *The Journal of Immunology* 2009;182:921-933

Medeiros A, Peres-Buzalaf C, Fortino Verdan F, Serezani CH: Mediators of Inflammation 2012;2012:13

Medeiros AI, Serezani CH, Lee SP, Peters-Golden M: Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE(2)/EP2 signaling. *The Journal of Experimental Medicine* 2009;206:61-68

Miller LS, Cho JS: Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol* 2011;11:505-518

Minegishi Y: Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007;448:1058-1062

Mori K, Tanaka I, Kotani M, Miyaoka F, Sando T, Muro S, Sasaki Y, Nakagawa O, Ogawa Y, Usui T, Ozaki S, Ichikawa A, Narumiya S, Nakao K: Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP4 subtype: differential regulation in monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 1996;74:333-336

Muller LMAJ, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AIM, Rutten GEHM: Increased Risk of Common Infections in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Clinical Infectious Diseases* 2005;41:281-288

Novelli M, Savoia P, Cambieri I, Ponti R, Comessatti A, Lisa F, Bernengo MG: Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Clinical and experimental dermatology* 2000;25:423-431

Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM: Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:3-13

Qvist R, Larkins RG: Diminished production of thromboxane B2 and prostaglandin E by stimulated polymorphonuclear leukocytes from insulin-treated diabetic subjects. *Diabetes* 1983;32:622-626

Scandella E, Men Y, Gillissen S, Förster R, Groettrup M: Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002;100:1354-1361

Schauber J, Gallo RL: Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:R13-R18

Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M: Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;39:127-132

Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE: Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology and cell biology* 2000;78:91-102

Syeda MM, Jing X, Mirza RH, Yu H, Sellers RS, Chi Y: Prostaglandin Transporter Modulates Wound Healing in Diabetes by Regulating Prostaglandin-Induced Angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 2012;181:334-346

Tan JS, Anderson JL, Watanakunakorn C, Phair JP: Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1975;85:26-33

Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM: Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation. *Nature* 2009;458:78-82

Ueno Y, Yamada N, Koike H, Nishio S: Effects of beraprost sodium and prostaglandin E1 on skin blood flow in diabetic rats and normal dogs. *General Pharmacology: The Vascular System* 1996;27:333-335

Vallerskog T, Martens GW, Kornfeld H: Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. The Journal of Immunology 2010;184:6275-6282
Walt RP: Misoprostol for the Treatment of Peptic Ulcer and Antiinflammatory-Drug-Induced Gastrointestinal Ulceration. New England Journal of Medicine 1992;327:1575-1580
Weinreb M, Machwate M, Shir N, Abramovitz M, Rodan GA, Harada S: Expression of the prostaglandin E2 (PGE2) receptor subtype EP4 and its regulation by PGE2 in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue. Bone 2001;28:275-281

Acknowledgments

This work was supported by National Institutes of Health Grants (NIH HL-103777; R01HL124159-01; T32AI060519; T32DK007519), American Lung Association Senior Training Fellowship, CAPES and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 14/17374-3, 12/23580-0, 11/17611-7). We thank Dr. Ana Paula Moreira Serezani for suggestions.

Guarantor's statement

Dr. C. Henrique Serezani is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DeJani, NN; Serezani, CH, Brandt, SL, Glosson-Byers, N, Medeiros, AI. Performed the experiments: DeJani, NN, Brandt, SL, Wang, S, Piñeros, A. Analyzed the data: DeJani, NN, Piñeros, A, Serezani CH, Medeiros AI, Brandt, SL, Glosson-Byers, N, Piñeros, A. Wrote the paper: DeJani, N.N., Serezani, C.H.

Disclosures

The authors have no conflicts of interest.

Fig. 1. Uncontrolled MRSA skin infection in diabetics correlates with decreased skin PGE₂ and Th17 cells in the infected skin. (A) Control and diabetic mice were infected s.c. with MRSA (5×10^6 CFU). Lesion development was monitored every other day for 7 days. **(B)** Representative images of the skin of diabetic and control mice at day 7 post-infection. **(C-J)** Skin biopsies were collected at day 7 post-infection and isolated cells were examined for bacterial counts **(C)**, expression of CD4 and IL-17A **(D and E)**, and expression of T-bet **(F)** and Foxp3 **(G)** by CD4⁺ lymphocytes. The lymphocyte population was gated on TCRβ⁺CD4⁺ cells. Levels of PGE₂ **(H)**, IL-17A **(I)**, and IL-10 **(J)** were determined by ELISA in skin biopsy homogenates. Data show mean ± SEM of samples from 5-10 mice. *p<0.05 vs control.

Fig. 2. Impaired DC migration and Th17 generation in skin-draining lymph nodes of diabetic mice. (A) Representative dot plots of the DC (CD11c⁺MHCII⁺) population and

histogram of the percentage of FarRed⁺ DCs in the brachial lymph nodes of control and diabetic mice 36 h post-infection. **(B, C)** Percentage and number of migrating DCs (CD11c⁺MHCII⁺FarRed⁺) in the lymph nodes. **(D)** Representative dot plots of the Th17 (CD4⁺IL-17A⁺) population in the brachial lymph nodes 36 h post-infection in control and diabetic mice. **(E, F)** Percentage and numbers of IL-17A-producing CD4⁺ lymphocytes. Data show mean ± SEM of samples from 5-10 mice. *p<0.05 vs control.

Fig. 3. Decreased CCR7 and MHCII expression by Langerin⁺ DCs in diabetic skin during MRSA infection. **(A, B)** Representative dot plots of CD11c⁺CD11b⁺ and Langerin⁺ DCs in the skin of control and diabetic mice 18 h post-infection. **(C)** Percentage of Langerin⁺ DCs in skin of control and diabetic mice 18 h post-infection. Percentage of Langerin⁺ DCs expressing MHC II **(D)**, CD86 **(F)**, or CCR7 **(H)** 18 h post-infection. Intensity of staining (median fluorescence intensity, MFI) of MHC II **(E)**, CD86 **(G)**, and CCR7 **(I)** in Langerin⁺ DCs from diabetics and controls 18 h post-infection. **(J, K)** Percentage of Langerin⁺CCR7⁺ DCs and CCR7 MFI on Langerin⁺ DCs in the skin of naïve control and diabetic mice or 18 h post-infection. Data show mean ± SEM of samples from 5-10 mice. *p<0.05 vs control.

Fig. 4. Exogenous PGE₂ restores CD86 and CCR7 expression in BMDCs cultured in high glucose and incubated with MRSA-IAC. Representative histograms of expression (median fluorescence intensity, MFI) of MHC II **(A)**, CD80 **(B)**, CD86 **(C)**, and CCR7 **(D)**. Fold change in expression (MFI) of MHC II **(E)**, CD80 **(F)**, CD86 **(G)**, and CCR7 **(H)** by BMDCs from control or diabetic mice after efferocytosis of MRSA-IAC compared with inactivated BMDCs from control or diabetic mice. The analyzed populations were gated on CD11c⁺CD11b⁺. Data represent mean ± SEM of at least 3 independent experiments performed in triplicate. *p<0.05 vs control 5 mM glucose, &p<0.05 vs control 25 mM glucose, #p<0.05 vs diabetic 5 mM glucose, %p<0.05 vs diabetic 25 mM glucose.

