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

Felipe Fortino Verdan da Silva

Prostaglandina E2 inibe a diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas

Ribeirão Preto 2015 Felipe Fortino Verdan da Silva

Prostaglandina E2 inibe a diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

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

Ribeirão Preto 2015 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Verdan, Felipe Fortino

Prostaglandina E2 inibe a diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas

Ribeirão Preto, 2015.

174 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. Prostaglandina E2; 2. Apoptose; 3. Eferocitose; 4. Th17.

Nome: Felipe Fortino Verdan da Silva

Título: Prostaglandina E2 inibe a diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas

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

Aprovado em: 16 de novembro de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Drof Dr	Instituição
F101. DI.	
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular das Infecções Pulmonares na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo № 2011/20199-0.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota"

Madre Teresa de Calcuta

Dedicatória

A Deus

Pai, obrigado pela benção de conquistar mais um ciclo de minha vida. Agradeço pela força diária necessária para enfrentar as provas do dia a dia. Que todos os obstáculos e dores de meu caminho sejam revertidos em força e sabedoria. Guie-me com sua luz.

À minha família (Pai - Valter, Mãe - Rosa, Irmão - Raphael)

"Uma vida sem amor não vale nada. E amar se aprende em casa, com os pais e os irmãos.

A família é a primeira escola do amor. O lar é o lugar mais abençoado do mundo. Digo-lhe de coração: ame sua família! O lar é o primeiro espaço para a vida, a primeira escola do amor, o lugar providencial onde se aprende o exercício da fraternidade. Faça de seu lar um lugar de paz e alegria!"

Jesus Cristo

À minha Esposa Yara

Pela pessoa essencial que você se tornou em minha vida. A melhor companheira, minha motivação para buscar sempre o melhor em mim.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente e principalmente à minha orientadora Professora Dra Alexandra Ivo de Medeiros, que me deu todo o suporte necessário para a prosseguimento e conclusão de meu doutorado.

Ao Professor Dr Mark Kaplan pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo suporte. Agradeço ao casal Henrique e Ana Serezani pela ajuda essencial para minha ida aos EUA.

Agradeço aos amigos do laboratório, que tiveram juntos nos momentos de experimentos e lazer.

Agradeço aos amigos da pós graduação de Imunologia Básica e Aplicada pelo carinho e ensinametos compartilhados. Foi uma honra fazer parte dessa turma.

Aos amigos da Universidade de Indiana pela recepção e pelas boas experiências. Agradeço especialmente ao pós doc Matt Olson pela supervisão e ensinamentos.

Aos amigos da vida, por me apoiarem e terem a paciência pela minha constante ausência em nome da ciência.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- Número

AC – Célula apoptótica

AMPc - Adenosina mono fosfato cíclica

BAI1 - Brain-specific angiogenesis inhibitor 1

CM - Meio Condicionado

CFU - Unidades formadoras de colônia

COX – Ciclo-oxigenase

CD3 – Cluster of differentiation 3

CD28 – Cluster of differentiation 28

CD80 – Cluster of differentiation 80

CD86 – Cluster of differentiation 86

CCR7 – Receptor de quimiocina C-C tipo 7

CCL19 – Quimiocina (domínio C-C) ligante 19

CCL21 – Quimiocina (domínio C-C) ligante 21

CXCL1 – Quimiocina (domínio C-X-C) ligante 1

DC – Célula Dendrítica

EP1, EP2, EP3, EP4 – Receptor de prostaglandina E 1, 2, 3 ou 4

Epac - Proteína de troca de nucleotídeo guanina ativada por AMPc

FcR - Receptores de Fc

FOXP3 - Forkhead box P3

Gas6 - Growth arrest-specific 6

GPCRs - Receptores associados a proteína G

IL – Interleucina

IFN-γ – Interferon gamma

IL-1R - Receptor de interleucina 1

IL-23R – Receptor de interleucina 23

IRF-4 – Interferon regulatory factor 4

MAMP - Padrão molecular associado ao micróbio

MIP-1α - Macrophage Inflammatory Protein 1α

MFG-E8 - Milk fat globule-EGF factor 8 protein

MHC-II - Complexo de histocompatibilidade principal classe II

Myd88 - Myeloid differentiation primary response gene 88

- PAF Fator de Agregação Plaquetária
- PAMP Padrão molecular associado ao patógeno
- PC Fosfatidilcolina
- PE Fosfatidiletanolamina
- PS Fosfatidilserina
- PC-OX Fosfatidilcolina oxidada
- PS-OX Fosfatidilserina oxidada
- PI Iodeto de Propídeo
- PI3K Posfatidilinositol-3-quinase
- PRRs Receptores de reconhecimento de padrão
- PSR Receptor de fosfatidilserina
- PG Prostaglandina
- PLA2 Fosfolipase A2
- cPLA2 Fosfolipase A2 citosólica
- PGH2 Prostaglandina H2
- PGI₂ Prostaglandina I2
- PGF₂ Prostaglandina F2
- PGD₂ Prostaglandina D2
- PGE₂ Prostaglandina E2
- cPGES PGE sintase do citosol
- mPGES-1 e mPGES-2 PGE sintases de membrana 1 e 2
- PKA Proteína quinase A
- ROS Espécies reativas do oxigênio
- STAT3 Signal transducer and activator of transcription
- TLR Receptor do tipo toll
- TCR Receptor de célula T
- TRIF TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
- Tim1 T-cell immunoglobulin and mucin domain 1
- Tim4 T-cell immunoglobulin and mucin domain 4
- **TGF-** β Fator de crescimento tumoral
- **TNF-** α Fator de necrose tumoral
- TxA2 Tromboxana A2
- Th17 Célula T auxiliadora 17
- Th1 Células T auxiliadora 1

Treg – Células T reguladoras **nTreg** - Células Treg naturais **iTreg** - Células Treg induzidas

UV - Ultravioleta

Lista de figuras

Figura 1. Síntese de prostanóides
Figura 2. Receptores de PGE2 e suas ações em macrófagos
Figura 3. Hipótese
Figura 4. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea
Figura 5. As células diferenciadas apresentaram características fenotípicas de células dendríticas imaturas
Figura 6. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula
óssea
Figura 7. Avaliação da taxa de infecção e perfil de morte celular do exsudado peritoneal.
Figura 8. Células dendríticas (DC) são capazes de fagocitar células apoptóticas infectadas (AC ^{+E.coli})
Figura 9. Comparação da taxa de infecção de células Raw 264.7 nos diferentes tempos de infecção de acordo
com a proporção de E.coli-GFP
Figura 10. Apoptose de MØ ^{+E.coli}
Figura 11. DC são capazes de fagocitar AC ^{+E.coli}
Figura 12. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove a ativação de células
dendríticas
Figura 13. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove produção de mediadores específicos para a
diferenciação de células Th17 e mediadores anti-inflamatórios
Figura 14. A fagocitose de células apoptóticas infectadas aumenta a expressão de CCR7 em
células dendríticas
Figura 15. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove a migração de células dendríticas 68
Figura 16. PGE ₂ é produzida durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas por DC 70
Figura 17. Produção de IL-1 β e IL-6 por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas
infectadas.
Figura 18. Produção de TGF-B por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas
infectadas
Figura 19. PGE ₂ é produzida durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas por DC 75
Figura 20. Produção de IL-6 TGF-β por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas
infectadas
Figura 21. Produção de IL-1 β e IL-23 por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas
Figura 22 Antagonista de EP4 aumenta a diferenciação de células Th17 80
Figura 22. Antagonista de EP4 aumenta a diferenciação de células Th17 mesmo na condição
CM

Figura 24. Agonista de EP4 inibe a diferenciação de células Th17 na condição CM ^{+Indo}	82
Figura 25. PGE_2 atua via receptor EP4 para regulação negativa da diferenciação de	linfócitos
Th17	84
Figura 26. PGE ₂ atua via receptor EP4 para inibição da produção de IL-17A	85
Figura 27. PGE ₂ inibe a diferenciação de células Th17 em termos de número de células	86
Figura 28. Antagonista de EP4 aumenta a diferenciação de células Th17 na condição CM ^{mice}	
Figura 29. Antagonista de EP4 aumenta a expressão de IL-17A e RORγT	89
Figura 30. Antagonista de EP4 aumenta a produção de IL-17A na condição CM ^{mice}	90
Figura 31. Efeito supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17 <i>in vivo</i> – Pulmão	93
Figura 32. Efeito supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17 in vivo – Linfonodo cervical	96
Figura 33. Inibição de PGE2 resulta no aumento da migração de neutrófilos e diminuição da recuper	ração de E.
<i>coli</i> no pulmão	97
Figura 34. PGE ₂ regula a diferenciação de células Th17 no contexto da fagocitose de células a	apoptóticas
infectadas por célula dendríticas	106
Figura suplementar 1. Imagens Ilustrativas da infecção dos MØ por <i>E.coli</i> -GFP	108
Figura suplementar 2. Confirmação da internalização de <i>E.coli</i> -GFP pelos MØ	110
Figura suplementar 3. Ensaio de diferenciação de células T	111
Figura suplementar 4. O CM promove a diferenciação de células Th17	112
Figura suplementar 5. Ensaio de adição exógena de PGE ₂ na diferenciação de células Th17	113
Figura suplementar 6. A adição de PGE ₂ inibe a diferenciação de células Th17	114
Figura suplementar 7. Inibição da diferenciação de células Th17 por PGE2 na condição de 4 µ	ıg/poço de
αCD3	115
Figura suplementar 8. Gráficos de citometria ilustrativos da inibição de Th17 por PGE ₂	116
Figura suplementar 9. Antagonista de EP4 aumenta os diferenciação de células Th17	117
Figura suplementar 10. O tratamento com indometacina não altera a fagocitose de AC ^{+E.coli} por DC	118

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. RECONHECIMENTO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS	19
1.2. Efeito da Eferocitose na Modulação da Resposta Imune	22
1.3. Células Th17	23
1.4. PGE ₂ na modulação da Resposta Imune	25
1.5. PGE ₂ e Imunidade Inata	30
1.6. PGE ₂ e Imunidade Adaptativa	30
2. HIPÓTESE DE ESTUDO E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2.1. Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Animais	37
3.2. Bactérias Escherichia coli	37
3.3. DIFERENCIAÇÃO DE DC A PARTIR DE PRECURSORES DE MEDULA ÓSSEA (BMDC)	38
3.4. G ERAÇÃO DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS (AC ^{+E.coli})	39
3.4.1. AC ^{+E.coli} proveniente de células animais – <i>ex vivo</i>	39
3.4.2. AC ^{+E.coli} proveniente de células de linhagem Raw 264.7 – <i>in vitro</i>	41
3.5. Ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas (AC ^{+E.coli}) por células dendríticas	42
3.6. Ensaio de Migração	43
3.7. Ensaio de diferenciação de células T	44
3.8. Ensaio <i>in vivo</i>	45

3.8.1. Infecção com <i>E. coli</i> e instilação dos animais com células apoptóticas infectadas	45
3.8.2. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TH17 E TRATAMENTO COM INDOMETACINA IN VIVO	46
3.8.3. Obtenção de células do parênquima pulmonar, linfonodos cervicais e do mediastino	46
3.8.4. Homogenato do pulmão	47
3.9. Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares por citometria de fluxo) 47
3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	48
3.11. Análise estatística	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Eficiência do processo de diferenciação de células dendríticas	51
4.2. GERAÇÃO DAS CÉLULAS APOPTTÓTICAS INFECTADAS (AC ^{+E.coli})	55
4.2.1. AC ^{+<i>E.coll</i>} provenientes de células animais - <i>ex vivo</i>	55
4.2.2. GERAÇÃO ALTERNATIVA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS - AC ^{+E.coli} proveniente de células de	
LINHAGEM RAW 264.7 – <i>IN VITRO</i>	58
4.3. A FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS PROMOVE A ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS	
DENDRÍTICAS IN VITRO	62
4.4. A FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS INDUZ A PRODUÇÃO DE PGE2 JUNTAMENTE COM	IL-6
е TGF-в	69
4.4.1. CM^{MICE} - $AC^{+E.COLI}$ proveniente de células animais – <i>ex vivo</i>	69
4.4.2. CM ^{RAW} - AC ^{+E.COLI} PROVENIENTE DE CÉLULAS DE LINHAGEM RAW 264.7 – <i>IN VITRO</i>	74
4.5. A PGE ₂ proveniente da fagocitose de células apoptóticas infectadas por DC inibe a	
DIFERENCIAÇÃO DE TH17 VIA RECEPTOR EP4	78
4.6. A inibição <i>in vivo</i> de PGE ₂ no contexto de eferocitose de AC ^{+E.coli} aumenta a diferenciação d	ЭE
células Th17, promove o recrutamento de neutrófilos e diminuição da carga bacteriana no	
PULMÃO.	91
5. DISCUSSÃO	99
6. CONCLUSÃO	105
6.1. Avaliar a capacidade de migração de células dendríticas após a fagocitose de células	
APOPTÓTICAS INFECTADAS IN VITRO E IN VIVO;	105
6.2. Influência dos níveis de PGE2, oriunda da fagocitose de diferentes proporções de células	
APOPTÓTICAS INFECTADAS, NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TH17;	105

6.3. Avaliação do envolvimento de PGE $_2$ e seus receptores na diferenciação de células Th17	
ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA CONDICIONADO ORIUNDO DA FAGOCITOSE DE CÉLULAS	
APOPTÓTICAS INFECTADAS (CM);	105
6.4. Avaliar o envolvimento de PGE ₂ <i>in vivo</i> na diferenciação de células Th17 pela instilação	DE
CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS;	105
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	108
8. REFERÊNCIAS	121
ANEXO A - MANUSCRITO EM ELABORAÇÃO	168
ANEXO B - STABILITY OF TH9 CELLS: ROLE OF STAT3 - INDIANA UNIVERITY-PURDUE	
UNIVERSITY INDIANAPOLIS (IUPUI)	141
ABSTRACT	129
1. INTRODUCTION	130
3. RESULTS AND DISCUSSION	133
3.1. Long term Th9 cultures	133
3.1.1. TH9 ARE NOT CAPABLE OF MAINTAINING IL-9 PRODUCTION OVER TIME	133
3.1.2 IL-10 AND PSTAT3 CORRELATES NEGATIVELY WITH IL-9	133
3.1.3 The absence of Stat3 in T cells promotes the maintenance of Th9 phenotype	137
3.1.4. THE ABSENCE OF STAT3 ALTERS THE TRANSCRIPTION FACTORS ASSOCIATED TO TH9 PHENOTYPE	139
3.1.5. The absence of Stat3 in T cells promotes Th9 phenotype under Th2 differentiation culture	141
3.1.6. The absence of Stat3 alters the transcription factors associated with a Th9 phenotype	143
3.1.7. BLOCKING IL-10 BUT NOT IL-21 AMELIORATES TH9 DIFFERENTIATION	145
3.1.8. BLOCKING IL-6 DOES NOT AFFECT TH9 DIFFERENTIATION	147
3.1.9. IL-10R DEFICIENT T CELLS HAVE BETTER TH9 DIFFERENTIATION	149
3.1.10. FOXP3 IS ELEVATED ON S3KO CELLS	151
3.1.11. KEEPING HIGH IRF4 SEEMS IMPORTANT FOR IL-9+ MAINTENANCE	153
3.2. THE MONENSIN HISTORY	157
4. CONCLUSION	161
5. MATERIAL AND METHODS	162

5.3. QUANIITATIVE KI-PCK 5.4. Intracellular cytokine and Transcription factor co-staining	163
	100
6. REFERENCES	16

VERDAN, F. F. Prostaglandina E2 inibe a diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas. 2015. 174 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Resumo

A fagocitose de células apoptóticas, também denominada eferocitose, é um processo dinâmico e de fundamental importância para homeostase dos tecidos após uma injúria. Estudos demonstraram previamente que a fagocitose de células apoptóticas promove a síntese de mediadores anti-inflamatórios como PGE₂, TGF-β e IL-10, podendo resultar num microambiente supressor e aumento da susceptibilidade do hospedeiro contra agentes infecciosos. Entretanto, a fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promove a geração não apenas de citocinas anti-inflamatórias como TGF-β, mas também de IL-6 e IL-23, levando a um efeito imunoestimulador, a diferenciação de células Th17. A atuação da PGE₂ na imunidade adaptativa vem sendo investigada quanto à diferenciação e ativação de linfócitos Th1, Treg e Th17. Nossos resultados demonstram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas com E. coli promove a ativação e migração de células dendríticas, assim como a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e altos níveis de PGE₂. No entanto, diferente da hipótese inicial, a presença de altas concentrações de PGE₂ inibe drasticamente a diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas com E. coli por células dendríticas, *in vitro*. O tratamento de linfócitos T CD4⁺*naive* com antagonistas e agonistas de EP2/EP4 demonstram que o efeito supressor de PGE2 é mediado primordialmente pelo receptor EP4. Por fim, nossos resultados in vivo comprovam os resultados obtidos in vitro, demonstrando o papel supressor de PGE₂ na diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas em modelo de infecção pulmonar.

Palavras chave: 1. Prostaglandina E2; 2. Apoptose; 3. Eferocitose; 4. Th17.

VERDAN, F. F. **Prostaglandina E2 inhibts the differentiation of Th17 cells on the context of phagocytosis of infected apoptotic cells.** 2015. 174 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Abstract

The phagocytosis of apoptotic cells, also called efferocytosis, is a dynamic process critical for tissue homeostasis after injury. We and other groups previously have shown that phagocytosis of apoptotic cells promotes the synthesis of anti-inflammatory mediators such as PGE₂, TGF-β and IL-10, that may result in the suppression of host defense against microorganisms. However, an elegant study using infected apoptotic cells showed that phagocytosis of these cells promote not only the generation of anti-inflammatory cytokines such as TGF-B but also IL-6 and IL-23, resulting in an immunostimulatory effect, the differentiation of Th17 cells. The role of PGE₂ in adaptive immunity has been investigated regarding differentiation and activation of Th1, Th17 and Treg. Our results demonstrate that engulfment of E.coli infected apoptotic cells promotes the activation and migration of dendritic cells as well as production of pro and anti-inflammatory cytokines together with high levels of PGE₂. However, differing from our hypothesis, high levels of PGE₂ inhibits drastically the differentiation of Th17 cells on the context of engulfment of E.coli infected apoptotic cells by dendritic cells in *vitro*. The treatment of T CD4⁺naive cells with antagonist or agonists of EP2/EP4 receptors demonstrates the suppressor effect is mainly mediated by EP4 receptor. Finally, the instillation of E.coli infected apoptotic cells in E.coli infected animals resulted on modest Th17 increase but treatment with cox inhibitor increased Th17 cell differentiation. Therefore, our in vivo results prove the in vitro results.

Keywords: 1. Prostaglandin E2; 2. Apoptosis; 3. Efferocytosis; 4. Th17.

Introdução

1. Introdução

1.1. Reconhecimento de células apoptóticas

O conceito de morte celular por apoptose, ao contrário da morte celular por necrose, foi descrito e esclarecido no começo da década de 1970. Na década de 60, muitos pesquisadores elucidaram um mecanismo controlado de morte celular, diferente morfologicamente da morte celular por necrose, e demonstraram que esse fenômeno biológico participava de importante função na regulação do número de células em vários tecidos em condições fisiológicas e patológicas. Entretanto, apenas em 1972 o termo apoptose foi sugerido, o qual, derivado do grego, significa a queda das pétalas das flores, ou folhas das árvores, o que faz referência a sua função (Kerr;Wyllie and Currie 1972).

A apoptose, um tipo de morte celular programada, é um processo fisiológico envolvido no desenvolvimento e remodelamento dos tecidos que mantém a renovação tecidual homeostática nos diversos tecidos. Esse tipo de morte celular é morfologicamente associada com redução do volume celular (picnose), retração de pseudópode, condensação da cromatina, fragmentação nuclear (cariorrexe), pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural das organelas citoplasmáticas, e protrusões da membrana plasmática, com manutenção da integridade da mesma (Kroemer et al. 2009). Em contraste com a necrose, a permeabilidade celular é mantida durante a apoptose, evitando-se a liberação de componentes intracelulares tóxicos (Jeannin;Jaillon and Delneste 2008). Os corpos celulares, denominados corpos apoptóticos, são subsequentemente removidos por fagócitos profissionais, como macrófagos ou células dendríticas (DC) imaturas, porém, outras células adjacentes, como células epiteliais, também podem participar deste processo.

O reconhecimento e o englobamento de corpos apoptóticos fazem parte de um processo complexo e dinâmico denominado limpeza celular programada (*programmed cell clearance*)(Fadeel;Xue and Kagan 2010). A eficiência na remoção das células apoptóticas por fagócitos é necessária para evitar a perda da integridade das mesmas e dano tecidual decorrente da liberação de substâncias pró-inflamatórias. A fagocitose de células apoptóticas apresenta características morfológicas distintas e sinalização intracelular única, portanto, Peter Henson e colaboradores propuseram a utilização do termo eferocitose para denominar esse processo. Esse termo, deriva do latim, e significa carregar os corpos ao túmulo (Vandivier;Henson and Douglas 2006). Atualmente, o processo de eferocitose é considerado um processo distinto, no qual o englobamento de células apoptóticas assemelha-se à

macropinocitose. Após o englobamento, a sinalização intracelular diverge com relação à fagocitose e há a formação de um fagossomo denominado eferossoma. Por fim, assim como na fagocitose, ocorrerá a fusão com lisossomos, o que resultará na digestão do conteúdo contido no interior do eferossoma (Martin;Peters and Behar 2014).

O processo de eferocitose por fagócitos envolve a interação de um grande número de receptores e opsoninas com seus respectivos ligantes celulares expostos durante os vários estágios da morte celular programada. O processo da eferocitose envolve pelo menos quatro passos principais: 1) a liberação de sinais *find-me* por células apoptóticas; 2) a exposição de moléculas *eat-me* na membrana celular, que promove um reconhecimento específico por receptores endocíticos expressos em fagócitos, resultando no englobamento da célula apoptótica; 3) o processamento do corpo apoptótica, com sua final degradação; 4) a liberação de mediadores produzidos após o reconhecimento e o processamento da carga apoptótica (Ravichandran 2010).

As células do sistema imune possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs) capazes de distinguir não apenas entre próprio e não próprio, mas também entre células saudáveis e as que se encontram em processo de morte celular (Fadeel;Xue and Kagan 2010). Os PRRs solúveis atuam como opsoninas e são imprescindíveis na remoção de células apoptóticas, entre eles podemos citar as componentes do sistema complemento, as colectinas, ficolinas, e pentraxinas (Litvack and Palaniyar 2010).

Um fator comum em todas as membranas eucarióticas é a distribuição assimétrica de diferentes espécies de fosfolipídios na dupla camada lipídica. O processo de fagocitose de células apoptótica, por sua vez, utiliza-se dessa assimetria para que ocorra o reconhecimento destes fosfolipídios por fagócitos. Sendo assim, no início do processo apoptótico ocorre a perda dessa assimetria e a consequente exposição de fosfolipídios, mantidos na parte interna da membrana plasmática em células saudáveis, como a fosfatidilserina (PS), a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilcolina (PC) (Roos et al. 2004). Dentre estes, a externalização de PS na membrana celular é a mais bem estabelecida na literatura quanto ao reconhecimento via PRR por fagócitos como o sinal *eat-me*. Ainda, reações de oxidação que levam ao acúmulo de formas oxidadas de PS podem estimular a difusão transmembrana de PS e formas oxidadas de PS (PS-OX) durante o processo de apoptose (Fadeel;Xue and Kagan 2010).

Um fato que demonstra a importância da exposição de PS é o grande número de estruturas que a reconhecem. Moléculas solúveis que se ligam diretamente a PS exposta e indiretamente aos receptores de membrana em fagócitos estão entre as mais conhecidas.

Dentre estas, a glicoproteína MFG-E8, secretada por macrófagos ativados, liga-se à PS e secundariamente a integrinas $\alpha_{v}\beta_{3}$ expressas na superfície de macrófagos, resultando no processo de fagocitose das células apoptóticas. Da mesma maneira, as opsoninas Gas6 e a proteína S, ligam-se à PS e secundariamente ao receptor da tirosina quinase Mer (Hall et al. 2005). Inicialmente foi descrita uma molécula conservada e amplamente distribuída, originalmente denominada como um receptor específico para PS (PSR) (Fadok et al. 2000). No entanto, esse receptor parece não exercer o papel de reconhecimento de PS, pois após alguns anos após descrição desta molécula, a mesma foi identificada como um proteína presente predominantemente no compartimento nuclear (Cikala et al. 2004, Williamson and Schlegel 2004). O estudo de Bose et al. demonstrou a mesma eficiência na fagocitose de células apoptóticas por fagócitos isolados de camundongos PSR-/- (Bose et al. 2004). Porém, outros estudos utilizando animais deficiente para PSR, utilizando diferentes modelos de experimentais, não obtiveram resultados conclusivos (Li et al. 2003, Hong et al. 2004). Duas proteínas transmembranas, Tim1 e Tim4 (Miyanishi et al. 2007), e dois receptores, o receptor estabilina-2 (Park et al. 2008) e o receptor BAI1 (Park et al. 2007), foram também descritos como receptores de PS.

Formas oxidadas dos fosfolipídios expostos no momento da apoptose também são reconhecidas por receptores específicos de fagócitos e contribuem para exclusão de células em processo de apoptose. O reconhecimento de células apoptóticas pelo receptor *scavenger* CD36 ocorre via moléculas de PS oxidadas (PS-OX) e, em menor escala, moléculas de PC oxidadas (PC-OX), mas não se liga a PS não oxidada (Greenberg et al. 2006).

1.2. Efeito da Eferocitose na Modulação da Resposta Imune

A ingestão de células apoptóticas, ou mesmo sua ligação na superfícies de macrófagos, promove a liberação de moléculas anti-inflamatórias, entre elas TGF- β , IL-10, óxido nítrico, prostaglandina E₂, fator de ativação plaquetária (PAF), enquanto inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, CXL1, IL-8 e leucotrieno C₄ (Voll et al. 1997, Fadok et al. 1998, Medeiros et al. 2009). Esses efeitos anti-inflamatórios foram observados tanto em macrófagos ativados como não ativados e a falta de mediadores próinflamatórios parece estar associada com a ação autócrina e parácrina de TGF- β , PGE₂ e PAF (Fadok et al. 1998, McDonald et al. 1999).

