JULIA CORTINA CAMPOPIANO

**Regulação da expressão de FASL e sobrevivência dos
linfócitos T CD4⁺ pela PGE₂ durante a apresentação
antigênica**

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

São Paulo
2014

JULIA CORTINA CAMPOPIANO

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FASL E
SOBREVIVÊNCIA DOS LINFÓCITOS T CD4⁺ PELA
PGE₂ DURANTE A APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Ramalho Bortoluci

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Campopiano, Julia Cortina.

Regulação da expressão de FASL e sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ pela PGE₂ durante a apresentação antigênica / Julia Cortina Campopiano. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Controle molecular do processo de AICD.

Versão do título para o inglês: Regulation of FASL expression and CD4⁺ T lymphocytes survival by PGE₂ during antigen presentation.

1. Apoptose 2. AICD 3. Apresentação de antígeno 4. FASL 5. Morte celular 6. TLR I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0171/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Julia Cortina Campopiano.

Título da Tese: Regulação da expressão de FASL e sobrevivência dos
linfócitos T CD4⁺ pela PGE₂ durante a apresentação
antigênica.

Orientador(a): Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **41** nas fls. **86** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) João Gustavo Perssini Amarante-Mendes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo da regulação da expressão de FasL por agonistas de receptores do tipo Toll durante a apresentação de antígenos e a conseqüente modulação da sobrevivência dos linfócitos TCD4+ e células apresentadoras de antígenos** do qual participou(aram) o(s) **Julia Cortina Campopiano, Carina de Buzzo Lima, Welbert de Oliveira Pereira e a pesquisadora Karina Ramalho Bortoluci**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **16.06.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de junho de 2010.

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

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

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

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

Of. CEUA. 059.13

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

REF.: Protocolo nº 0041/10.

"Estudo da regulação da expressão de FasL por agonistas de receptores do tipo Toll durante a apresentação de antígenos e a consequente modulação da sobrevivência dos linfócitos TCD4+ e células apresentadoras de antígenos"

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 16.06.2016.**

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

Cordialmente,

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

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. João Gustavo Perssini Amarante-Mendes
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*À minha mãe Isabel,
minha maior inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes, pela orientação e amizade nestes oito anos de convívio. Obrigada por todas as discussões, pela atenção e disposição. Obrigada por confiar em mim, me apoiar e respeitar as minhas opiniões. Obrigada pelo incentivo constante e pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis! Obrigada por permitir que eu fizesse parte de um grupo de pesquisa composto por excelentes pessoas. Foi uma honra fazer parte do seu laboratório!!

À Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci, pela co-orientação e discussões! Agradeço a todos de seu laboratório com quem convivi desde o início do meu curso. Obrigada pela amizade e pelo carinho, em especial à Carina Buzzo, Thaís Boccia e Silvia Lage.

Ao Prof. Dr. Jean Pierre pela grande amizade, conselhos e por todas as discussões filosóficas! E a todos os membros de seu laboratório, pelo ótimo convívio e amizade.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e ao Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes, pelos ensinamentos durante o Programa de Aperfeiçoamento Estudantil – PAE.

Aos Professores Alexandre Steiner, Alexandre Barbuto e Mauricio Rodrigues, membros da minha banca de qualificação. Agradeço pelas discussões e críticas enriquecedoras!

À Prof. Dra. Jacqueline Jacysyn, Emília Zenteno e Tiago Clemente pela colaboração direta no meu trabalho e pelos ensinamentos.

Aos meus grandes amigos de laboratório, Jacqueline Jacysyn, Tiago Clemente Machado, Sandy Adjemian, Barbara Mello, Maria Emília Zenteno, Luciana Medina, Flávia Amoroso, Narciso Júnior, Nathalia de Victo, Priscila Cabral, Marcela Torres, Carolina Quino, Jennifer Marx, Bárbara Saty e Giulia Maria. Obrigada pela extrema união e cumplicidade! Pelo apoio no trabalho e fora dele. Obrigada por tornarem o laboratório um ambiente tão gostoso. Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração e eu espero carregar nossa amizade por toda a vida!

Ao técnico Daniel Chiminazzo, pela disposição e alegria.

Aos que não estão mais no laboratório, mas deixaram a sua marca: Ricardo Weinlich, Maíra Sant'Anna, Welbert Pereira, Daniel de Carvalho, Rodolfo Correia, Inaê Santiago, Luciana Concepción, Claudia Pantaleão, Márcia Marçal, Ana Eliza Bueno, Janine Leroy, Cláudia Rustice, Mônica Yon, Paola Vendramini, Cristiane Naffah e Priscila Denapoli. Por todos os ensinamentos e discussões!

À todos os funcionários do Departamento de Imunologia: Às secretárias e secretários do departamento, Maria Eni, Jotelma, Amanda e João, pela paciência, ajuda e disposição! Aos funcionários do biotério, em especial Israel, Silvia, Regina, Márcio e Ana, pela atenção e pelo cuidado com nossos animais. Ao Moisés e Márcio por todo auxílio com o audiovisual. À Andrea

pela cordialidade e ajuda na rotina do FACs. Ao Paulo, pela imensa disposição e ajuda na histologia! Aos funcionários da portaria, especialmente ao Otacílio, Milton, Geraldo e Delman. Obrigada pelo bom humor, pelo carinho e pela confiança! Cada um de vocês deixou uma recordação e fez a diferença nestes oito anos de convívio.

Muito obrigada a todo pessoal do departamento de imuno. Agradeço a excelente convivência, a troca de informações, os momentos de interação, discussão e a disponibilidade de todos!

Obrigada à Carina Buzzo, Matheus Ferracini e Esther Florsheim, por alegrarem meus dias e fazerem parte da minha vida!!!

Ao meu amor Daniel. Obrigada por me aguentar! Obrigada pelo companheirismo, pelo apoio e por ser um exemplo de determinação e dedicação!!

À minha mãe Isabel, meu exemplo de mulher e de ser humano! Muito obrigada pelas lições de vida e por me ensinar o significado do caráter, da honestidade, da bondade e da justiça! Obrigada pela paciência, pelos cuidados, pelo amor infinito! À você eu devo todas as minhas conquistas!

Ao meu pai Heitor, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Bruno e Fulvio, que sem saberem, servem de exemplo e de inspiração constante, no trabalho e na vida!!!

A Universidade de São Paulo – USP, pela estrutura e suporte para que essa pesquisa fosse realizada.

As agências de fomento Fapesp, CNPq e INCT pelo suporte financeiro.

RESUMO

Campopiano JC. Regulação da expressão de FASL e sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ pela PGE₂ durante a apresentação antigênica. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Nos órgãos linfóides periféricos, a ativação, proliferação e diferenciação em células efetoras ocorrem somente quando os linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos antigênicos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), em particular, as células dendríticas (DCs). A maturação das DCs ocorre através da estimulação dos seus receptores do tipo Toll (TLRs), que aumentam a capacidade de apresentação antigênica, expressão de moléculas coestimuladoras e produção de mediadores solúveis pelas DCs. Embora o processo de ativação dos linfócitos seja indispensável, é necessário que aconteça um equilíbrio homeostático, no qual as células autoreativas ou recorrentemente ativadas sejam eliminadas. Nestas situações, a morte por apoptose ocorre principalmente através da interação entre o receptor de morte FAS e o seu ligante FASL, em um processo denominado morte celular induzida por ativação (AICD). Dados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o estímulo de APCs via TLR4/MyD88 com LPS, induz a produção de PGE₂, que suprime a expressão de FASL e a AICD de linfócitos T CD4 *in vitro* (Weinlich et al., 2008). Dessa forma, o presente projeto foi baseado na hipótese de que a apresentação antigênica em um contexto de infecção teria um diferente impacto na expressão de FASL e na sobrevivência das células envolvidas, de maneira diretamente dependente de ligantes de TLRs e/ou PGE₂. Para investigar nossa hipótese, blastos de linfócitos T CD4⁺ que possuem TCR transgênico para ovalbumina (OVA) foram cocultivados com células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) pulsadas com o peptídeo da OVA (pOVA) na presença ou ausência do agonista de TLR4, LPS. Em paralelo, nós utilizamos dois modelos *in vivo*: A reação de DTH foi realizada com a imunização dos animais com OVA+CFA seguida de desafio com o antígeno. Em paralelo, na transferência adotiva de células os animais recipientes foram imunizados com pOVA±LPS. Para averiguar a participação da PGE₂ durante a apresentação antigênica, os camundongos foram tratados com Indometacina (INDO), um inibidor da ativação das enzimas ciclooxigenases (COX) e, portanto, da produção das prostaglandinas. Nós verificamos que a adição de LPS durante a apresentação de ovalbumina aumenta a ativação e a proliferação dos linfócitos T CD4⁺, bem como a frequência das células antígeno-específicas, e que o pré-tratamento com INDO reduziu significativamente o acúmulo destas células. Constatamos que a menor frequência de células T CD4 específicas para ovalbumina após o tratamento com INDO se deu por meio do aumento na expressão de FASL e da frequência de em apoptose, evento que é bloqueado na presença de FAS.Fc. Para comprovar que FASL é de fato a molécula chave na manutenção da sobrevivência dos linfócitos T CD4, utilizamos animais C57BL/6 Fas^{lpr/lpr} e geramos camundongos C57BL/6 OT-II/Fas^{lpr/lpr}, que apresentam TCRs específicos para ovalbumina, e possuem uma mutação no receptor FAS. Verificamos que nestes animais o tratamento com INDO não surte efeito, não interferindo no acúmulo dos linfócitos T CD4 específicos para ovalbumina. Sendo assim, sugerimos que a PGE₂ produzida em resposta ao LPS durante a apresentação de OVA regule a sobrevivência dos linfócitos T CD4 enquanto o estímulo antigênico persiste.

Palavras-chave: Apoptose. AICD. Apresentação antigênica. FASL. Morte celular. TLR.

ABSTRACT

Campopiano JC. Regulation of FASL expression and CD4⁺ T lymphocytes survival by PGE₂ during antigen presentation. [PhD thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

In peripheral lymphoid organs, activation, proliferation and differentiation into effector cells occur only when the CD4⁺ T lymphocytes recognize antigenic peptides presented by antigen-presenting cells (APCs), in particular dendritic cells (DCs). DCs maturation occurs through Toll-like receptors (TLRs) stimulation which increases the ability of antigen presentation, costimulatory molecules expression and production of soluble mediators by DCs. Although the process of lymphocyte activation is essential, there must be a homeostatic balance, in which autoreactive or recurrently activated cells are eliminated. In these situations, death by apoptosis occurs mainly through the interaction between the death receptor FAS and its ligand FASL, in a process called Activation-Induced Cell Death (AICD). Data from our research group demonstrated that APCs stimulation via TLR4/MyD88 with LPS induces PGE₂ production, which suppresses FASL expression and AICD of CD4 T lymphocytes *in vitro*. Thus, this project was based on the hypothesis that antigen presentation during the context of infection would have a different impact on FASL expression and survival of cells involved, directly dependent of TLRs ligands and/or PGE₂. To investigate our hypothesis, CD4⁺ T blasts that possess transgenic ovalbumin (OVA) TCR were co-cultured with bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) pulsed with ovalbumin peptide (pOVA) in the presence or absence of LPS, a TLR4 agonist. In parallel, we used two *in vivo* approaches: The DTH reaction was performed with the immunization of animals with OVA+CFA followed by challenge with antigen. Simultaneously, during adoptive cell transfer, recipient animals were immunized with pOVA±LPS. To determine the involvement of PGE₂ during antigen presentation, mice were treated with indomethacin (INDO), an inhibitor of activation of cyclooxygenase (COX) enzymes and thus inhibiting prostaglandins production. We found that LPS addition during OVA presentation enhances CD4⁺ lymphocytes activation and proliferation, as well as the frequency of antigen-specific cells, and that INDO pretreatment significantly reduced the accumulation of these cells. We found that the lowest frequency of OVA-specific CD4⁺ T cells following treatment with INDO occurred through increased expression of FasL and apoptosis, an event that is blocked in the presence of FAS.Fc. To prove that FASL is indeed the key molecule in maintaining the CD4 T cells survival, we used C57BL/6 Fas^{lpr/lpr} and generated C57BL/6 OT-II/Fas^{lpr/lpr}, which have TCR specific for OVA and a mutation in FAS receptor. We found that INDO do not interfere with the OVA-specific CD4 T lymphocytes accumulation. Therefore, we suggest that PGE₂ produced in response to LPS during OVA presentation regulates CD4 T lymphocytes survival during antigenic stimulus.

Keyword: Apoptosis. AICD. Antigen presentation. FASL. Cell death. TLR

“Para ver muita coisa é preciso despregar os olhos de si mesmo”

FRIEDRICH NIETZSCHE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll (TLRs).....	27
Figura 2. Via extrínseca de apoptose e sua amplificação mitocondrial.....	32
Figura 3. Representação ilustrativa do (A) fenótipo e (B) genótipo dos animais C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr} utilizados nos experimentos	41
Figura 4. Blastos de linfócitos T CD4⁺ sofrem AICD após estímulo com anti-CD3	52
Figura 5. LPS induz maturação fenotípica e funcional de BMDCs	55
Figura 6. mDCs não induzem morte de blastos de linfócitos T CD4⁺ durante ensaio de apresentação de pOVA in vitro	56
Figura 7. mDCs induzem expressão de CD69 em blastos de linfócitos T CD4⁺ durante ensaio de apresentação de pOVA in vitro	58
Figura 8. Eixo FAS-FASL está envolvido na morte de blastos de linfócitos T CD4 durante ensaio de apresentação de pOVA por iDCs in vitro	60
Figura 9. mDCs apresentam menor taxa de apoptose que iDCs durante ensaio de apresentação de pOVA in vitro	61
Figura 10. Prostaglandina E₂ participa na modulação da expressão de FASL em blastos de linfócitos T CD4⁺ após ensaio de apresentação de pOVA in vitro	63
Figura 11. Reação de DTH é dependente de linfócitos TCD4⁺	65
Figura 12. Prostaglandina E₂ participa da indução de DTH	66
Figura 13. FAS está envolvido na regulação de DTH por PGE₂	68
Figura 14. Imunização com OVA + LPS induz esplenomegalia	69
Figura 15. Tratamento com INDO impede o acúmulo de células KJI-26⁺ em baços e linfonodos de camundongos imunizados com OVA + LPS	71
Figura 16. Somente linfócitos T CD4⁺KJI-26⁺ proliferam em resposta à pOVA	73

Figura 17. Células KJI-26⁺ em baço e linfonodos apresentam altos índices de proliferação em resposta à OVA + LPS, os quais não são alterados pelo tratamento com INDO	75
Figura 18. LPS inibe a expressão de FASL e a morte de células KJI-26⁺ estimuladas com pOVA in vivo e tal efeito é parcialmente revertido pelo pré-tratamento com INDO	77
Figura 19. O tratamento com INDO inibe o acúmulo de células específicas em resposta ao estímulo com pOVA in vivo por um mecanismo que envolve FAS	78
Figura 20. Mecanismo proposto da participação de PGE₂ e FASL na modulação da sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ durante apresentação de ovalbumina	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR para identificação do gene <i>lpr</i></i>	41
Tabela 2: <i>Reação de PCR para identificação do gene <i>lpr</i></i>	42
Tabela 3: <i>Diagrama dos tratamentos ministrados nos camundongos</i>	44
Tabela 4: <i>Número de catálogo dos primers/sondas utilizados nas reações de qPCR</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – *Adenylate Cyclase*
ACAD – *Activated T cell autonomous death*
AICD – *Activation-Induced Cell Death*
ALPS - *Autoimmune Lymphoproliferative Syndrom*
AP-1 – *Activator protein-1*
APAF-1 - *Apoptotic-protease-activating factor-1*
APC – *Antigen Presenting Cell*
BMDC – *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*
cFLIP – *Cellular FLICE inhibitory protein*
cAMP - *Cyclic Adenosine Monophosphate*
CIITA - *MHC class II transactivator*
ConA – *Concanavalin A*
COX - *Cyclooxygenase*
DAMP – *Damage-associated molecular pattern*
DC - *Dendritic Cells*
DD – *Death domain*
DED – *Death effector domain*
DISC – *Death inducing signalling complex*
dsRNA - *Double strand RNA*
DTH - *Delayed Type Hypersensitivity*
Egr – *Early growth response genes*
EPAC - *Exchange protein directly activated by cAMP*
FADD – *Fas associated death domain*
FKHRL1 – *Forkhead transcription factor 1*
GILZ - *Glucocorticoids-induced leucine-zipper*
GIPs - *glycoinositolphospholipids*
Gld - *Generalized lymphoproliferative disease*
HSV- *Herpes Simplex Virus*
ICER – *Inducible cAMP early repressor*
iDCs – *Immature Dendritic Cells*
IFN – *Interferon*

INDO - Indometacina

IRFs – *Interferon regulatory factors*

iTreg – *Inducible Regulatory T cell*

LBP – *LPS binding protein*

Lpr - *Lymphoproliferation spontaneous mutation*

LPS – *Lipopolysaccharide*

LRR – *Leucine-rich repeat*

LTA - *Lipoteichoic Scid*

MCMV – *Mouse Cytomegalovirus*

mDCs – *Mature Dendritic Cells*

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

MyD88 – *Myeloid differentiation factor 88*

NF- κ B – *Nuclear factor kappa B*

NFAT – *Nuclear factor of activated T cell*

nTreg - *Nature Regulatory T cell*

OVA - *Ovalbumin*

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PEC – *Peritoneal Exudate Cells*

PG - *Prostaglandin*

PGE₂ – *Prostaglandin E₂*

PKA - *Protein kinase A*

PKB - *Protein kinase B*

PMA - *Phorbol Myristate Acetate*

Poly (I:C) – *Poliinosinedeoxicitidilico Acid*

pOVA – *Ovalbumin Peptide*

PRR – *Pattern Recognition Receptor*

RT-PCR – *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

SP-1 – *Secretory protein 1*

ssRNA – *Single strand RNA*

TAK1 – *TGF β -activated kinase 1*

TCR – *T Cell Receptor*

Tfh – *T follicular helper*

TGF- β - *Transforming Growth Factor-beta*

Th – *T helper*

TIR – *Toll/interleukin-1 receptor*

TIRAP/MAL – *TIR-associated protein / MyD88 adaptor-like*

TLR – *Toll-Like Receptor*

TNF- α - *Tumor necrosis factor- α*

TRAF6 – *Tumor necrosis-factor (TNF)-Receptor-Associated factor 6*

TRAM – *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF – *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β*

TXA – *Thromboxane*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Considerações Gerais	20
1.2 Ativação das células dendríticas e a interação com os linfócitos T CD4⁺	21
1.3 Receptores do tipo Toll e seu papel na ativação das células dendríticas	23
1.4 Subpopulações de linfócitos T CD4⁺	27
1.5 Morte Celular Induzida por Ativação (<i>Activation-Induced Cell Death – AICD</i>)	29
1.6 Prostaglandina E₂	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Metas Específicas	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Reagentes	39
3.2 Camundongos	39
3.3 Condições de cultura celular	40
3.4 Geração de camundongos OTII/FAS^{lpr/lpr}	40
3.5 Extração e PCR de DNA genômico	41
3.6 Geração de blastos de linfócitos T CD4⁺	42
3.7 Geração de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs)	43
3.8 Cocultura entre blastos de linfócitos T CD4⁺ e BMDCs	43
3.9 Transferência adotiva de células	43
3.10 Hipersensibilidade tardia (DTH)	45
3.11 Marcação celular com CellTrace	45
3.12 Análise fenotípica por citometria de fluxo	46
3.13 Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina	46

3.14 Eletroforese de Proteínas e <i>Western-blot</i>	46
3.15 Purificação de linfócitos T CD4⁺	47
3.16 Extração de RNA	47
3.17 Síntese de cDNA	48
3.18 RT-PCR em tempo real (qPCR)	48
3.19 Cálculo da expressão gênica relativa	49
3.20 Análise da produção de citocinas por BMDCs	50
3.21 Ensaio imunoenzimático para detecção de PGE₂	50
3.22 Análises estatísticas	50
4 RESULTADOS	51
4.1 iDCs, mas não mDCs, induzem AICD de blastos de linfócitos T CD4⁺ durante a apresentação <i>in vitro</i> de ovalbumina	51
4.2 PGE₂ produzida durante a maturação de DCs está envolvida com a regulação de AICD em blastos de linfócitos T CD4⁺ durante a apresentação <i>in vitro</i> de ovalbumina	62
4.3 Inibição da PGE₂ interfere na magnitude da reação de Hipersensibilidade Tardia (<i>DTH - Delayed Type Hypersensitivity</i>) por um mecanismo dependente do eixo FAS-FASL	64
4.4 Inibição de PGE₂ impede acúmulo de linfócitos específicos em modelo de transferência adotiva de células <i>in vivo</i> por um mecanismo que envolve o eixo FAS-FASL	68
5 DISCUSSÃO	81
5.1 Considerações finais	89
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), uma vez que são especializadas em ativar e diferenciar linfócitos T *naive*, dando início à resposta imune adaptativa (1). DCs imaturas (iDC), que residem em tecidos periféricos do organismo, realizam a captura de antígenos próprios ou provenientes de patógenos. Estas células são então ativadas quando entram em contato com padrões moleculares provenientes de uma ampla variedade de microorganismos (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* – PAMPs). Neste contexto, um dos sinais mais importantes para a maturação das APCs ocorre através da estimulação de receptores do tipo Toll (*Toll-Like Receptors* – TLRs) (2). A ligação dos TLRs aos componentes microbianos culmina na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) e membros da família dos IRFs (*Interferon regulatory factor*). Após exposição a esses fatores, as DCs passam por um processo de maturação no qual diminuem sua capacidade fagocítica, migram para os linfonodos drenantes e adquirem a expressão de altos níveis de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) classe II, moléculas coestimuladoras tais como CD80, CD86 e CD40, o receptor de quimiocina CCR7 e passam a produzir citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, IL-12, IL-1 β e TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*) (1).