Figure 5. Exogenous PGE₂ enhances BMDC migration in a CCR7-dependent manner after recognition of MRSA-IAC. **(A)** PGE₂ levels in the supernatants of BMDCs + MRSA-IAC co-cultures after 18 h determined by EIA. **(B)** Number of migratory BMDCs using flow cytometry acquisition software. **(C)** Representative images of migrating BMDCs. Data represent mean ± SEM of at least 3 independent experiments performed in triplicate. *p<0.05 control vs 5 mM glucose, §p<0.05 control vs 25 mM glucose, #p<0.05 diabetic control vs diabetic 5 mM glucose, %p<0.05 diabetic control vs diabetic 25 mM glucose.

Fig. 6. Misoprostol improves DC migration and Th17 development in skin-draining lymph nodes in diabetes. (A) Representative histograms of the percentage of migrating DCs in the brachial lymph nodes of MRSA infected control or diabetic mice treated or not with misoprostol. (B) Representative dot plots of the percentage of Foxp3 and IL-17A expressing T lymphocytes in the brachial lymph nodes of control and diabetic mice treated or not with misoprostol. (C) Percentage of migrating DCs (CD11c+FarRed+) in the brachial lymph nodes. The percentage of intracellular IL-17A (D), Foxp3 (E) and IFN- γ (F) producing TCR β^+ CD4 $^+$ T lymphocytes determined by FACS analysis. Data show mean \pm SEM of samples from 5-10 mice. *p<0.05 vs control and #p<0.05 vs untreated diabetic.

Fig. 7. Topical misoprostol decreases MRSA-skin infection in diabetics. (A) Lesion and abscess size are represented by affected area in mm 3 as described in Materials and Methods. (B) Bacterial load determination in the skin of diabetic mice treated or not with misoprostol at day 7 after infection. (C) Representative dot plots of the percentage of Foxp3 and intracellular IL-17A expressing T lymphocytes determined by FACS analysis. Percentage and number of IL-17A (D, E), Foxp3 (F, G), and IFN- γ (H, I) expressing TCR β^+ CD4 $^+$ lymphocytes determined by FACS analysis. mRNA expression of *β -defensin1* (J), *β -defensin2* (K), *β -defensin3* (L), *β -defensin4* (M), *β -defensin 5* (N) and *Cramp* (O). Results represent mean \pm SEM of samples from 5-10 mice. *p<0.05 vs control, #p<0.05 vs untreated diabetic.