Em um modelo de doença de Chagas, a administração de células apoptóticas aumentou a parasitemia, sendo este efeito bloqueado pela utilização de inibidor de COX

(Freire-de-Lima et al. 2000). De maneira semelhante, Medeiros *et al.* (2009) demonstraram que a administração de células apoptóticas 16 horas antes da administração intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae* promoveu um aumento da bacteremia com observação de disseminação hematogênica. A utilização de animais nocautes para o receptor EP2 reverteu a situação, controlando a bacteremia de modo semelhante ao controle infectado (Medeiros et al. 2009). Ambos os estudos demonstram a atuação da prostaglandina E_2 como o mediador imunossupressor no contexto da eferocitose.

Entretanto, a fagocitose de células apoptóticas infectadas, ou seja, com algum MAMP (Padrão Molecular Associado ao Micróbio) associado, promoveu a produção de IL-23, TGF- β e IL-6 por células dendríticas. Ainda, células T CD4⁺*naive* foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 na presença do meio condicionado (cultura de DC e células apoptóticas infectadas) e diferenciaram-se em células Th17 funcionais, ao contrário do meio condicionado oriundo da fagocitose de células apoptóticas não infectadas, o qual promoveu a diferenciação em células T reguladoras (Tregs).No entanto, em DC deficientes em TRIF e Myd88 a diferenciação de células Tregs foi mantida, porém a diferenciação de células Th17 foi abolida, demonstrando que a presença ou ausência de ligante de TLR dentro de células apoptóticas leva a ativação da DC e a produção de mediadores envolvidos na diferenciação de células T (Torchinsky et al. 2009).

Desta forma, a fagocitose de células apoptóticas infectadas promove um estímulo fisiológico com produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF-β) e pró-inflamatórias (IL-6) e gera condições ideais para a diferenciação de células Th17. Esse mecanismo foi comprovado *in vivo* pelo modelo de infecção por *Citrobacter rodentium*, conhecido por induzir resposta Th17, no qual o bloqueio da apoptose de células epiteliais anulou a resposta por células Th17 no intestino destes animais (Torchinsky et al. 2009).

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas também promove, além da produção de mediadores proteicos, a síntese de altos níveis de PGE₂. No entanto, até o momento nada se sabia da participação deste mediador lipídico e o mecanismo pelo qual a PGE₂ pode colaborar sinergicamente com TGF- β e IL-6 no processo de diferenciação de células Th17.

1.3. Células Th17

Os patógenos apresentam assinaturas moleculares, conservadas evolutivamente, descritas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que promovem a

Introdução

ativação das DC. Os PAMPs estão associados tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa e são reconhecidos por uma vasta família de receptores denominada receptores de reconhecimento de padrões (PRR). As DC expressam um grande repertório de PRRs e, em resposta a sinais promovidos pelo receptor, promovem uma profunda transformação fenotípica e funcional, denominadas ativação de DC. Desse modo, tornam-se células apresentadoras de antígenos competentes para sustentar a expansão e diferenciação de células T antígeno-específicas em células efetoras apropriadas. As DC ativadas pelo contato com o patógeno normalmente apresentam altos níveis da molécula de histocompatibilidade principal (MHC), as quais apresentam os peptídeos derivados do patógeno, que podem ser reconhecidos por receptores de células T (TCR) em células T naive antígeno-específicas. Esse é o primeiro sinal de ativação para a célula T e é conhecido como sinal 1. As DC ativadas pelo encontro com o patógeno também expressam uma variedade de moléculas coestimuladoras, as quais se ligam aos seus receptores nas células T e transmitem sinais que são importantes para a proliferação e manutenção das células T, conhecido como sinal 2. As moléculas co-estimuladoras mais conhecidas nesse contexto são as CD80 e CD86, que se ligam à CD28 na célula T. Por fim, as DC ativadas produzem mediadores que promovem a diferenciação de células T em células efetoras, conhecido como sinal 3. A integração desses

três sinais pela célula T determina o seu destino. Esses sinais parecem ser necessários para geração de células T efetoras, enquanto o sinal 1, na ausência dos sinais 2 e 3, parece ser utilizado para inativar a célula T virgem, ou promover destinos reguladores (Joffre et al. 2009).

As DC são células apresentadoras profissionais de antígeno que possuem capacidade ímpar de ativar linfócitos T. A fim de iniciar uma resposta de linfócitos T, DC devem migrar do sítio periférico para o linfonodo drenante, no qual iniciam a interação com linfócitos T. A migração de DC do sítio periférico para o linfonodo drenante ocorre através da entrada das mesmas nos vasos linfáticos e sua movimentação até o linfonodo. Esse processo é regulado pela expressão do receptor de quimiocina CCR7, assim, células dendríticas ativadas aumentam a expressão desse receptor e tornam-se aptas a migrar pelos vasos linfáticos. DC CCR7+ são atraídas pelo gradiente quimiotático de seus ligantes CCL19 e/ou CCL21, produzidos por células endoteliais dos vasos linfáticos. Assim que as DC chegam ao linfonodo drenante, células T rastreiam as DC por antígenos cognatos que podem reativar células T de memória ou iniciar a resposta de células T *naive* em condições inflamatórias (Randolph;Angeli and Swartz 2005, Förster;Braun and Worbs 2012, Johnson and Jackson

Introdução

2013). As CDs imunogênicas são geralmente definidas pela expressão de marcadores de maturação apropriados, como moléculas MHC classe II, CD80, CD86, CD40 e CCR7.

Um estudo demonstrou que a fagocitose de células apoptóticas por DC induz a expressão de CCR7 e migração das mesmas frente a um gradiente de CCL19/CCL21, apesar de não induzir a maturação de DC, com diminuição da expressão de MHC-II e CD86 (Verbovetski et al. 2002). Entretanto, não há relatos na literatura sobre a ativação e indução de migração de DC após a fagocitose de células apoptóticas infectadas.

Torchinsly e cols. (2009), demonstraram que o reconhecimento de células apoptóticas infectadas direciona a síntese simultânea de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6) pelas APCs e, dessa forma, gera condições ideais para a diferenciação de células Th17 (Torchinsky et al. 2009). Curiosamente, apesar de muitos estudos sobre células Th17, esse mecanismo foi o primeiro a propor um modelo fisiológico de diferenciação de células Th17 (Torchinsky;Garaude and Blander 2010).

Enquanto a diferenciação de células Th1 e Th2 dependem das citocinas efetoras, IFN- γ e IL-4, respectivamente, a indução de células Th17 não requer IL-17 (Bettelli et al. 2008). Por sua vez, o desenvolvimento de Th17 requer a atividade do fator de transcrição mestre ROR γ t e é dirigida por TGF- β e IL-6, enquanto a citocina IL-23 é associada com manutenção e expansão de células Th17 (Bettelli et al. 2008, Zhang;Meng and Strober 2008, Korn et al. 2009). As citocinas relacionadas à Th1 e Th2 inibem a diferenciação de células Th17, enquanto IL-17 não é capaz de inibir células Th1 e Th2 (Gocke et al. 2007). Entretanto, a supressão de IFN γ e IL-4 é uma das maneiras pela qual a citocina TGF- β pode promover a diferenciação de células Th17, porém essa diferenciação pode ocorrer também na ausência de IFN- γ e IL-4 (Harrington et al. 2005, Park et al. 2005). Os efeitos de TGF- β na diferenciação de células Th17, enquanto altas doses inibem o desenvolvimento de Th17 e promove o desenvolvimento de células T reguladoras (Tregs) (Manel;Unutmaz and Littman 2008).

A interação de TGF- β e IL-6 na indução de fatores transcricionais de Th17 estão sendo extensivamente estudadas. Células T naive expressam um receptor funcional de IL-6 que é composto por IL-6R α e pela subunidade sinalizadora gp130. A estimulação de TCR, assim como a exposição a IL-6, promove diminuição da expressão e internalização desses receptores, consequentemente reduzindo a resposta a IL-6. Entretanto, a citocina TGF- β induz a expressão de IL-6R α e é necessária para manter a responsividade de células T a IL-6. Por sua vez, a citocina IL-6 leva a ativação de STAT3, a qual, juntamente com TGF- β , promove

uma indução completa do fator de transcrição ROR γ t, ROR α e RUNX1 e permite a indução de células Th17 (Korn et al. 2009). ROR γ t é considerado o fator de transcrição mestre para o células Th17, entretanto, outros fatores de transcrição como IRF4, BATF, STAT3 e HIF1 α são importantes para estabilização e diferenciação terminal de células Th17 (Muranski and Restifo 2013, Gaffen et al. 2014).

As células Th17 apresentam a capacidade de produzirem IL-17A e IL-17F, além de outras citocinas como, por exemplo IL-21 e IL-22. A citocina de assinaura IL-17A está associada com a indução da produção de citocinas infamatórias (IL-6, TNF- e IL-1) e quimiocinas (CXCL1, GCP-2, IL-8, CINC, MCP-1) (Bettelli et al. 2008). As citocinas derivadas da população de células Th17 estão associadas com importante papel na proteção contra vários agentes patológicos, incluindo bactérias extracelulares e fungos, com a promoção da migração de neutrófilos e estimulando a produção de defensinas pelas células epiteliais (Ye et al. 2001, Huang et al. 2004, Korn et al. 2009). Entretanto, algumas inflamações crônicas, como a doença inflamatória do intestino, já estão sendo explicadas pela resposta de células Th17 (Elson et al. 2007, Monteleone;Pallone and Monteleone 2009).

1.4. PGE2 na modulação da Resposta Imune

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos formados pela maioria das células do nosso corpo e atuam de forma autócrina e parácrina. Como demonstrado na figura 1, as PGs têm origem do ácido araquidônico liberado de membranas pelas fosfolipases (PLA₂), principalmente a fosfolipase citosólica tipo 4 (cPLA₂) (Burke and Dennis 2009). O ácido araquidônico liberado é rapidamente metabolizado pela ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2) para formar uma prostaglandina intermediária denominada PGH₂. Enquanto a COX-1 é uma enzima constitutiva, responsável pelos níveis basais da produção de prostaglandinas, a enzima COX-2 é induzida em momentos de inflamação e atua potencializando a produção de PGs (Smith;DeWitt and Garavito 2000). Entretanto, a visão simplificada de que COX-1 exerce funções homeostáticas e COX-2 exerce funções patofisiológicas é errônea na maioria dos casos (Rouzer and Marnett 2009). As enzimas COX estão inseridas nas membranas nuclear e do retículo endoplasmático, com sua porção de ligação ao substrato orientada para o citoplasma (Smith;DeWitt and Garavito 2000). As enzimas responsáveis pela metabolização da PGH2 traçam o destino da mesma, podendo ocorrer a formação de PGI₂, PGF₂, PGD₂, PGE₂ ou tromboxanas A₂ (TxA₂). O produto final da metabolização de PGH₂ depende do tipo celular em questão, no qual as prostaglandinas

produzidas são liberadas pela célula predominantemente através de um transportador de prostaglandina e, devido sua curta meia vida, logo exercem sua função de forma autócrina e parácrina (Schuster 1998). No caso específico da PGE₂, a PGH₂ sofre isomerização em PGE₂ por três distintas PGE sintases, PGE sintase do citosol (cPGES), e duas PGE sintases ancoradas na membrana, mPGES-1 e mPGES-2. Enquanto cPGES e mPGES-2 são enzimas constitutivas, mPGES-1 é induzida em resposta a vários estímulos pró-inflamatórios e mitogênicos concomitantemente com COX-2. Assim, é postulado que cPGES utiliza a PGH₂ catabolizada de COX-1, enquanto mPGES-1 utiliza PGH₂ derivada de COX-2 (Sreeramkumar;Fresno and Cuesta 2012).

A PGE₂ exerce sua função através de 4 subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. Receptores EP estão acoplados à proteína G (GPCRs) e variam em sua estrutura molecular, propriedades de ligação à PGE₂, distribuição tecidual, expressão e transdução de sinais (figura 2)(Sugimoto and Narumiya 2007). Entre esses, EP2 e EP4 são expressos em altos níveis em monócitos e células T CD4⁺*naive* em humanos, enquanto EP1 e EP3 são pouco expressos ou inexistentes. Ainda, a ativação de células T humanas promove o aumento de duas a três vezes da expressão dos receptores EP2 e EP4 (Boniface et al. 2009). Por outro lado, em ensaios murinos, além da alta expressão de EP2 e EP4, o receptor EP1 também está presente em células T CD4⁺naive (Nagamachi et al. 2007). Enquanto EP1 é um receptor acoplado a proteínas $G\alpha_{a/p}$, ambos EP2 e EP4 estão acoplados à subunidade α estimuladora da proteína G $(G\alpha_{s}).$ A ligação de PGE_{2} a estes receptores promove, respectivamente, o aumento de Ca^{2+} intracelular e o aumento da concentração intracelular de adenosina mono fosfato cíclica (AMPc), importante segundo mensageiro que atua regulando diversas funções celulares (Breyer et al. 2001, Serezani et al. 2008). Esses receptores medeiam as funções da PGE₂ tanto na imunidade inata quanto na adaptativa e, devido à alta expressão de EP2 e EP4 em células T CD4⁺*naive*, estes foram os principais alvos de estudo no presente trabalho.



Figura 1. Síntese de prostanóides. Após estímulo celular, PLA2 é ativada e o ácido araquidônico (AA) é liberado de fosfolípides da membrana. Posteriormente, o AA é metabolizado pelas enzimas COX-1 ou COX-2 em compartimentos celulares distintos e subsequentemente metabolizado por sintases específicas, as quais levam à geração de prostanóides sintase-específicos. Uma vez que o prostanódie é produzido, eles são transportados para fora da célula para se ligarem em seus respectivos receptores. (PG, prostaglandina; Tx, tromboxana; PGJ2,

15-deoxi-Δ12,14-prostaglandina J2; COX-1/2, ciclo-oxigenase-1/2; PGDS, PGES, PGFS, e PGIS,

prostaglandina D2/E2/F2/I2-sintase; PGIS prostaciclina sintase; TxAS tromboxana A2 sintase)



Medeiros, A., Peres-Buzalaf, C., Fortino Verdan, F., & Serezani, C. H. (2012)

Figura 2. Receptores de PGE₂ e suas ações em macrófagos. A PGE₂ possui quatro receptores específicos: EP1, EP2, EP3 e EP4. Todos os receptores são acoplados à proteína G, sendo a sinalização de EP2 e EP4 associados à liberação da sub-unidade G α s do complexo G $\beta\gamma$. Por outro lado, a sinalização de EP3 libera a subunidade G α i, enquano a sinalização de EP1 libera a sub-unidade $\alpha q/p$. A liberação sa sub-unidade G $\alpha q/p$ promove o aumento de C a^{2+} intracelular. A sub-unidade G α é capaz de se ligar à adenilato cilase e promove a sua ativação (G α s) ou inibição (G α i) da geração do produto enzimático AMPc. Por sua vez, AMPc sinaliza atravé de moléculas efetoras como a proteína quinase A (PKA) ou a proteína de troca ativadada diretamente por AMPc (Epac), as quais possuem funções moduladoras da função de macrófagos. Aqui demonstrado estão funções antimicrobianas que são diferenciamente reguladas pelas moleculas efetoras PKA e Epac em macrófagos alveolares.

1.5. PGE₂ e Imunidade Inata

Na imunidade inata, a PGE₂ tem um papel chave bem estabelecido como mediador inflamatório, prinicpalmente na processo inflamatório, sendo bem estabelecido seu papel na indução de febre, dor, vasodilatação, e seu envolvimento durante o processo inflamatório é evidenciado pela utilização de inibidores de ciclo-oxigenases como potentes agentes antiinflamatórios (Flower 2003). Paradoxalmente, a PGE₂ também exerce ações antiinflamatórias em células do sistema imune, como monócitos, neutrófilos e linfócitos (Harris et al. 2002).

O AMPc pode ser considerado um importante mensageiro secundário em células do sistema imune inato, atuando na maioria das vezes como inibidor da ativação destas células. Algumas funções do AMPc estão bem descritas em macrófagos, sendo a PGE₂ o ligante mais importante no contexto da imunidade inata associado ao aumento de AMPc intracelular. Entre as ações de PGE₂ e AMPc estão a inibição da fagocitose; inibição da atividade microbicida; inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , MIP-1 α , e leucotrieno B₄, enquanto aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e do supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS-3) (Peters-Golden 2009).

Em macrófagos alveolares, as moléculas efetoras proteína quinase A (PKA) e proteína de troca de nucleotídeo guanina ativada por AMPc (Epac) são responsáveis pelas funções supressoras do AMPc. Assim, essas moléculas efetoras promovem suas ações de forma independentes ou redundantes. Enquanto PKA modula a geração de mediadores próinflamatórios e anti-inflamatórios, inibindo o primeiro e estimulando o segundo, Epac promove a inibição da fagocitose via receptores Fc (FcR), e ambos modulam a inibição da atividade microbicida através da diminuição da geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Aronoff et al. 2005). Entretanto, a especificidade de ação dessas moléculas efetoras pode variar de célula para célula, como foi demonstrado em células dendríticas, na qual ambos PKA e Epac atuam na modulação dos mediadores inflamatórios (Aronoff et al. 2006).

1.6. PGE₂ e Imunidade Adaptativa

A atuação da PGE_2 na imunidade adaptativa vem sendo desvendada nos últimos anos e, diferente da função imunossupressora descrita previamente (Betz and Fox 1991, Baratelli et al. 2005), recentes trabalhos demonstram uma importante função imunoativadora deste mediador lipídico (Yao et al. 2009).

O papel supressor de PGE_2 via EP2 foi demonstrado previamente pela inibição da capacidade proliferativa de células T usando um modelo de reação linfocitária mista (Nataraj et al. 2001). Esse efeito supressor de PGE_2 e 8-CPT-cAMP (análogo de AMPc que ativa especificamente PKA) em células T periféricas é mediado por PKA-Csk, que atua antagonizando a sinalização de TCR, competindo pela ativação da quinase da família Src (Lck), ou seja, enquanto o TCR estimula a ativação desta quinase, a PGE₂ estimula a inativação (Vang et al. 2003) (Mustelin and Tasken 2003). Ainda em uma visão imunossupressora, recentes trabalhos destacam o papel de PGE_2 na diferenciação de células Treg. Baratelli *et al.* (2005) demonstraram que a PGE_2 aumenta a expressão deste em células T CD4⁺naive , sendo capaz de promover a diferenciação destas em células Treg induzidas (iTreg) (Baratelli et al. 2005).

Contradizendo esses efeitos supressores diretos ou indiretos por PGE₂ em células T, um recente trabalho da literatura reportou que altas concentrações de anti-CD3 (indiretamente a ativação via TCR) superam o efeito supressivo da PGE₂. Nesse contexto, na presença de condições polarizantes que promovem a diferenciação de células Th1, a PGE₂ aumentou a porcentagem de células perfil Th1 produtoras de IFN- γ de maneira concentração dependente. Curiosamente, essa sinalização facilitadora da PGE₂, apesar de ocorrer via EP2 e EP4, foi promovida pela ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Yao et al. 2009). Outro estudo demonstrou que o receptor EP1 é um facilitador da diferenciação de células Th1, e estes linfócitos uma vez diferenciados, expressam predominantemente o receptor EP1 (Nagamachi et al. 2007).

No âmbito das células Th17, Boniface *et al.* (2009) demonstraram que PGE₂ atua via receptores EP2 e EP4 através da via de sinalização AMPc – PKA para auxiliar na diferenciação de células T $CD4^+naive$ humanas em células Th17. A PGE₂ aumenta a expressão dos receptores para a interleucina 1 (IL-1R) e interleucina 23 (IL-23R) em células T em diferenciação e, em combinação com citocinas que promovem a diferenciação da subpopulação Th17, aumentou a fosforilação de STAT3 e induziu uma mudança qualitativa e quantitativa na função e fenótipo de Th17 para um padrão mais inflamatório/patogênico (Boniface et al. 2009). Em murinos, a PGE₂ atua via receptores EP2 e EP4, e sinaliza via AMPc - PKA facilitando a expansão de células Th17 em conjunto com a IL-23. Além disso, a PGE₂ pode aumentar a produção de IL-23 por DC e colaborar indiretamente na expansão de Th17 (Yao et al. 2009, Schirmer et al. 2010). Outro importante trabalho da literatura demonstrou que a PGE₂ tem um importante papel no recrutamento de neutrófilos para a Introdução

cavidade articular em modelo de artrite através do aumento da síntese de IL-17 e inibição do eixo IL12/IFN-γ (Lemos et al. 2009).

Portanto, a PGE₂ tem demonstrado grande atuação na modulação da imunidade adaptativa, atuando, de maneira controversa, tanto como um mediador imunossupressor como imunoativador. Diante dessas ações, o presente trabalho visou estudar a atuação da PGE₂ no mecanismo de diferenciação de células Th17 a partir da fagocitose de células apoptóticas infectadas, vislumbrando os receptores e as vias de sinalização envolvidas neste processo.

Hipótese e Objetivos

2. Hipótese de estudo e Objetivos específicos

A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas induz a produção de citocinas associadas com a diferenciação de célula Th17, juntamente com PGE2. A função da PGE2 na diferenciação de Th17 ainda é controversa, mas estudos recentes demonstraram um papel auxiliador desse mediador. Nesse contexto, a hipótese deste estudo foi avaliar se a PGE₂, proveniente da eferocitose de células apoptóticas infectadas, auxiliaria na diferenciação de células Th17.



Figura 3. Hipótese. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas levaria à síntese de citocinas relacionadas com a diferencianção de células Th17 juntamente com PGE₂. A presença de PGE₂, através da interação com seus receptores específicos, levaria à ativação de AMPc/PKA e/ou Epac, resultando na ativação de ROR γ t e ROR α e inibição de FOXP-3, favorecendo a diferenciação de células Th17. Ferramentas in vitro como o bloqueio da produção de PGE2 por DC no momento da co-cultura, e o bloqueio de receptores específicos de PGE2 em células T, assim como modelo de infecção pulmonar somado à instilação de células apoptóticas infectadas, auxiliaram na investigação da hipótese.

Hipótese e Objetivos
2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de migração de células dendríticas após a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar a influência dos níveis de PGE₂, oriunda da fagocitose de células apoptóticas infectadas, na diferenciação de células Th17;
- Avaliar o envolvimento de PGE₂ e seus receptores EP na diferenciação de células Th17 através da utilização de meio de cultura condicionado oriundo da fagocitose de células apoptóticas infectadas (CM);
- Avaliar o envolvimento de PGE₂ *in vivo* na diferenciação de células Th17 pela instilação de células apoptóticas infectadas;

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 12 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 e ciclo de luz claro/escuro controlado e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram julgados e autorizados pelo comitê de ética local (CEP/FCF/CAr. 10/2009).

3.2. Bactérias Escherichia coli

Bactérias *Escherichia coli* (cepa ATCC 25992) ou *E. coli*-GFP (DH5α) foram mantidas a -80°C foram reativadas, recuperadas em meio sólido (DifcoTM LB AGAR, MILLER Luria-Bertani) e mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37°C *overnight*. No dia seguinte, as bactérias foram ressuspensas em meio líquido (DifcoTM LB, Broth Luria-Bertani) estéril e mantidas por 24 horas a 37°C sob agitação. Após o período de incubação, foi feita a quantificação das bactérias pela leitura da Densidade Ótica (DO), e estas foram centrifugadas e lavadas com solução salina tamponada (PBS) estéril gelada para posterior incubação com células RAW 264.7 ou infecção dos animais.



3.3. Diferenciação de DC a partir de precursores de Medula Óssea (BMDC)

As DC foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea do fêmur e tíbia dos animais C57BL/6 segundo protocolo preconizado por Lutz *et al.* (1999) (Lutz et al. 1999). As células precursoras foram plaqueadas em placa de petri na concentração de 1x10⁶ células/mL em volume final de 10 mL de meio RPMI (Gibco) completo, contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 10 µg/mL de gentamicina (Gibco), adicionado de 40 ng/mL de GM-CSF (Peprotech). A adição de GM-CSF foi realizada nos dias 3,6 e 8. Enfim, no último dia de diferenciação, as células não aderentes foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 1500rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com meio RPMI-c livre de SFB. Após lavagem, as células foram ressuspendidas em 2 mL de meio RPMI-c livre de SFB, contadas pelo método de exclusão por trypan e ajustadas para a concentração adequada para o ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas (item 3.5). As DC diferenciadas foram analisadas quanto a expressão de CD11c, CD11b, MHCII, CD80 e CD86 por citometria de fluxo, a fim de avaliar-se o fenótipo das mesmas.

3.4. Geração das células apoptóticas infectadas (AC^{+E.coli})



3.4.1. AC^{+E.coli} proveniente de células animais – ex vivo

Como fonte de células apoptóticas infectadas foram utilizados neutrófilos contendo *Escherichia coli* como descrito por Torchinsky *et al.* (2009). As bactérias foram plaqueadas em meio sólido LB ágar 2 % e mantidas em estufa a 37 °C. No dia seguinte, as bactérias foram ressuspendidas em 10 mL de meio LB líquido estéril e mantidas *overnight* a 37°C. Após o período de incubação, 100 µL dessa suspensão foi transferido para 10 mL de meio LB líquido estéril e o crescimento bacteriano foi acompanhado em absorvância de 600 nm (Epoch, Biotek) até que a DO atingisse aproximadamente 0,5. Após atingir a DO esperada, 2 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo falcon de 50 mL e centrifugados por 10min, 3000 rpm a 4 °C. As bactérias foram lavadas duas vezes com PBS estéril gelado. Após a lavagem, as bactérias foram ressuspendidas e diluídas em tioglicolato na quantidade necessária para cada experimento. As diluições foram realizadas de acordo com a curva de crescimento bacteriano padronizado no laboratório. No fim, 1 mL de tioglicolato+*E. coli*, na

concentração de 10^6 ou 10^5 unidades formadoras de colônia (CFU), foi inoculado via intraperitoneal nos animais. Após 13 horas foi realizado o lavado peritoneal, utilizando-se 5mL de PBS gelado, a fim de recuperar-se as células apoptóticas infectadas. A carga bacteriana inoculada por animal foi certificada através da contagem de CFU em diluições seriadas da suspensão de Tioglicolato+*E. coli*. Irradiamos com luz ultravioleta (UV) as células derivadas do lavado peritoneal com a energia de 5 mJ (placa aberta) ou 350 mJ (placa fechada) (CrossLinker, Vilber Lourmat) e colocamo-las por 4 horas em estufa a 37 °C. A irradiação foi realizada em placas de 24 poços, com volume final de 500 µL/poço e 3x10⁶ células/poço. No fim, as células estavam prontas para a adição das DC. A porcentagem de células apoptóticas e necróticas foi avaliada por citometria de fluxo com os marcadores de morte celular Anexina e Iodeto de Propídeo (PI).