Nos linfonodos, as DCs maduras (mDC) apresentam o antígeno capturado e processado para os linfócitos T, levando assim, ao início da resposta imune adquirida (3). Nestes locais, linfócitos T CD4⁺ interagem com as células apresentadoras de antígenos por meio de moléculas de MHC classe II, moléculas coestimuladoras e diversos produtos solúveis produzidos pelas DCs, entre eles, uma grande variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. Os linfócitos então proliferam e se diferenciam nas distintas subpopulações efectoras (4). Em virtude das citocinas presentes no microambiente, as DCs podem estimular a polarização para diferentes subpopulações de células T *helper* (*Th*), incluindo Th1, Th2, Th17 e iTreg. As células Th1 são diferenciadas na presença de IFN- γ e IL-12 e as células Th2 surgem na presença de IL-4 (5). TGF- β e IL-6 são necessários para a polarização de células Th17 (6) e as células iTreg, por sua vez, são produzidas na periferia na presença de TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*) e IL-10 (7). Estes diferentes subtipos de linfócitos T CD4⁺ orquestram os mecanismos efetores mais adequados para o combate de cada tipo de patógeno.

Após o pico da expansão clonal, o número de células T antígeno-específicas nos tecidos linfóides diminui drasticamente. A deleção de linfócitos T autorreativos é um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção da tolerância periférica, que previne o acúmulo de células efectoras desnecessárias e o potencial aparecimento de doenças autoimunes (8, 9). Da mesma forma, a eliminação de linfócitos T cronicamente estimulados que poderiam ser potencialmente prejudiciais ao organismo é outra característica de um sistema imune eficiente e bem regulado (10). Nestas situações, a morte por apoptose ocorre principalmente através da interação entre o receptor de morte FAS e o seu ligante FASL, em um processo denominado morte celular induzida por ativação (AICD – *Activation-Induced Cell Death*) (10, 11). De fato, mutações deletérias nos genes que codificam FAS, FASL ou proteínas que participam de sua sinalização, causam uma síndrome linfoproliferativa fortemente associada a processos autoimunes tanto em modelos animais quanto em humanos (12, 13).

A fase de retração da resposta imune também sofre a ação dos PAMPs. Na ausência da inflamação induzida por estes agentes, a morte das células T antígeno-específicas nos tecidos linfóides após a expansão clonal é praticamente total. Em contraste, um número muito maior de células sobrevive quando o antígeno é injetado na presença de adjuvantes, como o LPS. Anthony e colaboradores demonstraram que o LPS interfere com a morte de células T periféricas em modelo *in vivo* de imunização com superantígeno, mas o mecanismo pelo qual a morte é bloqueada não foi esclarecido (14).

Portanto, apesar do envolvimento das moléculas solúveis na ativação e diferenciação dos linfócitos T estarem muito bem caracterizados, a importância dos mediadores inflamatórios na modulação da sobrevivência dos linfócitos ainda é menosprezada. Dados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o estímulo de APCs via TLR4/MyD88 com LPS, induz a produção de PGE₂, que suprime a expressão de FASL e a AICD de linfócitos T CD4⁺ *in vitro* (15). Estes resultados complementam diversos achados da literatura e são de suma importância para explicar os mecanismos pelos quais a sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ é modulada durante e após a montagem de uma resposta imune.

1.2 Ativação das células dendríticas e a interação com os linfócitos T CD4⁺

As DCs são células “centrais” do sistema imunológico, responsáveis por traduzir a informação da imunidade inata para a adquirida, fazendo uma ponte entre os dois sistemas (16, 17). Na ausência de um estímulo externo, as DCs encontram-se em um estado inativo ou imaturo (iDCs), no qual possuem uma capacidade limitada de ativar linfócitos T *naive*.

Entretanto, na presença de uma infecção, as DCs passam por profundas mudanças fenotípicas e funcionais que resultam em uma melhora na sua habilidade de interação com as células T, promovendo a expansão clonal e diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em células efetoras. Esta conversão de iDCs para um estado de APC efetora é frequentemente denominada “ativação da DC” (1, 18)

As DCs ativadas através do contato com patógenos apresentam altos níveis de moléculas de MHC que carregam os peptídeos derivados dos microorganismos. Antígenos apresentados via MHC classe II por APCs se ligam aos receptores de células T CD4⁺ *naive* antígeno-específicas. Por outro lado, antígenos associados às moléculas de MHC classe I, presentes em todas as células nucleadas, são reconhecidos por linfócitos T CD8⁺. Esta apresentação antigênica é conhecida como o “primeiro sinal” para a ativação da célula T (18).

O reconhecimento do patógeno pela DC também induz a expressão de diversas moléculas coestimuladoras na superfície destas células que se ligam a receptores específicos nas células T e transmitem sinais fundamentais para a ativação e sobrevivência dos linfócitos (segundo sinal). Neste contexto, o sinal coestimulador melhor descrito até hoje é a interação entre o CD28, constitutivamente expresso em linfócitos T, e o CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) em APCs. A expressão de CD80 e CD86 é positivamente modulada de forma rápida e intensa pela estimulação de TLRs e depende da ativação do fator de transcrição NF-κB (19). Antígenos próprios, que não causam inflamação e nem ativação das APCs, são apresentados na ausência das moléculas coestimuladoras, limitando a ativação e proliferação dos linfócitos T. Por este motivo, este mecanismo é considerado central na manutenção da tolerância periférica ao próprio (20).

No entanto, o primeiro e o segundo sinal não são suficientes para a completa ativação de um linfócito T CD4⁺ *naive*. Células T ativadas na ausência de um “terceiro sinal” sofrem expansão clonal, mas permanecem indiferenciadas, sendo incapazes de produzir citocinas do tipo Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4) ou auxiliar linfócitos B. Dessa forma, somente as DCs adequadamente ativadas produzem mediadores que agem no linfócito T promovendo a sua diferenciação em célula efetora (terceiro sinal). A IL-12, por exemplo, é um típico mediador liberado por muitas DCs ativadas, que pode induzir o desenvolvimento de uma resposta imune caracterizada por linfócitos Th1 (18)

Assim, a integração destes três sinais pela célula T irá determinar o seu destino. Todos eles parecem ser necessários para a completa ativação de uma célula T efetora. Por outro lado, o primeiro sinal na ausência dos demais leva a célula T à um estado inativo, seja por anergia, deleção ou indução de um perfil regulador (21, 22).

1.3 Receptores do tipo Toll e seu papel na ativação das células dendríticas

Muitos sinais têm sido descritos como capazes de induzir, ao menos em parte, a ativação das DCs, mas os agentes mais poderosos neste caso são os produtos microbianos e virais (PAMPs) que constituem os diversos microorganismos e são diretamente reconhecidos por PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), incluindo membros da família dos TLRs (23).

DCs maturadas por citocinas inflamatórias ou dano celular na ausência de PAMPs não são completamente ativadas. Elas apresentam marcadores fenotípicos de maturação como CD80, CD86 e MHC classe II, mas não são hábeis em produzir IL-12 e ativar células T *naive*. Dessa forma, o reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs é fundamental para induzir a expressão coordenada de moléculas que irão conferir às DCs o seu fenótipo efetor, garantindo a ativação adequada dos linfócitos T *naive* (18).

O gene para o receptor Toll foi descoberto em meados dos anos 80 por Eric Wieschaus e Christiane Nüsslein-Volhard, que ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1995. Eles descreveram o Toll como um receptor transmembrana necessário para o estabelecimento da polaridade dorsoventral e desenvolvimento embrionário adequado da mosca *Drosophila melanogaster*. Em 1996, Lemaitre e colaboradores observaram que moscas com mutações neste receptor eram susceptíveis à infecção pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, uma vez que mutações no gene Toll bloqueavam a indução do peptídeo antimicrobiano drosomicina, em resposta à infecção fúngica (24). Em 1997, Medzhitov e colaboradores identificaram a presença de receptores homólogos ao Toll no genoma humano, que foram denominados *Toll-like receptors (TLRs)* (25). Hoje se sabe que os TLRs são evolutivamente conservados desde o verme *Caenorhabditis elegans* até os mamíferos (26-28). Atualmente, 13 membros da família TLR foram identificados em mamíferos. O genoma humano não possui TLR11, 12 e 13. Em camundongos, o TLR8 apesar de expresso não é funcional (29), e o genoma murino não possui TLR10.

Os TLRs são glicoproteínas transmembranas, caracterizadas estruturalmente pela presença de um domínio extracelular N-terminal rico em repetições leucina (*leucine-rich repeat* - LRR), que está envolvido diretamente ou através de moléculas acessórias, no reconhecimento dos ligantes. Possuem um domínio transmembrana de passagem única e um domínio intracitoplasmático de sinalização, homólogo ao receptor da interleucina-1 (*Toll/interleukin-1 receptor* – TIR), necessário para a interação com moléculas adaptadoras e sinalização intracelular (30). Os TLRs são expressos em diversas células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e subtipos específicos de linfócitos T,

bem como em células não-imunes como fibroblastos e células epiteliais. A expressão destes receptores não é estática e pode ser rapidamente modulada em resposta a patógenos, citocinas e sinais de estresse celular. Ainda, os TLRs são encontrados tanto extra quanto intracelularmente. Enquanto TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na superfície celular, outros como TLRs 3, 7, 8 e 9 são encontrados em compartimentos intracelulares, como os endossomos. Acredita-se que a maioria dos TLRs atue em forma de multímeros, sendo que alguns formam heterodímeros e outros se associam à moléculas que não fazem parte da família dos TLRs (31).

O TLR4 foi o primeiro membro da família a ser clonado e reconhece uma enorme variedade de PAMPs, como lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas (32), glicoinusitolfosfolípidos (GIPs) de *Trypanosoma Cruzi* (33), manana de *Candida albicans* (34) e envelopes virais glicoproteicos (35). O LPS, também conhecido como endotoxina, é uma das moléculas com maior capacidade imunoestimuladora. Sua porção lipídica chamada “*lipid A*” é responsável pela maioria dos fenômenos patogênicos associados às infecções por bactérias gram-negativas como, por exemplo, o choque séptico. Uma vez livre, o LPS se associa com *LPS-binding protein* (LBP), uma proteína de fase aguda presente na corrente sanguínea, e então se liga ao CD14 expresso na superfície celular de fagócitos. O LPS é em seguida transferido para a proteína MD-2, que se associa com a porção extracelular do TLR4 e culmina na oligomerização deste receptor que é a molécula central na sinalização do LPS (36). Consistente com a reduzida resposta às bactérias gram-negativas, camundongos C3H-HeJ, que possuem deficiência no receptor TLR4, são excepcionalmente susceptíveis à infecção por *Salmonella typhimurium* (37, 38).

Componentes de bactérias gram-positivas também estimulam o sistema imune inato. Embora estas bactérias não possuam LPS, o ácido lipoteicoico (LTA) parece funcionar de maneira similar como um ativador do sistema imune. Lipoproteínas e peptideoglicanas, que estão presentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas, também são potentes imuno estimulantes (39). Neste contexto, o receptor TLR2 possui um papel central na detecção de bactérias gram-positivas e está envolvido no reconhecimento de diversos componentes microbianos, incluindo LTA, lipoproteínas e peptidoglicanas e zimosan, uma glicana presente na superfície de alguns fungos. O TLR2 interage com TLR1 e TLR6 para reconhecer estas diversas estruturas presentes nos patógenos (40, 41). Em particular, os heterodímeros TLR1/2 e TLR2/6 podem discriminar entre triacil e diacil-lipopeptídeos, respectivamente. Em adição, TLR10 parece se heterodimerizar com TLR2 e TLR1, embora o ligante deste heterodímero ainda não esteja bem estabelecido (42). A importância do TLR2 na defesa do

organismo contra bactérias gram-positivas foi demonstrada usando-se camundongos deficientes em TLR2, que se mostraram altamente susceptíveis ao desafio com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (43, 44).

A flagelina é o maior constituinte proteico do flagelo bacteriano, aparato utilizado para locomoção de vários microorganismos patogênicos, e é um potente ativador de respostas imunes inatas (45). TLR5 é responsável pelo reconhecimento da flagelina, especificamente o domínio D1 que é relativamente conservado entre as diferentes espécies. Bactérias uropatogênicas e profilina de *Toxoplasma gondii* são reconhecidas pelo TLR11, embora o componente específico responsável por essa ativação ainda não seja conhecido (46).

Interessantemente, os receptores associados ao reconhecimento de ácidos nucleicos, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em vesículas endocíticas e compartimentos lisossômicos (31). Dessa forma, os seus ligantes requerem internalização para o endossomo antes que a sinalização do receptor seja iniciada. RNA de fita dupla (dsRNA) produzido durante a replicação viral e seu análogo sintético, ácido poliinosinedeoxicitidílico (poly(I:C)) são reconhecidos pelo TLR3 e são potentes indutores de IFNs tipo I (47). Os genes do TLR7 e TLR8 possuem grande homologia entre si, sendo que o TLR7 murino e o TLR8 humano reconhecem fita simples de RNA (ssRNA), alguns nucleotídeos análogos da guanossina (como a loxorribina) e componentes sintéticos de imidazoquinolinas (R848, Imiquimod, etc) (48). O DNA genômico bacteriano é reconhecido pelo TLR9 e bastante utilizado como adjuvante em alguns modelos experimentais. Seu efeito estimulador se deve à presença de dinucleotídeos CpG não metilados, em um contexto particular de bases denominado CpG-DNA. Embora abundante no genoma bacteriano, os motivos CpG tem sua frequência suprimida e são altamente metilados no genoma de mamíferos, não ativando as células do sistema imune. Sequências CpG-DNA possuem forte atividade imunoestimuladora incluindo a indução de citocinas inflamatórias e resposta do tipo Th1 (49). Vírus de DNA, incluindo herpes simples vírus (HSV) 1 e 2, e citomegalovírus murino (MCMV) também possuem genomas que são ricos em motivos CpG-DNA e induzem a produção de citocinas inflamatórias e secreção de IFN tipo I em resposta a estimulação de TLR9 (50). Por fim, em 2012, três grupos de pesquisa independentes identificaram RNA bacteriano de fita simples (ssRNA), mais precisamente a sequência conservada CGGAAAGACC do RNA ribossomal 23S, como um ligante de TLR13, receptor endossomal murino (51-53). Em adição, componentes não associados a patógenos, como moléculas endógenas liberadas por células em necrose, são comumente descritos como ligantes de TLRs. Tais “sinais de perigo” endógenos podem, em alguns casos, mimetizar os PAMPs e atuar como ligantes para os

PRRs. Produtos da degradação do hialurano, fibronectina A, fibrinogênio e proteínas de choque térmico são exemplos de ligantes potenciais aos TLRs, habitualmente denominados DAMPs (*Danger-associated molecular pattern*).

A ligação dos componentes microbianos aos TLRs ativa diversas cascatas de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e membros da família IRF (*IFN-regulatory factor*), com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , IFN- α , IFN- β e CXCL10 além da expressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 e CD40) e moléculas do MHC (54). Após a ligação aos seus respectivos agonistas, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de um conjunto de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR, incluindo MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*), TIRAP (*Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (30).

Na **Figura 1** é possível observar a cascata de ativação dos TLRs de forma simplificada. MyD88 participa da sinalização de todos TLRs, com exceção de TLR3. TLR2 e TLR4 utilizam ainda TIRAP para mediar a interação entre MyD88 e as proteínas subsequentes na cascata de sinalização (55). Nas vias de sinalização mediadas por TLR3 e TLR4, a ativação de IRF-3 e indução de IFN- β são observadas de maneira independente de MyD88. Neste caso, TRIF é a molécula adaptadora utilizada. Ainda, a proteína TRAM é específica para a sinalização de TLR4 independente de MyD88 e dependente de TRIF. De maneira geral, MyD88 e TRIF são responsáveis pela ativação de distintas vias de sinalização, que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFNs) tipo I, respectivamente (56).

Figura 1. Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll (TLRs).

1.4 Subpopulações de linfócitos T CD4⁺

Uma resposta imune eficiente depende da ativação de compartimentos específicos de seu sistema, de acordo com a natureza do patógeno presente. A coordenação desta resposta é mediada principalmente pelos linfócitos T CD4⁺, que durante o início de uma resposta imune, se diferenciam em diferentes subpopulações efetoras.

As células T CD4⁺ possuem uma notável plasticidade e são capazes de se diferenciar em vários subtipos celulares, baseadas essencialmente nas citocinas presentes no microambiente durante a sua ativação. Estas moléculas solúveis são produzidas pelas APCs em resposta aos diversos ligantes reconhecidos pelos TLRs (entre outros PRRs), mostrando que estes receptores são fundamentais para o início e para o direcionamento adequado da resposta imune adaptativa (57, 58). Isto é comprovado pelo fato de células T de camundongos deficientes da proteína adaptadora MyD88 não apresentarem proliferação ou produção de níveis detectáveis de IFN-γ em resposta à imunização com OVA em CFA(59).