Figure 1

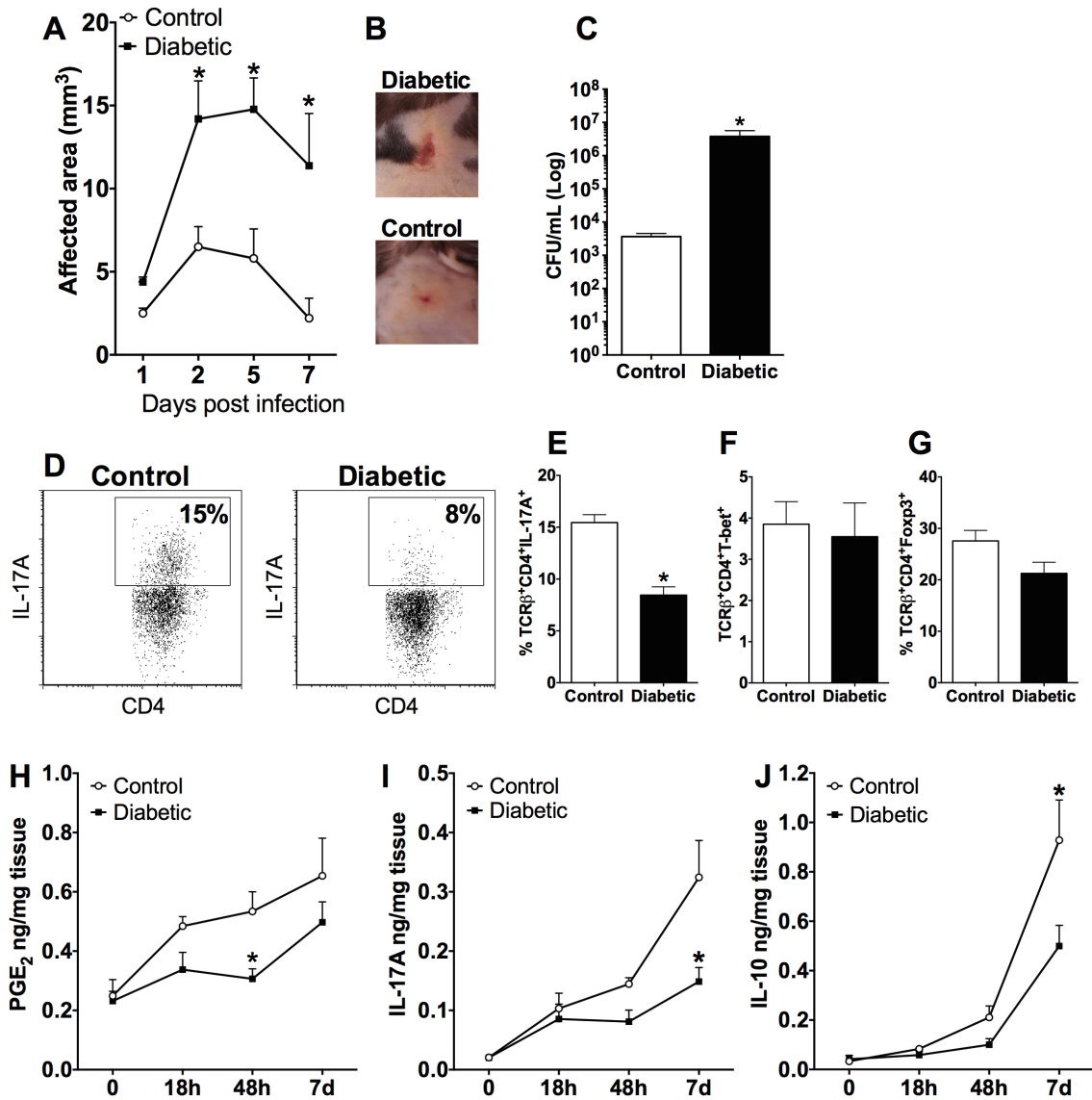


Figure 2

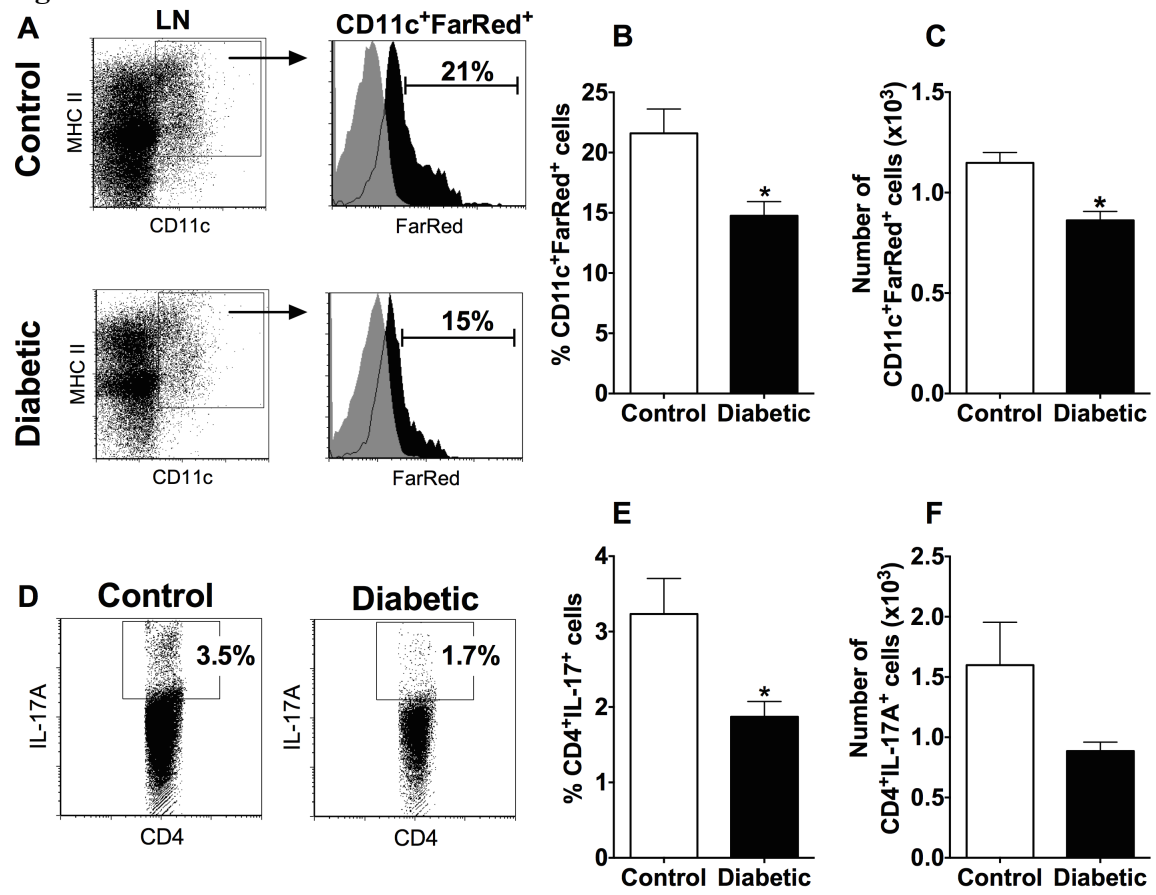


Figure 3

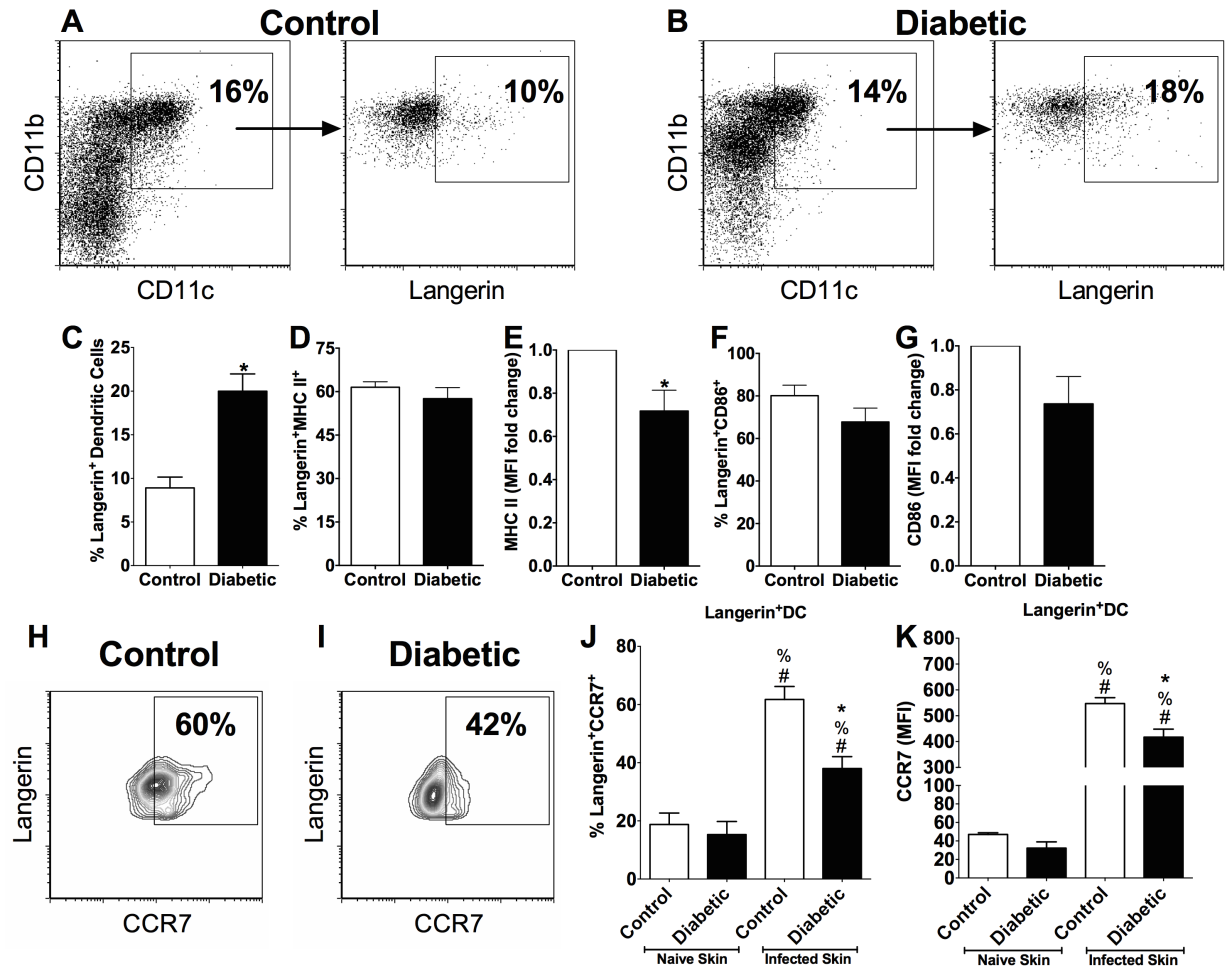