A fim de confirmarmos se as células derivadas do lavado peritoneal estavam realmente infectadas, os animais foram inoculados i.p. com $1 \times 10^6 E$. *coli* vivas (DH5 α) conjugadas com FITC e ressuspensas em 1 mL de tioglicolado e após 13 horas o lavado peritoneal foi coletado. Aproximadamente 1×10^6 neutrófilos foram avaliados quanto à presença da *E. coli* na presença de azul de trypan (250µg/mL), o qual funciona como um *quencher* para as bactérias que estejam presas a membrana da célula e não internas.



3.4.2. AC^{+E.coli} proveniente de células de linhagem Raw 264.7 – in vitro

Células de linhagem RAW 264.7 (MØ) foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 hora em estufa 5% CO2 à 37 °C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E. coli*-GFP em três proporções distintas: 1:10, 1:30 e 1:50 (MØ:*E. coli*). As células foram incubadas por 2 ou 3 horas em estufa 5% CO2 à 37 °C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e avaliadas quanto a expressão de CD11b e GFP em citometria de fluxo. Células CD11b+ foram avaliadas quanto a fluorescência GFP e comparadas de acordo com as condições distintas. Ainda, a expressão de CD11b e GFP foi avaliada através de imagens obtidas em microscópio de fluorescência de alta resolução (In Cell Analyzer, GE). Para comprovar a internalização das bactérias por MØ, realizamos um *quenching* da fluorescência externa da célula com azul de trypan tampão carbonato, no qual observaríamos um decréscimo da fluorescência GFP caso as bactérias estivessem apenas ligadas a membrana dos macrófagos e não internalizadas.

Após a padronização da infecção a condição escolhida foi proporção de 1:10 (MØ:*E. coli*) no tempo de 2 horas. Na padronização da apoptose, MØ infectados (MØ^{+*E.coli*}) foram lavados para remoção das bactérias e irradiados ou não com luz ultravioleta (UV). Quando as células foram irradiadas com luz UV utilizamos três quantidades diferentes de transferência de energia: 200 mJ, 350 mJ ou 500 mJ (placa fechada); ou 1 mJ, 5 mJ ou 10 mJ (placa aberta) (CrossLinker, Vilber Lourmat). Após o tratamento com luz UV as células foram avaliadas quanto a apoptose pelo método de Anexina V-APC / PI no citômetro de fluxo. A apoptose foi avaliada em MØ infectados, ou seja, células GFP+.

O último passo da padronização de MØ como fonte de células apoptóticas infectadas era avaliar a capacidade dessas células serem fagocitadas por DC. MØ foram plaqueados em placas de petri e incubados por 1 hora em estufa 5% CO2 à 37 °C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E. coli*-GFP na proporção 1:10 (MØ:*E. coli*). As células foram incubadas por 2 horas em estufa 5% CO2 à 37 °C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e irradiadas com 200 mJ ou 5 mJ de luz ultravioleta. AC^{+*E.coli*} foram coradas com CFSE e incubadas com DC por 18 horas em estufa 5% CO2 à 37 °C. Após a incubação as células foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de moléculas de superfície celular CD11c. Células CD11c+ foram avaliadas quanto a porcentagem de células CFSE+.

3.5. Ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas (AC^{+E.coli}) por células dendríticas

As células dendríticas imaturas diferenciadas de medula óssea foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 céls/poço em meio RPMI-c livre de SFB. Inicialmente, as células apoptóticas infectadas foram colocadas em cultura com as DC na proporção de 1:1, 1:3 e 1:5 (DC:AC^{+E.coli}). Para os ensaios posteriores, apenas a proporção de 1:3 foi utilizada. As células permaneceram por 18 horas em cultura a 37 °C, e o sobrenadante (CM) foi coletado, centrifugado para remoção de células, e utilizado para a quantificação de PGE₂ e citocinas, ou diferenciação de células T. Alternativamente, adicionou-se drogas inibidoras de COX não seletivas, Indometacina ou Ibuprofeno, na co-cultura entre DC e AC^{+E.coli}. O CM oriundo do tratamento com indometacina (CM^{+Indo}) ou ibuprofeno (CM^{+Ibu}) foram posteriormente utilizados no ensaio de diferenciação de células Th17. Ainda, CM foram tratados com coluna de purificação (*Prostaglandin E2 affinity column #400056* -

Cayman) para a remoção de PGE_2 (CM^{-PGE2}) para posteior utilização no ensaio de diferenciação de Th17. O CM foi armazenado em freezer -80 °C.

3.6. Ensaio de Migração



Após o término do ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas ($AC^{+E.coli}$) por células dendríticas, as células não aderidas foram coletadas e purificadas por separação magnética para o marcador fenotípico CD11c (CD11c MicroBeads, mouse, Miltenyi) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação uma parte das células foi marcada com os marcadores fenotípicos CD11c, CCR7, CD86 e MHC e analisadas por citometria de fluxo; outra parte foi utilizada para o ensaio de migração. A quimiotaxia dessas células foi mensurada em placas de *Transwell* de 24 poços (Corning) com membrana de policarbonato de 5 µm de porosidade. À câmara inferior foi adicionado 600 µL de meio RPMI-c contendo 300 ng/mL CCL19 e 250 ng/mL CCL21. Acima da membrana foram adicionadas 1x10⁵ células de acordo com as condições, em um volume de 100 µL de meio, e permaneceram 3 horas a 37° em estufa de CO₂. Após a incubação, as membranas foram removidas e as placas

foram analisadas ao microscópio invertido. A avaliação da migração foi realizada por imagens capturadas pela câmera acoplada ao microscópio invertido.



3.7. Ensaio de diferenciação de células T

As células T foram obtidas de células totais do baço de animais WT e diferenciadas na presença ou não de CM como descrito previamente por Torchinsky, *et al.* (2009). Células totais do baço foram purificadas magneticamente para o fenótipo CD4+CD62L+ (CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II, Miltenyi). Resumidamente, $1-2x10^5$ linfócitos T CD4⁺ *naive*/poço foram adicionados em placas de 96 poços com 4 µg/mL de anti-CD3 e 2 µg/mL anti-CD28 e por 3-4 dias foram cultivadas na presença de CM, CM^{+Indo}, CM^{+Ihup}, CM^{-PGE2} ou controle positivo, na presença de um coquetel de diferenciação para Th17 (20 ng/mL IL-6, 2.5 ng/mL TGF- β)(R&D Systems) ou controle negativo apenas na presença de anti-CD3 e anti-CD28, diluídos em IMDM suplementado com 5% de FBS, 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 nM piruvato de sódio. O uso de anticorpos neutralizantes de IL-2 (Clone S4B6, BD Biosciences), IFN- γ (Clone XMG1.2,

BD Biosciences) e IL-4 (Clone 11B11, BD Biosciences) foi realizado em alguns experimento. Agonistas (agonista de EP2 (Butaprost) ou EP4 (Cay10598)) e antagonistas (antagonista de EP1 (SC-51089) ou antagonista de EP2 (AH6869) ou antagonista de EP4 (L-161,982), todos da Cayman Chemical) de receptores EP foram adicionados na concentração de 5 μ M no início da cultura, a fim de entender-se por qual via PGE₂ estaria atuando.

3.8. Ensaio *in vivo*



3.8.1. Infecção com *E. coli* e instilação dos animais com células apoptóticas infectadas

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.), com xilazina/ketamina (Ketamina - cloridrato de cetamina 10%, Agener União, uso veterinário e Xilazin - cloridrato xilazina 2%, Syntec, uso veterinário) e instilados (i.n.) com uma suspensão de $1 \times 10^6 E. \ coli$, e ou, 1×10^7 células apoptóticas infectadas em PBS estéril, em um volume final de 30 µL, sendo instilado 15 µL por nostrin. Em seguida os animais foram instilados com mais 30 µL de PBS para lavagem do trato respiratório.

3.8.2. Diferenciação de células Th17 e tratamento com indometacina *in vivo*

Para comprovar os resultados obtidos *in vitro*, foi avaliado a diferenciação de células Th17 no ambiente pulmonar e o envolvimento de PGE₂ nesse contexto. Animais foram infectados com $1 \times 10^6 E$. *coli* através de instilação i.n. e após 24 horas foram instilados com $1 \times 10^7 \text{ AC}^{+E, coli}$. As concentrações utilizadas e períodos avaliados foram previamente padronizados pelo grupo de pesquisa. Para avaliar o envolvimento de PGE₂ no processo de diferenciação de células Th17, os animais foram divididos em grupos experimentais:

1) Grupo controle: animais não infectados com *E. coli*, não instilados com $AC^{+E.coli}$, tratados ou não tratados com indometacina.

2) Grupo *E. coli:* animais infectados com *E. coli*, não instilados com AC^{+*E.coli*}, tratados ou não tratados com indometacina.

3) Grupo $E.coli+AC^{+E.coli}$: animais infectados com E.coli, instilados com $AC^{+E.coli}$, tratados ou não tratados com indometacina.

Os animais receberam 100µg/animal de indometacina, ou PBS via i.p. em dias alternados (Valdez et al. 2012b), por 4 vezes a partir de 48 horas após a instilação de $AC^{+E.coli}$. No dia seguinte ao quarto tratamento, os animais foram novamente instilados com 1x10⁶ *E. coli* e após 24 horas eutanasiados. A diferenciação de células Th17 foi avaliada no pulmão e nos linfonodos do mediastino e cervicais. Desse modo, foi avaliado se na ausência de PGE₂ ocorre diferenciação de células Th17.

3.8.3. Obtenção de células do parênquima pulmonar, linfonodos cervicais e do mediastino

Após procedimentos de infecção com *E. coli* e instilação de células apoptóticas infectadas os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 , os pulmões foram perfundidos com 10mL de PBS estéril, por meio de injeção no ventrículo cardíaco direito, e então removidos para obtenção de células do parênquima pulmonar. Os lóbulos dos pulmões foram fragmentados no aparelho GentleMACSTM Dissociator e digeridos em 13mL de RPMI contendo gentamicina e colagenase D (1mg/mL, Roche), mantidos por 45 minutos a 37°C, sob agitação. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de meio RPMI com antibiótico contendo 10% de SBF para impedir a ação da protease e, portanto, bloquear a digestão celular. Para dispersão das células do parênquima, os fragmentos foram homogeneizados com

a ajuda de uma seringa e filtrados por peneira, para exclusão de resquícios de tecidos. A suspensão celular foi transferida para um novo frasco de 50mL e as células foram centrifugadas por 10 minutos, 1500rpm e 4°C. Os eritrócitos foram removidos por lise celular. As células obtidas foram reestimuladas com PMA/Ionomicina e GolgiStop por 5h e ou fixadas em PBS estéril com 4% de formaldeído por 15 minutos a 4°C, novamente centrifugadas e ressuspensas em meio de congelamento (SBF com 10% de DMSO). As amostras foram congeladas em freezer -80°C para posterior análise. O mesmo procedimento de congelamento celular foi utilizado na suspensão celular obtida dos linfonodos mediastinais e cervicais. Para obtenção de células dos linfonodos, esses órgãos linfóides foram macerados em peneira, as células obtidas foram centrifugadas reestimuladas com PMA/Ionomicina e GolgiStop por 5h. Depois, as células foram fixadas e ressuspensas em meio de congelamento de congelamento e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise por citometria de fluxo.

3.8.4. Homogenato do pulmão

Para avaliação da sobrevivência bacteriana, o lóbulo inferior esquerdo de cada animal foi removido e submetidos à homogeneização em PBS utilizando o equipamento Homogenizer Workcenter (IKA T10). As suspensões puras e nas diluições 10^1 , 10^2 e 10^3 foram plaqueadas em meio sólido (DifcoTMLB AGAR, MILLER Luria-Bertani) e incubadas em estufa 5% de CO₂ a 37°C, após 24 horas foi feita a contagem da recuperação de CFU de *E. coli*.

3.9. Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares por citometria de fluxo

Para a análise do fenótipo das DC foram avaliados os marcadores específicos de superfície CD11c, CD11b, MHCII, CD80 e CD86, após o período de diferenciação. As DC foram coletadas, contadas e distribuídas em tubos FACS (BD PharMingen, San Diego, USA), na concentração de $0,5-1x10^6$ células por tubo. Para o bloqueio das ligações inespecíficas, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc BlockTM – BD PharMingen), na concentração de $0,5 \ \mu g/5x10^5$ células. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos monoclonais de interesse: CD11c, CD11b, CD80, CD86, MHCII, na concentração de $0,2 - 0,5 \ \mu g$ de anticorpo/5x10⁵ células, seguido de nova incubação de 30 minutos a 4 °C. Após esse período de incubação, foram adicionados 2 mL de PBS (solução salina tamponada de fosfatos) pH 7,2 contendo 2% SFB e as células foram centrifugadas a

1500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas e fixadas em 500 μL de PBS 1% paraformaldeído.

Após a diferenciação em CM, as células T obtidas foram reestimuladas por 4 – 6 horas com 0,05 µg/mL com PMA (Sigma) e 0,5 µg/mL de *ionóforo* de *cálcio* (A23187-Sigma) e BD GolgiStopTM Protein Transport Inhibitor (contendo monensin). Após período de incubação as células foram incubadas com anticorpos anti-CD4 e em seguida permeabilizadas com PermWash (BD Cytofix/CytopermTM Plus) por 15 minutos e, então, incubadas com anticorpo anti-IL-17 e anti- INF- γ . Para análise do fator de transcrição ROR γ T juntamente com IL-17A foi utilizado o kit Transcription Factor Buffer Set (BD PharMingen).

As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCantoTM (Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA) e analisados pelo programa FCS Express 4 Flow Research Edition (De Novo software). Todos os anticorpos são da BD PharMingen (BD PharMingen, San Diego, USA) e foram usados seguindo-se as instruções do fabricante.

3.10. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O sobrenadante resultante do ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas $(AC^{+E.coli})$ por células dendríticas foi avaliado quanto à presença de PGE₂ (PGE₂ EIA Kit, Cayman Chemicals – 514010) e das citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β (BD-Biosciences), IL-23 e IL-17A (eBiosciences).

A quantificação de PGE₂ foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, os controles, padrões e amostras foram pipetados na placa e esta foi incubada *overnight* a 4 °C. Após o período de incubação a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem, e 200 µL do reagente de revelação (Ellman's reagent) foram adicionados a todos os poços. Para revelação da cor, a placa foi mantida sob agitação orbital por 60 a 90 minutos, até desenvolvimento de coloração. Após este período, a placa foi lida em espectrofotômetro em absorvância de 412 nm (Epoch, Biotek). A concentração das amostras foi calculada de acordo com a curva gerada pelas concentrações conhecidas do padrão e os resultados foram expressos em pg/mL.

Para as citocinas, as quantificações foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Basicamente, placas de 96 poços (Corning, NY, USA) foram recobertas com 100 μ L/poço de solução contendo anticorpos purificados de captura, diluídos em tampão apropriado. As placas foram incubadas a 4°C, durante uma noite. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com solução PBS-Tween 20 (0,05%) e as placas foram incubadas com

200 μ L/poço de solução de bloqueio (PBS contendo 10% SFB) durante uma hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes e adicionou-se o padrão e 100 μ L/poço das amostras (sobrenadante). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas por 5 vezes e incubadas com 100 μ L/poço do *working detector* (anticorpo biotinilado mais Sav-HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas, desta vez por 7 vezes, e foram adicionados 100 μ L/poço da solução do substrato. Desta vez, as placas foram incubadas sob proteção da luz durante 30 minutos. Após o tempo determinado a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L/poço da solução de parada (H₂SO₄ 2N). A absorvância foi lida a 450 nm em um leitor de microplaca (Epoch, Biotek) e as concentrações das citocinas foram calculadas pela curva padrão gerada em cada ensaio com concentrações conhecidas das citocinas em questão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm SD e foram analisados utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \le 0,05$. Todos os experimentos foram realizados ao menos duas vezes em diferentes períodos.

Resultados

4. Resultados

4.1. Eficiência do processo de diferenciação de células dendríticas.

O protocolo de diferenciação de DC consistia em10 dias de cultivo de células isoladas da medula óssea na presença de GM-CSF. O ensaio de diferenciação começou com um número de $1x10^7$ células precursoras e, ao final de 10 dias, obtive-se $2-4x10^7$ células semi-aderentes.

Ao avaliar-se o caráter fenotípico das células diferenciadas, foi observado uma alta porcentagem de células positivas para o marcador específico de células dendríticas, CD11c, que variou de 80 a 90% do total de células em três experimentos independentes (Figura 4A e 5A). As células oriundas deste protocolo de diferenciação também apresentaram positividade para CD11b, um marcador muito expresso em macrófagos, mas, atualmente, sua expressão em células dendríticas está bem estabelecida (Figura 4B). Quanto aos marcadores de maturação, MHC-II, CD80 e CD86, as células diferenciadas apresentaram uma baixa positividade e intensidade de expressão destas moléculas em células CD11c⁺ (Figura 5B). A porcentagem de expressão destes marcadores variou entre 10 a 15% em células CD11c⁺. Quanto a molécula de MHCII, as células CD11c+ apresentaram três padrões de expressão de MHCII, as quais foram classificada por baixa expressão (MHCII^{dim}), expressão intermediária (MHCII^{int}) e alta expressão (MHCII^{high}). As células com padrão de expressão baixo (23.45%) e intermediário (64.59%) de MHCII foram consideradas células imaturas, pois não apresentaram expressão de CD86 (Figura 6A e 6B) e as células que apresentaram padrão de alta expressão de MHCII foram consideradas as células maduras, pois apresentaram expressão positiva de moléculas co-estimuladoras CD86 (Figura 6B). De maneira similar, as células maduras também apresentaram a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 (Figura 5B). De maneira interessante, as células maduras perdem a expressão da molécula CD11b (Figura 6C), sem que haja alteração de CD11c, e se tornam células menores com relação a população total de CDs (dados não mostrados). Essa diminuição de CD11b pode estar relacionada a diminuição da capacidade fagocítica de CDs maturas, uma vez que a molécula de CD11b, juntamente com CD18, forma o receptor de complemento iC3b, CR3. Assim, os resultados apresentados nas figuras 4, 5 e 6 demonstraram que o fenótipo de células obtidas à partir do protocolo de 10 dias de diferenciação resultou na diferenciação de ~90 % de CDs com fenótipo majoritário (85 a 90%) CD11c⁺CD11b⁺MHC-II^{low}CD80^{low}CD86^{low}.

Resultados



Figura 4. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea. As células precursoras da medula óssea foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI completo suplementado com a citocina recombinante GM-CSF, e cultivadas a 37° C durante dez dias. As células diferenciadas foram marcadas com anticorpos anti-CD11c conjugados com FITC e anti-CD11b conjugados com APC. (A) Dot plot representativos da porcentagem de células CD11c+ e (B) dot plot demonstrativo do caráter duplo positivo de nossas células dendríticas.



Figura 5. As células diferenciadas apresentaram características fenotípicas de células dendríticas imaturas. As células precursoras da medula óssea foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células/mL em meio RPMI completo suplementado com a citocina recombinante GM-CSF, e cultivadas a 37° C durante dez dias. As células diferenciadas foram marcadas com anticorpos anti-CD11c conjugados com FITC e anti-MHC-II, CD80 e CD86 conjugados com PE. (A) Porcentagem de células CD11c positivas em experimentos independentes e (B) porcentagem dos marcadores MHC-II, CD80 e CD86 em células CD11c positivas (Resultado representativo de 3 experimentos independentes).



Figura 6. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea. As células precursoras da medula óssea foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células/mL em meio RPMI completo suplementado com a citocina recombinante GM-CSF, e cultivadas a 37[°] C durante dez dias. As células diferenciadas foram marcadas com anticorpos anti-CD11c conjugados com Pe-Cy7, e anti-CD11b conjugados com APC, anti-MHCII conjugados com FITC e anti-CD86 conjugados com PE. Dot plot representativos da expressão de MHCII (A), CD86 (B) e CD11b (C) por células CD11c+.

4.2. Geração das células apoptóticas infectadas (AC^{+E.coli})

4.2.1. AC^{+E.coli} proveniente de células animais – ex vivo

Inicialmente, foi necessário comprovar a presença da bactéria no interior das células do exsudato peritoneal. Para comprovar a presença de *E. coli* no interior de células recrutadas para a cavidade peritoneal, a fagocitose de bactérias conjugadas à FITC foi avaliada por citometria de fluxo. Animais foram inoculados i.p. com *E.* coli^{+FITC} e após 13 h as células recrutadas para a cavidade peritoneal foram avaliadas por citometria de fluxo (figura 7A). Como demonstrado na Figura 7A, houve um deslocamento no canal de fluerência do FITC, demonstrando a presença de FITC dentro de células do exsudato peitoneal. Esse resultado foi repetido diversas vezes e encontrou-se em média 30% de células positivas para FITC (dado não mostrado). Para descartar as bactérias ligadas a membrana foi adicionada à suspensão celular a solução de Azul de Trypan, que promove o quenching da fluorescência externa da células, porém não encontrou-se diminuição da emissão de fluorescência das células do exsudato (dado não mostrado). Esses resultados comprovam que a fonte de células provenientes do exsudato peritoneal estavam carregando a bactéria *E.coli* em seu interior.

Posteriormente, preocupou-se em avaliar o perfil apoptótico de células recrutadas a partir da inoculação intraperitoneal (i.p.) de *E. coli* vivas ressuspensas em tioglicolato (Tio + *E. coli*) após a irradiação com luz UV. Através da marcação com Anexina/PI, foi detecado a porcentagem de 62,7% de células anexina⁺Pi⁻, consideradas células apoptóticas, e apenas 4% de células anexina⁺PI⁺, consideradas células apoptóticas tardias (figura 7B).

O próximo e último passo foi avaliar se essas células apoptóticas infectadas seriam fagocitadas pelas nossas BMDC. Para avaliarmos a fagocitose, $AC^{+E.coli}$ foram marcadas com o corante fluorescente CSFE antes da co-cultura com DC. Após 18 h, as células foram avaliadas quanto à positividade para CFSE em citometria de fluxo. Assim, células CD11c⁺CD11b⁺CFSE⁺ foram consideradas DC que fagocitaram $AC^{+E.coli}$. Na figura 8A observou-se no *dot plot* a população de $AC^{+E.coli}$ não fagocitadas, CD11c⁻CFSE⁺, e as DC que não fagocitaram, CD11c⁺CFSE⁻. Entre essas duas população pôde-se observar uma população CD11c⁺CFSE⁺, que seria a população de DC que fagocitaram $AC^{+E.coli}$ (figura 8A). Para quantificação da fagocitose, a população celular CD11c⁺CD11b⁺ foi avaliada quanto a porcentagem de células CFSE+ (figura 8B). Portanto, DC foram capazes de fagocitar as $AC^{+E.coli}$, com aproximadamente 40% índice de fagocitose (figura 8B). Esse resultado nos certificou da capacidade das DC em fagocitarem AC^{+E.coli}, confirmando o fenótipo imaturo das DC descrito acima.



Figura 7. Avaliação da taxa de infecção e perfil de morte celular do exsudado peritoneal. Os animais foram inoculados i.p. com 1 mL de tioglicolato contendo $10^6 E$. $Coli^{+FITC}$ (A) *ou* $10^6 E$. Coli vivas (B). (A) As células foram coletadas e avaliadas quanto a presença de FITC dentro das células em citometria de fluxo. (B) As células foram coletadas e marcadas com Anexina V/PI para determinação da porcentagem de células apoptóticas e necróticas. Dado representativo de n=5 animais.

Resultados



Figura 8. Células dendríticas (DC) são capazes de fagocitar células apoptóticas infectadas ($AC^{+E.coli}$). DC foram incubadas com $AC^{+E.coli}$ coradas com CFSE por 18 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após a incubação as células foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de moléculas de superfície celular CD11c e CD11b. A) Células totais em *dot plot* representativo das populações de DC, CD11c+CFSE- ou CD11c+CFSE+, e $AC^{+E.coli}$, CD11c-CFSE+. B) Células CD11c+CD11b+ foram avaliadas quanto a porcentagem de células CFSE+.

4.2.2. Geração alternativa de células apoptóticas infectadas - AC^{+E.coli} proveniente de células de linhagem Raw 264.7 – *in vitro*

Células de linhagem RAW 264.7 são macrófagos transformados derivados de camundongos da linhagem BALB/c. Por motivos didáticos, quando nos referirmos à RAW 264.7, utilizaremos a denominação MØ. Assim, MØ foram incubadas com *E. coli*-GFP vivas em proporções e tempos distintos para entendermos a cinética da infecção. Após a incubação, células CD11b⁺ foram avaliadas quanto a porcentagem de células infectadas, células CD11b⁺GFP⁺, e a taxa de infecção, intensidade de fluorescência GFP por célula CD11b⁺. Em todas as proporções e tempos analisados a porcentagem de células infectadas foi próxima de 100% (figura 9).

O aumento da intensidade da fluorescência GFP em células $CD11b^+$ foi diretamente proporcional ao aumento da proporção de bactérias (figura 6). O mesmo padrão de fluorescência foi observado para os dois tempos de incubação, com a taxa de infecção, medida pela intensidade de fluorescência por célula CD11b+, sendo maior quanto maior a proporção de bactéria (figura 6). Quando avaliaou-se a variável tempo, 3 h de incubação promoveu uma maior taxa de infecção quando comparada ao tempo de 2 h, independente da razão analisada (figura 6). Na figura suplementar 1, os resultados obtidos por citometria foram confirmados por microscópio de fluorescência de alta resolução (In Cell Analyzer, GE). As imagens confirmaram a alta taxa de infecção e um aumento do número de bactérias dentro dos MØ conforme aumentou-se a proporção de *E-coli*-GFP (figura suplementar 1). Para os ensaios de padronizações subsequentes foi escolhida a proporção 1:10 no tempo de incubação de 2 h.

Para comprovar a fagocitose por MØ, foi realizado um *quenching* da fluorescência externa da célula com azul de trypan em tampão carbonato, no qual se observaria um decréscimo da fluorescência GFP caso as bactérias estivessem apenas ligadas a membrana dos macrófagos e não internalizadas. Apesar do *quenching*, não houve alteração da fluorescência GFP (figura suplementar 2), demonstrando que as bactérias estavam internalizadas. Esse ensaio foi realizado só com a proporção 1:30 no tempo de 2 h de incubação.