Após a interação apropriada com o antígeno apresentado na superfície de moléculas do MHC classe II pelas APCs, as células T CD4⁺ são ativadas e proliferam. Estas células podem se diferenciar nas subpopulações efetoras, incluindo os clássicos linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e 2 (Th2), as Th17, as células Th foliculares (Tfh), as células T reguladoras

induzidas (iTreg) e as mais recentemente descritas Th9. A polarização para um perfil de resposta Th1 ocorre principalmente em altas concentrações de IL-12 e IFN- γ . Estas células secretam citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α e são especializadas no combate às infecções por microorganismos intracelulares, uma vez que estão envolvidas na ativação de macrófagos, linfócitos T citotóxicos e produção de anticorpos IgG. De forma antagônica, a polarização para o perfil Th2 acontece na presença de altos níveis de IL-4. Estas células produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e devido à sua capacidade de promover a produção de IgE, são importantes nas respostas contra helmintos, organismos extracelulares e são responsáveis pelo desenvolvimento de quadros atópicos (5). A diferenciação em Th17, em camundongos, ocorre na presença de IL-6 e TGF- β . Estas células são responsáveis pela produção de IL-17 e IL-22 e possuem um importante papel na eliminação de infecções por fungos, especialmente em superfícies mucosas. Elas participam da ativação e recrutamento de neutrófilos, amplificando a inflamação tecidual e estão fortemente associadas a diversas síndromes autoimunes (60). As células Treg, por sua vez, podem ser divididas em duas categorias: as células Treg naturais (nTreg) que surgem no timo e as células Treg induzidas (iTreg), produzidas na periferia na presença de TGF- β e IL-10. Ambas as populações participam da manutenção da tolerância periférica e na prevenção de doenças autoimunes (7). IL-6 e IL-21 contribuem para a diferenciação das células Thf, um distinto subtipo de células T que expressa Bcl-6 e se localiza nos folículos de células B, nos órgãos linfoides (61). Apesar de produzirem IL-6 e IL-10, a citocina de assinatura destas células é a IL-21. Elas auxiliam na maturação e diferenciação das células B, e devido ao seu importante papel na seleção de clones de células B específicos para antígenos estranhos com alta afinidade, elas favorecem o desenvolvimento de uma resposta humoral robusta enquanto auxiliam na manutenção da tolerância ao próprio (62). Finalmente, as células Th9 se diferenciam na presença de um balanço entre TGF- β e IL-4 (63). Além da IL-9, as Th9 parecem produzir IL-10 e IL-21 e, apesar de sua função ser frequentemente associada a doenças inflamatórias, o seu papel ainda não é totalmente claro (64).

Além dos mecanismos que regem a diferenciação e polarização dos linfócitos T CD4⁺, a retração destas diferentes subpopulações efetoras tem um grande impacto no estabelecimento de uma resposta imune focada e eficiente na eliminação dos patógenos e também na manutenção desta resposta dentro de níveis não deletérios para o organismo. Um dos mecanismos responsáveis pela retração populacional dos linfócitos previamente ativados e expandidos durante a fase efetora da resposta imune é denominada AICD. Originalmente

descrita em hibridomas de linfócitos T (65), esta via de apoptose logo foi encontrada em células Th1, Th2 (66) e, mais recentemente, em populações de células Th17 (67).

1.5 Morte Celular Induzida por Ativação (*Activation-Induced Cell Death* – AICD)

Células T *naive* são encontradas principalmente nos órgãos linfóides secundários, até o momento em que elas são ativadas por antígenos exógenos apresentados pelas APCs. Após a ativação, os linfócitos T entram em uma fase de proliferação clonal, se diferenciam em células efetoras e migram para os sítios de infecção ou inflamação. Após a eliminação do antígeno, é necessário que a população de células T ativada seja eliminada. A alta capacidade proliferativa dos linfócitos específicos para o antígeno requer um controle efetivo de seu tempo de vida, a fim de manter a homeostase das células T e prevenir o desenvolvimento de doenças autoimunes e linfomas. Somente algumas células T que foram previamente expostas ao antígeno sobrevivem e se tornam células T de memória, que irão responder mais rápida e eficientemente ao mesmo antígeno em infecções posteriores (68).

Apoptose é um tipo de morte celular programada que permite a diminuição da quantidade de linfócitos durante a fase de retração de uma resposta imune. Dois conceitos para a indução de morte dos linfócitos T durante o encerramento da resposta imune devem ser considerados: Morte Celular Induzida por Ativação (*Activation-induced cell death* – AICD) e Morte Autônoma de Células T Ativadas (*Activated T cell autonomous death* – ACAD) (69, 70).

AICD é um processo de morte celular de linfócitos T desencadeada pela reestimulação do complexo TCR/CD3. Durante a fase de expansão da resposta imune, as células T possuem um fenótipo de resistência à AICD que gradualmente se altera para um estado de sensibilidade durante a fase de contração da resposta. A principal via de AICD depende do aumento na expressão de FASL e da sua interação com o receptor de morte FAS na superfície da célula alvo (65, 71). Em contraste, a morte celular por ACAD é causada pela privação de fatores de crescimento e citocinas e ocorre por uma via intrínseca de apoptose que envolve a mitocôndria e possui como molécula central a proteína pró-apoptótica BIM (8).

Duas mutações que ocorrem naturalmente em camundongos têm sido amplamente utilizadas para estudar a importância do sistema FAS/FASL na retração da população de células T expandidas durante uma resposta imune. Camundongos MRL/ lpr (*lymphoproliferation spontaneous mutation*) apresentam uma diminuição dramática da expressão de FAS na superfície celular. Por outro lado, camundongos MRL/gld (*generalized*

lymphoproliferative disease) possuem uma mutação que resulta na geração de um FASL defeituoso. Ambos os animais apresentam um fenótipo bastante semelhante, com linfadenopatia e esplenomegalia causada pelo acúmulo de linfócitos T ativados. A incidência de doenças autoimunes nestes camundongos é bastante aumentada e ocorre em múltiplos órgãos, indicando que o acúmulo de células ativadas que deveriam morrer por AICD via FAS/FASL não é apenas um problema de aumento dos órgãos linfóides, mas sim um distúrbio grave nos processos de tolerância periférica (12, 72-74). Em humanos, a ALPS (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*) é uma doença linfoproliferativa com alta incidência de linfomas, causada principalmente por deficiências na expressão de FAS, FASL ou moléculas envolvidas na via de sinalização, tais como caspase-8 e FADD (13). Camundongos nocaute para BIM apresentam um fenótipo semelhante aos deficientes na expressão de FAS/FASL, com linfadenopatias, deficiência no desenvolvimento de células T e doenças autoimunes (75).

Por muito tempo foi discutido na literatura qual seria o valor de cada uma destas moléculas e vias de sinalização na deleção de linfócitos T periféricos. Em 2008, publicações utilizando camundongos duplo nocaute para FAS e BIM mostraram que ambas as vias são complementares e sinérgicas, tanto para conter o aparecimento de síndromes autoimunes como na contração de populações expandidas. A teoria mais aceita atualmente sobre a participação de FAS/FASL e de BIM na eliminação dos linfócitos T que sofreram expansão clonal leva em consideração a forma e a duração da apresentação dos antígenos estranhos. Durante infecções agudas, o antígeno apresentado pelas APCs é rapidamente eliminado. Dessa forma, a concentração de fatores de sobrevivência se torna limitante e a morte dos linfócitos T ocorreria preferencialmente por um mecanismo dependente de BIM (76). Entretanto, quando o antígeno persiste, como em casos de infecção crônica, os linfócitos T permanecem recebendo estímulos de sobrevivência, evitando assim, a ativação da via dependente de BIM. Nesta situação, a ativação crônica dos linfócitos T induziria a expressão de FASL que agiria de forma autócrina ou parácrina, eliminando os linfócitos T por AICD (77). Neste caso, a expressão de FASL poderia também induzir a morte das APCs, o que limitaria a estimulação pelo antígeno, diminuindo a quantidade de sinais de sobrevivência, desencadeando nos linfócitos T uma morte dependente de BIM (78).

O mecanismo molecular da AICD, processo de morte alvo deste trabalho, depende da interação do receptor de morte FAS com seu ligante cognato FASL, ocorrendo, portanto, por uma via extrínseca de apoptose (79, 80). O receptor FAS é uma proteína transmembrana, membro da superfamília dos receptores de TNF. É constitutivamente expresso em uma

variedade de células, incluindo células B e T e pode ter sua expressão aumentada após a ativação celular (81).

Em contraste, FASL é sintetizado como uma proteína transmembrana, cuja expressão é limitada a poucos tipos celulares e pode ser altamente induzida em linfócitos T após a estimulação do TCR (82, 83). Sua porção extracelular pode ser clivada da membrana por metaloproteases para se tornar secretada, sendo que a forma solúvel de FASL parece ser em grande parte inerte como um ligante indutor de morte (84). No entanto, é evidente que na maioria dos casos a ligação de FAS com FASL associado à membrana, seja de maneira autócrina ou parácrina, induz rapidamente uma cascata auto-catalítica, que resulta na morte celular por apoptose (85, 86).

A estimulação do receptor FAS pelo seu ligante induz a formação de um complexo multimolecular denominado DISC (*death-inducing signaling complex*). DISC é formado por moléculas de FAS oligomerizadas, geralmente triméricas e uma molécula adaptadora que contém um domínio de morte (*Death domain – DD*) chamada FADD (*FAS-associated death domain*). FADD se liga ao FAS através de interações homotípicas entre os domínios DD de ambas as proteínas e medeia a interação e dimerização da procaspase-8 (ou procaspase-10). Esta procaspase sofre ativação autocatalítica, desliga-se do DISC e ativa caspases efetoras, como caspase-3, -6 e -7 (87). Estas caspases ativadas podem então clivar uma variedade de substratos, como enzimas reparadoras de DNA, proteínas estruturais, endonucleases e outros constituintes celulares, promovendo a apoptose da célula (81, 88, 89). Em paralelo, esta via pode sofrer uma amplificação dependente da mitocôndria, na qual a caspase-8 ativada no DISC cliva BID (90), um membro pró-apoptótico da família BCL-2, gerando um fragmento truncado denominado tBID. Este fragmento cliva outras proteínas pró-apoptóticas, tais como BAX ou BAK (91), aumentando a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e promovendo a liberação do citocromo c para o citoplasma. O citocromo c liga-se a APAF-1 (*apoptotic-protease-activating factor-1*), que, por sua vez, recruta a procaspase-9 formando um complexo de proteínas chamado apoptossomo. Este complexo, na presença de ATP, permite a ativação de procaspase-9 e subsequente ativação de procaspase-3, molécula responsável pela indução dos principais fenótipos apoptóticos (92) (**Figura 2**).

Figura 2: Via extrínseca de apoptose e sua amplificação mitocondrial.

Diversos fatores contribuem para a indução de um estado de susceptibilidade à AICD dos linfócitos T e participam da regulação deste processo de morte por apoptose. cFLIP é um potente inibidor da ativação de caspases no DISC (93). cFLIP é homólogo às procaspases iniciadoras, porém, com um domínio catalítico inativo. A razão entre cFLIP e procaspases no DISC determina se a apoptose será ou não iniciada (94). Após a ativação inicial da célula T, cFLIP é fortemente regulado positivamente. O aumento na sua expressão se correlaciona com a resistência das células T recentemente ativadas à indução de apoptose dependente de FAS. Em células T expandidas, sensíveis ao FASL e à AICD, os níveis de cFLIP diminuem, sugerindo que esta molécula é uma reguladora central que torna os linfócitos T suscetíveis à AICD dependente de FAS. O papel de cFLIP na AICD é ressaltado pela observação de que a coestimulação via CD28 resgata as células T da apoptose (95-97). Essa coestimulação é seguida por uma regulação positiva da expressão de cFLIP, o qual anula a ativação de procaspase-8 no DISC (97, 98).

Os *lipids rafts* também têm sido apontados como importantes reguladores da apoptose mediada por FAS, uma vez que podem controlar a eficiência dos eventos iniciais da sinalização via FAS/FASL. Por meio deles, ocorre a organização de proteínas sinalizadoras,

moléculas adaptadoras e receptores de superfície em um mesmo ponto da membrana celular. A estimulação do TCR de células T CD4⁺ resulta em redistribuição das moléculas de FAS para dentro dos *lipids rafts*, aumentando a susceptibilidade das células à apoptose (99, 100).

Outro importante ponto de regulação da AICD ocorre por meio da modulação na expressão gênica de FASL, tema que é amplamente estudado por ser um evento central na regulação da vida e morte de diversos tipos celulares, principalmente linfócitos T maduros. O fator de transcrição NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) é ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3 e parece ser o regulador central da expressão de FASL. Camundongos mutantes para NFAT apresentam expressão deficiente de FASL e em alguns modelos desenvolvem doenças linfoproliferativas (101, 102). Apesar do promotor de FASL apresentar um único sítio de ligação com o fator de transcrição NF-κB, este parece mediar diversos estímulos apoptóticos que usam a via de FAS/FASL (103, 104). No promotor do FASL existem ainda sítios de ligação consenso para Egr (*Early growth response genes*), membros da família IRF (*Interferon regulatory factors*), AP-1 (*Activator Protein-1*), c-Myc, FKHRL1 (*Forkhead transcription factor 1*) e SP-1 (*secretory protein 1*).

A expressão de FASL, induzida pela estimulação do TCR, pode ainda ser negativamente regulada através de diversos mecanismos. Um deles é o GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine-zipper*), um gene regulado por glicocorticóides, capaz de bloquear o aumento de FASL em hibridomas, interferindo com o processo de apoptose por AICD (105). O repressor transcripcional ICER (*Inducible cAMP early repressor*) é induzido rápida e fortemente pelo aumento nos níveis de AMPc e pode ocupar sítios de ligação consenso que são utilizados por diversos fatores de transcrição, impedindo a correta transcrição gênica mediada por estes fatores transcripcionais (106). O fator de transcrição CIITA (*MHC class II transactivator*), bem como o ácido retinóico, podem bloquear a função de NFAT e inibir a transcrição de FASL (107, 108). Finalmente, TGF-β pode igualmente inibir a expressão de FASL via reestimulação do TCR, através da modulação negativa da expressão de c-Myc (109).

Em resumo, a regulação da morte celular dependente de FAS/FASL é complexa e envolve alterações na transdução de sinal, ativação de caspase-8 e localização do receptor FAS, bem como na modulação da expressão gênica de FASL que é um mecanismo extremamente regulado, no qual diversos fatores de transcrição agem de forma aditiva, antagônica e/ou sinérgica, fazendo com que a somatória de todas estas influências tenha como consequência o resultado mais apropriado.

1.6 Prostaglandina E₂

A ativação dos TLRs, além de fundamental para controlar a produção de citocinas e quimiocinas citadas anteriormente, participa da regulação de diversos mediadores lipídicos. Um exemplo deles é a prostaglandina E₂, que pode ter a sua produção regulada através da estimulação de praticamente todos TLRs (110, 111).

As prostaglandinas (PG) são moléculas derivadas de lipídios, geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico através da ação de diversas enzimas. O ácido araquidônico é liberado a partir de fosfolipídeos da membrana plasmática pela ação da enzima fosfolipase A2 e é então processado pelas ciclooxygenases (COX) -1 e -2. A COX-1 é descrita, raras exceções, como sendo constitutivamente expressa, participando da manutenção dos níveis basais das PGs, exercendo funções de homeostase fisiológica (112). Por outro lado, a expressão de COX-2 é induzível e pode ser estimulada por diversos agentes pró-inflamatórios, especialmente durante processos infecciosos (113, 114). Em adição, o grupo de Dan Simmons publicou em 2002 o descobrimento de uma nova isoforma de COX em cães, chamada de COX-3(115). No entanto, em roedores e humanos, COX-3 parece codificar uma proteína com a atividade de ciclooxygenase questionável (116).

A ativação de COX-1 e COX-2 resulta na geração de PGG₂ que é reduzida, produzindo a intermediária PGH₂. Esta prostaglandina é bastante instável e rapidamente sofre a ação de isomerases e oxido-redutases que a convertem nas cinco principais prostaglandinas com efeitos fisiológico relevantes. São elas: PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{2α} e tromboxano (TXA) (117, 118).

A PGE₂ é o mais abundante prostanóide encontrado no corpo humano, produzida em diversas condições, especialmente durante a resposta imune. A isomerização de PGH₂ em PGE₂ é catalisada por 3 diferentes PGE sintases, sendo uma PGE sintase citosólica e outras duas ligadas à membrana citoplasmática chamadas mPGES-1 e mPGES-2. A PGE sintase citosólica e a mPGES-2 são constitutivas enquanto que mPGES-1 em geral é induzida. É postulado que a PGE sintase citosólica utiliza PGH₂ produzida por COX-1 enquanto que mPGES-1 usa a PGH₂ derivada da COX-2. A mPGES-2 pode usar ambas as fontes de PGH₂ (119, 120). A mPGES-1 é regulada positivamente em resposta a diversos estímulos pró-inflamatórios e mitogênicos com o concomitante aumento na expressão de COX-2. Citocinas como IL-1β, TNF-α e a estimulação de TLR4 com LPS são alguns dos indutores de mPGES-1 (121).

As funções biológicas da PGE_2 abrangem efeitos nos sistemas reprodutivo, gastrointestinal, cardiovascular, nervoso e imunológico. A PGE_2 geralmente atua como um importante mediador pró-inflamatório envolvido na indução de todos os sinais cardinais da inflamação: edema, calor, vermelhidão e dor. Isso é produzido como resultado de sua ação no aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo no tecido inflamado, hiperalgesia e ação nos neurônios sensoriais periféricos dentro da área afetada (122, 123). Sua influência no sistema imune é complexa, tendo ação em vários tipos celulares, como macrófagos, DCs, linfócitos B e T, causando efeitos tanto anti, quanto pró-inflamatórios.

Para se explicar a grande diversidade de efeitos que a PGE_2 desempenha, diversos fatores devem ser considerados. Dentre eles, a sua concentração no microambiente, o tecido alvo de sua ação, o estado de diferenciação da célula alvo e principalmente o receptor pelo qual ela será reconhecida. A PGE_2 se liga a quatro receptores específicos, chamados EP (EP1-4), sendo que existe heterogeneidade quanto às proteínas G acopladas a estes receptores (124, 125).

Os EPs foram originalmente classificados quanto a sua função nos músculos lisos, sendo divididos em basicamente dois grupos. O primeiro, denominado “relaxante” é formado por EP2 e EP4, que se acoplam à proteína G_s . Quando estes receptores são acionados, ocorre a ativação da adenilato ciclase (AC) com o consequente aumento na produção de cAMP (*Cyclic Adenosine Monophosphate*) e ativação de PKA (*Protein kinase A*). Embora ambos os receptores compartilhem a mesma via de sinalização, eles diferem no comprimento de sua sequência C-terminal e, portanto, possuem sensibilidade diferente à fosforilação e dessensibilização (126, 127). Mais recentemente foi descrita uma nova via dependente de AMPc, mas independente de PKA, que é mediada pelo EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*) e culmina na ativação de PKB (*Protein kinase B*) (128). Em contraste, os receptores EP1 e EP3 estão envolvidos na contração da musculatura lisa e funções inibitórias, estando acoplados à proteína G_q e G_i , respectivamente. Atuam elevando os níveis de cálcio intracelular e inibindo o aumento de cAMP (129).

Em relação à distribuição tecidual dos EPs, foi demonstrado que EP2 e EP4 estão amplamente distribuídos em quase todos os tecidos de camundongos, enquanto a expressão do mRNA de EP1 é restrita a alguns órgãos, tais com, rim, pulmão e estômago e o EP3 é o menos abundante de todos os receptores (130). A análise de expressão destes receptores em células do sistema imune mostrou uma ampla distribuição, sendo que tanto DCs e macrófagos (131, 132), como linfócitos B e T (133) podem expressar os quatro subtipos.