Figure 4

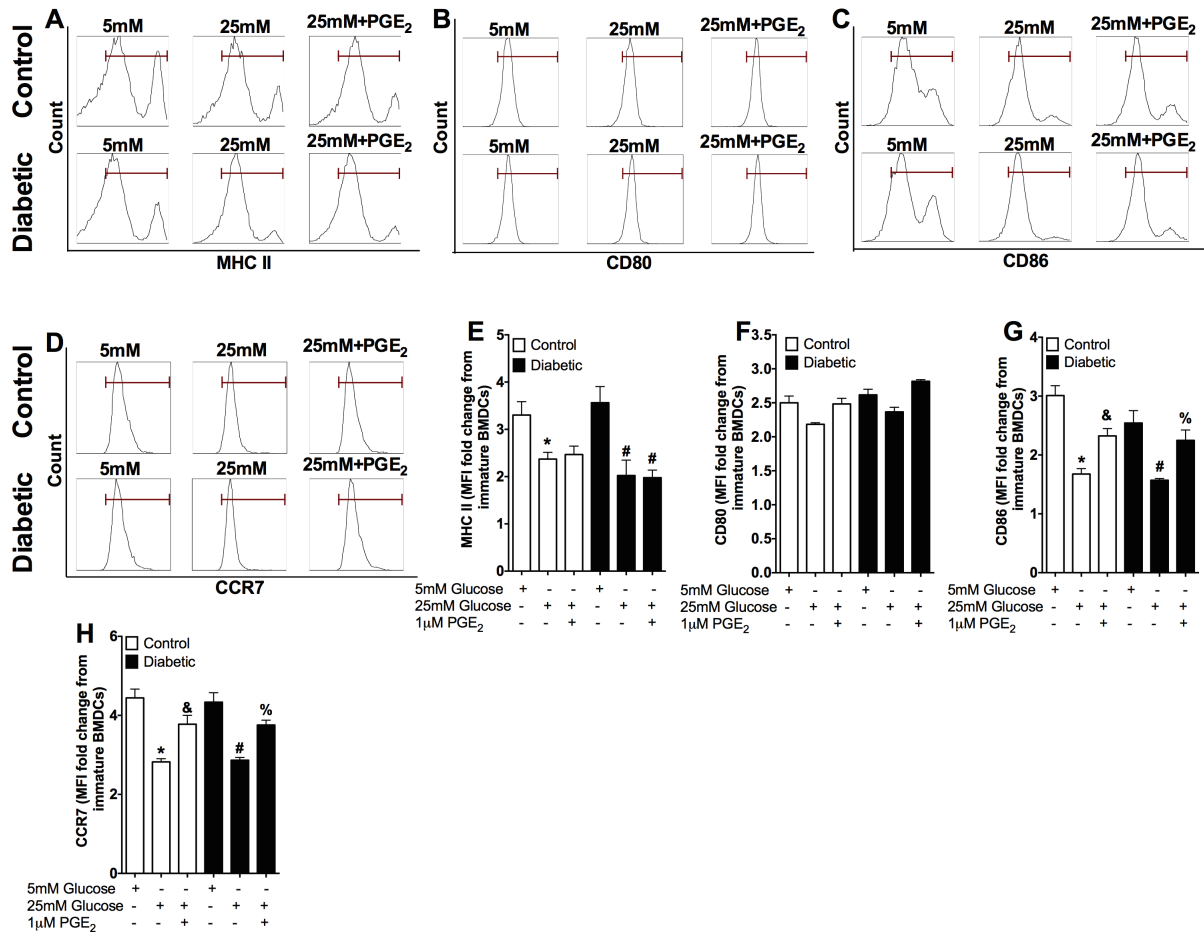
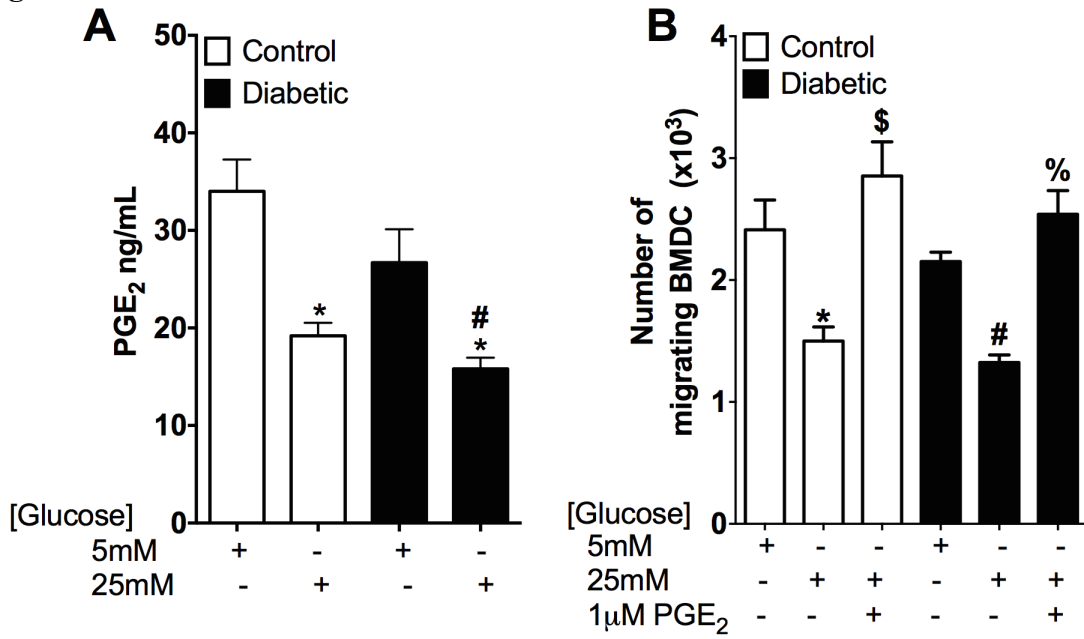
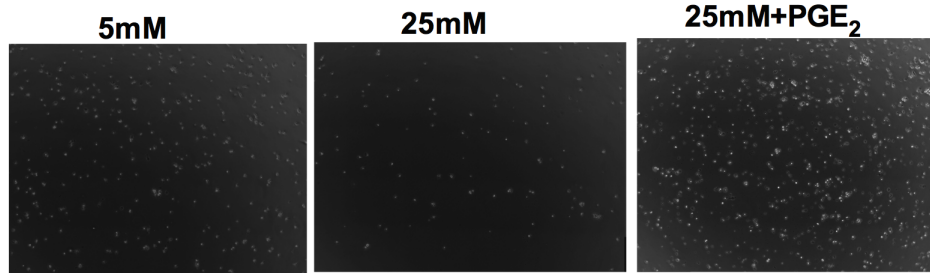