Figura 9. Comparação da taxa de infecção de células Raw 264.7 nos diferentes tempos de infecção de acordo com a proporção de *E.coli*-GFP. MØ foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 h em estufa 5% CO2 à 37°C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E.coli*-GFP em três proporções distintas: 1:10, 1:30 e 1:50 (MØ:*E.coli*). As células foram incubadas por 2 h ou 3 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e avaliadas quanto a expressão de CD11b e GFP em citometria de fluxo. A) Sobreposição dos histogramas da emissão de fluorescência GFP de células CD11b+ que foram incubadas na proporção 1:10 por 2 h(linha preta) ou 3 h (linha cinza). B) Sobreposição dos histogramas da emissão de fluorescência GFP de células CD11b+ que foram incubadas na proporção 1:30 por 2 h(linha preta) ou 3 h (linha cinza). C) Sobreposição dos histogramas da emissão de fluorescência GFP de células CD11b+ que foram incubadas na proporção 1:50 por 2 h (linha preta) ou 3 h (linha cinza). O marcador vermelho inserido nos histogramas representa a demarcação para a positividade da fluorescência GFP.

Após a comprovação que a maioria dos MØ apresentavam marcação para GPF, indicando que haviam fagocitado as bactérias, determinou-se qual seria a intensidade de radiação UV apropriada para induzir a apoptose das células infectadas sem induzir um aumento de necrose. Desta forma, cinco diferentes intensidades (1, 5, 10, 20 e 50 mJ) de radiação UV foram testadas. Os MØ^{+E.coli} foram irradiados com as diferentes doses e após 4h as células foram marcadas com Anexina-V e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para avaliação da apoptose. Como a presença de células necróticas poderia influenciar nos resultados, a intensidade de 5mJ foi a dose escolhida por apresentar reduzida porcentagem de necrose ~3% e aumentar a apoptose precose/tardia ~29% (figura 10).

O último passo da padronização de MØ como fonte de células apoptóticas infectadas era avaliar a capacidade dessas células serem fagocitadas por DC. As células dendríticas foram capazes de fagocitar as MØ apoptóticos infectados ($AC^{+E.coli}$), com taxa de fagocitose próxima aos 50%, conforme demonstrado nos *dot plot*s na população duplo positiva para CD11c/CFSE (figura 11). Assim como as células apoptóticos infectados provenientes do exsudato peritoneal, os macrófagos apoptóticos infectados também foram fagocitados com uma alta taxa pelas DC. Assim, com uma fonte alternativa de células apoptóticas infectadas padronizado, concentrou-se na avaliação do meio condicionado derivado da co-cultura de DC com $AC^{+E.coli}$ provenientes da células de linhagem RAW 264.7.

60



Figura 10. Apoptose de $MO^{+E.coli}$. MØ foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 h em estufa 5% CO2 à 37°C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E.coli*-GFP na proporção 1:10 (MØ:*E.coli*). As células foram incubadas por 2 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e irradiadas ou não com 5 mJ de luz UV (CrossLinker, Vilber Lourmat). Após o tratamento com luz UV as células foram avaliadas quanto a apoptose pelo método de AnexinaV/7-AAD no citômetro de fluxo.



Figura 11. DC são capazes de fagocitar AC^{+E.coli}. MØ foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 h em estufa 5% CO2 à 37°C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E.coli*-GFP na proporção 1:10 (MØ:*E.coli*). As células foram incubadas por 2 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e irradiadas com 5 mJ de luz ultravioleta. $AC^{+E.coli}$ foram coradas com CFSE e incubadas com DC por 18 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após a incubação as células foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de moléculas de superfície celular CD11c. Células CD11c⁺ foram avaliadas quanto a porcentagem de células CFSE⁺.

4.3. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove a ativação e migração de células dendríticas *in vitro*

Sabe-se que o microambiente gerado pela fagocitose de AC^{+E.coli} por células dendríticas resulta na produção de mediadores solúveis (Meio condicionado - CM) que resultam na ativação de células Th17. Entretanto, até o momento, nada foi descrito quanto à capacidade de DC que fagocitam AC^{+E.coli} migrarem para o linfonodo. Para entender melhor esse fenômeno elaborou-se um ensaio de migração utilizando células dendríticas que fagocitaram células apoptóticas infectadas e não infectadas.

Células dendríticas (DC) foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea, como demonstrado acima (figura 4, 5 e 6) e, após confirmação do fenótipo imaturo destas DC após 10 dias de diferenciação, essas foram co-cultivadas com células apoptóticas (AC) ou células apoptóticas infectadas (AC^{+E.coli}). Inicialmente, padronizou-se a utilização de células apoptóticas infectadas utilizando células derivadas de camundongos infectados (figuras 7 e 8). Entretanto, devido à grande quantidade de animais utilizados para obtenção de células apoptóticas, padronizou-se o uso de células de linhagem RAW 264.7 para a geração de células apoptóticas infectadas, como demonstrado no material suplementar (figuras 9, 10 e 11). As células apoptóticas utilizadas nesse ensaio foram provenientes de linhagem RAW 264.7. Após 18 horas de co-cultura entre DC e AC ou AC+E.coli, as células CD11c+ foram avaliadas quanto ao fenótipo de ativação, no qual analisou-se a expressão de moléculas MHC-II, a molécula coestimuladora CD86 e o receptor de quimiocina CCR7. A fagocitose de AC resultou em baixa expressão concomitante de MHC-II e CD86, o que indica, como esperado, que a eferocitose não foi capaz de ativar as DC (figura 12). Por outro lado, quando as células apoptóticas estavam infectadas houve um aumento significativo na porcentagem de DC que expressavam MHC-II e CD86 (figura 12). Portanto, diferente dos resultados obtidos com DC que fagocitaram células apoptóticas não infectadas, a presença do micro-organismo no interior das células apoptóticas resultou na ativação de DC.

Outra característica da ativação de células dendríticas é a produção de mediadores, os quais criam o microambiente responsável pela orientação e polarização das células T $CD4^+$ *naive* no linfonodo drenante. A fagocitose de $AC^{+E.coli}$ por DC induziu a produção de IL-6 e TGF- β , enquanto a fagocitose de AC induziu apenas TGF- β (figura 13 B, C). Com relação à citocina IL-23, a detecção foi próxima ao limite inferior de detecção da curva padrão do ELISA (dados não mostrados). Ainda, os resultados obtidos demonstraram que a fagocitose

Resultados

de $AC^{+E.coli}$ promove a síntese de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e PGE₂ (figura 13 A e D), o que reitera a produção simultânea de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios no contexto da fagocitose de células apoptóticas infectadas.



Figura 12. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove a ativação de células dendríticas. Células dendríticas foram co-cultivadas com células apoptóticas (DC+AC), células apoptóticas infectadas (DC+AC^{+E.coli}) na proporção 1:3, ou na presença de RPMI (DC+Media), ou LPS (100ng/mL) (DC+LPS). Após 18h, células CD11c+ foram purificadas magneticamente com auxílio de microbeads conjugadas com anticorpo contra CD11c+. DC CD11c+ foram incubadas com anticorpos fluorescentes anti-CD86 (PE) e anti-MHCII (FITC) e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultado está expresso em contour plots que demonstram a expressão de MHC-II (eixo y) contra a expressão de CD86 (eixo x), representativos de um experimento. Resultado representativo de 4 experimentos individuais.



Figura 13. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove produção de mediadores específicos para a diferenciação de células Th17 e mediadores anti-inflamatórios. Células dendríticas foram cocultivadas com células apoptóticas (DC+AC), células apoptóticas infectadas (DC+AC^{+E.coll}) na proporção 1:3, ou na presença de RPMI (DC+Media), ou LPS (100ng/mL) (DC+LPS). Após 18h, o sobrenadante dessas células foi coletado e os mediadores solúveis IL-10 (A), IL-6 (B), TGF- β (C), PGE₂ (D) foram quantificados pelo método de ELISA. Experimento representativo de 4 experimentos individuais. Sendo, *p<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

No entanto, além das moléculas MHC-II+/CD86+, envolvidas na capacidade da DC em ativar a célula T CD4⁺, outra molécula importante associada à ativação de DC é o receptor de quimiocina CCR7. A expressão deste receptor de quimiocinas é essencial para a migração da mesma do sítio inflamatório para o linfonodo drenante, permitindo assim o encontro entre DC ativadas e células T CD4⁺ *naive*. A fagocitose de células apoptóticas infectadas (DC+AC^{+E.coli}) foi capaz de aumentar a expressão de CCR7, enquanto células apoptóticas não infectadas (DC+AC) induziram expressão mais modesta CCR7 (figura 14A e B). A fagocitose de AC^{+E.coli} foi capaz de induzir a expressão de CCR7 em DC, tanto em termos de % de células positivas para CCR7 como em número de moléculas expressas na superfície destas células, observado pelo aumento do deslocamento da fluorescência para a direita (figura 14 A).

A migração de DC para os linfonodos é um evento muito importante para a resposta imune, porém os fatores que governam esse fenômeno estão sendo elucidados. Acredita-se que o fator mais importante seja o receptor CCR7, que direciona as DC em direção aos vasos linfáticos aferentes por sua atração aos seus ligantes, CCL21 e CCL19, principalmente CCL21(Johnson and Jackson 2013). Assim, no ensaio de migração por *transwell*, as DC foram avaliadas quanto a sua capacidade migratória (trasnwell com porosidade de 5µm) na presença de CCL21 e CCL19. Ao final do ensaio, foram adquiridas imagens por câmera acoplada ao microscópio invertido para avaliar a migração de DC nas diferentes condições de cocultura: AC e AC^{+E.coli}. As DC incubadas com AC^{+E.coli} foram capazes de migrar de uma maneira semelhante ao controle positivo DC+LPS, enquanto DC que foram incubadas com AC tiveram uma migração semelhante ao controle negativo DC+Media (figura 15).



Figura 14. A fagocitose de células apoptóticas infectadas aumenta a expressão de CCR7 em células dendríticas. Células dendríticas foram co-cultivadas com células apoptóticas (DC+AC), células apoptóticas infectadas (DC+AC^{+E.coli}) na proporção 1:3, ou na presença de RPMI (DC+Media), ou LPS (100ng/mL) (DC+LPS). Após 18h, células CD11c+ foram purificadas magneticamente com auxílio de microbeads conjugadas com anticorpo contra CD11c+. DC CD11c+ foram avaliadas quanto a expressão do receptor CCR7. A) Area plot representativo da porcentagem de células positivas para CCR7 em células CD11c+. B) Análise comparativa da expressão de CCR7 pela sobreposição de histogramas das condições sobre o histograma do controle negativo DC. Resultado representativo de 4 experimentos individuais.



Figura 15. A fagocitose de células apoptóticas infectadas promove a migração de células dendríticas. Células dendríticas foram co-cultivadas com células apoptóticas (DC+AC), células apoptóticas infectadas (DC+AC^{+E.coli}) na proporção 1:3, ou na presença de RPMI (DC+Media), ou LPS (100ng/mL) (DC+LPS). Após 18h, células CD11c+ foram purificadas magneticamente com auxílio de microbeads conjugadas com anticorpo contra CD11c+. DC CD11c+ foram avaliadas em ensaio de migração realizado em placas de *transwell* com porosidade de 5 μ m. 600 μ L de meio RPMI-c contendo 300 ng/mL CCL19 e 250 ng/mL CCL21 foram adicionados à câmara inferior, e 1x10⁵ DC foram adicionadas à câmara superior. As placas permaneceram 3 h a 37° em estufa de CO₂ a. As membranas foram retiradas e imagens foram capturadas através de câmera acoplada ao microscópio invertido. A) Controle negativo; B) Condição DC+AC; C) Condição DC+ AC^{+E.coli}; C) Condição DC+LPS.

4.4. A fagocitose de células apoptóticas infectadas induz a produção de PGE2 juntamente com IL-6 e TGF-β

Após co-cultura de DC e $AC^{+E.coli}$, o sobrenadante da cultura, denominado meio condicionado (CM), foi coletado e avaliado quanto a presença de PGE₂ e citocinas. Inicialmente, o CM gerado era proveniente da co-cultura entre DC e $AC^{+E.coli}$ provenientes de células animais (CM^{mice}). Devido ao gasto de animais, e à necessidade em avaliar uma fonte de célula apoptótica alternativa, optou-se pela utilização de células apoptóticas infectadas provenientes de linhagem. Portanto, padronizou-se a geração de células apoptóticas infectadas proveniente de linhagem células Raw 264.7. O CM gerado a partir da co-cultura dessa fonte alternativa de $AC^{+E.coli}$ com DC foi denominado CM^{Raw}.

4.4.1. CM^{mice} - AC^{+E. coli} proveniente de células animais – ex vivo

Na tentativa de mimetizar a cinética da carga bacteriana durante um processo infecioso, os animais foram inoculados com alta cargas bacteriana, $10^6 E. coli$ (*high*), e baixa carga bacteriana, $10^5 E. coli$ (*low*), gerando desta forma os grupos AC^{+E.coli} (*high*) ou AC^{+E.coli} (*low*).

A fagocitose de $AC^{+E.coli}$ por DC foi capaz de promover a produção de PGE_2 para ambos os grupos DC+ $AC^{+E.coli}$ (*low*) e DC+ $AC^{+E.coli}$ (*high*), de maneira significativa quando comparados ao controle negativo, grupo DC (Figura 16). Ainda, o aumento da carga bacteriana resultou no aumento da produção de PGE₂ quando comparamos os grupos $AC^{+E.coli}$ (figura 16). Enquanto isso, obteve-se apenas um modesto aumento de PGE₂ por DC durante a eferocitose, porém não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo DC.



Figura 16. PGE₂ é produzida durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas por DC. As DC foram incubadas com AC, ou AC^{+E.coli} infectadas com baixa (*low*, 10⁵) ou alta (*high*, 10⁶) carga bacteriana, na proporção de 1DC:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de PGE₂ foi analisada por Elisa. Sendo, *p<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.
Conforme esperado, foi encontrado no CM as citocinas relacionadas ao padrão de diferenciação de células Th17, IL-6, IL-1 β e TGF- β (figura 17 e 18). A condição DC+AC^{+E.coli} (*high*) resultou na síntese de altos níveis destes mediadores quando comparado com a condição DC+AC^{+E.coli} (*low*) (figura 17 e 18), na qual apenas a produção de TGF- β foi significativamente maior com relação ao controle DC (figura 18). Assim, gerou-se duas condições distintas de CM: a condição de co-cultura capaz de induzir a produção de altos níveis mediadores solúveis, como IL-6, TGF- β , IL-1 β e PGE₂ (CM (*High*)) e a condição de co-cultura que leva a síntese de baixos níveis destes mediadores (CM (*Low*)) (Figura 17 e 18).



Figura 17. Produção de IL-1 β e IL-6 por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas. As DC foram incubadas com AC, ou AC^{+E.coli} infectadas com baixa (*low*, 10⁵) ou alta (*high*, 10⁶) carga bacteriana, na proporção de 1DC:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-1 β (A) e IL-6 (B) foi analisada por Elisa. Sendo, *p < 0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.



Figura 18. Produção de TGF- β por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas. As DC foram incubadas com AC, ou AC^{+E.coli} infectadas com baixa (*low*, 10⁵) ou alta (*high*, 10⁶) carga bacteriana, na proporção de 1DC:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-1 β (A) e IL-6 (B) foi analisada por Elisa. Sendo, *p < 0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

4.4.2. CM^{Raw} - AC^{+E.coli} proveniente de células de linhagem Raw 264.7 – *in vitro*

A fagocitose de AC^{+E.coli} por DC promoveu elevados níveis de PGE₂ (~16 ng/mL), e o tratamento com indometacina (CM^{+Indo}) foi capaz de reduzir significativamente a produção de PGE₂ (figura 19). Para avaliar o papel de PGE₂, presente no CM, na diferenciação de células Th17, além do tratamento com inibidores não seletivos de COX, utilizamos colunas de purificação de PGE₂ (*Prostaglandin E2 affinity column #400056 - Cayman*). Esta coluna remove seletivamente a PGE2, permanecendo no CM os demais prostanóides também produzidos pela enzima COX. Assim, a retenção de PGE₂ por meio da coluna de afinidade supracitada (CM^{-PGE2}) também reduziu significativamente os níveis de PGE₂, entretanto, de maneira menos efetiva quando comparado ao tratamento com a droga indometacina (figura 19). A coluna de afinidade não foi capaz de reter toda PGE₂ produzida, pois sua capacidade de retenção é de no máximo 10 ng/mL, o que já foi significativo no ensaio (figura 19).

As citocinas envolvidas na diferenciação de Th17 também foram produzidas em níveis significativos durante a fagocitose de $AC^{+E.coli}$ provenientes de células Raw 264.7 (figura 20 e 21). Quando o CM foi tratado para a remoção de PGE₂ em coluna de afinidade observou-se uma perda significativa de TGF- β (CM^{-PGE2}) (figura 20B), entretanto os níveis de IL-6 (figura 20A) e IL-1 β (figura 21A) não foram alterados. Ainda, observou-se que o tratamento com inibidores não seletivos de COX (indometacina-CM^{+Indo} e ibuprofeno-CM^{+Ibup}) reduziram significativamente a produção de TGF- β (figura 20B), IL-6 (figura 20A) e IL-1 β (figura 21A) pelas DC, enquanto a produção de IL-23 (figura 21B) não foi alterada.



Figura 19. PGE₂ é produzida durante a fagocitose de células apoptóticas infectadas por DC. As DC foram incubadas com AC^{+*E.coli*} infectadas, derivadas de fonte de linhagem, na proporção de 1DC:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de PGE₂ foi analisada por Elisa. DC, apenas células dendríticas; CM, DC cultivadas por 18h com AC^{+*E.coli*}; CM^{-PGE2}, CM após passagem por coluna seletiva para remoção de PGE₂; CM^{+Indo}, CM + indometacina (10 μ M). Sendo, **p*<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pósteste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.



Figura 20. Produção de IL-6 TGF-β por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas. As DC foram incubadas com AC^{+E.coli} infectadas, derivadas de fonte de linhagem, na proporção de 1DC:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-6 (A) e TGF-β (B) foi analisada por Elisa. DC, apenas células dendríticas; CM, DC cultivadas por 18h com AC^{+E.coli}; CM^{-PGE2}, CM após passagem por coluna seletiva para remoção de PGE₂; CM^{+Indo}, CM + indometacina (10 μM); CM^{+Hbup}, CM + ibuprofeno (10 μM); Apop, DC cultivada por 18h com células apoptóticas não infectadas; Nec, DC cultivada por 18h com células necróticas. Sendo, *p<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.



Figura 21. Produção de IL-1 β e IL-23 por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas. As DC foram incubadas com AC^{+*E.coli*} infectadas, derivadas de fonte de linhagem, na proporção de 1DC:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-1 β (A) e IL-23 (B) foi analisada por Elisa. DC, apenas células dendríticas; CM, DC cultivadas por 18h com AC^{+*E.coli*}; CM^{-PGE2}, CM após passagem por coluna seletiva para remoção de PGE2; CM^{+Indo}, CM + indometacina (10 μ M); CM^{+Ibup}, CM + ibuprofeno (10 μ M); Apop, DC cultivada por 18h com células apoptóticas não infectadas; Nec, DC cultivada por 18h com células necróticas. Sendo, **p*<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

4.5. A PGE₂ proveniente da fagocitose de células apoptóticas infectadas por DC inibe a diferenciação de Th17 via receptor EP4

Inicialmente, os primeiros ensaios de diferenciação de células T utilizando o CM resultaram em nula ou muito baixa diferenciação de células Th17 (figura suplementar 3). O aumento na força do primeiro sinal, através do aumento da concentração de anti-CD3 foi capaz de melhorar a diferenciação de células Th17 (figura suplementar 4), entretanto, curiosamente, o bloqueio da PGE₂ foi responsável pelo aumento da diferenciação de células Th17 em pelo menos 50% (dados não mostrados) nos experimentos subsequentes.

Nesse momento, a fim de entender-se melhor o papel da PGE₂ na diferenciação de células Th17 e para responder se ela poderia estar inibindo a diferenciação de células Th17 em nosso contexto, realizaram-se experimentos com adição de PGE₂ em cultura de células Th17. Mesmo em baixas concentrações (10 nM), mesmo com o primeiro sinal elevado (4 μ g/poço), a PGE₂ foi capaz de inibir a diferenciação e proliferação de células Th17 (figuras suplementares 5, 6, 7 e 8).

Os resultados citados acima foram obtidos com CM^{mice}, em sua maior parte, e os experimentos seguintes foram realizados com CM^{raw} no intuito de entender essa atuação inibitória de PGE₂.

Para aumentar a pureza de nossas amostras obtidas a partir da purificação por *beads* magnéticas, e minimizar a presença de contaminantes como células T de memória, seria interessante utilizar-se um *sorting* de células T $CD4^+naive$ por citometria de fluxo. Entretanto, essa estratégia não foi possível e a estratégia adotada para diminuir a influência de células T de memória foi a utilização de anticorpos bloqueadores de citocinas (anti-IFN- γ , anti-IL-4 e anti-IL-2). Ainda, essa estratégia foi escolhida para aumentar a visualização do efeito inibitório de PGE₂ nos ensaios de diferenciação de células Th17.

Para investigar quais receptores de PGE₂ seriam responsáveis pelo efeito supressor na diferenciação de Th17, utilizou-se agonistas de EP2 e EP4 e antagonistas de EP1, EP2 e EP4 durante os ensaios de diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naive* na presença de CM ou CM^{+Indo}. Como demonstrado na figura 22, a diferenciação de células Th17 na presença do CM é baixa (\cong 3,6 %), entretanto, quando adicionou-se antagonista de EP4 (L-161,982), a diferenciação se tornou evidente, com \cong 20 % das células TCD4⁺ sendo IL-17A⁺ (figura 22). Porém, a adição do antagonista de EP1 (SC-51089) ou antagonista de EP2 (AH6869) não resultou em aumento na diferenciação de Th17 na presença de CM (figura 22), sugerindo que a

PGE₂ esteja sinalizando via receptor EP4. Ainda, a adição concomitante de antagonista de EP2 (AH6869) e antagonista de EP4 (L-161,982) não aumentou a diferenciação de células Th17 observada com a adição de antagonista EP4 apenas, não havendo assim ação sinérgica entre os receptores EP2 e EP4 (figura 22).

Quando utilizou-se o CM^{+Indo} , obteve-se um aumento na diferenciação de células IL-17A⁺, quando comparado ao grupo CM, sugerindo que a ausência de PGE₂ seria responsável por esse aumento (figura 23A). De maneira interessante, quando o antagonista de EP4 foi adicionado ao CM^{+Indo} , houve um aumento na diferenciação de células Th17, enquanto a adição de antagonista de EP1 ou antagonista de EP2 não alterou a diferenciação de Th17 (figura 23 B). Novamente, não observou-se efeito sinérgico ao bloquear-se os receptores EP2 e EP4 concomitantemente na condição CM^{+Indo} . A capacidade do antagonista de EP4 em aumentar a diferenciação de Th17 mesmo na condição CM^{+Indo} reitera o quanto a presença de PGE₂, mesmo em níveis reduzidos, pode comprometer a diferenciação de células Th17. Ainda, o mesmo resultado também foi observado quando utilizou-se uma outra droga inibidora de COX, o ibuprofeno (CM^{+Ibu}), como observado na figura suplementar 9.



Figura 22. Antagonista de EP4 aumenta a diferenciação de células Th17. Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, derivados da população CD4⁺. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.



Figura 23. Antagonista de EP4 aumenta a diferenciação de células Th17 mesmo na condição CM^{+Indo} . Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM ou CM^{+Indo} (A), com adição de antagonista de EP1, 5 µM SC-51089; ou antagonista de EP2, 5 µM AH6869; ou antagonista de EP4, 5 µM L-161,982; ou antagonista de EP2 e EP4 concomitantemente, conforme indicado. Após 3 dias de cultura as células repousaram por um dia antes de serem reestimuladas por 5 h com PMA/Ionomicina e GolgiStop. A porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL-17A⁺ foi avaliada por citometria de fluxo e está representada por countour plots de ROR γ T x IL-17A, derivados da população CD4⁺. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

Por fim, a adição de agonistas de EP2 (Butaprost) e EP4 (Cay10598) na condição CM^{+Indo} foi capaz de confirmar a importância do receptor EP4 na atuação da PGE₂ em inibir a diferenciação de células Th17. Quando o agonista de EP4 foi adicionado à condição CM^{+Indo} observou-se uma completa inibição da diferenciação de Th17, enquanto que para o agonista de EP2 observou-se uma diminuição não significativa (figura 24). Assim, o receptor EP4 parece ser o principal receptor pelo qual a PGE₂ regula negativamente a diferenciação de células Th17.



Figura 24. Agonista de EP4 inibe a diferenciação de células Th17 na condição CM^{+Indo}. Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM^{+Indo}, com adição de agonista de EP2, 5 µM butaprost; ou agonista de EP4, 5 µM Cay10598, conforme indicado. Após 3 dias de cultura as células repousaram por um dia antes de serem reestimuladas por 5 h com PMA/Ionomicina e GolgiStop. A porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL-17A⁺ foi avaliada por citometria de fluxo e está representada por countour plots de ROR γ T x IL-17A, derivados da população CD4⁺. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

Quando os resultados foram expressos em gráficos de barras, observou-se que, apesar do aumento na porcentagem de células IL-17A+ observado em alguns grupos (figura 25A), não houve diferença estatística para média geométrica de fluorescência (MFI) das células IL-17A+ (figura 25B), ou seja, a produção por célula de IL-17A não foi alterada. Ainda, não foi observado diferença na expressão de RORγT nos diferentes grupos, ao menos no dia 4 de cultura (figura 25C). Por fim, esses resultados também foram comprovados por dosagem de IL-17A no sobrenadante de cultura da diferenciação de Th17 (figura 26).

Vale ressaltar que, além do aumento na porcentagem de células IL-17A+ observado nos grupos no qual a ação de PGE₂ foi inibida, foi observado em todos experimentos um aumento drástico no número de células ao final do experimento nesses grupos. Entretanto, a contagem precisa só foi permitida em um dos experimentos, que foi realizado no citômetro Accuri, que permite a contagem de células (figura 27). A diferença encontrada entre o a concentração de células ao final da diferenciação de Th17 demonstra a capacidade de inibição da PGE₂ em regular a diferenciação de células Th17 e aumenta drasticamente a diferença entre os grupos quando transfere-se essa diferença para os dados em porcentagem.