A PGE₂ pode atuar em diversas fases da vida do linfócito T, desde o seu desenvolvimento, ativação, maturação e até durante a realização de suas funções efetoras. Por exemplo, o aumento de AMPc via receptor EP2 e EP4 parece mediar a proteção de timócitos duplo-positivos da morte por seleção negativa (134). O receptor EP2 também está envolvido na inibição da proliferação de células T causada pela PGE₂ (135, 136). Ainda, a PGE₂ pode favorecer a maturação das DCs, induzir a expressão de moléculas coestimuladoras, a captura dos antígenos e o *homing* para os linfonodos, aumentando a ativação de linfócitos T. Por outro lado, este mediador lipídico suprime a diferenciação do subtipo de linfócitos T CD4⁺ Th1, favorecendo um padrão de resposta Th2 (137). Em adição, foi demonstrado em diferentes modelos experimentais e tipos celulares o importante papel da PGE₂ na modulação da morte por apoptose (138-140).

Em 1999, Porter e Malek mostraram pela primeira vez um mecanismo pelo qual a PGE₂ exerce seu efeito antiapoptótico. Induzindo AICD em esplenócitos ativados ou na linhagem celular 2B4.11.13, eles demonstraram que a inibição da apoptose pela PGE₂ envolve a modulação negativa do ligante de morte FASL nas células T, tanto em nível de mRNA, quanto de proteína (141). Em 2001, Yarovsky e Hunninghake, utilizando um modelo *in vitro*, mostraram que fibroblastos do pulmão resgatam as células T da AICD através da secreção de PGE₂, que inibe a ativação de caspase-3 e caspase-8 e consequentemente a apoptose (142). Em 2007, o grupo de Gjomarkaj publicou um trabalho demonstrando que a PGE₂ secretada no fluido pleural após a ativação de macrófagos com LPS, prolongava a vida de um subgrupo específico de linfócitos T (CD45RO⁺), resultando na diferenciação destas células no espaço pleural inflamado (143). Ainda em 2007, o grupo de Martín-Sanz mostrou que hepatócitos de animais transgênicos que superexpressam COX-2 são resistentes à morte induzida via FAS e que bloqueando o acúmulo de PGE₂ no fígado, esta resistência é suprimida (144). Finalmente, um trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa em 2008 demonstrou que APCs ativadas com LPS via TLR4/MyD88 produzem PGE₂ que inibe a AICD de células T CD4⁺. Neste trabalho células de exsudato peritoneal (PEC), BMDC (*Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) e a linhagem macrofágica J774 tiveram o seu sobrenadante recolhido após o estímulo com LPS. Este sobrenadante foi adicionado aos linfócitos T CD4 (hibridoma DO11.10 e blastos) estimulados com anti-CD3 adsorvido em placa, estímulo que mimetiza a AICD. Verificou-se que a PGE₂ presente no sobrenadante agiu via seus receptores EP2 e EP4, bloqueando a expressão de FASL e inibindo a apoptose (15). É importante ressaltar que este trabalho foi inteiramente realizado *in vitro* e que foi utilizado um modelo

experimental que possui a deficiência de não considerar o contato celular a os co-estímulos provenientes do mesmo.

Sendo assim, este projeto teve como objetivo ampliar o conhecimento nesta área, utilizando um modelo experimental mais complexo e próximo ao fisiológico, partindo da hipótese de que, durante o processo de apresentação antigênica, a expressão de FASL e a morte dos linfócitos T CD4⁺ pode ser modulada pelo microambiente de maneira dependente da ativação de TLR e/ou produção de PGE₂.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o impacto da interação entre DCs imaturas ou maduras com linfócitos TCD4⁺ na expressão de FASL, proliferação, ativação e sobrevivência destes linfócitos.

2.2 Metas Específicas

- Padronizar protocolos de apresentação antigênica *in vitro* e *in vivo*, utilizando camundongos transgênicos DO11.10 ou OTII, cujos TCR reconhecem ovalbumina.
- Verificar o perfil de ativação, proliferação e apoptose dos linfócitos T CD4⁺, após a apresentação antigênica, na presença ou ausência de LPS.
- Averiguar a expressão de FASL e a importância da sua sinalização nos linfócitos T CD4⁺, após a apresentação antigênica, na presença ou ausência de LPS.
- Investigar a participação de PGE₂ nos fenômenos observados
- Cruzar camundongos C57BL/6 OTII e C57BL/6 FAS^{lpr/lpr} (deficiente em FAS), a fim de obter uma sub-linhagem C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr} que será utilizada em experimentos de apresentação antigênica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados em cultura celular foram obtidos da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA) e o Ficoll-Hypaque foi adquirido da GE Healthcare (Pittsburgh, PA, EUA). O GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator*) recombinante murino e a IL-2 recombinante humana foram adquiridos na PeproTech (Ribeirão Preto, SP, Brasil) e utilizados para a geração de células dendríticas derivadas de medula óssea e como fator de crescimento para linfócitos T, respectivamente. Da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram obtidos o LPS (lipopolissacarídeo) de *E. coli*, a ovalbumina grau II, ovalbumina grau V, o adjuvante completo de Freud (CFA), a Concanavalina A (ConA), a PMA (Phorbol Myristate Acetate), a Ionomicina, a Brefeldina e a Indometacina. O peptídeo da ovalbumina (pOVA 323-339) que apresenta a sequência de aminoácidos ISQAVHAAHAEINEAGR, com pureza de 98%, foi adquirido da Proteimax (Cotia, SP, Brasil) e utilizado em todos os ensaios de apresentação antigênica. O Kit de fixação e permeabilização Cytofix/Cytoperm foi adquirido da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). Os anticorpos anti-CD4 (APC.Cy7), anti-CD8 (pacific-blue), anti-CD3 (FITC), anti-CD19 (APC), anti-CD11b (PercP.Cy5.5), anti-CD11c (PE.Cy7), anti-CD25 (PE.Cy7), anti-CD69 (PercP.Cy5.5), anti-KJI-26 (PE), anti-TCR $\nu\beta 5$ (PE), anti-IL-17 (APC), anti-IFN- γ (PercP.Cy5.5), anti-FAS (PE.Cy7), anti-FASL (PE) e anti-Foxp3 (PE), utilizados em citometria de fluxo foram obtidos da BioLegend (San Diego, CA, EUA). O Cell Trace Violet Cell Proliferation Kit, os reagentes utilizados para as reações de PCR, os oligonucleotídeos e o Kit Taqman de qPCR foram adquiridos da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Para seleção de linfócitos T CD4⁺, utilizamos o “CD4⁺ T cell isolation Kit II”, bem como as “LS separation columns” e o “MidiMACS separator”, todos da Miltenyi Biotec (San Diego, CA, EUA). O kit de imunoensaio enzimático para detecção de PGE₂ foi adquirido da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA). Para análise da produção de citocinas foi usado o kit comercial BD OptEIA da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

3.2 Camundongos

Os camundongos BALB/C, BALB/C DO11.10 e C57BL/6, mantidos em condições *germfree*, foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de

Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Camundongos C57BL/6 OTII foram gentilmente fornecidos pela Dra. Maria Bellio da Universidade Federal do Rio de Janeiro (EFRJ). Camundongos C57BL/6 FAS^{lpr/lpr} foram gentilmente fornecidos pelo Dr. João Santana da Silva Faculdade de medicina de Ribeirão Preto. Camundongos C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr} foram gerados e mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia no Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo. Os procedimentos para a manipulação dos camundongos foram analisados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA). Os animais utilizados nos experimentos foram todos machos com 6 a 10 semanas de idade.

3.3 Condições de cultura celular

Os blastos de linfócitos T CD4⁺ foram cultivados em meio R-VIT (RPMI-1640 suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 0,1 mM de vitaminas, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de gentamicina, 100 U/L penicilina + 100 µg/L estreptomicina, 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino) em placas de 12 poços, mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂. O cultivo das células dendríticas foi realizado em meio R-10 (RPMI-1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de gentamicina, 100 U/L penicilina + 100 µg/L estreptomicina e 10% de soro fetal bovino) em placas de 6 poços, mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. O uso das células para experimentos foi condicionado o mínimo de 95% de viabilidade verificada por exclusão com Azul de Tripan 0,2%. A contagem do número de células para a execução dos experimentos foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.4 Geração de camundongos OTII/FAS^{lpr/lpr}

O camundongo FAS-deficiente contendo o TCR transgênico OTII em contexto H-2^b (OTII/FAS^{lpr/lpr}) foi gerado pelo cruzamento entre camundongos C57BL/6 OTII e camundongos C57BL/6 FAS^{lpr/lpr}. Para confirmação da homozigose para o gene LPR, as gerações filhas foram genotipadas através de reações de PCR de DNA genômico, utilizando-se *primers* específicos para as regiões alvo. Para confirmação da expressão do TCR transgênico, células do sangue periférico foram marcadas com anticorpos CD3 e CD4 e analisadas quanto à frequência do TCR vβ5.1 (específico para ovalbumina). Nos experimentos, foram utilizados somente camundongos LPR homozigotos (que apresentam

ambos os alelos do gene *fas* mutados) e cuja frequência de linfócitos T CD4⁺ com TCR v β 5.1 foi superior a 90%, como ilustrado na **Figura 3**.

Figura 3. Representação ilustrativa do (A) *fenótipo* e (B) *genótipo* dos animais C57BL/6 OTII/FAS^{*lpr/lpr*} utilizados nos experimentos.

3.5 Extração e PCR de DNA genômico

Para realizar a genotipagem dos camundongos *knockouts* utilizamos amostra de DNA obtida da extremidade da cauda. Cortamos aproximadamente 0,5 cm da cauda de cada animal e transferimos para um tubo contendo 400 μ l de tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 200 mM NaCl; 5mM EDTA; 0,2% SDS, 100 μ g/mL de proteinase K). Incubamos *overnight* à 56 °C, 750 rpm. Centrifugamos durante 5 minutos, 15000 rpm, 4 °C e transferimos o sobrenadante para outro tubo. Adicionamos 400 μ l de isopropanol e invertemos 15 vezes para completa homogeneização. Centrifugamos durante 10 minutos, 12000 rpm, 4 °C. Desprezamos o sobrenadante, adicionamos 500 μ l de etanol 70% gelado e centrifugamos novamente por 5 minutos, 12000 rpm, 4 °C. Descartamos o sobrenadante e mantivemos o tubo invertido durante 5 minutos para secar o precipitado. Acrescentamos 50 μ l de TE (400 uL TRIS; 80 uL EDTA; ddH₂O qsp 40 mL) e incubamos por 30 minutos à 65 °C para completa diluição do DNA. O DNA presente em cada amostra foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 e as amostras foram diluídas de maneira a ficarem na concentração de 50 ng DNA/ μ l. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR foram adquiridos da Invitrogen e as suas sequências encontram-se discriminadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR para identificação do gene *lpr*.

	Oligonucleotídeos	Sequência do Oligonucleotídeos
Comum	oIMR1678	5'- GTA AAT AAT TGT GCT TCG TCA G -3'
Mutante	oIMR1679	5'- TAG AAA GGT GCA CGG GTG TG -3'
Selvagem	oIMR1680	5'- CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG -3'

Cada reação, para determinação da mutação no gene *fas*, foi realizada como descrito na **Tabela 2**. O tamanho esperado de amplificação foi de 179 pb para o alelo selvagem e 217 pb para o alelo mutante. Camundongos heterozigotos para a mutação apresentaram ambos amplificados.

Tabela 2: Reação de PCR para identificação do gene *lpr*.

	MIX selvagem (μL)	MIX mutante (μL)
10X PCR Buffer	1,2	1,2
50mM MgCl ₂	0,48	0,48
olMR 1678 10μM	0,6	0,6
olMR 1679 10μM		0,9
olMR 1680 10μM	0,4	
Taq DNA polimerase	0,06	0,06
dH ₂ O	7,02	6,52
Volume final	10	10
gDNA (50ng/μL)	2	2

3.6 Geração de blastos de linfócitos T CD4⁺

Baços de camundongos BALB/C DO11.10 ou C57BL/6 OTII foram removidos e por esmerilhamento com lâminas foscas as células foram liberadas de seus órgãos de origem. As hemácias foram removidas por lise em solução de cloreto de amônia e as células restantes foram lavadas e mantidas em meio R-VIT. Para a geração de blastos de linfócitos T CD4⁺, 3x10⁶ células/mL foram plaqueadas na presença de 5 μg/ml de ConA em volume final de 2 ml/poço. Após 48 horas as células foram lavadas para retirada da ConA e replaqueadas na presença de 100 U/ml de rIL-2 em volume final de 2 ml. Após 48 horas o conteúdo de cada poço foi expandido para mais dois poços na presença de 100 U/ml de rIL-2 e mantido em cultura por mais três, quatro ou cinco dias. Na sequência, as células foram submetidas à centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque para eliminação de células mortas, lavadas três vezes, contadas e plaqueadas conforme os protocolos envolvidos. As células resultantes foram fenotipadas por citometria de fluxo em FACS Canto II (BD Bioscience).

3.7 Geração de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs)

Foram extraídas células da medula óssea dos fêmures de camundongos BALB/C DO11.10 ou C57BL/6 OTII através de jatos de meio, com o uso de seringa e agulha hipodérmica. As células foram então centrifugadas por 5 minutos a 500 g e ressuspensas em meio R-10. Para a geração de BMDCs, 7×10^6 células foram plaqueadas em placa de petri de 100 mm em volume final de 10 ml na presença de 20 ng/ml de GM-CSF que foi repostado no quarto dia. No sétimo dia de cultura, o sobrenadante contendo as células dendríticas em suspensão foi removido e centrifugado (145). As células foram contadas, replaqueadas e estimuladas ou não com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS durante 24 horas. A fenotipagem das células foi realizada por citometria de fluxo em FACS Canto II (BD Bioscience)..

3.8 Cocultura entre blastos de linfócitos T CD4^+ e BMDCs

DCs e linfócitos T CD4^+ foram cultivados na proporção de 1 para 2, respectivamente. BMDCs foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $1,5 \times 10^6/\text{mL}$ em volume final de 100 μL de R-VIT, na presença ou ausência de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS, durante 24 horas. Ao término deste período as DCs foram pulsadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVA durante 2 horas. Os linfócitos foram marcados com CellTrace e 3×10^5 blastos de linfócitos T CD4^+ foram adicionados por poço às DCs, totalizando $4,5 \times 10^5$ células por poço em volume final de 200 μL . Após determinados períodos de cocultura as células foram analisadas.

3.9 Transferência adotiva de células

Para realização dos experimentos de apresentação antigênica de ovalbumina *in vivo* utilizamos um protocolo de transferência de células de camundongos transgênicos para os respectivos animais isogênicos (146).

Dia 0: Baços de camundongos BALB/C DO11.10 ou C57BL/6 OTII foram removidos e, por esmerilhagem com lâminas foscas, as células foram liberadas de seus órgãos de origem. As hemácias foram removidas por lise em solução de cloreto de amônia e as células restantes foram lavadas, contadas e marcadas com CellTrace. Dez milhões de células em volume final de 100 µL de PBS foram injetadas nos camundongos recipientes de todos os grupos através do plexo ocular.

Dia 2: Foram realizados 6 diferentes tipos de tratamentos, com 3 animais recipientes por grupo. A indometacina (INDO) foi administrada via intraperitoneal na concentração de 5mg/Kg do animal em volume final de 500 µL de DMEM incompleto (sem suplementação). Após 1 hora os outros tratamentos foram ministrados via endovenosa pelo plexo ocular, como descrito na **Tabela 3**. As quantidades de estímulos utilizados foram 50 µg de pOVA e 10 µg de LPS por animal em volume final de 100 µL de PBS.

Tabela 3: Diagrama dos tratamentos ministrados nos camundongos.

GRUPOS	N	TRATAMENTOS	
		Imunização	Desafio
1	3	1X10 ⁷ células	PBS
2	3	1X10 ⁷ células	LPS i.v.
3	3	1X10 ⁷ células	pOVA i.v.
4	3	1X10 ⁷ células	INDO i.p. + pOVA i.v.
5	3	1X10 ⁷ células	pOVA + LPS i.v.
6	3	1X10 ⁷ células	INDO i.p. + pOVA + LPS i.v.

Dia 5: Os animais recipientes foram sacrificados e os linfonodos inguinais, axilares e os baços foram removidos. Os baços foram colocados individualmente em poços de placa de 12 poços em 2 mL de PBS. Os linfonodos de cada animal foram colocados juntos dentro de um mesmo poço de placa de 12 poços em 2 mL de PBS. Os órgãos foram processados para liberação das células. As hemácias dos baços foram removidas por lise em solução de cloreto de amônia e as células restantes foram lavadas. Após contagem, 2x10⁶ células dos baços e do pool de linfonodos foram marcadas com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo em FACS Canto II (BD Bioscience).

3.10 Hipersensibilidade tardia (DTH)

Para indução de DTH, utilizamos um protocolo modificado de Chiller e colaboradores (147).

Dia 0 - Sensibilização: Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 100 µg de ovalbumina (OVA) grau V emulsificada em parte igual de Adjuvante Completo de Freud (CFA). Cada animal recebeu duas injeções de 50 µl da emulsão, uma em cada lado da base da cauda. Para um dos grupos, foi adicionado à emulsão INDO na concentração de 10 mg/Kg do animal. Outro grupo recebeu INDO via intraperitoneal na concentração de 10 mg/Kg do animal em volume final de 500 µL de DMEM incompleto (sem suplementação). Os grupos restantes receberam a injeção com veículo.

Dia 4 - Desafio: O desafio dos animais foi realizado com 2% de OVA grau II agregada, preparada através do aquecimento em banho-maria à 80 °C durante uma hora, com agitação a cada 15 minutos. Em seguida, centrifugamos à 3000 rpm por 10 minutos e ressuspendemos em salina. Todos os animais receberam injeção no coxim plantar de OVA grau II na pata direita e salina na pata esquerda.

Dias 5-7: As medições de incremento de espessura (mm) da pata produzido pela resposta imunológica foram realizadas com auxílio de paquímetro após 24, 48 e 72 horas do desafio. Os dados gerados pela diferença entre a medida da pata experimental (OVA II) e a pata controle (salina) de cada animal foram usados para análise.

3.11 Marcação celular com CellTrace

CellTrace Violet Cell Proliferation Kit foi utilizado *in vitro* para distinção entre as populações celulares e *in vivo* para avaliar a proliferação celular através da diminuição de fluorescência emitida pelas células após cada divisão. Um mL de solução de CellTrace 1 µM (para experimentos *in vitro*) ou 5 µM (para experimentos *in vivo*) foi adicionado à 2×10^6 células e incubado durante 20 minutos a 37 °C. Para lavagem das células foi adicionado 5X o

volume de RPMI suplementado e centrifugado por 5 minutos, 500 g. O precipitado celular foi ressuspendido em PBS ou R-VIT e utilizado nos experimentos.

3.12 Análise fenotípica por citometria de fluxo

Para avaliação fenotípica, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de interesse, diluídos em tampão de marcação (PBS + 2% SFB) durante 30 minutos, 4°C, no escuro. Em seguida as células foram lavadas com tampão de marcação, fixadas com paraformoldeído 1% e analisadas por citometria de fluxo em FACS Canto II (BD Bioscience).