Figure 5



C Control



Diabetic

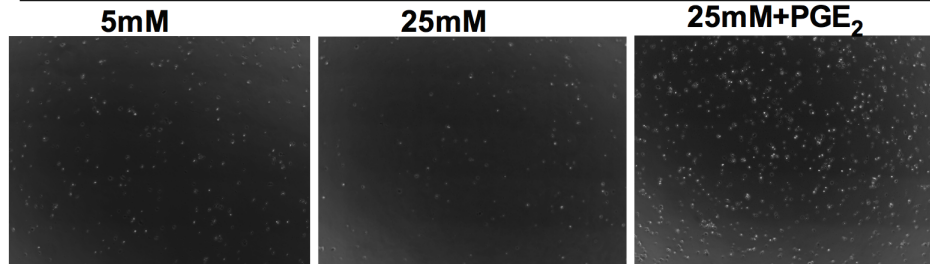


Figure 6

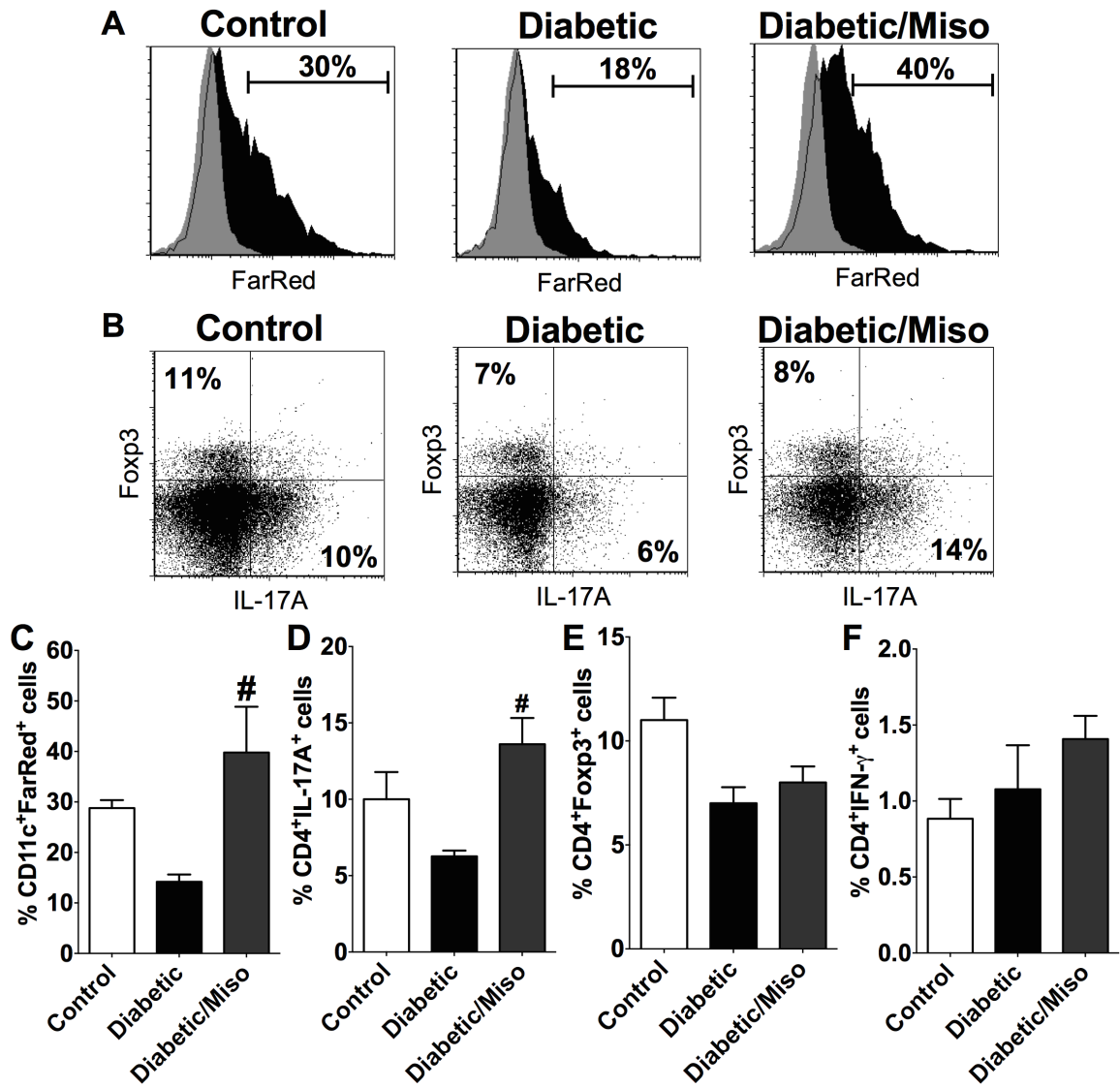
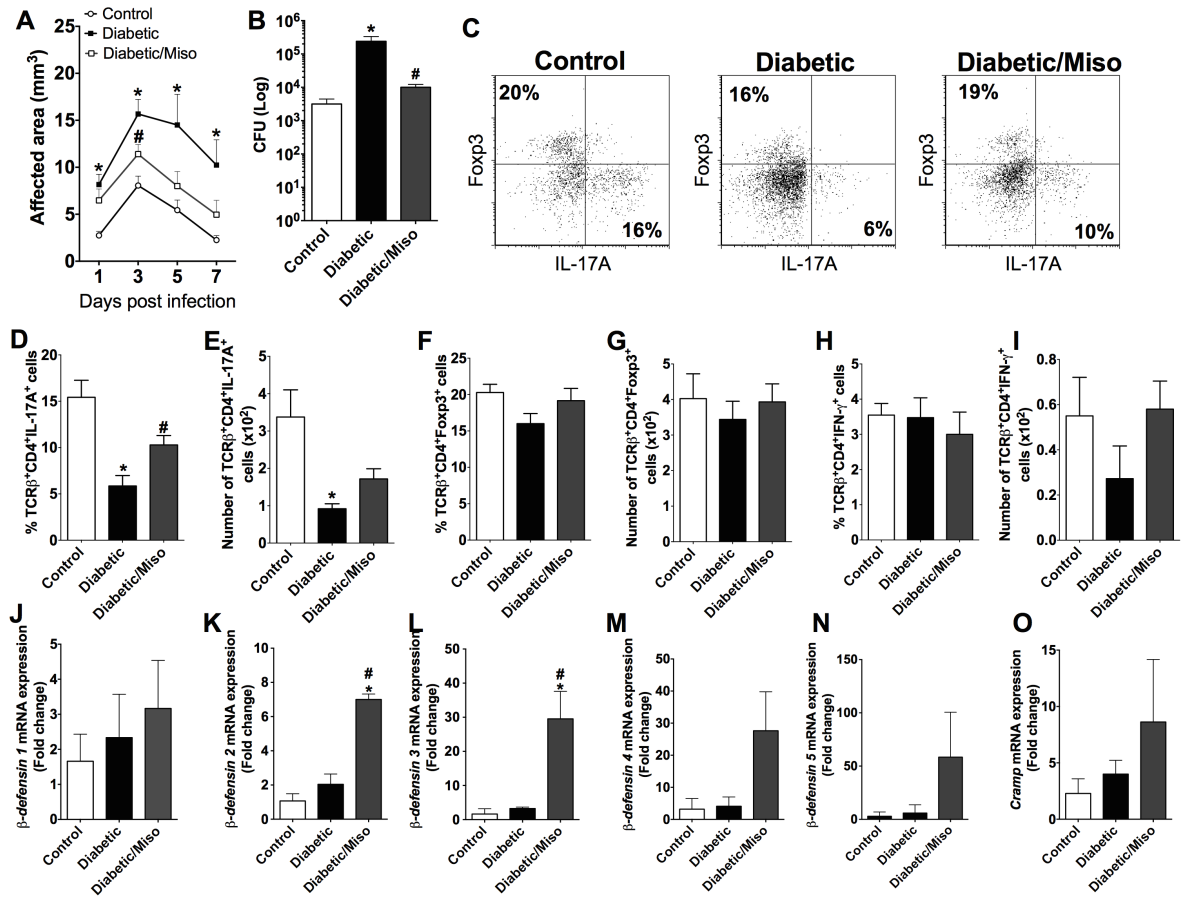