Figura 25. PGE₂ atua via receptor EP4 para regulação negativa da diferenciação de linfócitos Th17. Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM ou CM^{+Indo}, com adição de antagonista de EP1, 5 µM SC-51089; ou antagonista de EP2, 5 µM AH6869; ou antagonista de EP4, 5 µM L-161,982; ou antagonista de EP2 e EP4 concomitantemente; ou agonista de EP2, 5 µM butaprost; ou agonista de EP4, 5 µM Cay10598, conforme indicado nos gráficos. Após 3 dias de cultura as células repousaram por um dia antes de serem reestimuladas por 5 h com PMA/Ionomicina e GolgiStop. A porcentagem de linfócitos T CD4⁺ produtoras de IL-17A. B) Gráfico demonstrativo da média geométrica de fluorescência de IL-17A em células TCD4⁺ produtoras de IL-17A. B) Gráfico demonstrativo da porcentagem de células TCD4⁺ ROR γ T+. Sendo, *p<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Os grupos comparados estatítiticamente foram CM (low) e CM (high), e os grupos que receberam tratamento com antagonistas ou agonistas com seus respectivos CM, como delimitado pela linha tracejada. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.



Figura 26. PGE₂ atua via receptor EP4 para inibição da produção de IL-17A. Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM ou CM^{+Indo}, com adição de antagonista de EP1, 5 µM SC-51089; ou antagonista de EP2, 5 µM AH6869; ou antagonista de EP4, 5 µM L-161,982; ou antagonista de EP2 e EP4 concomitantemente; ou agonista de EP2, 5 µM butaprost; ou agonista de EP4, 5 µM Cay10598, conforme indicado nos gráficos. Após 3 dias de cultura o sobrenadante foi coletado e a citocina IL-17A foi quantificada por ELISA. Sendo, **p*<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Os grupos comparados estatítiticamente foram CM (low) e CM (high), e os grupos que receberam tratamento com antagonistas ou agonistas com seus respectivos CM, como delimitado pela linha tracejada. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.



Figura 27. PGE_2 inibe a diferenciação de células Th17 em termos de número de células. Linfócitos T CD4⁺ naive foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM ou CM^{+Indo}, com adição de antagonista de EP2, 5 µM AH6869; ou antagonista de EP4, 5 µM L-161,982; ou antagonista de EP2 e EP4 concomitantemente; conforme indicado no gráfico. Após 3 dias de cultura as células repousaram por um dia antes de serem reestimuladas por 5 h com PMA/Ionomicina e GolgiStop. A contagem de células foi calculada pelo citômetro Accuri no momento da aquisição das células marcadas. Sendo, *p<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Os grupos comparados estatítiticamente foram CM (low) e CM (high), e os grupos que receberam tratamento com antagonistas com seus respectivos CM, como delimitado pela linha tracejada.Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Por fim, utilizou-se o CM^{mice} (item 4.4.1), a fim de comprovar os resultados obtidos com o CM^{Raw} (item 4.4.2). De maneira interessante, o CM^{mice} derivado da co-cultura de DC e $AC^{+E.coli}(low)$ (grupo CM (Low)) não promoveu a diferenciação de células Th17, enquanto o CM^{mice} derivado da co-cultura de DC e $AC^{+E.coli}(high)$ (grupo CM (High)) promoveu uma alta diferenciação de células Th17 (\cong 20 %), o que não havia sido observado até o momento com o CM^{Raw} (figura 28). Ainda, quando bloqueou-se o receptor EP4, através do uso de antagonista (L-161,982), essa diferenciação aumentou drasticamente (\cong 49 %) (figura 28), demonstrando mais uma vez a importância do receptor EP4 para inibição da diferenciação de células Th17.

Além do aumento na porcentagem, houve ainda aumento significativo no MFI de células IL-17A⁺ quando comparou-se CM(Low) e CM(High), porém não houve aumento significativo quando o grupo CM(High) foi tratado com antagonista de EP4 (figura 29A). Ainda, observou-se um aumento significativo na porcentagem e no MFI de células positivas para o fator de transcrição mestre do fenótipo Th17 ROR γ T, tanto entre os grupos CM(Low) e CM(High), como quando houve o tratamento com antagonista de EP4 no grupo CM(High) (figura 29B). Ainda, esses resultados também foram comprovados por dosagem de IL-17A no sobrenadante de cultura da diferenciação de Th17 (figura 30).



Figura 28. Antagonista de EP4 aumenta a diferenciação de células Th17 na condição CM^{mice}. Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM^{mice} derivado da co-cultura de DC e AC^{+E.coli}(low-1x10⁵) (grupo CM (Low)); ou CM^{mice} derivado da co-cultura de DC e AC^{+E.coli}(high-1x10⁶) (grupo CM (High)), com adição de antagonista de EP4, 5 µM L-161,982, conforme indicado. Após 3 dias de cultura as células repousaram por um dia antes de serem reestimuladas por 5 h com PMA/Ionomicina e GolgiStop. A porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL-17A⁺ foi avaliada por citometria de fluxo e está representada por countour plots de ROR γ T x IL-17A, derivados da população CD4⁺. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.



Figura 29. Antagonista de EP4 aumenta a expressão de IL-17A e ROR γ T. Linfócitos T CD4⁺ naive foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti-IL-6, 5 µg/mL de anti-IL-17A. B) Gráfico demonstrativo da média geométrica de fluorescência de IL-17A em células TCD4⁺ROR γ T+. D) Gráfico demonstrativo da média geométrica de fluorescência de ROR γ T em células TCD4⁺ROR γ T+. Sendo, *p < 0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Os grupos comparados estatíticamente foram CM (low) e CM (high), e os grupos +EP4 Ant com seus respectivos CM, como delimitado pela linha tracejada. Resultado representativo de 2



Figura 30. Antagonista de EP4 aumenta a produção de IL-17A na condição CM^{mice} . Linfócitos T $CD4^+$ naive foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM^{mice} derivado da co-cultura de DC e AC^{+E.coli}(low-1x10⁵) (grupo CM (Low)); ou CM^{mice} derivado da co-cultura de DC e AC^{+E.coli}(high-1x10⁶) (grupo CM (High)), com adição de antagonista de EP4, 5 µM L-161,982, conforme indicado. Após 3 dias de cultura o sobrenadante foi coletado e a citocina IL-17A foi quantificada por ELISA. Sendo, *p<0.05, utilizando análise de variância ANOVA, pós-teste Tukey. Os grupos comparados estatítiticamente foram CM (low) e CM (high), e os grupos +EP4 Ant com seus respectivos CM, como delimitado pela linha tracejada. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

Para comprovar os resultados obtidos *in vitro*, foi avaliado a diferenciação de células Th17 no ambiente pulmonar e o envolvimento de PGE₂ nesse contexto. Para isso, criou-se um modelo experimental de infecção associado à presença de $AC^{+E.\ coli}$, descrito com mais detalhes no delineamento experimental (item 3.8). Animais foram infectados com $1x10^6\ E.\ coli$ através de instilação intranasal (i.n.) e após 24 horas foram instilados com $1x10^7\ AC^{+E.\ coli}$. Os animais foram ou não tratados com o inibidor não seletivo de COX, indometacina, e, ao final do ensaio, os animais foram novamente infectados por via i.n., na intenção de promover uma maior migração de células Th diferenciadas para o sítio inflamatório. As concentrações utilizadas e períodos avaliados foram previamente padronizados pelo grupo de pesquisa. Para avaliar o envolvimento de PGE₂ no processo de diferenciação de células Th17, os pulmões, linfondos do mediastino e cervicais foram coletados para a análise de células Th17. Células totais foram reestimuladas com PMA/Ionomicina e GolgiStop por 5 horas e analisadas por citometria de fluxo para a produção de IL-17A.

Quando comparou-se os grupos apenas infectado com *E. coli* e o grupo de animais que, além da infecção por *E.coli* recebeu a instilação $AC^{+E.\ coli}$, não foi possível observar diferenças entre a diferenciação de células Th17 (figura 31A). Entretanto, quando tratou-se o grupo *E.coli* + $AC^{+E.\ coli}$ com o bloqueador não seletivo de Cox indometacina, observou-se um aumento significativo da diferenciação de células Th17 (figura 31A). Quando as diferenças são avaliadas em número absoluto de células os resultados são evidentes. Os animais instilados com $AC^{+E.\ coli}$ e tratados com Indometacina apresentaram um aumento de ~ 4x no número de células Th17 no pulmão, quando comparado com o número destas células obtidas dos animais instilados com $AC^{+E.\ coli}$ que não receberam Indo (figura 31C).

Bactérias gram-negativas, como *E. coli*, induzem a síntese de PGE₂ (Agard;Asakrah and Morici 2013) e diferenciação de células Th17 (Tsai et al. 2013). No entanto, os resultados aqui apresentados sugerem que baixos níveis de PGE₂ foram produzidos pela infecção com *E. coli* e, desse modo, a inibição deste mediador lipídico pelo tratamento com indometacina, não levou ao aumento de diferenciação de células Th17 nesses animais. No entanto, a presença de *E. coli* no interior de AC resulta na produção de altos valores de PGE₂ pela fagocitose das $AC^{+E. coli}$ por DC. Portanto, os valores elevados de PGE₂, produzidos após a instilação de

AC^{+*E. coli*}, geram um microambiente que inibe a diferenciação de células Th17, e esse efeito é revertido pelo tratamento com inibidor de COX, indometacina (figura 31 A, B e C).



Resultados



Figura 31. Efeito supressor de PGE₂ **na diferenciação de células Th17** *in vivo* – **Pulmão.** Animais C57BL/6 foram infectados (i.n.) com 1x10⁶ *E. coli* e instilados com 1x10⁷ AC^{+E.coli}. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: (A) Grupo controle: animais não infectados com *E. coli* e não instilados com AC^{+E.coli}, tratados ou não tratados com Indometacina (100 µg/animal); (B) Grupo *E. coli*: animais infectados com *E. coli*, tratados ou não com Indometacina (100 µg/animal); (C) Grupo *E. coli*: Animais infectados com *E. coli*, instilados com AC^{+E.coli} após 24 h, tratados ou não tratados com Indometacina (100 µg/animal); (C) Grupo *E. coli*+AC^{+E.coli}. animais infectados com *E. coli*, instilados com Indometacina (100 µg/animal) ou PBS i.p., a cada 2 dias, por 4X, a partir do dia 3. Após 24 h do último tratamento com a droga, os animais foram reinstilados (i.n.) com 1x10⁶ *E. coli* e no dia seguinte eutanasiados. Foi feita a coleta dos pulmões e linfondos cervicais e do mediastino, e as suspensões celulares obtidas foram analisadas quanto à porcentagem de células positivas para Th17 por citometria de fluxo após reestimulo com PMA/Ionomicina e GolgiStop por 5h. A, B e C) Dot Plots representativos da % de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ no pulmão dos animais dos diferentes grupos experimentais. D) Sobreposição dos histogramas representativos entre os grupos controle, AC^{+E.coli} s/ Indo e AC^{+E.coli} c/ Indo (MIF); E) Gráfico representativo da % de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ nos pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais. F) Gráfico representativo do número absoluto de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ em relação a contagem de leucócitos totais dos pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais. F) Gráfico representativo do número absoluto de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ em relação a contagem de leucócitos totais dos pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais. F) Gráfico representativo do número absoluto de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ em relação

Nos linfonodos cervicais foi observado o mesmo efeito biológico dos resultados descritos no pulmão. Tanto em animais do grupo controle, como em animais apenas infectados com *E. coli* tratados ou não com indometacina, não foi possível detectar células positivas para Th17 (Dados não mostrados). Assim como observado no pulmão, o tratamento com indometacina dos animais infectados com *E. coli* e instilados com $AC^{+E. coli}$ resultou em um aumento em ~ 3x na porcentagem de células T CD4⁺ positivas para IL-17 (Figura 32A e B). Nos linfonodos do mediastino não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (Dados não mostrados).

Ainda, o aumento de células Th17, observado para o grupo $E.coli + AC^{+E.coli}$ tratado com indometacina, foi acompanhado pelo aumento do recrutamento de neutrófilos para o pulmão e diminuição da carga bacteriana, quando comparado com animais que não receberam tratamento com Indo (Figura 33A e B).



Figura 32. Efeito supressor de PGE₂ na diferenciação de células Th17 *in vivo* – Linfonodo cervical. Animais C57BL/6 foram infectados (i.n.) com $1\times10^6 E$. *coli* e instilados com $1\times10^7 \text{ AC}^{+\text{E.coli}}$. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo controle: animais não infectados com *E. coli* e não instilados com $AC^{+\text{E.coli}}$, tratados ou não tratados com Indometacina (100 µg/animal); Grupo *E. coli*: animais infectados com *E. coli*, instilados com Indometacina (100 µg/animal); Grupo *E. coli*: animais infectados com *E. coli*, instilados com $AC^{+\text{E.coli}}$ após 24 h, tratados ou não tratados com Indometacina (100 µg/animal); Grupo *E. coli*+ $AC^{+\text{E.coli}}$: animais infectados com *E. coli*, instilados com $AC^{+\text{E.coli}}$ após 24 h, tratados ou não tratados com Indometacina (100 µg/animal). Os animais foram tratados com Indometacina (100 µg/animal) ou PBS i.p., a cada 2 dias, por 4X, a partir do dia 3. Após 24 h do último tratamento com a droga, os animais foram reinstilados (i.n.) com $1\times10^6 E$. *coli* e no dia seguinte eutanasiados. Foi feita a coleta dos pulmões e linfonodos cervicais e do mediastino, e as suspensões celulares obtidas foram analisadas quanto à porcentagem de células positivas para Th17 por citometria de fluxo após reestimulo com PMA/Ionomicina e GolgiStop por 5h. A, B) Dot Plots representativos da % de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ no linfonodo cervical dos animais do grupo *E.coli*+AC^{+E.coli}. C) Gráfico representativo da % de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ no linfonodos cervicais dos animais dos diferentes grupos experimentais. Análise feita pelo programa

GraphPadPrism 5.0. Dados de um experimento representativo, de 3 experimentos individuais. N= 3 animais por grupo.

LUNG



Figura 33. Inibição de PGE₂ resulta no aumento da migração de neutrófilos e diminuição da recuperação de *E. coli* no pulmão. Células obtidas do pulmão de animais dos diferentes grupos experimentais foram marcadas com anti-CD11b e anti-LY6G e o número de neutrófilos foi avaliado por citometria de fluxo. (A) Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos LY6G⁺ no pulmão dos diferentes grupos experimentais. (B) O lóbulo inferior esquerdo do pulmão foi homogeneizado e CFU de *E. coli* foram recuperadas. Dados de um experimento representativo, de 3 experimentos individuais. N= 3 animais por grupo



5. Discussão

A fagocitose de AC^{+*E.coli*} por células dendríticas resulta na produção de mediadores solúveis capazes de promover a ativação de células Th17 (Torchinsky et al. 2009). Entretanto, até o momento, nada foi descrito quanto à capacidade de DC migrarem para o linfonodo após a fagocitose de AC^{+*E.coli*}. As DC que fagocitam uma célula apoptótica infectada possuem a capacidade de apresentar peptídeos próprios e não próprios na presença de moléculas co-estimuladoras (Blander and Medzhitov 2006). Uma maneira de evitar a ativação de clones auto reativos seria diminuir, ao invés de aumentar, a sua capacidade de migração. A migração de DC do sítio periférico para o linfonodo drenante ocorre através da entrada das mesmas nos vasos linfáticos e sua movimentação até o linfonodo, processo regulado principalmente pela expressão do receptor de quimiocina CCR7 e seus ligantes CCL19 e/ou CCL21 (Randolph;Angeli and Swartz 2005, Förster;Braun and Worbs 2012, Johnson and Jackson 2013).

Os resultados demonstraram que a fagocitose de AC^{+E.coli} por DC foi capaz de ativar as mesmas, com aumento da expressão de MHC-II, CD86 e CCR7. Ainda, essas DC produziram uma grande quantidade de PGE₂, juntamente com as citocinas previamente descritas IL-6 e TGF-β (Torchinsky et al. 2009). Além disso, estas DC foram capazes de migrar em resposta aos seus ligantes CCL19 e CCL21, in vitro. Ainda, os resultados demonstraram um aumento na expressão de CCR7 não associado à maturação da DC após a fagocitose de AC, corroborando com o estudo de Verbovetski et al., 2002, porém não observou-se um aumento na capacidade de migração, ao contrário do estudo supracitado. Essa diferença pode estar associada com o receptor utilizado pela DC para fagocitar as ACs, já que este estudo utilizou-se de ACs opsonizadas com iC3b (Verbovetski et al. 2002). A PGE₂ é um mediador importante para indução de CCR7 em células dendríticas, atuando através dos receptores EP2 e EP4 (Scandella et al. 2002, Legler et al. 2006). Apesar de não ter-se bloqueado a produção de PGE₂ nos ensaios, a alta produção de PGE₂ por DC após a fagocitose de AC^{+E.coli} pode estar associada ao aumento da expressão do receptor CCR7. Portanto, os resultados sugerem que as DC que fagocitam AC^{+E.coli} são ativadas e adquirem capacidade de migrar para o linfonodo drenante.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a produção de altos níveis de PGE_2 por macrófagos após a fagocitose de células apoptóticas (Fadok et al. 1998, Medeiros et al. 2009), não obteve-se aumento significativo deste mediador para DC durante a eferocitose, sugerindo que a produção de altos níveis de PGE_2 nos grupos DC+AC^{+E.coli} deva estar ligada ao conteú-

99

do microbiano presente na AC^{+E.coli}. É provável que o LPS seja o indutor chave na síntese de PGE₂ por DC em nosso contexto, já que LPS é sabidamente um forte indutor da produção desse mediador lipídico (Agard;Asakrah and Morici 2013). Ainda, experimentos realizados pelo grupo com patógenos Gram+ não obtiveram produções acentuadas de PGE₂ como observado para ensaios com patógenos Gram- (dados não mostrados).

De maneira interessante, quando iniciou-se os ensaios de diferenciação de células Th17 na presença do meio condicionado (CM) derivado da co-cultura entre DC e de $AC^{+E.coli}$, essa diferenciação só foi possível quando adicionado a cultura uma alta concentração de anti-CD3 (1° sinal), como reportado por (Torchinsky et al. 2009), uma quantidade muito acima do padrão descrito na literatura (Boniface et al. 2009, Napolitani et al. 2009, Yao et al. 2009). Questionou-se neste trabalho o porquê de as células T CD4⁺ *naive* precisarem de um 1° sinal tão forte para diferenciarem-se em células Th17 e se a PGE₂ poderia estar associada a esse efeito?

A PGE₂ é um mediador pleiotrópico, que atua via 4 receptores, EP1, EP2, EP3 e EP4. Células T CD4⁺*naive* expressam apenas majoritariamente EP2 e EP4 (Boniface et al. 2009, Napolitani et al. 2009, Yao et al. 2009). Células Th17, assim como células T CD4⁺*naive*, apresentam apenas mRNA para EP2 e EP4 (Valdez et al. 2012). Ainda, um trabalho recente demonstrou em células humanas que a expressão do receptor EP2 é regulada negativamente por ROR γ T na diferenciação de Th17, restando apenas o receptor EP4 em células Th17 (Kofler et al. 2014).

Nos últimos anos vários grupos tentaram demonstrar o papel da PGE₂ na diferenciação de Th17, *in vitro* ou em modelos experimentais *in vivo*, entretanto, o assunto ainda permanece controverso. Enquanto alguns artigos demonstram uma atuação auxiliadora da PGE₂ na diferenciação de células Th17 (Boniface et al. 2009, Napolitani et al. 2009, Yao et al. 2009), outros tantos mostram um efeito inibitório da mesma (Chen et al. 2009, Duffy et al. 2011, Valdez et al. 2012). Vale destacar o artigo de Duffy e cols. (2011), que demonstra que células tronco mesenquimais inibem diferenciação de linfócitos Th17 pela produção de PGE₂, o qual atua via receptor EP4 (Duffy et al. 2011).

Diferente do que proposto inicialmente, os resultados apontaram para um papel supressor da PGE₂ na diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de $AC^{+E.coli}$ por DC. O tratamento com inibidores não seletivos de COX, indometacina ou ibuprofeno, durante a co-cultura de DC com $AC^{+E.coli}$, promoveu um aumento da diferenciação de células Th17, sugerindo um efeito inibitório da PGE₂. Ainda, os resultados demonstraram um efeito inibitório pela adição exógena de PGE₂ que, mesmo em baixa concentração (10 nM) foi capaz de inibir a diferenciação de células Th17. Esse resultado corrobora com o efeito inibitório visualizado durante a diferenciação utilizando os meios condicionados.

A PGE₂ possui a capacidade de inibir a fagocitose em macrófagos alveolares, ao menos via receptores Fc (FcR) (Aronoff et al. 2005). Por isso, poderia especular-se que o tratamento com indometacina no momento da co-cultura poderia alterar a fagocitose de $AC^{+E.coli}$ por DC. Assim, na ausência de PGE₂, ocorreria uma maior eficiência no processo de fagocitose de $AC^{+E.coli}$, e essa maior fagocitose poderia estar associada, de algum maneira, no aumento da diferenciação de células Th17. Essa dúvida foi respondida por duas estratégias: (i) pela avaliação da eficiência de fagocitose de $AC^{+E.coli}$ por DC quando houve o tratamento com indometacina; (ii) pela utilização de antagonistas receptores EP2 e EP4 no ensaio de diferenciação de células Th17 com CM, ao invés do uso de indometacina na co-cultura. Ainda, a utilização de antagonistas também auxiliou no entendimento se a indometacina não estaria agindo nas células T de maneira inespecífica para aumentar a diferenciação de Th17, já que a droga está presente no CM.

Primeiro, a utilização de indometacina não alterou a eficiência de fagocitose de $AC^{+E.coli}$ por DC (figura suplementar 10), assim, a alteração da fagocitose não está associada ao efeito da indometacina no aumento da diferenciação de células Th17. Segundo, a utilização de antagonista de EP4 foi capaz de aumentar a diferenciação de células Th17, evidenciada tanto por ELISA quanto por detecção de citocina intracelular. A utilização de antagonista EP4 foi capaz de mimetizar o e efeito promovido pelo uso de inibidores não seletivos de COX, enquanto o uso de antagonista EP1 ou EP2 não obteve o mesmo efeito. Ainda, o tratamento com indometacina reduziu a produção de IL-1 β pelas DC, citocina relacionada com o aumento da diferenciação de células Th17 patogênicas (Ghoreschi et al. 2010, Zielinski et al. 2012), entretanto, a redução de IL-1 β parece não estar relacionada com o fenômeno observado nos experimentos.

De maneira surpreendente, o uso de antagonista de EP4 junto com o CM^{+Indo} ou CM^{+Ibu} promoveu uma diferenciação notável de Th17, próxima de 50% de células positivas em um dos experimentos, evidenciando o caráter inibitório da PGE₂ nesse contexto. Quando utilizou-se antagonista EP2 e antagonista EP4 juntamente, demonstrou-se que não havia efeito sinérgico entre os dois receptores. Para comprovação de que o efeito inibitório da PGE₂ era via receptor EP4, utilizou-se agonistas de EP2 ou EP4 juntamente com CM^{+Indo}, no qual apenas o agonista de EP4 foi capaz de mimetizar a ação de PGE₂ e inibir completamente a dife-

renciação de células Th17, resultado evidenciado pela completa inibição da produção de IL-17A observada no ensaio de ELISA. Ambos receptores EP2 e EP4 sinalizam através da ativação da adenilato ciclase e aumento do AMPc intracelular, entretanto, os resultados sugerem que a PGE₂ atue exclusivamente via receptor EP4 para sua função de inibição da diferenciação de células Th17. Resultados em andamento do grupo tem demonstrado que a sinalização de EP4 ocorre via aumento de AMPc e ativação de PKA (dados não mostrados).

A fim de comprovar os resultados discutidos acima, utilizando meio condicionado de linhagem celular (CM^{Raw}), realizou-se experimentos com meio condicionado oriundo neutrófilos de camundongos (CM^{mice}). De maneira interessante, os resultados obtidos com o CM^{mice} foram mais evidentes do que os resultados obtidos com CM^{Raw}. Enquanto a condição CM (*High*), proveniente de células apoptóticas contendo alta carga bacteriana, foi capaz de induzir uma boa diferenciação de células Th17, a condição CM (*Low*), proveniente de células apoptóticas contendo baixa carga bacteriana, não induziu a diferenciação de células Th17. O resultado negativo do grupo CM (*Low*) já era esperado, já que a baixa carga bacteriana não foi capaz de ativar uma produção significativa de mediadores inflamatórios relacionados a diferenciação da subpopulação Th17. A menor produção de PGE₂ provavelmente deve ser a responsável pela diferença entre a diferenciação de Th17 entre o CM^{mice} e o CM^{Raw}. Ainda, quando bloqueou-se o receptor EP4 através do uso de antagonista (L-161,982), essa diferenciação aumentou drasticamente, demonstrando mais uma vez a importância do receptor EP4 para inibição da diferenciação de células Th17.

Por fim, os resultados *in vivo* comprovaram os resultados previamente obtidos *in vitro*, demonstrando o papel supressor de PGE₂ na diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas. Esse resultado é muito importante, pois sugere como a PGE₂ deva estar atuando num contexto de infecção. O resultado demonstrou que a instilação de $AC^{+E.\ coli}$ por si só não resultou na diferenciação de células Th17, porém, quando bloqueou-se a produção de PGE₂, a diferenciação de Th17 é aumentada, demonstrando o efeito inibitório de PGE₂ nesse contexto específico. Os resultados *in vivo* sugerem que a diferenciação de células Th17 no contexto de $AC^{+E.\ coli}$ é inibida pela alta concentração de PGE₂. O tratamento com indometacina impede a regulação negativa desse mediador, sugerindo um papel crítico da PGE₂ na supressão do desenvolvimento desse subtipo celular no contexto de eferocitose de células apoptóticas infectadas. Esses resultados corroboram com as observações *in vitro* de que a PGE₂ é um potente inibidor da diferenciação de células Th17 no contexto de eferocitose de células apoptóticas infectadas. Embora a elevada expressão de IL-17A esteja relacionada a doenças inflamatórias das vias aéreas tais como asma (Molet et al. 2001), fibrose cística (Tan et al. 2011) e doenças autoimunes, este perfil de resposta pró-inflamatória desempenha um papel protetor importante contra bactérias extracelulares específicas e fungos (Korn et al. 2009). O caráter protetor da resposta Th17 se baseia principalmente no aumento da granulopoiese e no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Recentemente, um estudo demonstrou que uma citocina produzida por Th17, IL-26, funciona como um peptídeo antimicrobiano, com capacidade de matar bactérias Gram- como *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia*, assim como bactérias Gram+ como *Staphyloccocus aureus* (Meller et al. 2015). Assim, a IL-17 induz uma resposta inflamatória protetora, mas uma exacerbada ativação aumenta o risco de imunopatologias severas e autoimunidade. Assim como o esperado, o aumento no número de células Th17 em nosso modelo *in vivo* refletiu no aumento em número absoluto e na porcentagem de neutrófilos no sítio inflamatório e menor recuperação de bactéria no pulmão dos animais infectados.