3.13 Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina

Para a marcação com Anexina-V-FITC, as células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e lavadas uma vez em tampão de ligação (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂). Em seguida, 1×10^5 à 2×10^6 células foram incubadas com 2 µg/mL de anexina V-FITC em 100 µL de tampão de ligação por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com tampão de ligação, fixadas com paraformoldeído 1% diluído nesse tampão e analisadas por citometria de fluxo em FACS Canto II (BD Bioscience).

3.14 Eletroforese de Proteínas e Western-blot

Para obtenção das amostras, utilizamos o extrato protéico obtido de 1×10^6 células. As células foram centrifugadas 300 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 100 µL de tampão de amostra contendo SDS-*Sodium Dodecyl Sulphate* (50 mM Tris-HCL, pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de 2-mercaptoetanol). Na sequência, foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos e rapidamente resfriadas em gelo. A análise das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida redutor na concentração de 12%. A presença de detergente (SDS) desnatura as proteínas das amostras e neutraliza suas cargas, fazendo com que elas migrem no gel de acordo com sua massa molecular. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de 0,45 µm de PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) com auxílio do sistema semi-dry (Bio-Rad), de acordo com instruções do fabricante. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 3 horas em temperatura ambiente com uma

solução de 5% BSA (*Bovine Serum Albumin*) em TBS-Tween, com 0,1% de azida sódica. A marcação das membranas com os anticorpos foi feita durante 18 horas com anticorpo primário desejado (EP1, EP2, EP3 ou EP4). Após esse processo a membrana foi lavada 3 vezes em TBS-Tween e incubada por 1 hora no anticorpo secundário conjugado à peroxidase apropriado à temperatura ambiente. Após essa marcação a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS Tween. A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência e subsequente exposição a um filme auto-radiográfico. O tempo de exposição das membranas ao filme dependeu da intensidade da marcação e variou de 10 segundos à 3 minutos.

3.15 Purificação de linfócitos T CD4⁺

Após 5 horas de cocultura entre os blastos de linfócitos T CD4⁺ e as BMDCs, realizamos a purificação das células CD4⁺ através de um kit de seleção negativa (Miltenyi Biotec). A suspensão de células foi centrifugada a 300 g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido. Ao precipitado celular foi adicionado 40 µL de buffer (0,5% SFB, 2 mM EDTA em PBS pH7.2) e 10 µL de Biotin-Antibody Cocktail para cada 10⁷ células, homogeneizado e incubado à 4 °C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 30 µL de buffer e 20 µL de Anti-Biotin MicroBeads para cada 10⁷ células, homogeneizado e incubado à 4 °C por 10 minutos. As colunas de separação foram lavadas com 3 mL de buffer para em seguida receberem a suspensão celular. A população enriquecida de células T CD4⁺ não marcada foi coletada em um novo tubo. Adicionamos mais 3 mL de buffer na coluna e recuperamos o restante das células T CD4⁺, que foi adicionado ao primeiro efluente. As células foram utilizadas em qPCR Real-time.

3.16 Extração de RNA

As células foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a 420 g por 5 minutos. Descartamos o sobrenadante e adicionamos 0,5 ml de TRIZOL, agitando em vortex lento. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente adicionamos 100 µl de clorofórmio, seguido de nova incubação por 3 minutos. Centrifugamos 12.000 g por 15 minutos à 4 °C, separando-se a solução em fases aquosa e orgânica. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo. Sobre ela foi adicionado 250 µL de isopropanol, seguido por uma incubação a temperatura ambiente por 1 hora. Centrifugamos novamente e

descartamos o sobrenadante. Foi adicionado 500 µl de etanol 75% e centrifugamos 7500 g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi seco e ressuspensão em 20 µl de H₂O destilada, livre de DNase e RNase. Para avaliar a integridade do RNA, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, coradas em brometo de etídeo e visualizadas através de um transiluminador de UV. Em amostras de RNA íntegro foi possível visualizar duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18S e 28S. A quantificação e análise da pureza foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 1000.

3.17 Síntese de cDNA

Três microgramas de RNA foram diluídos em 12 µl de H₂O destilada livre de DNases e RNases. Foi adicionado 1 µl de oligo dT (500 µg/ml) e 1 µl de dNTP (10 mM) seguido de aquecimento à 65 °C por 5 minutos e rápido resfriamento em gelo. Acrescentamos 6 µl do mix (4 µl de Tampão 5x; 1 µl de DTT 0,1 M e 1,0 µl Superscript III 200 U/µl) e incubamos à 50 °C por 50 minutos. A enzima foi inativada incubando-se a 70 °C por 15 minutos seguidos por 5 minutos a 4 °C. Para avaliar a integridade do cDNA foi realizada reação de RT-PCR para o gene da β -actina (Forward: tggaatcctgtggcatccatgaaac; Reverse: taaaacgcagctcagtaacagtccg). O ciclo de amplificação utilizado foi: 95 °C/300s + 23(95 °C/45s, 68 °C/60s, 72 °C/45s) + 72 °C/120s. As amostras resultantes foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, coradas em brometo de etídeo e visualizadas através de um transiluminador de UV, para que em comparação com o marcador molecular, fosse analisado se os tamanhos de amplificação obtidos correspondiam aos esperados (349 pb).

3.18 RT-PCR em tempo real (qPCR)

A reação de qPCR avalia o acúmulo do produto da reação de amplificação em sua fase logarítmica, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação. Para as reações de qPCR foi utilizado o kit Taqman (Applied Biosystem). Além dos *primers* específicos para o gene de interesse, a tecnologia Taqman inclui uma sonda, que é uma sequência de DNA específica e complementar ao gene de interesse. Esta sonda possui em uma das extremidades um fluoróforo que permanece coberto por um repressor, impedindo a emissão de luz. Com a atividade da Taq polymerase balizada pelos *primers*, há a degradação da sonda ligada ao gene, separando o fluoróforo do seu repressor. A luz emitida é então

quantificada por um programa de computador específico, e é proporcional ao número de cópias sendo amplificadas.

Cada reação foi composta por 6 µL de master mix, 3,4 µL de H₂O destilada livre de RNase e DNase, 0,6 µL da sonda Taqman e 2 µL (30 µg) de cDNA. O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 50 °C/2 min + 95 °C/10 min + 45x(95 °C/15s, 60 °C/1 min). O número de catálogo de cada *primer*/sonda está especificado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Número de catálogo dos primers/sondas utilizados nas reações de qPCR

Gene	Nº de Catálogo
<i>FasI</i>	Mm00438854_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

3.19 Cálculo da expressão gênica relativa

Duas análises podem ser utilizadas para quantificar a expressão gênica, a quantificação absoluta e a quantificação relativa. O método de comparação de Ct (quantificação relativa) foi utilizado neste trabalho para comparar a expressão relativa dos genes estudados. Para os cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi levado em consideração que durante a reação de qPCR, a fluorescência aumenta a cada ciclo e atinge um limiar (*threshold*) no qual as amostras podem ser comparadas. Quanto maior o número inicial de fitas molde, mais cedo a fluorescência poderá ser observada. O valor de *threshold cycle* (Ct) de cada amostra, obtido na fase exponencial da reação, foi analisado para os genes de interesse assim como para um controle interno com expressão que não apresente variação frente aos estímulos (*housekeeping*), no caso o *gapdh*. A diferença entre os valores dos Ct (ΔCt) foi calculada para cada gene e a normalização foi realizada subtraindo-se o valor de Ct do *gapdh* do valor do Ct do gene em questão. O $\Delta\Delta Ct$ foi obtido subtraindo-se o valor de ΔCt da amostra controle do valor de ΔCt das outras amostras. Finalmente o valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é calculado para a obtenção da relação entre cada célula e sua respectiva amostra de referência. Esse valor representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído (148).

3.20 Análise da produção de citocinas por BMDCs

Placas com propriedade de alta ligação foram sensibilizadas com 50 µL do anticorpo de captura diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) por 18 horas a 4 °C. Após esse período, os poços foram bloqueados por 1 hora com 100µL de PBS contendo 0,05% de PBS-Tween 20 (PBS-T) e 10% de soro fetal bovino. As placas foram lavadas com PBS-T e em cada poço foram adicionados 50 µL das amostras ou do recombinante murino (IL-6 e IL-12) em diluições seriadas a partir de 4000 pg/mL para IL-6 e 2000 pg/mL para IL-12, diluído em solução de bloqueio. As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e lavadas com PBS-T. Aos poços foram adicionados 50 µL de solução contendo o anticorpo de detecção biotilado e estreptoavidina conjugada à peroxidase, permanecendo por um período de 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS-T e 50 µL da solução OPD foram adicionados à cada poço, seguido de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 4N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.21 Ensaio imunoenzimático para detecção de PGE₂

A detecção da PGE₂ nos sobrenadantes foi feita através da técnica de ELISA sanduiche, utilizando-se um kit comercial da Cayman Chemicals, segundo os protocolos do fabricante. Em resumo, 50 uL de cada amostra, concentrada e diluída 2x, foi incubada com o eicosanoide conjugado com acetilcolinesterase e anticorpos específicos em uma placa de 96 poços revestida de anticorpos anti-IgG. Após a adição do substrato enzimático, a densidade ótica das amostras foi determinada por leitura a 420 nm em espectrofotômetro e a quantificação foi feita com base na curva-padrão, sendo o resultado convertido em pg/mL.

3.22 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional *GraphPad Prism* versão 5. Para comparar dois ou mais grupos o teste usado foi o one-way analysis of variance (one-way ANOVA), seguido pelo pós-teste Tukey. Nos experimentos que envolveram mais de uma variável, utilizamos o two-way ANOVA, que analisa a influência de duas variáveis independentes diferentes sobre uma variável dependente. O pós-teste utilizado foi o Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 iDCs, mas não mDCs, induzem AICD de blastos de linfócitos T CD4⁺ durante a apresentação *in vitro* de ovalbumina

Um dos modelos experimentais utilizados neste projeto para se estudar a AICD foi a apresentação antigênica de peptídeo da ovalbumina (pOVA) durante a cocultura entre linfócitos T CD4⁺ e células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs). No entanto, células CD4 *naive* não são suscetíveis à morte por AICD. Para que estas células se tornem sensíveis é necessário que elas sejam ativadas e sofram alguns ciclos de proliferação na presença de IL-2 (149). Sendo assim, para estabelecermos este modelo, realizamos uma cinética de geração de blastos de linfócitos T CD4⁺ a partir de células de baço de camundongos BALB/C DO11.10, cujos linfócitos T possuem TCR transgênico que reconhecem um peptídeo da ovalbumina (OVA 323-339) apresentado em contexto de MHC classe II I-A^d. As células de baço foram mantidas em cultura por 7, 8 ou 9 dias na presença de estímulos específicos para a proliferação dos linfócitos (150, 151) e citocina IL-2 (152). Após os tempos determinados, as células foram submetidas a gradiente de Ficoll-Paque para remoção das células mortas, e fenotipadas por de citometria de fluxo quanto à expressão de marcadores de superfície.

Verificamos que no oitavo e nono dias de cultura, a frequência de células CD3⁺CD4⁺ ultrapassou 95%, sendo que as células restantes (2 a 5%) se trataram de linfócitos T CD3⁺CD8⁺. Não detectamos contaminação com macrófagos (CD11b⁺), células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺) ou linfócitos B (CD19⁺) (dados não mostrados), comprovando que o protocolo de geração de blastos de linfócitos T CD4⁺ foi eficiente (**Figura 4A**).

Figura 4. Blastos de linfócitos T CD4⁺ sofrem AICD após estímulo com anti-CD3. Células do baço de camundongo transgênico BALB/C DO11.10 foram tratadas com cloreto de amônio para lise de eritrócitos. Em seguida, 6×10^6 células por poço, em placa de 12poços, foram incubadas com ConA (5 μ g/ml) durante 48h e então lavadas e replaqueadas na presença de 100U/ml de rIL-2 por 48h. Após este período mais 100U/ml de rIL-2 foram adicionados à cultura e incubadas totalizando 7, 8 ou 9 dias. (A) Duzentas mil células foram marcadas com anticorpos anti-CD3.FITC, anti-CD4.APC-Cy7 e anti-CD8.Pacific blue e analisadas por citometria de fluxo. (B - E) Trezentas mil células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa durante 8h (B - D) ou 18h (B e E) e a expressão de FASL, FAS e marcação de Anexina-V foram analisadas através de citometria de fluxo utilizando-se anticorpos anti-FASL.PE e anti-FAS.PE-Cy7. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001; **P < 0,01 em relação aos controles não estimulados (Two-way Anova seguido de pós-teste Bonferroni). Resultado representativo de seis experimentos independentes.

Em paralelo, a mesma cinética foi realizada para analisarmos o momento em que as células estavam mais susceptíveis à morte por apoptose. Os blastos foram estimulados com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa, simulando o estímulo de MHC + peptídeo no complexo TCR/CD3, levando as células à morte por AICD, processo conhecidamente dependente da interação entre FAS e seu ligante FASL (65). Para análise da expressão de FAS e FASL, os blastos foram estimulados durante 8 horas, enquanto que para análise da apoptose através da marcação dos resíduos de fosfatidilserina com anexina-V, foi realizado um estímulo de 18 horas.

Primeiramente, verificamos que os blastos apresentam uma alta expressão de FAS (cerca de 95%) que não varia de acordo com os tempos observados (7, 8 ou 9 dias). Em adição, não observamos modulação da expressão de FAS pelo tratamento com anti-CD3 (**Figura 4B e 4C**). Em relação ao ligante de morte FASL, constatamos que a baixa expressão observada nas células controle foi positivamente modulada nas células estimuladas via o seu complexo TCR/CD3. O aumento na expressão de FASL pôde ser observado nos dias 7, 8 e 9 de cultura, sendo que a maior expressão (aproximadamente 14%) foi observada no oitavo dia (**Figura 4B e 4D**). Quanto à porcentagem de células mortas, constatamos que cerca de 30% das células da condição controle estavam morrendo por apoptose e que o sinal emitido pela ligação do CD3 foi bastante potente, aumentando a frequência de células em processo de apoptose para cerca de 100%. Não foi observada diferença na porcentagem de morte nos diferentes tempos de geração de blastos, tanto nas células controle como nas células estimuladas (**Figura 4B e 4E**).

Os resultados em conjunto indicam que o protocolo de geração de blastos de linfócitos T CD4⁺ foi efetivo apresentando mais de 95% de pureza das células geradas e que o tratamento dos blastos com anti-CD3 foi capaz de modular a expressão de FASL e a morte destas células. Porém, não observamos uma diferença expressiva na modulação de FAS, FASL ou na frequência de células em apoptose entre os vários dias analisados. Desta forma, optamos por utilizar o protocolo de 8 dias de geração de blastos de linfócitos T CD4⁺ e os demais resultados apresentados foram obtidos utilizando-se este protocolo.

Ainda para o estabelecimento do modelo experimental de cocultura celular, realizamos a padronização da geração de BMDCs (*Bone Marrow Derived Dendritic Cells*), onde células obtidas de lavado de medula óssea foram mantidas em cultura na presença de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Fator*), uma citocina que atua como fator de crescimento, estimulando a diferenciação das células tronco em granulócitos e monócitos (153). Após 7 dias de cultura, as células presentes no sobrenadante foram removidas, contadas

e estimuladas ou não com LPS durante 24 horas a fim de torná-las maduras (mDCs). Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo quanto a marcadores de superfície celular característicos de DCs (CD11b e CD11c), bem como moléculas de superfície expressas após a sua ativação. Ainda, confirmamos o estado de maturação destas células por meio da análise de citocinas pró-inflamatórias. Primeiramente, verificamos uma alta frequência de células CD11b⁺CD11c⁺ (aproximadamente 90%) na cultura após protocolo de diferenciação (**Figura 5A**). Observamos que após o tratamento com LPS, agonista de TLR4, as BMDCs apresentaram um perfil fenotípico de células maduras, com aumento na expressão dos marcadores de ativação CD80, CD86, MHC classe II e CD40 (**Figura 5B - 5E**). Ainda, estas células exibiram aumento na transcrição gênica das citocinas IL-6 e IL-12 (**Figura 5F e 5G**), bem como na sua secreção (**Figura 5H e 5I**). Em conjunto, os resultados obtidos nos comprovaram que a geração de BMDCs foi bastante eficaz e que o estímulo com LPS induziu a maturação destas células, que passaram de um estado imaturo (iDC) para um perfil ativado (mDC), caracterizado fenotípica e funcionalmente pela modulação da expressão de moléculas coestimuladoras e produção de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 5. LPS induz maturação fenotípica e funcional de BMDCs. Sete milhões de células extraídas de medula óssea de camundongo transgênico BALB/C DO11.10 foram mantidas com GM-CSF (20ng/mL) durante 7 dias, com troca do meio de cultura e adição de mais GM-CSF no quarto. No dia 7 as células foram ou não estimuladas com LPS (1μg/mL) durante 24h. (**A - E**) Análise por citometria de fluxo utilizando-se anticorpos anti-CD11b.Percp.cy5, anti-CD11c.PE-Cy7, anti-CD80.FITC, anti-CD86.PE, antiCD40.FITC e anti-MHCII.APC. (**F-G**) As células foram lisadas em trizol e analisadas por qPCR. A amostra controle foi utilizada como calibrador e os valores da expressão de IL-6 (**F**), IL-12 (**G**) para o tratamento com LPS são relativos à mesma. (**H-I**) Análise da produção de IL-6 e IL-12 no sobrenadante das culturas celulares em pg/mL. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001 em relação às BMDCs não estimuladas (CTRL). One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de cinco experimentos independentes.

Uma vez estabelecido o melhor tempo para geração de blastos de linfócitos T CD4⁺ e caracterizada a geração de BMDCs, utilizamos estas células para um ensaio de apresentação de pOVA. Sendo assim, após os protocolos de derivação de cada tipo celular, os blastos foram marcados com o corante vital CellTrace e as BMDCs imaturas (iDCs) ou maduras (mDCs)

foram pulsadas ou não com pOVA durante duas horas. As DCs foram colocadas em cocultura com os blastos, na proporção de uma DC para dois linfócitos T CD4⁺ e então analisadas através de citometria de fluxo após 6, 12, 18 e 24 horas. Para todas análises foram descartados os agregados celulares (FSC-A x FSC-H) e realizado um *gate* nas células viáveis (FSC-A x SSC-A), descartando os “debris” celulares. Selecionamos então as células CellTrace⁺ CD4⁺, que correspondem aos blastos e avaliamos a morte celular através da marcação com Anexina-V, que nos permitiu quantificar a externalização de resíduos de fosfatidilserina expostos após a célula entrar em apoptose (**Figura 6**). Verificamos que os blastos mantidos com iDCs ou com mDCs, mas na ausência do peptídeo antigênico, exibem uma taxa de morte basal ao redor de 20%. Por outro lado, quando iDCs apresentam o peptídeo da ovalbumina (OVA) para os blastos, estas células são induzidas à morte. Observamos 40% de linfócitos em apoptose após 12 horas de cocultura, e cerca de 60% após 18 horas. No entanto, quando a OVA foi apresentada por mDCs, a morte não foi verificada, permanecendo semelhante ao controle, com cerca de 20% de linfócitos T CD4⁺ em apoptose (**Figura 6**).