Figure 7



Supplementary Information
Sup. Fig. S1

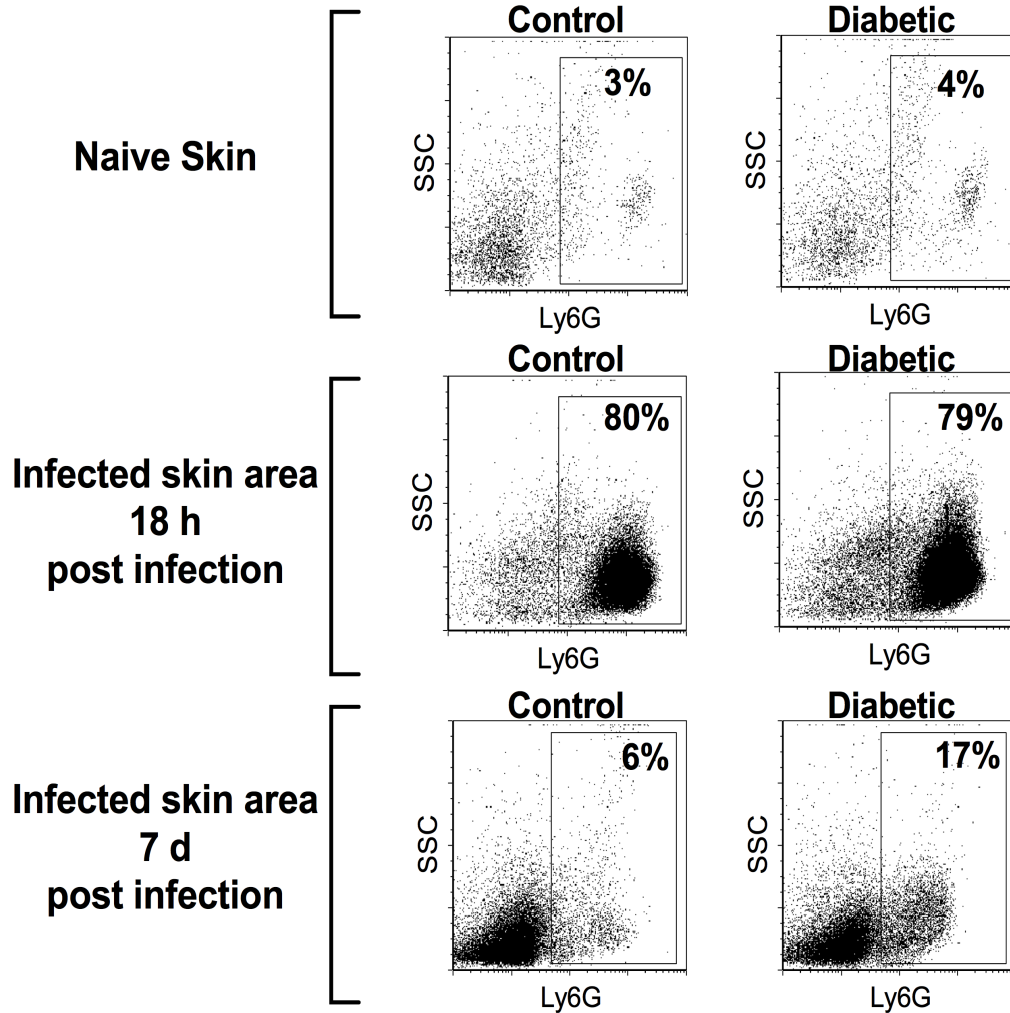


Figure S1. Diabetic mice exhibit a persistent neutrophil recruitment to the affected skin during MRSA infection. (A) Percentage of neutrophils in the naïve skin of control and diabetic mice determined by FACS analysis. (B) Percentage of neutrophils in the infected skin of control and diabetic mice 18 h post MRSA infection determined by FACS analysis. (C) Percentage of neutrophils in the infected skin of control and diabetic mice 7 d post MRSA infection determined by FACS analysis. Data show mean \pm SEM from 5-10 mice. * $p < 0.05$ vs control.

Sup. Fig. S2

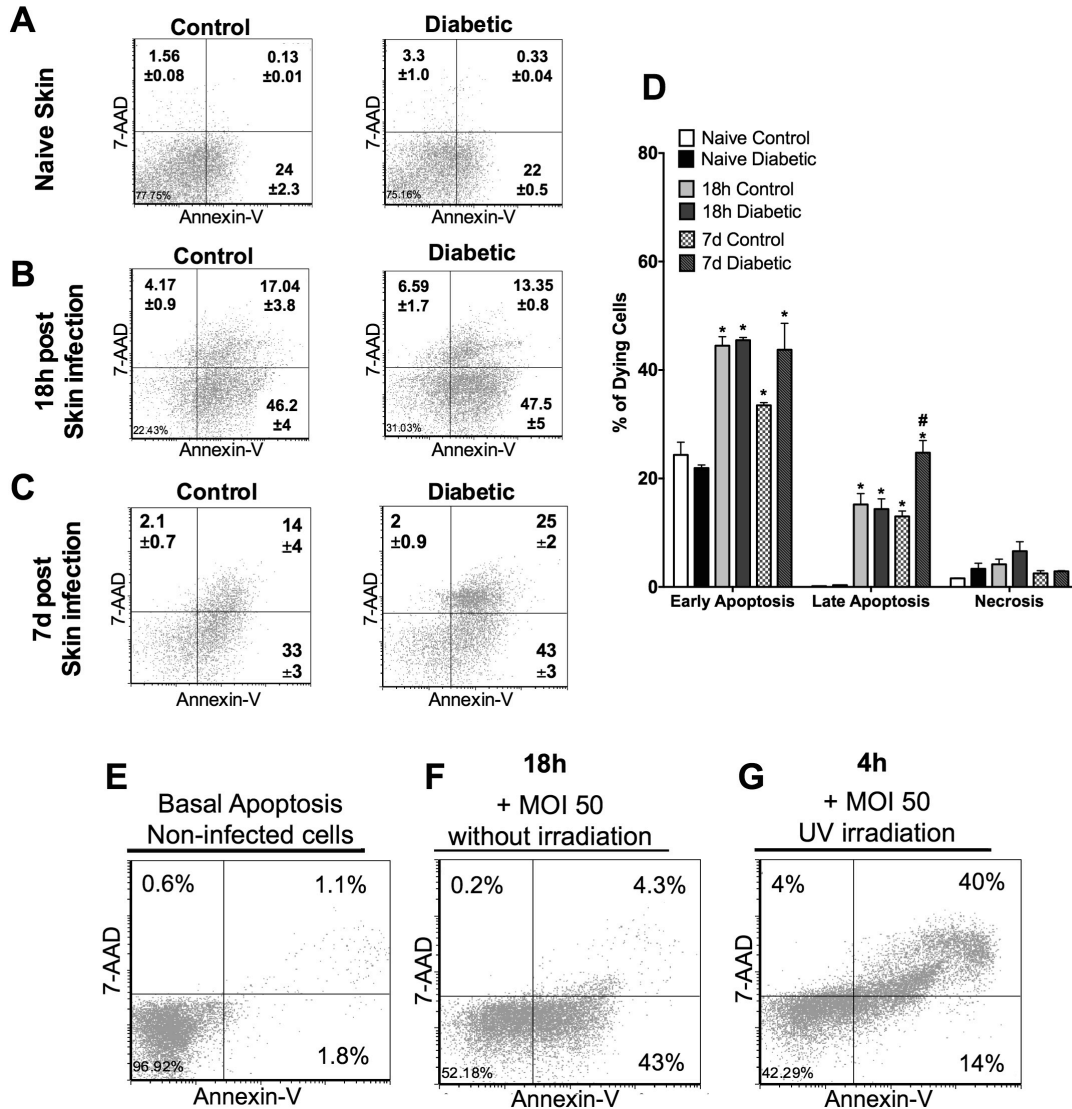


Figure S2. MRSA infection induces apoptosis in the infected skin of control and diabetic mice and in a human neutrophil-like cell line in vitro. (A, B, C) Representative dot plots of apoptotic cells stained with 7-AAD and Annexin V, and **(D)** percentage of early (Annexin-V⁺) and late apoptosis (Annexin-V⁺ 7-AAD⁺) and necrosis (7-AAD⁺) in naïve and infected skin of control and diabetic mice after 18 h and 7 d of MRSA infection determined by FACS analysis. **(E)** Representative dot plots showing basal apoptosis in neutrophil-like HL-60 cells. **(F)** Number of apoptotic cells after 18 h of MRSA infection and **(G)** number of apoptotic cells after 4 h MRSA infection and UV irradiation. Representative dot plots of 3 independent experiments. **p*<0.05 vs naïve control and diabetic. #*p*<0.05 vs 7d control (late apoptosis).