Sabe-se que a inibição de PGE₂ pode beneficiar o hospedeiro durante infecções bacterianas (Agard;Asakrah and Morici 2013), com aumento da resposta imune inata. Camundongos deficientes de COX-2 demonstram um aumento na sobrevivência pós-infecção contra vários patógenos bacterianos. Camundongos deficientes de COX-2 expostos a doses elevadas de LPS (i.p.) apresentam aumento da sobrevivência quando comparado com os animais selvagens (Ejima et al. 2003). Além disso, camundongos COX-2^{-/-} também demonstram maiores taxas de sobrevivência associada a menor carga bacteriana no figado e no baço após infecção intravenosa com *S. pyogenes* (Bowman and Bost 2004). No entanto, nestes estudos não foi observado qualquer correlação da presença de PGE₂ com aumento de células Th17

Portanto, os ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram a importância da PGE₂ na modulação negativa da diferenciação de células Th17 no contexto da fagocitose de células apoptóticas infectadas. Estudos posteriores em outros modelos serão importantes para entendermos até onde essa inibição se extende e qual o impacto do tratamento com inibidores de COX na diferenciação de células Th17 em diferentes modelos.



6. Conclusão

6.1. Avaliar a capacidade de migração de células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas *in vitro* e *in vivo*;

A fagocitose de $AC^{+E. \ coli}$ por DC promoveu a ativação e migração de DC, assim como a produção de altos níveis de PGE₂.

6.2. Influência dos níveis de PGE₂, oriunda da fagocitose de diferentes proporções de células apoptóticas infectadas, na diferenciação de células Th17;

Diferentemente do que foi hipotetizado inicialmente, a PGE₂ demonstrou um papel inibitório na diferenciação de células Th17 no contexto da fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas.

6.3. Avaliação do envolvimento de PGE₂ e seus receptores na diferenciação de células Th17 através da utilização de meio de cultura condicionado oriundo da fagocitose de células apoptóticas infectadas (CM);

Através da utilização de inibidores de COX, os resultados apresentados demonstraram que a presença de altas concentrações de PGE_2 inibem a ativação de células T no contexto de fagocitose de $AC^{+E.\ coli}$ por DC *in vitro*. Ainda, por via da utilização de agonistas e antagonistas de receptores EP2 e EP4, demonstrou-se que PGE_2 atua via EP4 para realizar suas funções inibitórias.

6.4. Avaliar o envolvimento de PGE₂ *in vivo* na diferenciação de células Th17 pela instilação de células apoptóticas infectadas;

Os resultados *in vivo* comprovaram os resultados previamente obtidos *in vitro*, demonstrando o papel supressor de PGE₂ na diferenciação de células Th17 no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas.

Por fim, a PGE₂ se revelou um mediador com capacidade de supressão da diferenciação de Th17, tanto nos experimentos com meio condicionado, quanto nos experimentos de adição exógena de PGE₂, quanto no experimento *in vivo*. Os resultados foram resumidos da figura de conclusão abaixo (figura 34).



Figura 34. PGE₂ regula a diferenciação de células Th17 no contexto da fagocitose de células apoptóticas infectadas por célula dendríticas. (1) Após a fagocitose de $AC^{+E.coli}$, DC adquirem caráter de ativação, com aumento da expressão de MHC-II, CD86 e CCR7, o que permite que essas sejam capazes em migrar para o linfonodo drenante. (2) Ao chegarem no linfonodo, as DC apresentam o complexo MHC-II-peptídeo em um micro-ambiente propício para a diferenciação de células Th17, com produção de IL-6, TGF-β e IL-23, juntamente com PGE₂. (3) A presença de PGE₂ inibe a diferenciação de células Th17, fazendo com que a diferenciação de células Th17 só ocorra na presença de elevado 1° sinal; A inibição da produção de PGE₂ pelo uso de inibidores de COX ou uso de antagonista EP4 no momento da diferenciação de células Th17 retira supressão mediada por PGE₂ e aumenta a diferenciação de Th17. (4) Em modelo de infecção pulmonar mais adição de AC^{+E. coli}, a inibição de COX por tratamento dos animais com indometacina promoveu o aumento na diferenciação de células Th17, com aumento de migração de neutrófilos para o pulmão e diminuição da carga bacteriana.
Material Suplementar

7. Material Suplementar

Time: 2 h of infection

A)



Time: 3 h of infection

B)



Figura suplementar 1. Imagens Ilustrativas da infecção dos MØ por *E.coli*-GFP. MØ foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 h em estufa 5% CO2 à 37°C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E.coli*-GFP em três proporções distintas: 1:10, 1:30 e 1:50 (MØ:*E.coli*). As células foram incubadas por 2 h ou 3 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e avaliadas quanto a expressão de CD11b e GFP em microscópio de fluorescência de alta resolução (In Cell Analyzer, GE). A) Sobreposição das imagens de emissão de CD11b (vermelho) e emissão de fluorescência GFP (verde) de células que foram incubadas por 2 h nas diferentes proporções, 1:10 (primeira linha), 1:30 (segunda linha), 1:50 (terceira linha). B) Sobreposição das imagens de emissão de CD11b (vermelho) e emissão de fluorescência GFP (verde) de células que foram incubadas por 3 h nas diferentes proporções, 1:10 (primeira linha), 1:30 (segunda linha), 1:50 (terceira linha).



Figura suplementar 2. Confirmação da internalização de *E.coli*-GFP pelos MØ. MØ foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 h em estufa 5% CO2 à 37°C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E.coli*-GFP na proporção 1:30 (MØ:*E.coli*). As células foram incubadas por 2 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e avaliadas quanto a expressão de CD11b e GFP em citometria de fluxo. Após análise ao citômetro, as células foram incubadas por 5 minutos com uma solução de trypan em tampão carbonato e reanalisadas quanto à perda da fluorescência GFP. A diminuição da fluorescência representaria o *quenching* da fluorescência das bactérias que não foram completamente internalizadas. As análises foram sobrepostas no histograma da fluorescência GFP, com MØ+PAMP em linha preta e MØ+PAMP+Trypan em linha vermelha.



Figura suplementar 3. Ensaio de diferenciação de células T. As células T foram obtidas de células totais do baço de animais WT e diferenciadas na presença ou não de CM. Antes do ensaio de diferenciação, as células do baço foram purificadas para células CD4+ por separação magnética. $0,5-1x10^6$ linfócitos T CD4+ /poço foram adicionados em placas de 48 poços previamente tratadas com 2 µg/mL de anti-CD3 e 2 µg/mL anti-CD28 e cultivados por 6 dias na presença de CM, na proporção de 1:1 ou na presença de um coquetel de diferenciação para Th17 Para avaliar a diferenciação das células para o padrão Th17 a citocina IL-17 foi a detectada intracelularmente por citometria de fluxo. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 conjugados com PerCP-Cy5.5, anti-IL-17 conjugados com PE e anti-Foxp3 conjugados com APC. Dot plots representativos das células positivas para CD4 (dot plots da esquerda) e de células CD4+ produtoras de IL-17 (dot plots da direita). (A) Células diferenciadas apenas na presença de meio. (B) Células diferenciadas com o coquetel de diferenciação para Th17. (C) Células diferenciadas na presença do CM.

Material Suplementar



Figura suplementar 4. O CM promove a diferenciação de células Th17. DC foram incubadas com $AC^{+E.coli}$, tratadas ou não com Indometacina (10 µM) ou LPS em estufa 5% CO2 à 37°C. Após 18 h, o sobrenadante foi coletado. Células T CD4⁺*naive*, marcadas previamente com CFSE, foram diferenciadas com 4 µg/poço de α CD3 e 2 µg/mL de α CD28 e CM na proporção de 1:1 (CM:IMDMc). Como controle positivo foi adicionado 2,5 ng/mL TGF- β e 25ng de IL-6. Após 96 h em estufa 5% CO2 à 37°C, as células foram coletadas e reestimuladas por 5 h com PMA (50 ng/mL), ionomicina (1 µg/mL) e GolgiStop (4µL a cada 6mL). As células T foram permeabilizadas e avaliadas quanto a expressão de CD4 e IL-17 e quanto a diluição de CFSE. A) Condição controle positivo (C+), Histograma superior – expressão da molécula de superfície celular CD4; *Dot plot* da produção de CFSE; Histograma inferior – avaliação da proliferação pela diluição de CFSE. B) Condição meio condicionado (CM), histograma superior – expressão da molécula de SIPENE da produção de CP4; *Dot plot* da produção de CFSE. B) Condição de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE.



Figura suplementar 5. Ensaio de adição exógena de PGE₂ na diferenciação de células Th17. Células T $CD4^+$ *naive*, marcadas previamente com CFSE, foram diferenciadas com concentrações variadas de α CD3(1 ou 2 ou 4 µg/poço), de α CD28 (2 ou 10 ou 20 µg/mL) e PGE₂ (1 ou 10 ou 100 nM). Citocinas para indução de Th17 (2,5 ng/mL TGF- β e 25ng de IL-6) foram adicionados em todas as condições. Após 96 h em estufa 5% CO2 à 37°C, as células foram coletadas e reestimuladas por 5 h com PMA (50 ng/mL), ionomicina (1 µg/mL) e GolgiStop (4µL a cada 6mL). As células T foram permeabilizadas e avaliadas quanto a expressão de CD4 e IL-17.



Figura suplementar 6. A adição de PGE₂ inibe a diferenciação de células Th17. Células T CD4⁺*naive*, marcadas previamente com CFSE, foram diferenciadas com concentrações variadas de α CD3(1 ou 2 ou 4 µg/poço), de α CD28 (2 ou 10 ou 20 µg/mL) e PGE₂ (1 ou 10 ou 100 nM). Citocinas para indução de Th17 (2,5 ng/mL TGF- β e 25ng de IL-6) foram adicionados em todas as condições. Após 96 h em estufa 5% CO2 à 37°C, as células foram coletadas e reestimuladas por 5 h com PMA (50 ng/mL), ionomicina (1 µg/mL) e GolgiStop (4µL a cada 6mL). As células T foram permeabilizadas e avaliadas quanto a expressão de CD4 e IL-17. A) Porcentagem de células T CD4+ produtoras de IL-17 quando as células foram estimuladas com 4 µg/poço de α CD3; B) Porcentagem de células T CD4+ produtoras de IL-17 quando as células foram estimuladas com 2 µg/poço de; C) Porcentagem de células T CD4+ produtoras de IL-17 quando as células foram estimuladas com 1 µg/poço de α CD3; D) Controle positivo do experimento



Figura suplementar 7. Inibição da diferenciação de células Th17 por PGE₂ na condição de 4 µg/poço de α CD3. Células T CD4⁺naive, marcadas previamente com CFSE, foram diferenciadas com 4 µg/poço de α CD3e concentrações variadas de PGE₂ (1 ou 10 ou 100 nM). Citocinas para indução de Th17 (2,5 ng/mL TGF- β e 25ng de IL-6) foram adicionados em todas as condições. Após 96 h em estufa 5% CO2 à 37°C, as células foram coletadas e reestimuladas por 5 h com PMA (50 ng/mL), ionomicina (1 µg/mL) e GolgiStop (4µL a cada 6mL). As células T foram permeabilizadas e avaliadas quanto a expressão de CD4 e IL-17. A) Porcentagem de células T CD4+ produtoras de IL-17; B) Porcentagem de células T CD4+; C) Mediana da produção de IL-17 por célula produtora de IL-17; D) Índice de proliferação de células T. Sendo, *p<0,05, quando comparado entre os grupos indicados pelas linhas.



Figura suplementar 8. Gráficos de citometria ilustrativos da inibição de Th17 por PGE₂. Células T CD4⁺*naive*, marcadas previamente com CFSE, foram diferenciadas com 4 µg/poço de α CD3, 2 µg/mL de α CD28, e concentrações variadas de PGE₂ (1 ou 10 ou 100 nM). Citocinas para indução de Th17 (2,5 ng/mL TGF- β e 25ng de IL-6) foram adicionados em todas as condições. Após 96 h em estufa 5% CO2 à 37°C, as células foram coletadas e reestimuladas por 5 h com PMA (50 ng/mL), ionomicina (1 µg/mL) e GolgiStop (4µL a cada 6mL). As células T foram permeabilizadas e avaliadas quanto a expressão de CD4 e IL-17. A) Condição com adição de 1 nM de PGE₂ - *Dot plot* da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de células T pela diluição de CFSE; Dot *plot* da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de 10 nM de PGE₂ - *Dot plot* plot da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de 10 nM de PGE₂ - *Dot plot* plot da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de células T pela diluição de CFSE; Dot *plot* plot da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de células T pela diluição de CFSE; Dot *plot* plot da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de células T pela diluição de CFSE; Dot *plot* plot da produção de IL-17 de acordo com a diluição de CFSE e Histograma da proliferação de células T pela diluição de CFSE.



Figura suplementar 9. Antagonista de EP4 aumenta os diferenciação de células Th17. Linfócitos T $CD4^+$ *naive* foram ativados com 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28, 5 µg/mL de anti-IL2, 5 µg/mL de anti-IL-4, 5 µg/mL de anti IFN- γ , na presença de CM, CM+Indo, ou CM+Ibu, na presença ou de 5µM de antagonista de EP2, AH6869; ou antagonista de EP4, L-161,982. Após 3 dias de cultura as células repousaram por um dia antes de serem reestimuladas por 5 h com PMA/Ionomicina e GolgiStop. A porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL-17A⁺ foi avaliada por citometria de fluxo e está representada por density plots de IFN- γ x IL-17A, derivados da população CD4⁺. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.



Figura suplementar 10: O tratamento com indometacina não altera a fagocitose de $AC^{+E.coli}$ **por DC.** Células Raw foram plaqueadas em placas de petri e incubadas por 1 h em estufa 5% CO2 à 37°C para aderência. Após aderência os MØ foram infectados com *E.coli*, na presença ou não de indometacina (10 µg/mL) na proporção 1:10 (MØ:*E.coli*). As células foram incubadas por 2 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias e irradiadas com 5 mJ de luz ultravioleta. $AC^{+E.coli}$ foram coradas com CFSE e incubadas com DC por 18 h em estufa 5% CO2 à 37°C. Após a incubação as células foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de moléculas de superfície celular CD11c. Células CD11c+ foram avaliadas quanto a porcentagem de células CFSE+. Resultado da aluna de doutorado Naiara Dejani.

Referências

8. Referências¹

Agard, M., S. Asakrah and L. A. Morici (2013). "PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection." <u>Front Cell Infect Microbiol</u> **3**: 45.

Aronoff, D. M., et al. (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., et al. (2006). "Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis." J Interferon Cytokine Res **26**(11): 827-833.

Baratelli, F., et al. (2005). "Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells." J Immunol **175**(3): 1483-1490.

Bettelli, E., et al. (2008). "Induction and effector functions of T(H)17 cells." <u>Nature</u> 453(7198): 1051-1057.

Betz, M. and B. Fox (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." <u>The Journal of Immunology</u> **146**(1): 108-113.

Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." <u>Nature</u> **440**(7085): 808-812.

Boniface, K., et al. (2009). "Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling." J Exp Med **206**(3): 535-548.

Bose, J., et al. (2004). "The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal." <u>J Biol</u> 3(4): 15.

Bowman, C. C. and K. L. Bost (2004). "Cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production in mesenteric lymph nodes and in cultured macrophages and dendritic cells after infection with Salmonella." J Immunol **172**(4): 2469-2475.

Breyer, R. M., et al. (2001). "PROSTANOID RECEPTORS: Subtypes and Signaling 1." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **41**(1): 661-690.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023. Sistema autor-data.

Chen, H., et al. (2009). "Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells." <u>Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids</u> **80**(4): 195-200.

Cikala, M., et al. (2004). "The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity." <u>BMC Cell Biol</u> **5**: 26.

Duffy, M. M., et al. (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." European Journal of Immunology **41**(10): 2840-2851.

Ejima, K., et al. (2003). "Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death." <u>FASEB J</u> **17**(10): 1325-1327.

Elson, C. O., et al. (2007). "Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cellmediated model in mice." <u>Gastroenterology</u> **132**(7): 2359-2370.

Fadeel, B., D. Xue and V. Kagan (2010). "Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **396**(1): 7-10.

Fadok, V. A., et al. (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.

Fadok, V. A., et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." <u>Nature</u> **405**(6782): 85-90.

Flower, R. J. (2003). "The development of COX2 inhibitors." <u>Nat Rev Drug Discov</u> 2(3): 179-191.

Förster, R., A. Braun and T. Worbs (2012). "Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics." <u>Trends in Immunology</u> **33**(6): 271-280.

Freire-de-Lima, C. G., et al. (2000). "Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages." <u>Nature</u> **403**(6766): 199-203.

Gaffen, S. L., et al. (2014). "The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing." <u>Nat Rev Immunol</u> **14**(9): 585-600.

Ghoreschi, K., et al. (2010). "Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF-[bgr] signalling." <u>Nature</u> **467**(7318): 967-971.

Gocke, A. R., et al. (2007). "T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity." J Immunol **178**(3): 1341-1348.

Greenberg, M. E., et al. (2006). "Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells." J Exp Med **203**(12): 2613-2625.

Hall, M. O., et al. (2005). "Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells." <u>Exp Eye Res</u> **81**(5): 581-591.

Harrington, L. E., et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." <u>Nat Immunol</u> **6**(11): 1123-1132.

Harris, S. G., et al. (2002). "Prostaglandins as modulators of immunity." <u>Trends Immunol</u> **23**(3): 144-150.

Hong, J. R., et al. (2004). "Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish." <u>Development</u> **131**(21): 5417-5427.

Huang, W., et al. (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-631.

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

Joffre, O., et al. (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." <u>Immunol Rev</u> **227**(1): 234-247.

Johnson, L. and D. Jackson (2013). "Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines." <u>Angiogenesis</u>: 1-11.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." <u>Br J Cancer</u> **26**(4): 239-257.

Kofler, D. M., et al. (2014). "Decreased RORC-dependent silencing of prostaglandin receptor EP2 induces autoimmune Th17 cells." <u>The Journal of Clinical Investigation</u> **124**(6): 2513-2522.

Korn, T., et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol 27: 485-517.

Kroemer, G., et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." <u>Cell Death Differ</u> 16(1): 3-11.

Legler, D. F., et al. (2006). "Prostaglandin E2 Is Generally Required for Human Dendritic Cell Migration and Exerts Its Effect via EP2 and EP4 Receptors." <u>The Journal of Immunology</u> **176**(2): 966-973.

Lemos, H. P., et al. (2009). "Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences</u> **106**(14): 5954-5959.

Li, M. O., et al. (2003). "Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells." <u>Science</u> **302**(5650): 1560-1563.

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." <u>Innate Immun</u> **16**(3): 191-200.

Lutz, M. B., et al. (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." J Immunol Methods **223**(1): 77-92.

Manel, N., D. Unutmaz and D. R. Littman (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat." Nat Immunol 9(6): 641-649.

Martin, C. J., K. N. Peters and S. M. Behar (2014). "Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control." <u>Current Opinion in Microbiology</u> **17**: 17-23.

McDonald, P. P., et al. (1999). "Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells." J Immunol **163**(11): 6164-6172.

Medeiros, A. I., et al. (2009). "Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling." J Exp Med **206**(1): 61-68.

Meller, S., et al. (2015). "TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26." <u>Nat Immunol</u> **16**(9): 970-979.

Miyanishi, M., et al. (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." <u>Nature</u> **450**(7168): 435-439.

Molet, S., et al. (2001). "IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines." J Allergy Clin Immunol **108**(3): 430-438.

Monteleone, I., F. Pallone and G. Monteleone (2009). "Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation." <u>Mediators Inflamm</u> **2009**: 297645.

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

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

Nagamachi, M., et al. (2007). "Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1." J Exp Med **204**(12): 2865-2874.

Napolitani, G., et al. (2009). "Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN- γ production by memory CD4+ T cells." <u>European Journal of Immunology</u> **39**(5): 1301-1312.

Nataraj, C., et al. (2001). "Receptors for prostaglandin E2 that regulate cellular immune responses in the mouse." <u>The Journal of Clinical Investigation</u> **108**(8): 1229-1235.

Park, D., et al. (2007). "BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module." <u>Nature</u> **450**(7168): 430-434.

Park, H., et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol 6(11): 1133-1141.

Park, S. Y., et al. (2008). "Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor." <u>Cell Death Differ</u> **15**(1): 192-201.

Peters-Golden, M. (2009). "Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function." <u>Sci Signal</u> **2**(75): pe37.

Randolph, G. J., V. Angeli and M. A. Swartz (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." <u>Nat Rev Immunol</u> **5**(8): 617-628.

Ravichandran, K. S. (2010). "Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums." <u>The Journal of Experimental Medicine</u> **207**(9): 1807-1817.

Roos, A., et al. (2004). "Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells." <u>European Journal of Immunology</u> **34**(4): 921-929.

Rouzer, C. A. and L. J. Marnett (2009). "Cyclooxygenases: structural and functional insights." J Lipid Res **50 Suppl**: S29-34.

Scandella, E., et al. (2002). <u>Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and</u> migration of monocyte-derived dendritic cells.

Schirmer, C., et al. (2010). "Human fibroblasts support the expansion of IL-17–producing T cells via up-regulation of IL-23 production by dendritic cells." <u>Blood</u> **116**(10): 1715-1725.

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

Serezani, C. H., et al. (2008). "Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function." <u>Am J Respir Cell Mol Biol</u> **39**(2): 127-132.

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

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

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

Tan, H. L., et al. (2011). "The Th17 pathway in cystic fibrosis lung disease." <u>Am J Respir Crit</u> <u>Care Med</u> **184**(2): 252-258.

Torchinsky, M. B., J. Garaude and J. M. Blander (2010). "Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger." <u>Curr Opin Immunol</u> **22**(1): 55-62.

Torchinsky, M. B., et al. (2009). "Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation." <u>Nature</u> **458**(7234): 78-82.

Tsai, H. C., et al. (2013). "IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection." <u>Clin Dev</u> <u>Immunol</u> **2013**: 267971.

Valdez, Patricia A., et al. (2012a). "Prostaglandin E2 Suppresses Antifungal Immunity by Inhibiting Interferon Regulatory Factor 4 Function and Interleukin-17 Expression in T Cells." <u>Immunity</u> **36**(4): 668-679.

Valdez, P. A., et al. (2012b). "Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 function and interleukin-17 expression in T cells." <u>Immunity</u> **36**(4): 668-679.

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." <u>Chest</u> **129**(6): 1673-1682.

Vang, T., et al. (2003). "Combined Spatial and Enzymatic Regulation of Csk by cAMP and Protein Kinase A Inhibits T Cell Receptor Signaling." Journal of Biological Chemistry **278**(20): 17597-17600.

Verbovetski, I., et al. (2002). "Opsonization of Apoptotic Cells by Autologous iC3b Facilitates Clearance by Immature Dendritic Cells, Down-regulates DR and CD86, and Upregulates CC Chemokine Receptor 7." <u>The Journal of Experimental Medicine</u> **196**(12): 1553-1561.

Voll, R. E., et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." <u>Nature</u> **390**(6658): 350-351.

Williamson, P. and R. A. Schlegel (2004). "Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor." J Biol 3(4): 14.

Yao, C., et al. (2009). "Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion." <u>Nat Med</u> **15**(6): 633-640.

Ye, P., et al. (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med **194**(4): 519-527.

Zhang, F., G. Meng and W. Strober (2008). "Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells." <u>Nat Immunol</u> **9**(11): 1297-1306.

Zielinski, C. E., et al. (2012). "Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-[ggr] or IL-10 and are regulated by IL-1[bgr]." <u>Nature</u> **484**(7395): 514-518.



ANEXO A – Manuscrito em elaboração

EFFEROCYTOSIS OF INFECTED APOPTOTIC CELLS TRIGGERS DENDRITIC CELL MATURATION AND MIGRATORY CAPACITY

Felipe Fortino Verdan¹, Fernanda De Nuzzi Dias², Letícia de Aquino Penteado², Naiara Naiana Dejani¹, Alexandra Ivo de Medeiros^{1,2}

¹Department of Biochemistry and Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil. ²Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, 14801-902, São Paulo, Brazil

Abstract

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells (APCs), who participate in homeostasis through phagocytosis of apoptotic cells (AC) – termed efferocytosis – which leads to suppression of immune response and tolerance to self-antigen. However, after an infection, neutrophils that have engulfed the microorganism enter apoptosis becoming infected apoptotic cells. Phagocytosis by DC of infected apoptotic cells results in the production of pro-inflammatory cytokines like IL-6 as well as anti-inflammatory cytokines, like TGF- β , stimulating immune response through Th-17 cells differentiation. Taking a closer look into the phenotype and migratory capacity of DC in both situations, we showed that efferocytosis is unable to mature DC, whose levels of MHC-II, CD-86 and CCR-7 remained low. Phagocytosis of infected apoptotic cells, on the other hand, triggered dendritic cells maturation by upregulating such molecules, promoting DC migratory ability. These findings suggest how apoptotic cells can modulate the innate immune system through activation or not of DC and, consequently, promotion of DC migration ability *in vitro*.

Introduction

Pathogens present molecular signatures highly conserved described as pathogens associated molecular patterns (PAMP). Through a vast repertoire of pathogen recognition receptors (PRR), professional phagocytes as dendritic cells (DC) are able to recognize, engulf and process the pathogen along the endocytic pathway. Then DC undergoes profound morphological, phenotypical and functional changes acquiring an activated status which is represented by three typical signs: (i) high levels of MHC-II; (ii) co-stimulatory molecules expression such as CD80 and CD86; and (iii) mediators production. Together, these features make DC fully capable of translating the pathogen associated data into a specific T helper response, promoting their differentiation and expansion (Joffre et al. 2009).