Figura 6. mDCs não induzem morte de blastos de linfócitos T CD4⁺ durante ensaio de apresentação de pOVA *in vitro*. Células de medula óssea e baço de camundongos BALB/C DO11.10 foram utilizadas para geração de BMDCs e blastos de linfócitos T CD4⁺, respectivamente. As iDCs e mDCs foram pulsadas ou não com pOVA (1µg/mL) por duas horas e colocadas em cultura com os blastos marcados com Celltrace, na proporção de 1:2, respectivamente. Após 6, 12, 18 ou 24 horas, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7 e Anexina-V.FITC. A apoptose foi analisada por citometria de fluxo, dentro do gate de células Celltrace⁺CD4⁺. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001; ns = não significativo. Two-way Anova seguido de pós-teste Bonferroni. Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

Uma vez que a apresentação de OVA pelas mDCs não induziu qualquer alteração na morte dos linfócitos, tornou-se importante investigar algum outro parâmetro, que nos confirmasse que o contato entre as células de fato ocorreu e que alguma sinalização foi transmitida entre as DCs e os blastos. Para tanto, realizamos novamente o experimento, desta vez averiguando a apoptose e avaliando a expressão nos blastos de CD69, uma importante molécula de ativação celular precoce, envolvida na proliferação e transdução de sinal nos linfócitos T (154). Como a cocultura de 18 horas permitiu uma melhor visualização do resultado, a expressão de CD69, bem como o restante dos experimentos, foi verificada neste tempo (**Figura 7**).

Novamente, observamos que a apresentação de pOVA por iDCs, mas não por mDCs, induz a morte por apoptose dos blastos de linfócitos T CD4⁺. (**Figura 7A**). Quanto à ativação destes linfócitos, verificamos que os blastos na ausência de um antígeno, na presença ou não das DCs, não expressam CD69 em sua superfície. Porém, a apresentação de OVA pelas mDCs induziu uma robusta expressão de CD69 nos linfócitos, demonstrando que de fato as mDCs são capazes de ativar as células T CD4⁺ (**Figura 7B**).

Figura 7. mDCs induzem expressão de CD69 em blastos de linfócitos T CD4⁺ durante ensaio de apresentação de pOVA in vitro Células de medula óssea e baço de camundongos BALB/C DO11.10 foram utilizadas para geração de BMDCs e blastos de linfócitos T CD4⁺, respectivamente. As iDCs e mDCs foram pulsadas ou não com pOVA (1µg/mL) por duas horas e colocadas em cultura com os blastos marcados com Celltrace, na proporção de 1:2, respectivamente. Após 18 horas, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7, anti-CD69.Percp.Cy5 e Anexina-V-FITC. A expressão de Anexina V (**A**) e CD69 (**B**) foram analisadas por citometria de fluxo, dentro do gate de células Celltrace⁺CD4⁺. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001. One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

Para investigar se a morte observada nos blastos ocorria de fato por AICD, realizamos novamente a cocultura e verificamos a expressão de FAS e FASL, moléculas fundamentais neste processo de apoptose (**Figura 8**). Como demonstrado anteriormente, a expressão do receptor de morte FAS apresenta-se bem elevada, sendo expressa em cerca de 90% dos blastos. Ainda, a sua expressão é constante e não foi alterada independente das condições das BMDCs utilizadas (**Figura 8A**). Em seguida avaliamos a expressão nos blastos do ligante de morte, FASL, responsável por induzir a sinalização de apoptose na célula alvo que expressa FAS, de maneira autócrina ou parácrina. Verificamos que, assim como a morte por apoptose, a expressão de FASL aumentou após a apresentação de OVA por iDCs, e a apresentação de OVA por mDCs promoveu o retorno da expressão de FASL aos níveis basais (**Figura 8B**). Este resultado sugere que FASL pode ser o responsável pela apoptose dos blastos de

linfócitos T CD4⁺ induzida pela apresentação de OVA por iDCs. Para confirmar esta hipótese, utilizamos a proteína FAS.Fc, um bloqueador da sinalização FAS-FASL. Esta proteína é uma construção composta pelo domínio extracelular do receptor FAS fusionada à porção Fc de uma imunoglobulina (65) e foi utilizada para neutralizar o FASL, impedindo sua ligação ao receptor, e consequentemente a sua sinalização. Como controle experimental, realizamos uma curva dose-resposta do FAS.Fc no hibridoma de células T CD4 DO11.10, modelo bem estabelecido no laboratório, onde sabidamente as células passam a expressar FASL e a morrer dependente desta via após o estímulo *in vitro* com anticorpos anti-CD3. Verificamos que a morte desta célula é bloqueada na presença de FAS.Fc, de forma dose-dependente, comprovando que a construção está funcionando apropriadamente (**Figura 8C**). Em seguida utilizamos o FAS.Fc no modelo de apresentação antigênica *in vitro*, durante a apresentação de pOVA por iDCs. Verificamos, na presença da droga, uma redução na morte dos blastos induzida por iDCs+OVA, aproximando-se da condição controle (**Figura 8D**). Este resultado comprova que FASL é a molécula preponderantemente envolvida no fenômeno observado, e que a apresentação antigênica realizada por mDC é diferente da iDC, sendo a primeira capaz de modular a expressão deste ligante de morte.

Figura 8. Eixo FAS-FASL está envolvido na morte de blastos de linfócitos T CD4 durante ensaio de apresentação de pOVA por iDCs in vitro. Células de medula óssea e baço de camundongos BALB/C DO11.10 foram utilizadas para geração de BMDCs e blastos de linfócitos T CD4⁺, respectivamente. As iDCs e mDCs foram pulsadas ou não com pOVA (1µg/mL) por duas horas e colocadas em cultura com os blastos marcados com Celltrace, na proporção de 1:2, respectivamente. Após 18 horas, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7, anti-FAS.PE.Cy7 e anti-FASL.PE. A expressão de FAS (**A**) e FASL (**B**) foi analisada por citometria de fluxo, dentro do gate de células Celltrace⁺CD4⁺. (**C**) O hibridoma de linfócitos T CD4 DO11.10 foi estimulado com anticorpos anti-CD3 por 18 horas, na presença ou não de FAS.Fc (1,5µg/mL ou 15µg/mL), marcado com Anexina-V-FITC e analisado por citometria de fluxo. (**D**) BMDCs e blastos de linfócitos T CD4⁺ foram gerados. As iDCs foram pulsadas ou não com pOVA por duas horas e colocadas em cultura com blastos de linfócitos T CD4⁺ marcados com Celltrace, na proporção de 1:2, respectivamente, na presença ou não de FAS.Fc (15µg/mL). Após 18 horas as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7 e Anexina-V-FITC e analisadas por citometria de fluxo. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001; One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

Por fim, foi analisada a apoptose das DCs após cocultura com linfócitos T CD4⁺, realizando, para isso, um *gate* nas células celltrace⁻CD11c⁺. Verificamos que uma alta porcentagem de iDCs sofreram apoptose quando em cocultura com os blastos de linfócitos T CD4⁺ na ausência de pOVA (±50%) e que a adição do peptídeo antigênico à cocultura aumentou a taxa de morte (±60%). Todavia, apenas metade desta taxa de apoptose (±22%) foi

observada nas mDCs co-cultivadas com os linfócitos T CD4⁺, independente da presença do antígeno (**Figura 9A e 9B**), demonstrando que a maturação destas células parece ser importante para uma sinalização a favor de sua sobrevivência. Em relação à expressão de FASL, nenhuma modulação foi observada.

Figura 9. mDCs apresentam menor taxa de apoptose que iDCs durante ensaio de apresentação de pOVA *in vitro*. Células de medula óssea e baço de camundongos BALB/C DO11.10 foram utilizadas para geração de BMDCs e blastos de linfócitos T CD4⁺, respectivamente. As iDCs e mDCs foram pulsadas ou não com pOVA por duas horas e colocadas em cultura com blastos de linfócitos T CD4⁺ marcados com Celltrace, na proporção de 1:2, respectivamente. Após 18 horas, as células totais foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7, anti-CD11c.PE.Cy7, anti-FASL.PE e Anexina-V.FITC. A apoptose (**A** e **B**) e a expressão de FASL (**A** e **C**) foram analisadas por citometria de fluxo, dentro do gate de células Celltrace⁺ CD11c⁺. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. *P < 0,05; **P < 0,001. One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.2 PGE₂ produzida durante a maturação de DCs está envolvida com a regulação de AICD em blastos de linfócitos T CD4⁺ durante a apresentação *in vitro* de ovalbumina

Uma vez que comprovamos que o FASL tem sua expressão modulada no nosso modelo, o passo seguinte foi investigar a participação da PGE₂ na inibição da transcrição de FASL. Primeiramente verificamos por PCR real-time e por western-blot, que os blastos de linfócitos T CD4⁺ apresentam EP2 e EP4 (**Figura 10A e 10B**), os receptores de PGE₂ responsáveis por aumentar AMPc. Portanto, estas células apresentam os receptores necessários para atuação da PGE₂ e cuja sinalização pode bloquear a transcrição gênica de FASL (REF). Dessa forma, a PGE₂ mostrou-se uma candidata em potencial à molécula responsável por modular a expressão de FASL. Para comprovar esta hipótese, utilizamos indometacina (INDO), um inibidor não seletivo de COX-1 e COX-2, enzimas responsáveis pela síntese das prostaglandinas (PG), incluindo a PGE₂ (155). As mDCs foram pré-tratadas com INDO por um hora e em seguida ativadas com LPS. A cocultura entre as DCs e os blastos foi realizada por 5 horas e os linfócitos T CD4⁺ purificados desta cocultura foram analisados quanto à expressão de FASL. Verificamos que de fato, a inibição da transcrição de FASL é parcialmente dependente de PGs, uma vez que mDCs geradas na presença de INDO perdem sua capacidade de bloquear a expressão deste ligante de morte (**Figura 10C**). Finalmente, constatamos que, ao ativar as DCs com LPS (mDCs), não somente aumentamos a expressão de moléculas coestimuladoras e a produção de citocinas pró-inflamatórias (**Figura 2**), como também induzimos a produção de PGE₂ no seu sobrenadante. Como esperado, o pré-tratamento das DCs com INDO bloqueia de maneira significativa a produção deste mediador lipídico, que apresenta sua concentração intensamente reduzida no sobrenadante destas células (**Figura 10D**).

Figura 10. Prostaglandina E_2 participa na modulação da expressão de FASL em blastos de linfócitos T $CD4^+$ após ensaio de apresentação de pOVA *in vitro*. Baços de camundongos BALB/C DO11.10 foram utilizados para geração de blastos de linfócitos T $CD4^+$. **(A)** Estas células foram lisadas em trizol e analisadas posteriormente por qPCR utilizando primers Taqman. O EP3 foi utilizado como calibrador e os valores da expressão EP2 e EP4 são relativos ao mesmo. **(B)** 1×10^6 blastos foram lisados e analisados por *western Blot* utilizando-se anticorpo específico para EP1, EP2, EP3, EP4 e anticorpo anti- β -actina (41 KDa) como controle da quantidade de proteína carregada no gel. **(C)** Células de medula óssea e baço de camundongos BALB/C DO11.10 foram utilizados para geração de BMDCs e blastos de linfócitos T $CD4^+$, respectivamente. As iDCs e mDCs foram geradas na presença ou não de indometacina, pulsadas ou não com pOVA por duas horas e colocadas em cultura com blastos de linfócitos T $CD4^+$. Após 5 horas, as células $CD4^+$ foram purificadas através do uso de beads magnéticas, lisadas em trizol e analisadas por qPCR utilizando primers Taqman. A amostra “ $CD4^+$ naive” foi utilizada como calibrador e os valores da expressão de FASL para os outros tratamentos são relativos à mesma. **(A e C)** Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH. **(D)** Sete milhões de células extraídas de medula óssea de camundongo transgênico BALB/C DO11.10 foram mantidas com GM-CSF (20ng/mL) durante 7 dias, com troca do meio de cultura e adição de mais GM-CSF no quarto. No dia 7 as células foram ou não estimuladas com LPS (1 μ g/mL) durante 24h, o sobrenadante das culturas foi coletado e a dosagem de PGE₂ foi realizada por ELISA. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. *** $P < 0,001$ One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de três experimentos independentes

Estes dados sugerem fortemente que a diferença entre a apresentação antigênica realizada por iDCs e por mDCs, no que diz respeito à modulação de FASL e da morte por apoptose dos linfócitos T CD4⁺, reside na diferente habilidade das DCs neste dois diferentes estados de maturação, de produzir PGE₂. Assim, concluímos até esta etapa, que a maturação das DCs com LPS é importante para a manutenção de sua sobrevivência e que estas células, juntamente com seus produtos solúveis, além de essenciais para a ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4⁺, desempenham uma função fundamental na inibição da morte dos linfócitos T ativados.

4.3 Inibição da PGE₂ interfere na magnitude da reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH - *Delayed Type Hypersensitivity*) por um mecanismo dependente do eixo FAS-FASL

A despeito dos inúmeros modelos *in vitro* existentes para o estudo da apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T, o estudo *in vivo* da ativação de células T antígeno-específicas é indispensável para o entendimento deste mecanismo em situações fisiológicas. Devido ao nosso interesse em estudar a modulação de FASL e a sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ durante o desenvolvimento de uma resposta imune, nós escolhemos dois modelos murinos de estudo. Ambos os modelos compartilham a característica de serem respostas imunes mediadas por linfócitos T CD4 como células efetoras.

O primeiro deles corresponde ao modelo de Hipersensibilidade Tardia (DTH - *Delayed Type Hypersensitivity*). A reação de DTH corresponde a uma abordagem bastante útil para avaliar as respostas imunes mediadas por células CD4⁺ do tipo Th1. Esta resposta é frequentemente dividida em duas fases: A fase aferente ou de sensibilização, que se refere à imunização por via subcutânea dos camundongos com um antígeno específico emulsificado em um adjuvante. A fase eferente ou “desafio” ocorre normalmente entre 5 e 14 dias após a imunização, na qual os animais previamente sensibilizados são desafiados por injeção subcutânea no coxim plantar ou injeção intradérmica na orelha (156).

No nosso modelo, a reação de DTH foi induzida em animais C57BL/6, com uma etapa de sensibilização com ovalbumina emulsificada em CFA no dia zero, e uma segunda etapa de desafio com ovalbumina agregada, realizado no quarto dia do protocolo. Desta maneira, tem-se uma resposta primária com a ativação e expansão de clones específicos para a ovalbumina e uma resposta secundária para avaliar a ação efetora destes linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos.

Inicialmente, para analisar a eficiência do modelo, avaliamos a resposta dos animais à ovalbumina. Com este objetivo, geramos dois grupos experimentais dos quais, um deles foi imunizado com OVA+CFA e o segundo recebeu uma emulsão contendo unicamente CFA. Após o desafio com a ovalbumina agregada foram realizadas medições da resposta inflamatória às 24, 48 e 72 h. O grau de resposta inflamatória no DTH apresentou um pico após 48 h do desafio e uma etapa de resolução da resposta após 72 h. Na **Figura 11A** pode ser observada a representação gráfica na forma de sino em três tempos (24, 48 e 72 h) do grupo imunizado com OVA (CFA+OVA). Na mesma figura, como controle, podemos observar a ausência de inflamação no grupo imunizado com Salina+CFA.

Figura 11. Reação de DTH é dependente de linfócitos TCD4. (A) Animais C57BL/6 WT foram imunizados com a proteína OVA grau V (100 μ g) em CFA e o desafio foi realizado com OVA grau II (2%) no quarto dia após a imunização. (B) Animais C57BL/6 CD4 KO receberam i.v. células de baço total de camundongos C57BL/6 OTII. Após dois dias, foram imunizados com a proteína OVA grau V (100 μ g) em CFA e o desafio foi realizado com OVA grau II (2%) no quarto dia após a imunização. A espessura das patas foi avaliada após 24, 48 e 72 horas do desafio. O valor em mm correspondente à diferença entre a pata desafiada com o antígeno e a desafiada com salina do mesmo animal foi utilizado para análise. As barras representam a média (n=6) para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001 One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

A reação de DTH é classicamente caracterizada como mediada por linfócitos T CD4⁺ (157). Para comprovar a importância destas células no nosso modelo induzimos DTH em animais C57BL/6 CD4 KO. Verificamos que nestes animais houve uma redução na inflamação, especialmente no tempo de 48 h. No entanto, ao receber células transferidas de camundongos C57BL/6 OTII específicas para o antígeno, ou seja, ao repopular a população de linfócitos T CD4, pudemos observar nos animais C57BL/6 CD4 KO uma clássica resposta de DTH, com pico 48h após o desafio, e resolução após 72h (**Figura 11B**).

Desta forma, com o modelo de DTH bem caracterizado, a etapa seguinte foi avaliar a importância da PGE₂ durante esta reação. Para isto, inibimos a sua produção através do tratamento dos animais com indometacina (INDO). Em um dos grupos a INDO foi adicionada à emulsão e em outro grupo a INDO foi injetada no peritônio dos animais imediatamente após a sensibilização no dia 0. Observamos que a INDO, em ambas as vias de administração utilizadas, porém com cinética de atuação diferente, foi capaz de reduzir significativamente o DTH dos animais, até sete dias depois de sua inoculação (**Figura 12**).

Figura 12. Prostaglandina E₂ participa da indução de DTH. Animais C57BL/6 machos de cada grupo (n=6) foram imunizados com a proteína OVA grau V (100 µg) em CFA e o desafio foi realizado com OVA grau II (2%) no quarto dia após a imunização. A Indometacina (10mg/kg do animal) foi adicionada à emulsão ou injetada intraperitoneal após a sensibilização. A espessura das patas foi avaliada após 24, 48 e 72 horas do desafio. O valor em mm correspondente à diferença entre a pata desafiada com o antígeno e a desafiada com salina do mesmo animal foi utilizado para análise. As barras representam a média (n=6) para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,001 One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

A inibição do DTH pelo tratamento com INDO veio ao encontro de nossa hipótese e demonstra o envolvimento de PGs durante este processo inflamatório. Assim, sugerimos que a falta especificamente de PGE_2 no microambiente, permitiria o aumento na expressão de FASL e como consequência, a morte de linfócitos T antígenos-específicos. Isto explicaria a redução no DTH dos animais imunizados na presença de INDO.

Para investigar se FASL teve participação no resultado observado, nós realizamos a indução de DTH em animais C56BL/6 $FAS^{lpr/lpr}$. Estes animais apresentam uma mutação espontânea no gene *fas*, causada pela inserção de um elemento transponível precoce (ETn) no intron 2 deste gene. Esta inclusão provoca uma diminuição marcante na expressão do mRNA de *fas*, o que leva à uma redução drástica na sua expressão proteica, comprometendo a sinalização da via FAS-FASL. Nós observamos que, ao contrário dos animais C57BL6 WT (**Figura 13A**), os camundongos C56BL/6 $FAS^{lpr/lpr}$ não responderam ao tratamento com indometacina, desenvolvendo uma reação de DTH semelhante aos animais imunizados com OVA+CFA (**Figura 13B**). Dessa forma, parece que de fato, a redução de DTH observada nos animais C57BL6 WT tratados com indometacina ocorre de forma dependente da via de sinalização FAS-FASL. Pudemos observar ainda, que a inflamação/DTH nos animais LPR é menos intensa quando comparada aos WT.