Sup. Fig. S3

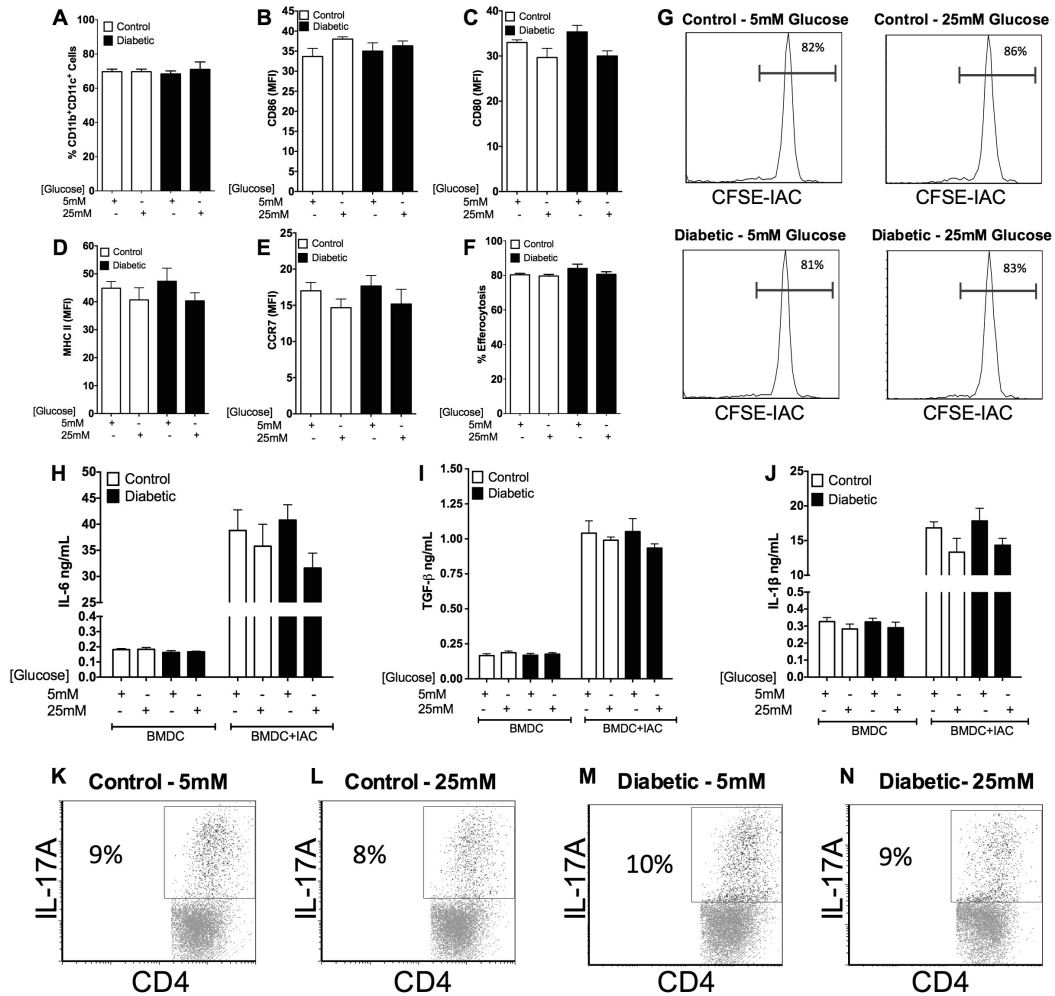


Figure S3. High Glucose does not influence BMDC phenotype after recognition of MRSA-IAC. (A) Percentage of CD11b⁺CD11c⁺ BMDCs after 7 days of differentiation in 5 mM or 25 mM of glucose. Expression of CD86 (B), CD80 (C), MHC II (D), and CCR7 (E) analyzed by FACS on BMDCs at day 7 of differentiation. (F) CD11b⁺CD11c⁺-mediated efferocytosis of CFSE labeled MRSA-IAC (1:3 ratio) for 18 h in 5 mM or 25 mM glucose. (G) Representative histograms showing percentage of CFSE⁺CD11b⁺CD11c⁺ BMDCs. Quantification of (H) IL-6, (I) TGF-β, and (J) IL-1β levels in supernatants of BMDCs incubated or not with MRSA-IAC for 18 h determined by ELISA. (K-N) Representative dot plots of the expression of IL-17A by T lymphocytes differentiated with supernatants from co-cultures of BMDCs with MRSA-IAC. Data are mean ± SEM (A-F; H-J), representative histograms (G) or representative dot plots (K-N) of 3 independent experiments.