In order to activate T cells, DC have to migrate to lymph nodes and interact with them. The migration of DCs from the peripheral site to draining lymph nodes is regulated by the expression of CC-Chemokyne Receptor 7 (CCR7). CCR7+ DCs crawl along lymphatic vessels responding to a chemotactic gradient of its ligands, CCL19 and/or CCL21, that originates from the lymphatic vessels. Once DCs reach the LN parenchyma T cells instantly scan the DCs for cognate antigen which might trigger the reactivation of tissuederived memory T cells or a fast and efficient initial priming of naive T cells under inflammatory conditions (Randolph;Angeli and Swartz 2005, Förster;Braun and Worbs 2012).

In homeostatic conditions billions of cells dye each day by apoptosis to maintain tissue homeostasis. Yet, those apoptotic cells are hardly found under homeostasis since its clearance, termed efferocytosis, by professional phagocytes is quite effective (McCubbrey and Curtis 2013). DC and macrophages are the major cells to engulf apoptotic cells, although neighboring cells such as fibroblasts and epithelial cells can do the job (Ravichandran 2010). It is well known that efferocytosis leads to suppression of immune production with of response antiinflammatory mediators as IL-10, TGF-β, and PGE₂ PAF while inhibits proinflammatory mediators such TNF-, IL-1, KC

and Leukotriene C4 (Voll et al. 1997, Fadok et al. 1998, Medeiros et al. 2009). Defective clearance may result in secondary necrosis, an unconstrained type of death where pro inflammatory contents are released, the so called damage-associated molecular patterns (DAMPs) which could lead to the development of chronical inflammatory diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and autoimmunity (Hochreiter-Hufford and Ravichandran 2013).

During an infection, however, shortlive neutrophils recruited to the site of infection capture the microorganisms and enter apoptosis becoming infected apoptotic cells. When DC encounters and phagocyte these infected apoptotic cells, there is the production of pro-inflammatory cytokine IL-6 as well as anti-inflammatory cytokines like TGF- β . These cytokines creates the proper microenvironment for Th17 cells differentiation and expansion. On the other hand, when DC phagocyte apoptotic cells in homeostatic conditions it triggers the differentiation of Treg cells (Torchinsky et al. 2009).

However, there is no data regarding whether the phagocytosis of apoptotic cells or infected apoptotic cells does really change the activation status of DC. Here, we demonstrate the ability of these two types of apoptotic cells in modulating the innate immune system through activation or not of dendritic

cells and, consequently, promotion of DC migration ability *in vitro*.

Materials and Methods

Mice

6 to 14 weeks-old C57BL/6 female mice were purchased from Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica -CEMIB/UNICAMP. The animals were maintained in mini-isolators with controlled temperature, humidity, air flow and dark/light cycle with free access to sterilized water and food. All the procedures were judged and authorized by local ethic committee. Parecer nº 40/2012

Generation of BMDCs

Dendritic cells were differentiated from bone marrow precursor cells of C57BL/6 mice according to protocol recommended by Lutz et al. (1999) (Lutz, Kukutsch et al. 1999). 1x10⁶ precursor cells/mL were platted in tissue culture plates (BD FalconTM, 100x20mm) in 10 mL of RPMI-1640 medium (LonzaTM), supplemented with 10% of fetal bovine serum and 10 μ g/mL of gentamicin (GibcoTM). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - GM-CSF (PeproTechTM) (40 ng/mL) was added to the culture and the plates were left at CO₂ heater at 37°C for 10 days. On the third day, 10 mL of fresh and complete RPMI medium were added to each plate together with GM-CSF. On the sixth and eighth day, non-adherent cells were collected from the plates in and centrifuged for 10 minutes at

1500rpm/24 °C. Supernatant was discharged and the cells were washed with complete RPMI medium without fetal bovine serum along with GM-CSF. On the tenth day, nonadherent cells were collected and centrifuged for 10 minutes at 1500rpm/4 °C. Supernatant was discharged, cells were ressuspended in 5 mL of complete-RPMI medium without fetal bovine serum, counted and adjusted to desired concentration to perform efferocytosis assay.

Generation of apoptotic cells and infected apoptotic cells

Raw 2647.6 cells cultured in bottles (BD FalconTM) in DMEM medium (LonzaTM), supplemented with 10% of fetal bovine serum and 10 µg/mL of gentamicin of gentamicin were exposed to UVC radiation (0.35 J) (Vilber Lourmat, BLX-254) and cultured in CO₂ heater during four hours to maintain apoptosis. Generation of infected apoptotic cells was obtained by Raw 2647.6 cells cultured in bottle with E. coli (ratio 1:10) during two hours for phagocytosis. After two hours, the bottle was washed twice with 10mL of PBS to remove cells debris. Infected cells were then submitted to apoptosis as mentioned above. After four hours, both types of apoptotic cells were collected in separated tubes and centrifuged for 10 minutes at 1500rpm/4 °C. Supernatant was discharged, cells were ressuspended in 5 mL of complete-RPMI medium without fetal bovine serum, counted and ad-

justed to desired concentration to perform efferocytosis assay.

Efferocytosis assay

Dendritc cells were cultivated with apoptotic cells or infected apoptotic cells (ratio 1:3) in a 24-well plate (BD FalconTM) with 1 mL of complete-RPMI medium supplemented with 10 µg/mL of gentamicin. For positive control, dendritic cells were cultured with LPS and, for negative control, dendritic cells were cultured with only complete-RPMI medium. After 18 hours, supernatant and cells were obtained from each condition and centrifuged in separated tubes for 10 minutes at 1500rpm/4 °C. Supernatant was collected and kept in a -80°C freezer to perform ELISA assay. The cells were ressuspended in 1 mL of complete-RPMI medium without fetal bovine serum and counted.

Isolation of dendritic cells

Dendritic cells were isolated by magnetic separation with magnetic $CD11c^+$ microbeads (Miltenyi Biotec[®]) according to protocol. After isolation, from total amount of dendritic cells counted, $2x10^5$ cells of each condition were separated for migration assay. Cells which were not used for migration assay will be evaluated according to its phenotype profile.

Migration assay

To evaluate migration capacity of dendritic cells, *Transwell* membranes (Transwell[®] Permeable Supports - Corning Incorporated)

were placed in a 24-well plate. Above the membrane, $2x10^5$ dendritic cells of each condition in 100µL were added. Below the membrane, CCL19 (Recombinant Murine MIP-3β – PeprotechTM) - (300ng/mL) and CCL21 (Recombinant Murine Exodus-2 - PeprotechTM) - (250ng/ml) chemokines were added in 600µL of RPMI medium. The plate was left at CO₂ heater for 6 hours. After that, cells that had transmigrated were photographed with camera coupled in reverse microscope (LabomedTM) collected and counted by flow cytometry (FACS CantoTM - Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA).

Evaluation of dendritic cell maturation phenotype

Phenotypic profile of dendritic cells was assessed by flow cytometry for expression of surface markers associated with cell maturation. Markers used were CD11c (BD PharmingenTM - PE-cy7), CCR7 (BD PharmingenTM - PerCP-cy5), MHC-II (BD PharmingenTM -FITC), CD86 (BD PharmingenTM - PE). The results were analysed by software FCS 4 Express Flow Cytometry.

Imunoenzimatic assay (ELISA)

To determine the microenvironment created by dendritic cells of each condition, ELISA tests were performed to determine production of IL-6, IL-23, TGF- β , IL-10, e PGE₂.

Results

Efferocytosis do not upregulate MHCII and co-stimulatory molecules on DC

Initially, we evaluated whether the phagocytosis of uninfected apoptotic cells (AC) were capable of activating DC derived from bone marrow precursors. DCs were cocultured with apoptotic cells (DC+AC) for 18 hours and the activated status of DC was measured by expression of MHC-II and costimulatory molecule CD86. As expected, it resulted in low expression of both MHC-II and CD86, similar to negative control containing only dendritic cells cultured with RPMI medium (Figure 1A,B). This low percentage of double positive cells indicates that recognition and engulfment of uninfected apoptotic cells by DCs is not capable activate the latter.

Phagocytosis of infected apoptotic cells (iAC) upregulate MHC-II and costimulatory molecules on DC

On the other hand, the phagocytosis of apoptotic cells containing the microorganism within $(DC+AC^{+E.coli})$ resulted in a significant increase in the percentage of double positive dendritic cells for MHC-II/CD86 molecules (figure 1C). After phagocytosis of infected apoptotic cells aproximately 46% of the cells become MHC-II⁺/CD86⁺ (Figure 1C). This percentage of double-positive dendritic cells was greater than that observed in the LPS stimulated positive control that was able to induce DC maturation close to 26% (Figure 1D). Therefore, unlike dendritic cells that engulfed apoptotic cells instead, DC that engulfed infected apoptotic cell seems to acquire an activate status.



Figure 1. Expression of molecules associated with DC activation/maturation, MHC-II and CD86, after efferocytosis. Dendritic cells were co-cultured with apoptotic cells (DC + AC), infected apoptotic cells (DC + AC+E. *coli*) in 1:3 ratio, or in the presence of RPMI (DC + medium) or LPS (100 ng/ml) (DC + LPS). After 18h, CD11c⁺ cells were isolated with CD11c⁺ microbeads. Cells were incubated with anti-CD86 antibody (PE) and anti-MHC-II (FITC), the results are expressed as % cells positive for expression of MHC-II and CD86. Representative result of 4 individual experiments. The cells were obtained using FACS CantoTM. The results were analyzed by FCS 4 Express Flow Cytometry program.

DC activation promotes cytokine production

Besides upregulation of MHC-II and CD86, DC may produce mediators in order to initiate an adaptive response. While the engulfment of apoptotic cells promotes only the production of TGF- β (figure 2C), engulfment of infected apoptotic cells promotes the pro-**Phagocytosis of infected apoptotic cells activate DC and promotes its migration**

duction of anti-inflammatory as well inflammatory mediatos (figure 2). Very high levels of IL-6 were induced, together with TGF- β , IL-10 and PGE₂. Our results corroborate with data showed by Torckinsky and cols. (Torchinsky et al. 2009), although it is the first time tha IL-10 and PGE2 are described in this context.

in vitro by upregulating CCR7 expression

Another activation marker is the upregulation of chemokine receptor CCR7. CCR7 expression is essential for DC migration from inflammatory site to proximal draining lymph nodes. Phagocytosis of infected apoptotic cells (DC^{+AC+E. coli}) was able to increase expression of chemokine receptor CCR7 while uninfected apoptotic cells (DC + AC) induced only a low expression of CCR7 (Figure 2), comparable to negative control. Phagocytosis of AC^{+E} . *coli* was able to induce the expression of CCR7 both in cell percentage and in the number of molecules expressed on the surface of such cells, represented by median fluorescence intensity (MFI) (Figure 2A e B). Therefore, the increase of CCR7 expression by DC after phagocytosis AC^{+E} . ^{coli} suggests that these cells should display an increased ability to migrate to the proximal lymph nodes and trigger an immunogenic response.

Phagocytosis of infected apoptotic cells activate DC and promotes its migration *in vitro*

In order to understand whether DC could in fact migrate after engulfment of infected apoptotic cells, we testes their migratory capacity with transwell assay. Thus, Thus, DC were evaluated for their migratory capacity in the presence of CCR7 ligands CCL21 and CCL19 chemokines. The migration status was assessed using an inverted microscope. As expected, engulfment of infected apoptotic cells lead to a pronounced effect on the migration of dendritic cells, which was similar to the migration of dendritic cells cultured with LPS (Figure 4), while engulfment of apoptotic cells did not increase the migratory ability of DC. These results corroborate with the idea that DC are fully activated after engulfment of infected apoptotic cells.



Figure 2: Engulfment of infected apoptotic cell by DC promotes cytokine production. Dendritic cells were co-cultured with apoptotic cells (DC + AC), infected apoptotic cells (DC + AC+*E. coli*) in 1:3 ratio, or cultured in the presence of RPMI with (DC) or LPS (LPS + DC) at different concentrations indicated. After 18h, the supernatant of these cells was collected and the soluble mediators quantified by ELISA. Representative experiment of 4 individual experiments, except for IL-23 - quantified in a single experiment. There is a statistical difference between the amount of PGE2 produced by DC + AC+*E. coli* and the amount of PGE 2 in the other conditions. Analysis by GraphPad



Figure 3: Phagocytosis of infected apoptotic cells was able to increase CCR7 expression on dendritic cells. DC were incubated with medium alone, AC, AC+*E. coli* or LPS in an oven at 37 ° C 5% CO2. After 18h, the semi-adherent cells were collected and purified by means of magnetic "beads" for marker CD11c (except for controls). DC CD11c⁺ were evaluated for the expression of CCR7. A) Dotplot the percentage of cells positive for CCR7 on CD11c⁺ cells. B) Comparative analysis of CCR7 expression by overlapping histograms of the experimental conditions. Representative result of 4 individual experiments. The cells were obtained using FACS CantoTM. The results were analyzed by FCS 4 Express Flow Cytometry program.



Figure 4: Migration capacity of dendritic cells after eferocitose: After 18h of eferocytosis, $2x10^5$ dendritic cells were separated from each condition for migration assay Membranes Transwell and after 6h of incubation, the cells were photographed by the camera attached to the microscope reversed. Representative result of 4 individual experiments. LPS concentration: 1µg/ml.

Discussion

The engulfment of iAC by DC results in the production of both inflammatory and anti-inflammatory mediators which are capable of trigger Th17 differentiation However, none was described about DC activation status and migratory ability after engulfing iAC. After engulfing iAC, DC acquire the capacity of presenting self and non-self peptides, together with costimulatory molecules expression and inflammatory mediators. Perhaps a good way of diminishing the chance of activation of self-reactive clones could be decreasing the ability of DC to migrate. Another mechanism would be the production of antiinflammatory mediators as well.

After DC encounters an antigen it acquires the ability to migrate from inflammatory site to proximal lymph node through lymphatic vessels. This process is mainly ANEXO A regulated by expression of chemokine receptor CCR7, which is upregulated on activated DC. CCR7+ DC crawl through lymphatic vessels following its ligands CCL19 and CCL21 chemiotatic gradient (Randolph;Angeli and Swartz 2005, Förster;Braun and Worbs 2012, Johnson and Jackson 2013).

Our results demonstrate that engulfment of iAC by DC was capable of fully activate DC with upergulation of MHC-II, CD86 and CCR7. Also, these DC produced high levels of IL-10 and PGE, together with the previously described IL-6 and TGF- β (Torchinsky et al. 2009). Finally, we demonstrated that DC are fully capable of migrating following CCL19 and CCL21 ligands *in vitro* after engulfment of iAC but not AC. PGE₂ is an interesting mediator which can act as anti or pro inflammatory molecule on innate and adaptive response (Voll et al. 1997, Fadok et al. 1998, Medeiros et al. 2009) (Betz and Fox 1991, Baratelli et al. 2005) (Yao et al. 2009). Nonetheless, PGE2 is an important mediator for the induction of CCR7 on DC, signaling through EP2 and EP4 receptors (Scandella et al. 2002, Legler et al. 2006). Our results showed a pronounced production of PGE2 when DC engulfed iAC but not AC, which could be a maind driver of CCR7 expression. Also. PGE2 could be acting together with IL-10 for dampening T naive activiton. Therefore, our results suggests that DC that engulf iAC are fully capable of migrating and initiating adpative immunity. It is important to further address whether the high prevalence of IL-10 and PGE2 could be interfering with T cell differentiation and actually controlling unwanted self-reactive T cell clones.

Referencesⁱ

Baratelli, F., et al. (2005). "Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells." J Immunol **175**(3): 1483-1490.

Betz, M. and B. Fox (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." <u>The Journal of Immunology</u> **146**(1): 108-113.

Fadok, V. A., et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro

inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." <u>J Clin Invest</u> **101**(4): 890-898.

Förster, R., A. Braun and T. Worbs (2012). "Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics." <u>Trends in Immunology</u> **33**(6): 271-280.

Hochreiter-Hufford, A. and K. S. Ravichandran (2013). "Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition,

Engulfment, and Digestion." <u>Cold Spring</u> <u>Harbor Perspectives in Biology</u> **5**(1).

Joffre, O., et al. (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." <u>Immunol</u> <u>Rev</u> **227**(1): 234-247.

Johnson, L. and D. Jackson (2013). "Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines." <u>Angiogenesis</u>: 1-11.

Legler, D. F., et al. (2006). "Prostaglandin E2 Is Generally Required for Human Dendritic Cell Migration and Exerts Its Effect via EP2 and EP4 Receptors." <u>The</u> Journal of Immunology **176**(2): 966-973.

McCubbrey, A. L. and J. L. Curtis (2013). "EFferocytosis and lung disease." <u>Chest</u> **143**(6): 1750-1757.

Medeiros, A. I., et al. (2009). "Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling." J Exp Med **206**(1): 61-68. Randolph, G. J., V. Angeli and M. A. Swartz (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." <u>Nat Rev Immunol</u> **5**(8): 617-628.

Ravichandran, K. S. (2010). "Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums." <u>The Journal of</u> <u>Experimental Medicine</u> **207**(9): 1807-1817.

Scandella, E., et al. (2002). <u>Prostaglandin</u> E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocytederived dendritic cells.

Torchinsky, M. B., et al. (2009). "Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation." <u>Nature</u> **458**(7234): 78-82.

Voll, R. E., et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." <u>Nature</u> **390**(6658): 350-351.

Yao, C., et al. (2009). "Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion." <u>Nat Med</u> **15**(6): 633-640.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023. Sistema autor-data.

ANEXO B

ANEXO B - Stability of Th9 cells: role of Stat3 - Indiana University-Purdue University Indianapolis (IUPUI)

Research Project: Stability and plasticity of Th9 cells: role of PU.1 Updated Research Project: Stability of Th9 cells: role of Stat3

Abstract

The newest Th cell subset to be proposed is the IL-9 secreting Th9 subset. IL-9 has long been implicated as a contributor to the inflammation observed during an allergic response. To further support this finding Dr. Kaplan's lab has demonstrated that blocking IL-9 activity as allergic inflammation develops decreases pulmonary infiltration. The recent emergence of Th9 cells as a major source of IL-9 has led to an abundance of questions and investigations that are aimed at affirming these cells as distinct from all other Th subsets. Recently, IL-9-producing T cells have been identified in both healthy and diseased human skin, and have shown pathogenic role in colitis model and protective role in worm infection mode. However, Th9 cells seem to have fast kinetic in vitro and are transient in some autoimmune models. Thus, the in vivo stability of Th9 cell phenotype shown in recent works contrasts with the inability to maintain Th9 in vitro. Previous work from our lab demonstrated that Stat3 deficient T cells have impaired Th2 differentiation and we observed that IL-9 was increased for Stat3 deficient T cells. We further investigated the role of Stat3 on Th9 stability and demonstrated that STAT3, and STAT3-activating cytokines have a negative effect on IL-9 production, and that blocking these pathways enhances IL-9. In particular, there is an inverse relationship between the amount of IL-10 produced by the culture or the amount of intracellular phospho-STAT3, and the amount of IL-9 produced by the cell. However, even when these signals are blocked, IL-9 production appears transient in the culture system. These results are going to be important for further understanding of IL-9 producing T cells.

1. Introduction

IL-9 has long been implicated as a contributor to the inflammation observed during an allergic response (Shimbara et al. 2000, Goswami and Kaplan 2011). To further support this finding Dr. Kaplan's lab has demonstrated that blocking IL-9 activity as allergic inflammation develops decreases pulmonary infiltration (Chang et al. 2010). The source of IL-9 was initially unclear until recently when a new Th cell subset, tentatively known as Th9 cells, was proposed to be the major producer of IL-9 (Schmitt E 1994, Dardalhon et al. 2008, Veldhoen et al. 2008).

The recent emergence of Th9 cells as a major source of IL-9 has led to an abundance of questions and investigations that are aimed at affirming these cells as distinct from all other Th subsets. The discovery of PU.1, a transcription factor necessary for expression of the Th9 phenotype (Chang et al. 2010), has strengthened the argument that Th9 cells belong to a separate Th cell linage. However, apart from making IL-9 and other cytokines, the niche of Th9 cells in the immune system has not been defined. Thus, gaining a better understanding of this new cell population may lead to the development of novel treatments for alleviating inflammatory disease.

The differentiation of naïve Th cells into effector Th cells is highly dependent on the cytokine microenvironment. The phenotype (Th1, Th2, Th17, Th9) attained by these effector Th cells was long thought to be permanent. However, Th17 cells have demonstrated the ability to take on other Th cell phenotypes when placed in lineage promoting cytokine media for other Th cell subsets (Stritesky;Yeh and Kaplan 2008b, Lee et al. 2009). Dr. Kaplan's lab was among the first to show that the IL-17-secreting phenotype was transient and later showed that even after maintaining Th17 in culture for three weeks, the period established as sufficient to commit Th1 and Th2 cells, Th17 cells could still acquire Th1 or Th2 cytokine secretion patterns (Mathur et al. 2006, Lexberg et al. 2008, Stritesky;Yeh and Kaplan 2008a, Lee et al. 2009). The flexibility of the Th17 phenotype provides a model for testing whether Th9 cells also have a flexible phenotype. Furthermore, the addition of TGF- β 1 to cultured Th2 cells may be related to, or a subset of the Th2 phenotype that can develop when adequate amounts of TGF- β 1 are available. As the putative Th9 cell population has been identified as the major producer of the pro-inflammatory cytokine IL-9, characterizing the *in vivo* nature of this cell
population will be important as they may be a future target for helping treat inflammatory disease.

Since these cells are a recent discovery there is a lack of fundamental understanding surrounding the phenotype of these cells and the precise role they play in the progression of allergic inflammation beyond their secretion of IL-9, IL-10 and various chemokines. Understanding the pathogenesis of allergic inflammation has been useful in identifying new therapies to treat these diseases in patients. Mark Kaplan's lab has recently demonstrated that PU.1-dependent Th9 development is required for the development of allergic inflammation in a mouse model (Chang et al. 2010). However, apart from making IL-9 and other cytokines, the niche of Th9 cells in the immune system is still being defined.

Recently, IL-9-producing T cells have been identified in both healthy and diseased human skin (Purwar et al. 2012, Schlapbach et al. 2014), has shown pathogenic role in colitis model (Gerlach et al. 2014) and protective role in worm infection model (Licona-Limón et al. 2013). However, Th9 cells seems to have fast kinetic *in vitro* and is transient in some autoimmune models (Jäger et al. 2009, Tan et al. 2010). A review has recently been published detailing all the current challenges regarding Th9 cells (Kaplan;Hufford and Olson 2015).

Therefore, the *in vivo* stability of the Th9 cell phenotype shown in recent works contrasts with the inability to maintain Th9 *in vitro*. Previous work demonstrated that Stat3 deficient T cells have impaired Th2 differentiation (Stritesky et al.). Together with this work was generated RNAseq data comparing wild type (WT) Th2 and Stat3 deficient (Stat3^{fl/fl}CD4-cre, for simplicity S3KO) Th2 cells, where was observed elevated IL-9 mRNA as well.

Thus, we proposed that STAT3 could be negatively regulatig Th9 phenotype and further disturbing the stability of Th9 at in vitro cultures. So, we started working with long term Th9 cultures using Stat3 deficient T cells and observed improved stability of Th9 cells. Our work demonstrates that STAT3, and STAT3-activating cytokines have a negative effect on IL- 9 production, and that blocking these pathways enhances IL-9. In particular, there is an inverse relationship between the amount of IL-10 produced by the culture or the amount of intracellular phospho-STAT3, and the amount of IL-9 produced by the cell. However, even when these signals are blocked, IL-9 production appears transient in the culture system.

3. Results and Discussion

3.1. Long term Th9 cultures

3.1.1. Th9 are not capable of maintaining IL-9 production over time

We performed long term Th9 cultures as illustrated above and evaluated the cytokines, mRNA and Stat activation status of cells at day 5 of each of the three rounds of differentiation. We realized that the Th9 phenotype was not maintained over time (figure 1B and 1C), meaning that at day 5 of round 2 (R2D5) we observed greatly diminished IL-9 production. The major transcriptions factors for Th9 were evaluated by qPCR and were also decreased after first round induction (figure 1E to I). PU.1 has a decrease after activation but it is considered a master transcription factor because its importance for Th9 differentiation and higher expression when compared to other Th phenotypes (Chang et al. 2010). For the qPCR data we just used round 1 and round 2 data because round 3 had very low survival of the cells.

3.1.2 IL-10 and pStat3 correlates negatively with IL-9

Although IL-9 was decreased during long term differentiation, IL-10 production was higher over time (figure 2A). Also, pStat3 was also higher over time (figure 2B) and correlated positively with IL-10 (figure 2C). The cytokine IL-10 signals through Stat3, so IL-10 could be at least one of the sources of Stat3 activation. Interestingly, data from independent Th9 cultures showed a impressive negative correlation at day 5, meaning that the higher IL-10 observed at day 5, the lower IL-9 production was observed (figure 1D). Previous work demonstrated the same correlation between IL-9 and IL-10 we observed in our long term cultures (Tan et al. 2010), but no further association between IL-10 and IL-9 was made.

To further confirm the Stat3 activation we evaluated the expression of three target genes, IL-10, IL-24 and Socs3, and all of them were upregulated throughout the differentiation process (figure 2D to F) but Socs3 was only upregulated at R2D5 (figure 2F). We asked whether IL-10 and Stat3 could be regulating negatively the Th9 phenotype. In this context, we found increased IL-9 expression in S3KO Th2 cells (data not shown), which further supported idea.



Figure 1. Th9 are not capable of maintaining IL-9 production over time. Naïve CD4+T cells were isolated from spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry and gene expression using qPCR. A) Simplified experimental design of 3 rounds of Th9 differentiation. B) Contour plots showing IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) throughout the long term Th9 differentiation. C) Graph of percentage of IL-9+ cells over time. D) Linear regression of IL-9 versus IL-10 at day 5 (R1D5) for independent Th9 differentiation experiments. Gene expression of Gata-3 (E), Irf-4 (F), Sfpi1 (G), Batf (H), and Erg (I) throughout the long term Th9 differentiation.