Figura 13. *FAS* está envolvido na regulação de DTH por PGE_2 . Animais C57BL/6 WT (A) ou C57BL/6 $FAS^{lpr/lpr}$ (B) foram imunizados com a proteína OVA grau V (100 μ g) em CFA e o desafio foi realizado com OVA grau II (2%) no quarto dia após a imunização. A Indometacina (10mg/kg do animal) foi injetada intraperitoneal após a sensibilização. A espessura das patas foi avaliada após 24, 48 e 72 horas do desafio. O valor em mm correspondente à diferença entre a pata desafiada com o antígeno e a desafiada com salina do mesmo animal foi utilizado para análise. As barras representam a média ($n=6$) para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. $**P < 0,001$ One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

4.4 Inibição de PGE_2 impede acúmulo de linfócitos específicos em modelo de transferência adotiva de células *in vivo* por um mecanismo que envolve o eixo FAS-FASL

Para investigar de maneira mais profunda os resultados observados no modelo de DTH, e esclarecer a participação da PGE_2 e de FASL na modulação da sobrevivência dos linfócitos T CD4 durante a apresentação de antígenos, optamos por um modelo mais complexo, que nos permite rastrear as células envolvidas. O método de transferência adotiva de células é ideal para o cumprimento deste objetivo, pois gera uma população de células T específicas no interior de um animal recipiente, suficientemente grande para ser detectada, mas pequena o bastante para se comportar de maneira fisiológica quando estimulada pelo antígeno.

Sendo assim, para estudar a resposta dos linfócitos T CD4⁺ estimulados *in vivo*, nós utilizamos um sistema de transferência adotiva de células utilizando camundongos BALB/C DO11.10 que possuem TCR transgênico para ovalbumina. As células de baço destes animais foram isoladas, marcadas com CellTrace e transferidas, através do plexo ocular, para camundongos isogênicos selvagens BALB/C. Após 48 horas, os animais recipientes foram imunizados pela mesma via com o peptídeo da ovalbumina (pOVA) na presença ou não de LPS, agonista de TLR4 que sabidamente induz a produção de PGE₂. Para investigar o papel da PGE₂ neste contexto, alguns animais foram previamente tratados via intraperitoneal (i.p.) com indometacina (INDO). Após 72 horas de estímulo antigênico, os baços e linfonodos inguinais e axilares destes camundongos foram analisados.

Figura 14. Imunização com OVA + LPS induz esplenomegalia. A transferência de células entre camundongos BALB/C DO11.10 e selvagens foi realizada como descrito em “Materiais e Métodos”. Para análise, baços foram removidos dos animais recipientes. **(A)** Peso em gramas do baço de cada animal, sendo 3 animais por grupo experimental. **(B)** Fotografia representativa do baço de um animal de cada grupo. O gráfico apresenta a média das triplicatas realizadas para cada tratamento com os respectivos desvios padrão. *** $P < 0,0001$, One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de seis experimentos independentes.

A primeira observação realizada foi quanto ao aspecto dos baços dos animais recipientes. Verificamos que os grupos de animais estimulados somente com PBS, com OVA ou com OVA+INDO apresentaram peso (cerca de 0,13g) e tamanho semelhantes. Por outro lado, quando o antígeno foi injetado na presença de LPS constatamos um aumento médio de 70% no peso dos baços, alcançando até 0,25g, não havendo diferença estatística entre o grupo pré-tratado com INDO e o grupo que recebeu apenas OVA+LPS. Ainda verificamos que a imunização somente com LPS foi suficiente para aumentar o peso dos baços dos animais deste grupo (**Figura 14A e 14B**). Assim, presumimos que a imunização na presença de um adjuvante, como o LPS, é capaz de promover o aumento do órgão devido ao acúmulo de células T específicas. De forma contrária, imaginamos que o aumento no baço de animais que receberam somente LPS se deve ao seu efeito mitógeno em linfócitos B, induzindo um estímulo policlonal e proliferação destas células.

A etapa seguinte foi investigar a premissa básica do projeto e analisar se o LPS e a PGE₂ modulariam de alguma forma a ativação, proliferação e principalmente a sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺. Para análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo, novamente selecionamos os *singlets* e descartamos os “debris” celulares. Para identificar as células transferidas utilizamos o anticorpo monoclonal KJI-26 que detecta especificamente o TCR transgênico das células específicas para ovalbumina (158).

Baços de camundongos que só receberam o veículo (PBS) apresentaram ~0,15% de células T CD4⁺KJI-26⁺. O tratamento com LPS mostrou uma frequência muito semelhante ao controle, sugerindo novamente que na ausência do antígeno o LPS não tem ação na proliferação dos linfócitos T, e que o aumento no baço dos animais desse grupo, comentando anteriormente, se deve possivelmente à sua ação em outras células. A injeção de pOVA resultou em um aumento dessa população (~0,50%), e o pré-tratamento dos animais com INDO não alterou estatisticamente este resultado. Porém, a administração do antígeno na presença de LPS levou a um acúmulo das células DO11.10 em maior quantidade do que observado após a injeção de pOVA sozinha (~1,40%). Este evento foi parcialmente inibido pelo tratamento prévio do animal com INDO (~0,78%) (**Figura 15A**). Células T CD4⁺KJI-26⁺ também foram encontradas no *pool* de linfonodos axilares e inguinais dos animais recipientes. Um perfil de resultado muito semelhante ao encontrado no baço foi verificado nestes órgãos linfoides, porém, com maior frequência das células específicas para OVA (**Figura 15B**).

Figura 15. Tratamento com INDO impede o acúmulo de células KJI-26⁺ em baços e linfonodos de camundongos imunizados com OVA + LPS. A transferência de células entre camundongos BALB/C DO11.10 e selvagens foi realizada como descrito em “Materiais e Métodos”. Para análise, baços e linfonodos inguinais e axilares foram removidos. Após lise das hemáceas, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7 e anti-KJI-26.PE e analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células CD4⁺ KJI-26⁺ nos baços dos animais dos diferentes grupos. (B) Frequência de células CD4⁺ KJI-26⁺ no “pool” de linfonodos dos animais de cada grupo. (C) Gráfico em barras dos resultados obtidos. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P < 0,0001, One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de oito experimentos independentes.

A indometacina inibe de maneira não-seletiva, a expressão de COX-1 (expressão constitutiva) e COX-2 (expressão induzida), responsáveis pela síntese de PGE₂ em condições fisiológicas (112) e inflamatórias (159), respectivamente. A ausência de PGE₂ induzida pelo pré-tratamento com indometacina poderia interferir basicamente de duas formas para diminuir a frequência das células CD4⁺KJI-26⁺ no baço e linfonodos dos camundongos imunizados: Aumentando a morte das células específicas ou diminuindo a sua proliferação.

Uma vez que células totais de baço foram marcadas com celltrace e transferidas para os camundongos recipientes, nós investigamos se houve proliferação das células injetadas diante dos diversos tratamentos realizados. Primeiramente verificamos que apenas os linfócitos T CD4⁺ específicos para OVA (KJI-26⁺) proliferaram, uma vez que observamos o deslocamento da população celular para a esquerda do gráfico (**Figura 16A e 16B**). Outros tipos celulares, que foram marcados e injetados com os linfócitos T CD4⁺ específicos, como linfócitos B, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺ não específicos para OVA, que correspondem às células celltrace⁺KJI-26⁻, não proliferaram em resposta ao estímulo com pOVA uma vez que mantiveram a sua fluorescência inicial. Este resultado comprova que o estímulo utilizado induziu a proliferação apenas de clones de linfócitos T CD4⁺ que possuem o TCR transgênico.

Figura 16. Somente linfócitos $T CD4^+ KJI-26^+$ proliferam em resposta à pOVA. A transferência de células entre camundongos BALB/C DO11.10 e selvagens foi realizada como descrito em “Materiais e Métodos”. Para análise, baços e linfonodos inguinais e axilares foram removidos. Após lise das hemáceas, as células foram marcadas com anticorpos $CD4-APC.Cy7$ e $KJI-26-PE$ e analisadas por citometria de fluxo. Resultado representativo de oito experimentos independentes.

Uma vez demonstrada a proliferação antígeno-específica dos linfócitos T CD4⁺ que reconhecem ovalbumina, realizamos um estudo quantitativo da proliferação que foi observada, a fim de investigar a possível interferência da indometacina na divisão das células. Após a aquisição das amostras, foi feita uma análise dentro do *gate* de células CD4⁺KJI-26⁺ e, através da plataforma de proliferação que o software FlowJo dispõe, calculamos o índice de proliferação e o índice de replicação celular. Verificamos que o tratamento com OVA induz proliferação das células específicas, porém, o pré-tratamento com indometacina não interfere neste resultado. A imunização com OVA+LPS induz uma proliferação mais vigorosa do que o tratamento somente com OVA, resultado que, novamente, não é inibido pela administração prévia de indometacina. Nas imunizações com PBS ou LPS, não foi observada divisão celular. Estes resultados podem ser observados por meio do índice de proliferação (número médio de divisões que as células que dividiram sofreram) e índice de replicação celular na **Figura 17A e 17B**, e confirmados por meio da diferença da média de intensidade de fluorescência (MFI) do Celltrace para cada tratamento (**Figura 17C e 17D**), comprovando com bastante nitidez que a indometacina não interfere na proliferação celular.

Figura 17. Células KJI-26⁺ em baço e linfonodos apresentam altos índices de proliferação em resposta à OVA + LPS, os quais não são alterados pelo tratamento com INDO. A transferência de células entre camundongos BALB/C DO11.10 e selvagens foi realizada como descrito em “Materiais e Métodos”. Para análise, baços e linfonodos inguinais e axilares foram removidos. Após lise das hemáceas, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC.Cy7 e anti-KJI-26.PE e analisadas por citometria de fluxo. (A) Índice de Proliferação das células CD4⁺KJI-26⁺ do baço e linfonodos. (B) Índice de Replicação das células CD4⁺KJI-26⁺ do baço e linfonodos (C) Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CellTrace nas células CD4⁺KJI-26⁺ do baço. (D) Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CellTrace nas células CD4⁺KJI-26⁺ dos linfonodos. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. ***P<0,0001 (A e B) One-way Anova seguido de pós-teste Tukey, (C e D) Two-way Anova seguido de pós-teste Bonferroni, ND=não detectável. Resultado representativo de cinco experimentos independentes.

No entanto, nós demonstramos que a administração de indometacina diminuiu significativamente a frequência das células $CD4^+KJI-26^+$ específicas para ovalbumina (**Figura 15**). Estes resultados quando analisados em conjunto evidenciam que a indometacina pode estar interferindo na sobrevivência dos linfócitos T $CD4^+$ e não em sua proliferação, efeito que vem ao encontro da hipótese do presente trabalho.

Sendo assim, para comprovar a nossa hipótese, analisamos a frequência de células em apoptose após os diversos tratamentos. Tal estudo foi realizado na população de células $CD4^+KJI-26^+$ que se trata apenas de linfócitos respondedores para OVA. Os resultados obtidos corroboram a nossa hipótese, demonstrando que os animais tratados com OVA+LPS apresentam menos apoptose e menor expressão de FASL nas células específicas em relação aos animais que receberam somente OVA. Em adição, o pré-tratamento com indometacina dos animais imunizados com OVA+LPS aumentou significativamente a frequência de células em apoptose, bem como a expressão de FASL, quando comparados com o grupo tratado com OVA+LPS, comprovando a interferência da indometacina na morte celular por apoptose (**Figura 18A e 18B**).

Figura 18. LPS inibe a expressão de FASL e a morte de células KJI-26⁺ estimuladas com pOVA in vivo e tal efeito é parcialmente revertido pelo pré-tratamento com INDO. A transferência de células entre camundongos BALB/C DO11.10 e selvagens foi realizada como descrito em “Materiais e Métodos”. Para análise, baços e linfonodos inguinais e axilares foram removidos. Após lise das hemáceas, as células foram marcadas com anti-CD4.APC.Cy7, anti-KJI-26PE e anexina-V e analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células marcadas com anexina-V (B) Frequência de células que expressam FASL. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. * P < 0,01 foi considerado significativo, One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de cinco experimentos independentes.

Finalmente, para comprovar se FASL é, de fato, o responsável majoritário pela indução da morte nos linfócito T CD4⁺ antígeno-específicos, nós realizamos uma nova abordagem. Camundongos transgênicos C57BL/6 OTII que também possuem TCR específico para ovalbumina foram cruzados com animais C57BL/6 FAS^{lpr/lpr}. Como resultado obtivemos uma linhagem que carrega a mutação *lpr* em todas as suas células e que apresenta mais de 95% dos seus linfócitos T CD4⁺ específicos para ovalbumina (**Figura 3**). Estes animais C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr}, bem como os camundongos C57BL/6 OTII foram usados como doadores de células que foram transferidas para camundongos C57BL/6 isogênicos.

Figura 19. O tratamento com INDO inibe o acúmulo de células específicas em resposta ao estímulo com pOVA in vivo por um mecanismo que envolve FAS. A transferência de células entre camundongos BALB/C DO11.10 e selvagens foi realizada como descrito em “Materiais e Métodos”. Para análise, baços e linfonodos inguinais e axilares foram removidos. Após lise das hemáceas, as células foram marcadas com anti-CD4.APC.Cy7, anti-KJI-26PE e anexina-V e analisadas por citometria de fluxo. (A) Frequência de células marcadas com anexina-V (B) Frequência de células que expressam FASL. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. * $P < 0,01$ foi considerado significativo, One-way Anova seguido de pós-teste Tukey. Resultado representativo de cinco experimentos independentes.

Assim como esperado, os animais que receberam células OTII WT, após imunização com OVALPS apresentaram maior frequência de células $CD4^+TCR^+$, quando comparado com animais imunizados com PBS ou OVA sozinha. O tratamento com INDO reduziu o acúmulo destas células antígeno específicas no baço destes animais, corroborando os resultados obtidos em camundongos BALB/C. De maneira contrária, animais C57BL/6 que receberam células OTII/FAS^{lpr/lpr} não exibiram diminuição na frequência de células $CD4^+TCR^+$ quando tratados com OVALPS+INDO (**Figura 19A**). Além disso, notamos que o acúmulo de células específicas para OVA após a injeção de OVA LPS ocorreu de forma mais discreta nos camundongos que receberam células OTII/FAS^{lpr/lpr}, resultado que reproduz o dado obtido no modelo de DTH (**Figura 13B**), sugerindo a necessidade da interação entre FAS e FASL para a proliferação celular. Por fim, podemos novamente observar na **Figura 19B** que o tratamento com INDO de fato não interfere com a proliferação das células antígeno-específicas.

Analisados em conjunto, os resultados obtidos *in vitro* e os resultados *in vivo* demonstram uma relação íntima entre as células da imunidade inata e adaptativa no que diz respeito à manutenção da sobrevivência destas populações celulares. Baseados nesses dados, propomos um mecanismo no qual, na ausência de um agonista de TLR (PAMP), a sinalização mediada por uma iDC induz a transcrição gênica de FASL nos linfócitos T $CD4^+$ reestimulados, culminando na sua morte por AICD (**Figura 20A**). Por outro lado, na presença do PAMP, mDCs produzem PGE₂ que agem no linfócito T $CD4^+$ bloqueando a transcrição de FASL e impedindo a apoptose destas células (**Figura 20B**).

Figura 20. Mecanismo proposto da participação de PGE_2 e FASL na modulação da sobrevivência dos linfócitos $T CD4^+$.

5 DISCUSSÃO

Este projeto surgiu para complementar resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais foram demonstrados que APCs (células aderentes do exudato peritoneal – PEC; células dendríticas derivadas da medula óssea – BMDC; e a linhagem monocítica J774) estimuladas com LPS via TLR4/MyD88, liberavam prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual, por sua vez, inibia o processo de AICD de linfócitos T CD4 através da supressão da expressão de FASL. Tal fenômeno foi observado tanto em hibridomas de linfócitos T quanto em linfócitos T primários extraídos de baço ou linfonodo de camundongos, evidenciando um efeito indireto da estimulação de TLRs (expresso pelas APCs) na regulação da sobrevivência de linfócitos T (15). É importante destacar que estes resultados foram obtidos utilizando um protocolo bem estabelecido de AICD *in vitro*, mimetizado pela estimulação do complexo TCR/CD3 através de anticorpos anti-CD3, na presença de sobrenadantes de APCs estimuladas ou não com LPS. Portanto, embora este modelo experimental seja excelente para estudar as vias de sinalização diretamente nos linfócitos T, ele não reflete perfeitamente o que ocorre durante a apresentação antigênica.

Neste sentido, o presente projeto foi desenhado para suprir esta deficiência. Ao invés de trabalhar com APCs e linfócitos T isoladamente, como foi realizado no trabalho anterior, nós realizamos ensaios de apresentação antigênica *in vitro* e *in vivo*. Partimos da hipótese de que a apresentação antigênica em um contexto de infecção (em contraste à apresentação de antígenos próprios que ocorre constantemente na ausência de infecção/inflamação/perigo) impede a expressão de FASL pela estimulação do complexo TCR/CD3 e, consequentemente, resulta na sobrevivência das células envolvidas nesta interação. Uma vez que nossos resultados anteriores demonstraram que este efeito é, pelo menos parcialmente, mediado pela PGE₂ produzida pelas APCs em resposta a ligantes de TLRs (15), nossos novos experimentos também foram delineados para verificar esta possibilidade. É importante destacar que a relevância da nossa pergunta deve-se ao fato de que, embora conheçamos bem os mecanismos de ativação dos linfócitos T pelas APCs, ainda não temos um conhecimento profundo sobre o impacto desta interação sobre as vias de sobrevivência destas duas células. Nossa proposta é que a PGE₂, produzida durante a estimulação através dos TLRs e, portanto, pelas DCs maduras, mas não pelas imaturas, é um importante regulador da expressão de FASL nos linfócitos T ativados pelas APCs, com consequências importantes para a geração da resposta imune adaptativa.

Sendo assim, o projeto foi iniciado com o estabelecimento de modelos de apresentação antigênica, nos quais seria testado o efeito do agonista de TLR4, LPS, na modulação da morte. Foram desenvolvidos e padronizados modelos de apresentação antigênica *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se o peptídeo da ovalbumina ou a proteína inteira. Primeiramente foi utilizada a linhagem de camundongos transgênicos BALB/C DO11.10. Em sua linhagem germinativa, estes animais apresentam rearranjados os genes das cadeias V α e V β do TCR, que codificam um receptor específico para o peptídeo da ovalbumina (pOVA - sequência de aminoácidos 323-339) ligados à moléculas de MHC classe II I-A^d (160). Este TCR pode ser detectado através do anticorpo monoclonal KJI-26 que se liga somente a este particular heterodímero (158). Uma vez que o transgene inibe o rearranjo endógeno dos genes do TCR e como o TCR transgênico é restrito ao MCH classe II, a maior fração de células T nestes camundongos é selecionada positivamente no timo para tornar-se linfócitos T CD4⁺KJI-26⁺ (161). Os animais BALB/C DO11.10 foram utilizados como doadores de células tanto para os experimentos *in vitro*, nos quais foram gerados blastos de linfócitos T CD4⁺ e células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs), como nos experimentos *in vivo*, nos quais foi utilizado um sistema de transferência adotiva de células. Em adição utilizamos animais C57BL/6 OTII, outra linhagem de camundongos transgênicos, que apresenta TCR específico para a mesma sequência do peptídeo da ovalbumina apresentado em contexto I-A^b. Células de baço e linfonodos destes animais foram utilizadas em experimentos de transferência adotiva. Em adição, estes camundongos foram cruzados com animais C57BL/6 FAS^{lpr/lpr}, mutantes para a proteína FAS, para geração da linhagem C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr}, utilizada nos experimentos com o objetivo de se compreender a necessidade da sinalização entre FAS e FASL durante a apresentação antigênica.