Sup. Fig. S4

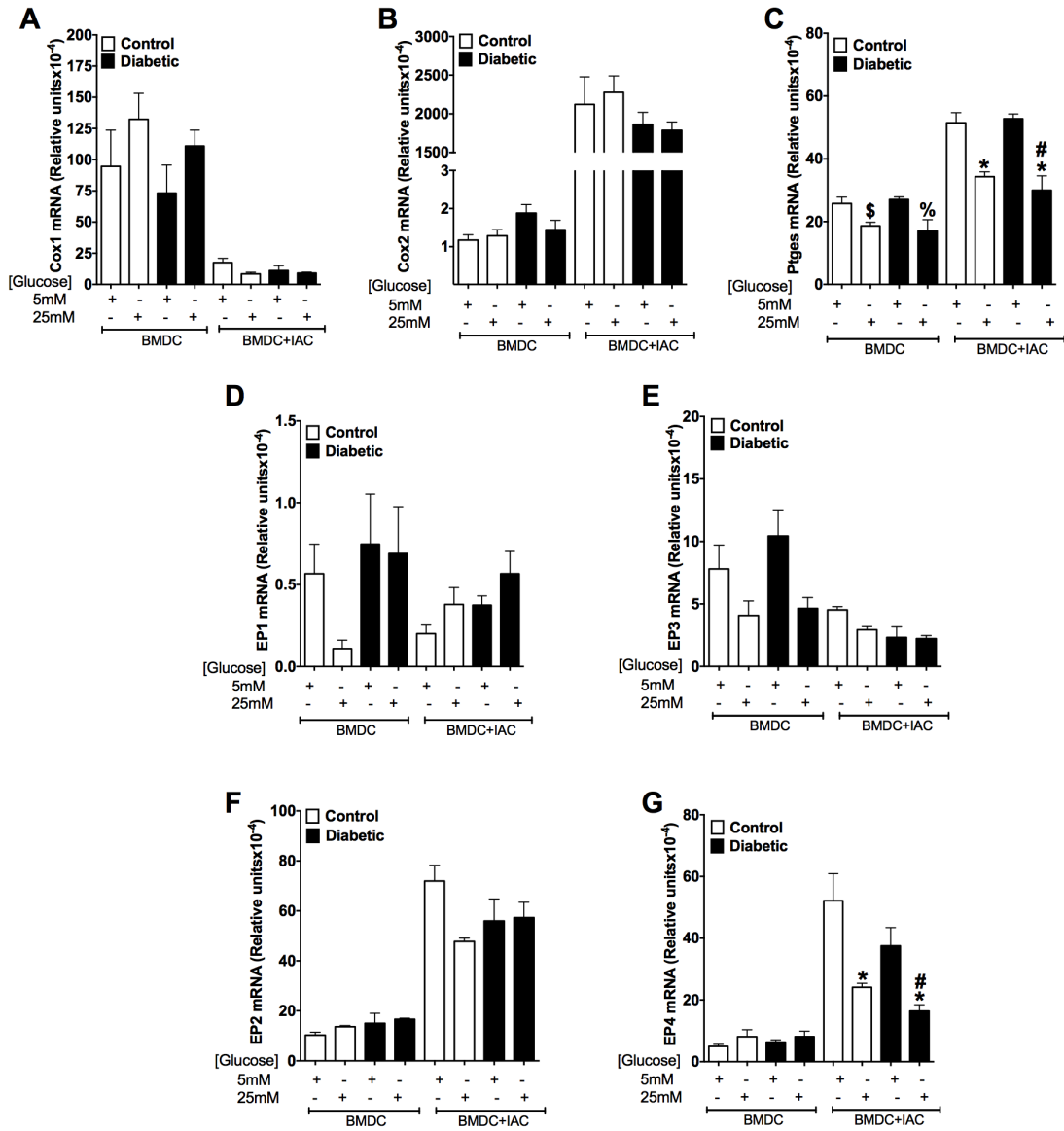


Figure S4. High glucose inhibits PGE₂ synthase (*Ptges*) expression. (A) *Cox-1*, (B) *Cox-2*, (C) *Ptges*, (D) *Ptger1*, (E) *Ptger3*, (F) *Ptger2*, and (G) *Ptger4* mRNA expression by BMDCs from control or diabetic mice co-incubated or not with MRSA-IAC (1:3 ratio) for 18 h in 5 mM or 25 mM glucose determined by real time PCR. Data represent mean ± SEM from 3-5 individual experiments, each performed in triplicate. \$*p* < 0.05 vs BMDC control 5mM. %*p* < 0.05 vs BMDC diabetic 5mM. **p* < 0.05 vs BMDC+IAC control 5mM. #*p* < 0.05 vs BMDC+IAC diabetic 5mM.

Sup. Fig. S5

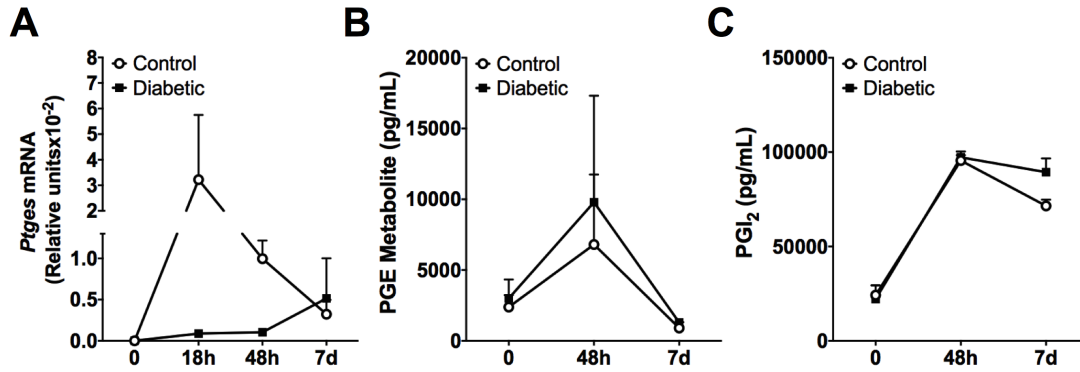


Figure S5. *Ptges* expression is decreased in diabetic skin after MRSA infection. (A) At different time points post-infection the expression of *Ptges* mRNA was analyzed in the skin of control and diabetic mice by qPCR. (B, C) Levels of PGE metabolite and 6-keto prostaglandin F1a were quantified in the naïve skin of control and diabetic mice as well as at 48 h and 7 d post-infection. Data show mean \pm SEM from 2-4 mice.

Sup. Fig. S6

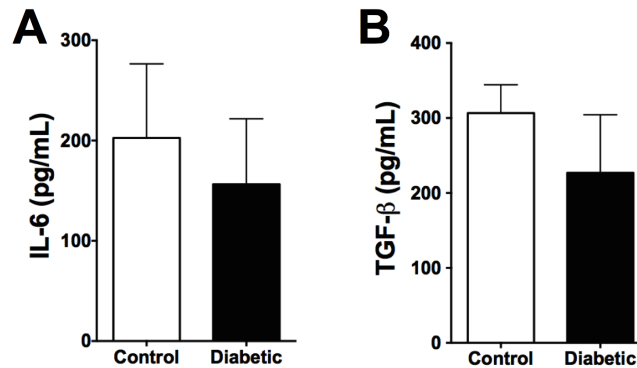


Figure S6. Hyperglycemia does not modulate TGF- β and IL-6 levels in the skin. (A, B) Levels of IL-6 and TGF- β were determined in the skin of control and diabetic mice at 18 h post-infection. Data show mean \pm SEM from 4-5 mice.

Sup. Fig. S7

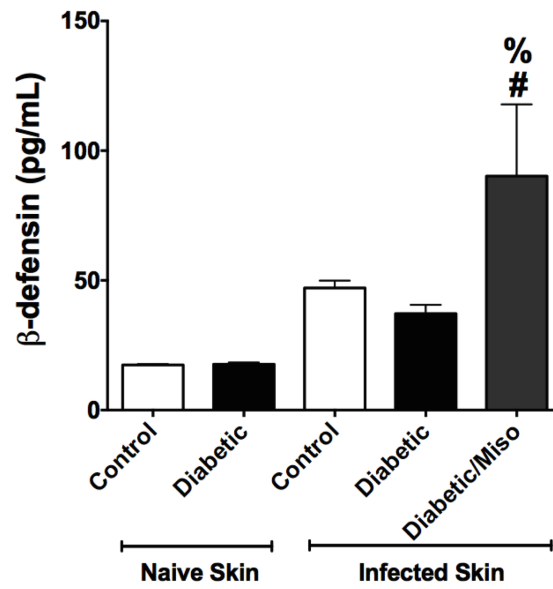


Figure S7. Misoprostol treatment enhances β -defensin 3 production. Levels of β -defensin 3 were quantified by Elisa in the naïve skin of control and diabetic mice, and in the skin of control, diabetic and diabetic treated with topical misoprostol mice at 7 d post-infection. Data show mean \pm SEM from 4-5 mice. [#] $p < 0.05$ vs control naïve skin. [%] $p < 0.05$ vs diabetic naïve skin.