ANEXO B



Figure 2. IL-10 and pStat3 correlates negatively with IL-9. Naïve CD4⁺T cells were isolated from spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry and gene expression using qPCR. Graphs show correlation between IL-9+ and IL-10+ cells (A), IL-9+ and pStat3+ cells (B), IL-10+ and pStat3+ cells (C) throughout the long term differentiation. Gene expression of Stat3 target genes IL-10 (D), IL-24 (E), Socs3 (F), for day 0, R1D5 and R2D5 time points. The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.3 The absence of Stat3 in T cells promotes the maintenance of Th9 phenotype

To understand whether Stat3 had a role in Th9 differentiation we worked with mice that have Stat3 deficient CD4⁺T cells (Stat3^{fl/fl}CD4-cre, for simplicity S3KO). As suspected, the absence of Stat3 resulted not only in an increase in IL-9 production at day 5 (R1D5), percentage (figure 3B) and MFI (figure 3C), but also in the ability to maintain the Th9 phenotype over time, at least for round 2 (Figure 3A-C). Stat3 deficient cells have a problem with survival, so we think that could be on of the reasons that we didn't find Th9 in the round 3. Stat3 is a major driver of IL-10, which could explain why IL-10 is lower for S3KO Th9 cells.

When we looked for IL-9 transcripts we observed a huge increase for S3KO, higher then 100 fold, only for day 10 (R2D5), which could explain the maintenance of Th9 phenotype for these cells (figure 3D). Interestingly, there is no difference for R1D5 between S3KO and WT cells, which suggest a level of post transcriptional control in IL-9 production. Also, The IL-9 mRNA does not decrease between R1D5 and R2D5 for WT cells, although we observe almost no protein, which also argues for post transcriptional controlling (figure 3D). We did not further investigate this hypothesis. As expected, IL-10 transcript was lower in S3KO cells (figure 3E).



Figure 3. Absence of Stat3 in T cells promotes the maintenance of Th9 phenotype. Naïve $CD4^+T$ cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry and gene expression using qPCR. A) Contour plots show IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) throughout the long term Th9 differentiation; upper panel: WT mice; lower panel: S3KO mice. Graph representation of percentage (B) and MFI (C) of IL-9+ cells over time for WT mice (closed circle) and S3KO mice (open circle and dashed line). Gene expression of IL-9 (D) and IL-10 (E) throughout the long term Th9 differentiation for WT mice (closed circle) and S3KO mice (open circle and dashed line). The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.4. The absence of Stat3 alters the transcription factors associated to Th9 phenotype

Next we addressed the expression of the transcription factors associated with Th9 phenotype. Interestingly, not all of them were upregulated, with Gata3, Irf4, Batf and Crem being downregulated for S3KO cells when compared to WT cells and PU.1, Erg being upregulated in S3KO cells (figure 4). PU.1 is considered the master transcription factor of Th9 cells and its uperegulation may be the driver of better Th9 differentiation and maintenance. It could be speculated particularly because PU.1 is upregulated at R2D5 but fails to keep high for R3D5, which mimics the failed maintenance for R3D5 Th9 (figure 4D). Erg is being investigated in our lab as an important activating transcription factor (figure 4E). Crem is a negative regulator of IL-9 expression that is currently being investigated in our lab and its downregulation may also be involved to better Th9 (figure 4F). Therefore, we believe that the upregulation of PU.1 and Erg, together with the downregulation of Crem could be the responsible for higher expression of IL-9 transcript that could be involved to the maintenance of Th9 phenotype.



Figure 4. Absence of Stat3 alters the transcription factors associated to Th9 phenotype. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry and gene expression using qPCR. Gene expression of Gata-3 (A), Irf-4 (B), Batf (C), Sfpi1 (D), Erg (E), and Crem (F) throughout the long term Th9 differentiation for WT mice (closed circle) and S3KO mice (open circle and dashed line). The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.5. The absence of Stat3 in T cells promotes Th9 phenotype under Th2 differentiation culture

Since we knew that S3KO had increased IL-9 expression under Th2 cultures (data not shown) we performed the same long term culture for Th2 phenotype. The Th2 long term culture was performed as Th9 long term cultures with the only difference being the absence of TGF- β for Th2 culture. As expected, S3KO cells had increased IL-9 production at day 5 (R1D5) both percentage (figure 5B) and MFI (figure 5C). Also, S3KO cells were capable of maintaining IL-9 production for longer than under Th9 culture, having real IL-9 detection at even R3D5 (figure 5A). This maintenance was accompanied by a contraction of the total IL-9+ population over time (figure 5B). It is interesting to think how IL-9 expression could reach 20% of IL-9+ cells without TGF- β signalling. Some could speculate that TGF- β may act by downregulating Stat3 activation. Nonetheless IL-9 transcript was also upregulated throughout the differentiation process and this could be responsible for the maintenance of IL-9 until R3D5 (figure 5D), not observed for Th9 long term culture. IL-10 transcript was downregulated as expected (figure 5E), although the protein itself wasn't decreased for R2D5 and R3D5 (figure 5A).



Figure 5. Absence of Stat3 in T cells promotes Th9 phenotype under Th2 differentiation culture. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th2 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry and gene expression using qPCR. A) Contour plots show IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) throughout the long term Th2 differentiation; upper panel: WT mice; lower panel: S3KO mice. Graph representation of percentage (B) and MFI (C) of IL-9+ cells over time for WT mice (closed circle) and S3KO mice (open circle and dashed line). Gene expression of IL-9 (D) and IL-10 (E) throughout the long term Th2 differentiation for WT mice (closed circle) and S3KO mice (open circle and dashed line). The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.6. The absence of Stat3 alters the transcription factors associated with a Th9 phenotype

We evaluated the transcription factors for Th2 cultures and observed a similar pattern with Th9 cultures. Since the data came from independent experiments, it is hard to compare the expression value rather than the expression pattern. Although Gata-3, Irf4, Batf and Crem are downregulated for S3KO cells as encountered for Th9, the expression is the same for S3KO and WT cells at R3D5 (figure 6 A,B,C,F). PU.1 (figure 6D) and Erg (figure 6E) are upregulated at R2D5 and R3D5 and could be driving the maintenance of Th9 phenotype over time. Interestingly, all transcription factors but Erg and PU.1 are the same for WT and S3KO cells at R3, thus they may account for the remaining IL-9 production at R3D5 for S3KO cells (figure 5A).

Our results demonstrate that Stat3 regulates negatively Th9 differentiation, with its absence promoting a better Th9 differentiation and a prolonged maintenance of the phenotype. The next step was further investigate which mediator could be responsible for such activation and consequently regulation of Th9 cells. Because Stat3 is a common signalling pathway for several cytokines, we started by investigating the ones that were known to be produced by Th9 cells, as IL-10 and IL-21.



Figure 6. Absence of Stat3 alters the transcription factors associated to Th9 phenotype. Naïve $CD4^+T$ cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th2 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry and gene expression using qPCR. Gene expression of Gata-3 (A), Irf-4 (B), Batf (C), Sfpi1 (D), Erg (E), and Crem (F) throughout the long term Th9 differentiation for WT mice (closed circle) and S3KO mice (open circle and dashed line). The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.7. Blocking IL-10 but not IL-21 ameliorates Th9 differentiation

Since IL-10 and IL-21 could be produced by Th9 cells or other cells present in the culture, and they are strong activators of Stat3 we blocked these cytokines separetely or together to evaluate their role as negative regulators of Th9 differentiation. Blocking IL-10 alone increased IL-9 production for R1D5 (figure 7A) assessed by both percentage and MFI (figure 7B). However, blocking IL-10 did not maintain IL-9 production over time, with Th9 cells being reduced dramaticaly at R2D5 (figure 7A and B). Blocking IL-10 could still recover some production of IL-9 but not close to S3KO cells (figure 7A). It seems that at least for the first round, blocking IL-10 mimics the S3KO phenotype, meaning that IL-10 may be the major driver of Stat3 activation for the first round, as supported by reduction of pStat3 levels at R1D5 when blocking IL-10 but not IL-21 (figure 7D). For the second round, blocking IL-10 did not decrease pStat3 and only when we blocked IL-10 and IL-21 we could see a better inhibition of pStat3, meaning that for round 2 other mediators may be acting together with IL-10 and IL-21 (figure 7D). On the other hand, blocking IL-21 did nothing to Th9 differentiation, with R1D5 being the same as no treatment and no recovery of Th9 phenotype at R2D5 (figure 7B). Interestingly, blocking IL-10 promoted increased production of IL-9 for Th2 cultures as well as R1D5, both percentage and MFI (figure 7C). Again, we observed no recovery of IL-9 prodution at R2D5 (figure 7C), suggesting that other Stat3 activators may be acting for Th2 cultures as well.

Blocking IL-10 didn't solve the contraction of Th9 phenotype over time and finding other mediators that could be responsible for this contraction was the next step. Although IL-6 is not strongly produced by T cells it was our next target. Also, since IL-10 is more produced over time, our blocking could be turning less efficient throughout the differentiation proccess and consequently allowing IL-10 to regulate negativelly Th9 cells. A better way to address the IL-10 signalling role would be using IL-10R deficient mice.



Figure 7. Blocking IL-10 but not IL-21 ameliorates Th9 differentiation. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. IL-10 and IL-21 were blocked separated or together throughout the long term differentiation. At day 5 (R1D5) and 10 (R2D5) cells were collected and analyzed for cytokine production and Stat activation by flow cytometry. A) Rainbow contour plots show IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) throughout the long term Th9 differentiation; upper panel: WT mice; middle panel: WT + α IL-10; lower panel: S3KO mice. Graph representation of percentage (left graph) and MFI (right graph) of IL-9+ cells for Th9 (B) or Th2 (C) differentiation at R1D5 and R2D5. D) Graph representation of percentage of pStat3+ cells for Th9 differentiation at R1D5 and R2D5. The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.8. Blocking IL-6 does not affect Th9 differentiation

Before blocking IL-6 signalling we wanted to be sure that it could be at least a possibility. CD4+T cells are not known as strong producers of IL-6, but even small amounts of IL-6 can induce a strong activation Stat3. First, we evaluated the IL-6 and its receptor transcripts. IL-6 was upregulated at R1D5 but come back to T CD4⁺naive levels at R2D5 (figure 8A). Both receptors IL-6R α and Gp130 (IL-6st) were downregulated throughout the Th9 differentiation, although still present (figure 8B and C). We decided to start an experiment blocking IL-10 and IL-6R α , side by side to evaluate whether IL-6 could be playing any role as negative regulator of Th9 differentiation. Blocking IL-6 had no effect over IL-9 production and no influence over Th9 maintenance (figure 8D and E). This specific experiment didn't work out so well as we had very few IL-9 production at R1D5, however, IL-10 blocking was capable of improving the differentiation of Th9 cells while IL-6 blocking had no effect. Although blocking IL-6 did not change Th9 differentiation, current work in our lab has shown that exogenous IL-6 is a potent inhibitor of Th9 cells (data not shown). So, we could not discard an in vivo role for IL-6 as negative regulator of Th9 differentiation.



Figure 8. Blocking IL-6 does not affect Th9 differentiation. Naïve $CD4^+T$ cells were isolated from WT mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. IL-10 or IL-6R α was blocked throughout the long term differentiation. At day 5 (R1D5) and 10 (R2D5) cells were collected and analyzed for cytokine production by flow cytometry. cDNA from previous experiments were used to verify the gene expression of IL-6 (A), IL-6R α (B) and IL-6st (C) for WT cells. Graph representation of percentage (D) and MFI (E) of IL-9+ cells for Th9 differentiation at R1D5 and R2D5.

3.1.9. IL-10R deficient T cells have better Th9 differentiation

To further investigate whether our IL-10 blocking wasn't able to block all IL-10 produced thus failing to protect Th9 differentiation we used mice with IL-10R α deficient CD4⁺T cells. Again, our Th9 culture didn't generate a high percentage of IL-9+ cells, which worked well for us because it proved one more time how potent IL-10 is as a negative regulator of Th9 cells. We observed an impressive IL-9+ population at R1D5. Unfortunately, we still had a huge contraction of Th9 phenotype (figure 9A and B), We were still able to detect IL-9 positive cells, with a sizable 10%, even higher than our WT R1D5, although the contraction did show that there are still other mediators that may be playing an important role as negative regulators of Th9 differentiation.



Figure 9. IL-10R deficient T cells have better Th9 differentiation. Naïve $CD4^+T$ cells were isolated from WT and IL-10Ra^{fl/fl}CD4-cre mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th2 polarization cytokines. At day 5 (R1D5), 10 (R2D5) and 15 (R3D5) cells were collected and analyzed for cytokine production by flow cytometry. A) Contour plots showing IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) at R1D5 and R2D5; upper panel: WT mice; lower panel: IL-10Ra^{fl/fl}CD4-cre mice. Graph representation of percentage (B) and MFI (C) of IL-9+ cells over time for WT mice (closed circle) and IL-10Ra^{fl/fl}CD4-cre mice (open circle and dashed line).

One feature that we observed in our Th9 cultures was higher Foxp3 expression for S3KO cells when compared to WT (figure 10A). Besides being higher at R1D5, it kept increasing over time, while WT cells would not have this increase (figure 10A). The MFI was also higher for S3KO cells when compared to WT, indicating more protein per cell (figure 10B). Having more Foxp-3+ cells could mean more T regulatory cells present in the culture, which could be the reason why S3KO cells lose Th9 phenotype at R3D5. This feature was also present when we blocked IL-10 and when we used IL-10R deficient mice (data not shown).



Figure 10. Foxp3 is elevated on S3KO cells. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. IL-10 and IL-21 were blocked separated or together throughout the long term differentiation. At day 5 (R1D5) and 10 (R2D5) cells were collected and analyzed for transcription factors expression by flow cytometry. Graph representation of percentage (A) and MFI (B) of Foxp-3+ cells for Th9 differentiation at R1D5 and R2D5. The data is representative of 3 independent experiments.

3.1.11. Keeping high Irf4 seems important for IL-9+ maintenance

We also assessed the transcription factors at protein level after reactivation with PMA/Ionomycin/Monensin. This way we could understand the transcription factors looking for IL-9+ cells. As expected we observed that IL-9+ cells were Irf4⁺Gata-3⁺Foxp-3⁻ at R1D5 (figure 11) and maintained this phenotype for R2D5 (figure 12). An interesting feature was that IL-9 producing cells are clustered on Irf4^{high} population, while Gata-3 expression varies more inside the IL-9+ population (figure 11,12 and 13). Blocking IL-10 or S3KO cells have higher production of IL-9, however, there was no phenotype change at either time point (figure 11 and 12). Other transcription factors may be acting together with Irf4 to explain why S3KO cells have more IL-9+ cells



Figure 11. Keeping high Irf4 seems important for IL-9+ maintenance. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. IL-10 was blocked throughout the long term differentiation. At day 5 (R1D5) and 10 (R2D5) cells were collected and analyzed for transcription factors expression by flow cytometry. Rainbow contour plots show IL-9 (y axis) against Irf-4 (left column) or Gata-3 (middle column) or Foxp-3 (right column) for Th9 differentiation at R1D5; Upper panel: WT cells; Middle panel: WT + α IL-10; Lower panel: S3KO cells. The data is representative of 3 independent experiments.



Figure 12. Keeping high Irf4 seems important for IL-9+ maintenance. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. IL-10 was blocked throughout the long term differentiation. At day 5 (R1D5) and 10 (R2D5) cells were collected and analyzed for transcription factors expression by flow cytometry. Rainbow contour plots show IL-9 (y axis) against Irf-4 (left column) or Gata-3 (middle column) or Foxp-3 (right column) for Th9 differentiation at R2D5; Upper panel: WT cells; Middle panel: WT + α IL-10; Lower panel: S3KO cells. The data is representative of 3 independent experiments.



Figure 13. IL-9+ cells maintain Irf-4. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT mice spleen and differentiated for 3 rounds of 5 days under Th9 polarization cytokines. At day 5 (R1D5) and 10 (R2D5) cells were collected and analyzed for transcription factors expression by flow cytometry. A) Area plots showing gating strategy for IL-9+/IL-9+IL-10+/IL-10+ populations for posterior transcription factors analysis. Graph representation of MFI of Irf-4+ cells for Th9 differentiation at R1D5 (B) and R2D5 (C). Graph representation of Gata-3+ cells for Th9 differentiation at R1D5 (E).

3.2. The monensin history

This part of the project was originated from an unexpected observation found in our S3KO cells. As a negative control of our cytokine staining, we usualy do not stimulate the cells and stain them as a background control. Interstingly we started seeing high percentages of IL-9+ cells on our S3KO Th9 cultures but no other cytokine (figure 14A right panel). Initially we thought it was a mistake but after repeating several times we started investigating what could be happening. If there is no monensin, how could we detect IL-9 cytokine? The first idea was to stimulate Th9 cells with or without monensin and evaluate all the cytokines. The result was very intriguing, with the IL-9 percentage increasing dramatically (figure 14B to D) and also increased IL-10 percentage when no monensin was added (PI group, see legend on figure 20). We observed that when we did not add monensin IL-2 cytokine was gone, so we asked whether this IL-2 secretion could be responsible for this IL-9 increased production. When we blocked IL-2 signalling, the effect was lost, meaning that the secreted IL-2 was required for the increased IL-9 production (figure 14B to D). Adding monensin is responsible for accumulating cytokines inside the cell, thus, instead of elliminating the addition of monensin, we could add it in the very end of the stimulation proccess, allowing the cells to secrete some IL-2 and increase IL-9 production.

We also assessed the mRNA profile of the cells and found a 10 fold increase of IL-9 mRNA when no monensin was added (PI) and a 2 fold increase for IL-10 transcripts (figure 15A and B) when compared to stimulation with monensin (see legend on figure 14). When we blocked IL-2 signalling both increases were lost (figure 15A and B), demonstrating a requirement for IL-2. On the other hand, IL-4 and IFN- γ had no increase of expression, with IL-4 being lower and IFN- γ being the same of regular stimulated cells (figure 15D and E). Interstingly, blocking IL-2 signalling altered IL-4 expression but had no effect on IFN- γ expression. Nonetheless, IL-2 mRNA was decreased for PI group, but no effect was observed when we further blocked IL-2 signalling, suggesting that the IL-2 transcript decrease is not IL-2 dependent (figure 15C).



Figure 14. No addition of secretion inhibitor drug (monensin) increase number of IL-9+ cells. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT and S3KO mice spleen and differentiated for 5 days under Th9 polarization cytokines. Day 5 cells were collected and restimulated or not with PMA/Ionomycin and monensin for 5 hours before intracellular cytokine detection by flow cytometry. A) Rainbow contour plots show IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) for S3KO Th9 cells at day 5 after stimulation (left plot) or no stimulation (right plot). B) Rainbow contour plots show IL-9 (y axis) against IL-10 (x axis) for WT Th9 cells that were restimulated as indicated in legend and evaluated for cytokines production. Graph representation of percentage (C) and MFI (D) of IL-9+ cells for Th9 differentiation following restimulation legend. The data is representative of 3 independent experiments.

ANEXO B



Figure 15. No addition of secretion inhibitor drug (monensin) upregulate IL-9 transcripts levels. Naïve CD4⁺T cells were isolated from WT mice spleen and differentiated for 5 days under Th9 polarization cytokines. Day 5 cells were collected and left unstimulated (D5), restimulated with PMA/Ionomycin and monensin (+PIM), PMA/Ionomycin (+PI), or PMA/Ionomycin + α IL-2/ α CD25 for 5 hours before gene expression evaluation by qPCR. Gene expression of IL-9 (A), IL-10 (B), IL-2 (C), IL-4 (D) and IFN-y (E). The data is representative of 3 independent experiments.

4. Conclusion

Our data reveal Stat3 as a negative regulator of Th9 differentiation and could further help to establish the Th9 subset *in vitro*. At least for the first round of activation, IL-10 seems to be the major driver of Stat3 activation and plays a main role at regulating IL-9 producing T cells. Understanding other players that may activate Stat3 during long term Th9 cultures seems to be very important for understanding of Th9 commitment *in vitro*.

The monensin history is an intriguing piece of data because it is counter intuitive. The intracellular detection of cytokines was made possible by blocking secretion, however, adding monensin during PMA/Ionomycin stimulation has a negative effect over IL-9 production and detection. Our data suggests that IL-2 secretion is needed for this increase in IL-9 expression but the exact mechanism still need to be elucidated.

5. Material and Methods

5.1. Animals

WT, Stat3^{fl/fl}CD4-cre and IL-10R $\alpha^{fl/fl}$ CD4-cre mice were housed in the Laboratory Animal Research Center (LARC) of the Indiana University School of Medicine. The LARC facility has two full-time veterinarians on staff and is accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Mice were maintained in pathogen-free conditions and all studies were approved by the Indiana University School of Medicine Care and Use Committee.

5.2. Th9 and cell Differentiation



As illustrated above, naïve CD4+CD62L+ T cells were purified from spleens by magnetic selection (Miltenyi Biotec). Naïve CD4+ T cells ($1x10^{6}$ cells/ml complete RPMI 1640 medium) were activated with plate-bound α -CD3 (2 µg/ml) and soluble α -CD28 (5 µg/ml) and cultured under Th9 conditions (IL-4 [20 ng/mL], TGF- β [2 ng/ml], and α -IFN- γ [10 µg/mL]), Th2 (IL-4 [20 ng/mL], and α -IFN- γ [10 µg/mL]), or Th17 (IL-1 β [10 ng/mL], IL-6 [100 ng/mL], TGF- β [2 ng/mL], IL-23 [10 ng/mL], α IFN- γ [10 µg/ml], α IL-4 [10 µg/ml])

condition. At day 3 we expanded the cells and added half of initial concentration for polarizing cytokines. For Th9 long term cultures Th9 cell were maintained through three rounds or cycles of culture, with each round being 5 days with Th9-priming cytokines. For second and third round cells were activated with plate-bound α -CD3 (1 µg/ml) and soluble α -CD28 (5 µg/ml). After each round a portion of cells will be collected and analyzed for the expression of selected genes using qPCR, secretion of IL-9, activation of Stat, and transcription factors expression by flow cytometry. When we blocked IL-10, IL-21 or IL-6R α , we used 10 µg/ml for starting the rounds of activation and half concentrated for expansion.

5.3. Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated with TRIzol from unstimulated cells, followed by reverse transcription according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies). Taqman Fast Universal PCR Master Mix and commercially available primers for and mouse genes and the 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) were used for quantitative PCR. RNA expression was normalized to the expression of β 2-microglobulin and relative expression was calculated by the change-in-threshold ($-\Delta\Delta$ CT) method.

5.4. Intracellular cytokine and Transcription factor co-staining

After differentiation, cells were incubated in monensin for the final 3 h of a 5-hour restimulation with or PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) plus ionomycin. After restimulation we stained the dead cells with Fixable Viability Dye from eBioscience (65-0865-14) - eFluoro 780 before fixing with 4% formaldehyde solution. Intracellular cytokines were stained by standard protocols with fluorochrome-conjugated α -IL-9 (mouse, RM9A4, BioLegend), α -IL-10 (JES5-16E3 BD, Biolegend), α -IL-4 (11B11; eBioscience), α -IL-17 (eBio17B7; eBioscience), α -IFN- γ (XMG1.2, eBioscience), α -Foxp3 (FJK-16s; eBioscience), α -Irf-4 (3E4, eBioscience) and α -Gata-3 (TWAG, eBioscience). For staining of transcriptions factors together with cytokines, we had to fix the cells with 4% formaldehyde solution for 5 minutes before using Foxp-3 fixative. This was a necessary step because Foxp-3 fixative is also a permeabilization solution, which promotes leaking of cytokines. The stained cells were evaluated by flow cytometry with an Attune Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies). Data were analyzed by FlowJo and FCSExpress.

6. References¹

Chang, H.-C., et al. (2010). "The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation." <u>Nat Immunol</u> **11**(6): 527-534.

Dardalhon, V., et al. (2008). "IL-4 inhibits TGF-[beta]-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-[beta], generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells." <u>Nat Immunol</u> **9**(12): 1347-1355.

Gerlach, K., et al. (2014). "TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cellmediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells." <u>Nat Immunol</u> **15**(7): 676-686.

Goswami, R. and M. H. Kaplan (2011). "A Brief History of IL-9." <u>The Journal of Immunology</u> **186**(6): 3283-3288.

Jäger, A., et al. (2009). "Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes." <u>The Journal of Immunology</u> **183**(11): 7169-7177.

Kaplan, M. H., M. M. Hufford and M. R. Olson (2015). "The development and in vivo function of T helper 9 cells." <u>Nat Rev Immunol</u> **15**(5): 295-307.

Lee, Y. K., et al. (2009). "Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage." Immunity **30**(1): 92-107.

Lexberg, M. H., et al. (2008). "Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo." European Journal of Immunology **38**(10): 2654-2664.

Licona-Limón, P., et al. (2013). "Th9 cells drive host immunity against gastrointestinal worm infection." <u>Immunity</u> **39**(4): 10.1016/j.immuni.2013.1007.1020.

Mathur, A. N., et al. (2006). "T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype." <u>Blood</u> **108**(5): 1595-1601.

Nowak, E. C., et al. (2009). "IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease." <u>The</u> <u>Journal of Experimental Medicine</u> **206**(8): 1653-1660.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023. Sistema autor-data.

Purwar, R., et al. (2012). "Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells." <u>Nat Med</u> **18**(8): 1248-1253.

Schlapbach, C., et al. (2014). "Human TH9 Cells Are Skin-Tropic and Have Autocrine and Paracrine Proinflammatory Capacity." <u>Science Translational Medicine</u> **6**(219): 219ra218.

Schmitt E, G. T., Goedert S, Hoehn P, Huels P, Huels C, Koelsch S, Kuhn R, Muller W, Palm N, Rude E (1994). "IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma "<u>The</u> <u>Journal of Immunology</u> **153**(9): 3989-3996.

Shimbara, A., et al. (2000). "IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: Increased expression in asthma." Journal of Allergy and Clinical Immunology **105**(1, Part 1): 108-115.

Stritesky, G. L., et al. "The Transcription Factor STAT3 Is Required for T Helper 2 Cell Development." <u>Immunity</u> **34**(1): 39-49.

Stritesky, G. L., N. Yeh and M. H. Kaplan (2008a). "IL-23 mediates stability but not commitment to the Th17 lineage." Journal of Immunology **In press**.

Stritesky, G. L., N. Yeh and M. H. Kaplan (2008b). "IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage." <u>The Journal of Immunology</u> **181**(9): 5948-5955.

Tan, C., et al. (2010). "Antigen-Specific Th9 Cells Exhibit Uniqueness in Their Kinetics of Cytokine Production and Short Retention at the Inflammatory Site." <u>The Journal of Immunology</u> **185**(11): 6795-6801.

Veldhoen, M., et al. (2008). "Transforming growth factor-[beta] 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." <u>Nat Immunol</u> 9(12): 1341-1346.