A importância do processo de maturação de DCs para a ativação e diferenciação de linfócitos T virgens é um fenômeno bastante conhecido (18). De fato, em nosso modelo verificamos que a maior expressão de CD69 foi observada quando pOVA é apresentada por mDCs, quando comparado com iDCs. Ao contrário das iDCs que possuem alta capacidade de fagocitose, mas baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, as mDCs apresentam potente habilidade de apresentação antigênica na presença de proteínas co-estimuladoras, como CD80/CD86 que ligam-se ao CD28 expresso constitutivamente na superfície dos linfócitos T. A estimulação via CD28 em adição à ligação do TCR pode promover um potente sinal coestimulatório, importante para completa ativação dos linfócitos T CD4 e produção de citocinas como IL-2. Por outro lado, a associação do TCR ao complexo MHC/antígeno na ausência da interação CD28/CD80 pode resultar em um estado de anergia das células T (22).

Assim, nossos resultados corroboram os dados da literatura, mostrando que a ativação dos linfócitos T CD4 só ocorre na presença do antígeno e é fortemente potencializada quando o antígeno é apresentado por células dendríticas maduras (mDCs).

Linfócitos T naive são altamente refratários à morte de AICD, devido, ao menos em parte, à alta expressão da proteína anti-apoptótica cFLIP. Porém, em células T expandidas, os níveis de cFLIP diminuem e estas células tornam-se sensíveis a este processo de apoptose (87). A modulação negativa de cFLIP parece depender da proliferação do linfócito T, de maneira dependente de IL-2, muito provavelmente devido a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular (68, 95, 162). Em adição, o processo de AICD e a expressão de FASL em células primárias podem ser controlados pelo complexo Ciclina B1/Cdk1 (*Cyclin-dependent kinase 1*), que além de controlar a progressão da fase G2 para a fase M (mitótica), promove a transcrição de FASL através da modulação da ativação de NF- κ B (163, 164). Dessa forma, para estabelecermos nosso modelo, foi fundamental induzir a proliferação dos linfócitos T naive e encontrar o momento de maior suscetibilidade à AICD. Após uma cinética de geração de blastos de linfócitos T CD4⁺, nós constatamos que oito dias de cultura foram necessários e suficientes para a obtenção de uma população celular enriquecida e passível de morrer por AICD. Interessante, os blastos de linfócitos T CD4 mantidos com iDCs ou mDCs, na ausência de um sinal antigênico sofreram baixa taxa de apoptose. Em contrapartida, as células T CD4⁺ ativadas por iDCs apresentando pOVA foram intensamente estimuladas à morte. Este fenômeno não foi observado quando pOVA foi apresentada aos linfócitos por mDCs, mostrando que, além de sua influência na ativação dos linfócitos T, o processo de maturação de DCs também está diretamente relacionado à sobrevivência dessas células.

A morte observada nos blastos parece acontecer por AICD. Corroborando dados da literatura, a alta expressão constitutiva do receptor FAS em linfócitos T CD4⁺ não sofreu alteração diante das diferentes condições (81). Por outro lado, observamos que o FASL é expresso durante a apresentação de pOVA por iDCs, e tem sua expressão diminuída quando mDCs realizam a apresentação antigênica. Ainda, mostramos que a morte dos linfócitos T CD4⁺ induzida pela iDCs que apresentam pOVA é inibida após o bloqueio da sinalização entre FAS e FASL. Estes resultados somados demonstram que a apresentação do antígeno realizada por uma APC madura é fundamental para o envio de sinais de sobrevivência para estas células, ou bloqueio de sinais de morte como, por exemplo, através da modulação negativa da expressão de FASL.

Interessante, constatamos que a viabilidade das mDCs em co-cultura com blastos de linfócitos T CD4 também é maior do que a das iDCs. De fato, tem sido amplamente

constatado que a maturação das DCs promove a sua sobrevivência, no entanto, pouco é entendido sobre os mecanismos envolvidos (165). Chen e colaboradores mostraram que a estimulação das DCs via TLRs ou CD40 inibe a apoptose destas células através do aumento na expressão de BCL-xL e em menor grau, BCL-2, ambas proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 (166). Portanto, estes resultados, juntamente com os dados da literatura, sugerem que os sinais recebidos pelas DCs durante o seu amadurecimento parecem ser fundamentais para sua posterior sobrevivência.

No entanto, observamos que as iDCs sofrem mais apoptose na presença do antígeno. A morte das DCs pode ocorrer por distintos mecanismos, como apoptose, necrose (167) e autofagia (168). Estas células expressam receptores de morte e são suscetíveis a apoptose induzida por FASL, TNF e TRAIL (166, 169, 170), além de serem sensíveis à morte através da ativação da via intrínseca de apoptose, induzida em situações de stress celular e ausência de fatores de crescimento (171). Em nosso modelo, não observamos variação na expressão de FASL pelas DCs diante das diferentes situações, no entanto, uma vez que este ligante de morte pode agir de forma autócrina ou parácrina, o FASL expresso pelos linfócitos T CD4⁺ poderia ser responsável pela maior frequência de iDCs em apoptose. Dessa forma, estudos complementares, analisando a expressão de outras moléculas envolvidas na morte celular são necessários para poder explicar o mecanismo pelo qual a sobrevivência das DCs é regulada em nossos experimentos.

A família dos receptores de PGE₂ compreende quatro receptores acoplados à diferentes proteínas G, chamados EP1, EP2, EP3 e EP4. Os receptores EP2 e EP4 são acoplados à proteína G_s, responsáveis pelo aumento nos níveis de cAMP através da atividade da adenilato ciclase. cAMP atua ativando duas grandes vias de sinalização, a clássica via de PKA (*Protein Kinase A*) e a alternativa, posteriormente descrita, via de EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*). Ambas as vias parecem contribuir, de forma sinérgica, para a inibição da transcrição de *fasl* (15). Assim, a expressão transcricional e proteica destes receptores foram avaliadas e nós constatamos que, com exceção de EP1, todos os receptores de PGE₂ são expressos nos blastos de linfócitos T CD4⁺, resultado esperado, uma vez que o hibridoma de células T CD4 DO.1110, derivado da mesma linhagem murina usada nesses experimentos, apresenta a mesma expressão de EPs (15). Para investigar a atuação da PGE₂ nos blastos, nós bloqueamos sua produção ao tratar as DCs com INDO antes de ativá-las com LPS. Como esperado, o tratamento inibiu substancialmente a quantidade de PGE₂ no sobrenadante das mDCs e constatamos então, que na sua ausência, as mDCs são incapazes de inibir a expressão

de *fasl*. Assim, nossos resultados mostraram que: 1) mDCs, mas não iDCs, produzem PGE₂; 2) Os blastos de linfócitos T CD4⁺ apresentam os receptores de PGE₂ necessários para a sua ação anti-apoptótica; 3) A apresentação de pOVA por mDCs promove uma sinalização nos linfócitos T CD4⁺ que inibe a sua morte e a expressão de FASL. 4) Na presença de INDO, o bloqueio na produção de PGE₂ é acompanhado do aumento na expressão de FASL. Sugerimos que, no nosso modelo de estudo *in vitro*, a PGE₂ é a molécula central responsável pela promoção da sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ recorrentemente estimulados.

A reação de DTH é um método bastante útil para avaliar *in vivo* a resposta imune celular associada à um perfil Th1 de linfócitos T CD4⁺. Neste processo, as células T CD4⁺ reconhecem o antígeno geralmente apresentado por APCs produtoras de IL-12, que estimulam a proliferação dos linfócitos antígeno-específicos. Os linfócitos, por sua vez, produzem grandes quantidades de IL-2 e IFN- γ , mediando assim a resposta imune. Localmente, o DTH manifesta-se por infiltração celular no local de administração do antígeno e a resposta é determinada no local do desafio por medição do incremento do tamanho da pata após 24 à 72 horas (172). Neste trabalho, nós caracterizamos o modelo de DTH, inicialmente avaliando a resposta de camundongos C57BL/6 ao antígeno utilizado (ovalbumina) e comprovando que os linfócitos T CD4⁺ são indispensáveis para que a reação ocorra. A inibição da produção de PGE₂ pelo tratamento com INDO no dia da sensibilização induziu uma redução bastante significativa no DTH, independente da via pela qual foi realizado o tratamento (intraperitoneal ou subcutânea adicionada à emulsão).

Por causa da sua ação inibidora das enzimas COX-1 e COX-2, a indometacina possui uma potente atividade anti-inflamatória e é usualmente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias, sendo eficaz no alívio da dor, na redução da febre e do edema. Essa droga possui uma meia-vida de cerca de 5 à 10 horas e quando administrada por via oral ou em forma de supositório, sua absorção completa ocorre em até 4 horas (173). Assim, apesar de não estar claro na literatura, é provável que a sua absorção também ocorra de forma bastante rápida na cavidade peritoneal. A análise destas informações é fundamental para sugerir que o fenômeno observado no nosso modelo não ocorre devido à ação anti-inflamatória da INDO. É importante ressaltar que a medição da reação de DTH foi realizada de 5 à 7 dias após a sua administração, ou seja, em um momento onde este inibidor de COX já havia sido completamente eliminado. Portanto, a função desempenhada pela INDO ocorre no momento da sensibilização dos animais, e seu efeito repercute até sete dias depois. De fato, nós verificamos que camundongos C56BL/6 FAS^{lpr/lpr}, que possuem a sinalização FAS-FASL comprometida, não apresentam redução do DTH em resposta ao tratamento com

indometacina, demonstrando claramente a participação desta via de apoptose na diminuição da resposta e apontando novamente para um papel da INDO que independe de sua ação anti-inflamatória.

Assim, com a observação dos dados, sugerimos que a imunização com OVA na presença de CFA induz a produção de PGE₂ no microambiente do linfonodo, onde a resposta imune está sendo desenvolvida. De fato, o CFA contém uma mistura de componentes micobacterianos, alguns dos quais são reconhecidos por diferentes TLRs, incluindo TLR2 e TLR4 (59). A ativação destes receptores possibilita a ativação de NF-κB, transcrição dos genes de *cox-1* e *cox-2* e produção de PGE₂ (111). Nossos resultados apontam para uma ação inibidora deste mediador, sobre a expressão de FASL nos linfócitos T CD4⁺ específicos para OVA, permitindo sua sobrevivência e o seu acúmulo. Dessa forma, após o desafio no coxim plantar, estas células migrariam para a pata dos animais, estabelecendo a reação de DTH. Por outro lado, no momento da imunização com OVA+CFA, a presença concomitante de INDO inibe a ativação de COX e produção de PGE₂ no microambiente. Na ausência deste mediador, FASL não seria bloqueado, e a sua expressão induziria a morte dos linfócitos T CD4⁺, diminuindo a frequência destas células e reduzindo o DTH. Corroborando esta hipótese, camundongos C56BL/6 FAS^{lpr/lpr} imunizados com OVA+CFA não foram capazes de responder ao tratamento com INDO devido à sua característica intrínseca de não expressar FAS. Nestes animais, apesar de ocorrer a expressão de FASL, o comprometimento da via de sinalização impede a morte dos linfócitos T CD4⁺ e, portanto, o DTH foi visualizado de forma semelhante aos animais não tratados com indometacina.

Com a obtenção desses resultados, tornou-se necessário utilizar uma metodologia que nos permitisse investigar mais profundamente os fenômenos observados. Assim, para aperfeiçoarmos o entendimento da modulação da morte por apoptose durante a apresentação antigênica, realizamos experimentos *in vivo* utilizando o método de transferência adotiva de células. Esse modelo nos permitiu, através da marcação das células transferidas com um corante vital, rastrear e estudar de forma bastante precisa, a proliferação e apoptose dos linfócitos T CD4⁺ específicos para o antígeno, enriquecendo o conhecimento nessa área em situações fisiológicas. Animais isogênicos selvagens BALB/C, após inoculação das células transgênicas DO11.10, foram imunizados com OVA, na presença ou não de LPS. Para investigar a participação da PGE₂ durante a apresentação antigênica, um grupo de animais foi pré-tratado com INDO a fim de inibir a produção desse mediador lipídico. A injeção intravenosa de pOVA resultou em um acúmulo das células KJI-26⁺ transferidas, em relação ao controle PBS. No entanto, quando injetado juntamente com LPS, o estímulo antigênico

provocou um aumento marcante no acúmulo de células T KJI-26⁺ no baço e linfonodos dos animais recipientes. Embora a injeção de pOVA provoque a proliferação das células DO11.10 transferidas, esta ativação é transiente e não gera uma população persistente de células T de memória, nem provoca “priming” imunológico nos animais recipientes. Dresser e Freund demonstraram que proteínas solúveis estranhas são incapazes de elicitar a produção de anticorpos a não ser que administradas juntamente com um adjuvante (174). Trabalhos subsequentes mostraram que a injeção de antígenos solúveis sozinhos não só são incapazes de induzir uma resposta imune, como na verdade, provocam um estado de tolerância (175). Em contraste à resposta não produtiva que ocorre após a apresentação do antígeno sozinho, a apresentação antigênica na presença de infecção resulta na produção de células T de memória. A presença do adjuvante ou de um PAMP induz a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-6 por macrófagos e migração de DCs do sítio inflamatório para os linfonodos drenantes da região (176-178). Em adição, CD80/CD86 induzidos nas APCs em resposta aos PAMPs interagem com CD28, que contribui para o aumento da expansão clonal via aumento na produção de IL-2 (179). Assim, o reconhecimento de antígenos estranhos por si só é suficiente para a indução de tolerância, e sinais adicionais, em geral provindos de moléculas presentes em patógenos, e que realizam o papel de adjuvantes, são necessárias para as células T serem ativadas de forma apropriada e produtiva (146).

No entanto, o pré-tratamento com INDO em camundongos imunizados com OVA+LPS induziu uma redução na frequência de células DO11.10 específicas para OVA, mostrando uma clara interferência da INDO/ PGE₂ nos processos de proliferação ou de morte destas células.

Uma explicação seria o tratamento com INDO inibir a proliferação celular e consequentemente o acúmulo de células. Porém, outra possibilidade ocorreria por meio do papel imunossupressor da PGE₂. Essa hipótese encontra fundamento nos diversos artigos científicos publicados, principalmente na década de 80, discutindo a função imunossupressora da PGE₂, inibindo a ativação e proliferação de células T (180). Em grande parte destes estudos, esse efeito foi creditado à inibição da produção de IL-2 e mais tarde, constatada a importância do cAMP. Foi mostrado que o cAMP interfere na expressão de IL-2 e de seus receptores (136, 181, 182), inibe o aumento de Ca²⁺ intracelular (183, 184), além de inibir a sinalização de proteínas G e bloquear a ativação dos linfócitos (185). No entanto, após muitos estudos sobre o seu efeito imunomodulatório, foi postulado que a concentração da PGE₂, o receptor envolvido no seu reconhecimento, o estado de diferenciação da célula alvo, assim como o grau de interação entre a PGE₂ e a célula, seriam fatores importantes no controle

desse processo. Dessa maneira, consideramos a possibilidade da PGE_2 produzida endogenamente após o tratamento dos animais com OVA+LPS inibir a proliferação dos linfócitos. A falta de divisão celular justificaria a ausência de FASL, uma vez que a sua expressão depende da ciclagem da célula. No entanto, verificamos que o tratamento com OVA+LPS induziu uma potente proliferação dos linfócitos T CD4 antígeno-específicos, eliminando essa possibilidade. Constatamos ainda, que o pré-tratamento dos animais com indometacina também não interferiu, de forma alguma, na proliferação dessas células. Esse resultado foi verificado e confirmado através da análise de vários parâmetros, como os índices de proliferação e replicação celular, bem como por meio da média de intensidade de fluorescência (MFI) do CellTrace.

Sendo assim, com a possibilidade de interferência na proliferação excluída, analisamos a frequência de células em apoptose nos baços e linfonodos dos animais que receberam os diversos tratamentos, fato que justificaria a redução do número de células KJI-26 nos animais tratados com INDO. Confirmando a suposição deste trabalho, foi observado que os animais que tiveram a produção de PGE_2 inibida durante a imunização com OVA+LPS apresentaram maior frequência de células em apoptose, em relação aos animais que só receberam o antígeno mais LPS. Concomitante à modulação da morte, foi observada a regulação de FASL, que também apresentou sua expressão aumentada nas células T CD4⁺ dos animais tratados com INDO. Para comprovar precisamente que FASL, de fato, é a molécula central na regulação da apoptose no nosso modelo, os experimentos foram realizados com células provenientes de animais C57BL/6 OTII, e o resultado foi comparado com o dos animais C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr}. Notamos que as células T CD4⁺ específicas para OVA dos animais C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr} respondem com menor intensidade ao estímulo antigênico, fato que também pôde ser observado na resposta de DTH. As células deficientes em FAS proliferaram menos e o seu acúmulo ocorreu de forma mais moderada quando comparado com as células suficientes em FAS. Alguns trabalhos apontam que as linhagens de camundongos *lpr* possuem produção deficiente de IL-2 em resposta à estímulos policlonais, como o ConA. Em adição, as células do baço desses animais respondem fracamente à IL-2 exógena. Este fato pode ser o responsável, ao menos em parte, pela menor resposta observada nestes camundongos após o estímulo com OVA. Infelizmente, o processo inflamatório brando observado nestes animais, decorrente de uma deficiência intrínseca, prejudicou uma observação precisa do resultado. Porém, ainda assim, verificamos diferenças estatísticas que suportam a idéia de que, nos animais que receberam células dos camundongos C57BL/6 OTII/FAS^{lpr/lpr}, a administração de

INDO não aumenta a frequência de linfócitos T CD4⁺ específicas em apoptose devido ao comprometimento da sinalização FAS/FASL nessas células.

5.1 Considerações finais

Para uma análise precisa dos resultados obtidos até o momento, é importante lembrar que a indometacina é uma droga que inibe de forma não seletiva COX-1 e COX-2, enzimas que participam da síntese das prostaglandinas e tromboxanos (118). A utilização de INDO, portanto, poderia bloquear a produção de outros mediadores lipídicos, além da PGE₂, que talvez participassem da modulação da apoptose. A PGE₂ é definitivamente o metabolito do ácido araquidônico mais estudado e do qual se tem mais informações na literatura, no que diz respeito à regulação da morte celular. No entanto, existem algumas publicações que mostram a modulação de processos de apoptose, mediada por outros produtos das enzimas COX-1 e COX-2. O tromboxano (TXA), por exemplo, parece ter ação anti-apoptótica, pois a supressão da tromboxano sintase promove a apoptose de células tumorais do pulmão (186). De forma contrária, PGD₂ e seu metabolito, 15d-PGJ₂, possuem um potencial antitumorigênico, uma vez que podem promover apoptose via ativação de caspases ou inibir a expressão de Bcl-2 (187-189). Porém, a maioria dos estudos com estes mediadores foi realizado em câncer e os mecanismos de ação, bem como a sua importância não estão muito claros. Em adição, não encontramos na literatura trabalhos que demonstrem a regulação de FASL por outros mediadores lipídicos, que não a PGE₂. Portanto, levando em conta os resultados apresentados, conjuntamente com os dados da literatura, acreditamos que a PGE₂ seja, de fato, a principal molécula responsável pelos fenômenos observados no decorrer deste trabalho. Para consolidar estes resultados, outras abordagens experimentais serão realizadas, dentre elas, a utilização de inibidores específicos de sua síntese e, como contra-prova, a reintrodução de PGE₂ exógena (metodologia em andamento) após o seu bloqueio com o inibidor específico.

Todos os achados abordados no decorrer desse trabalho vêm ao encontro da hipótese inicial e corroboram a importância do reconhecimento dos PAMPs para a manutenção da sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺. Esse mecanismo mediado pelas APCs colabora para distinguir a ativação de linfócitos T CD4⁺ em condições infecciosas e em condições assépticas. Essa distinção seria realizada pelas APCs através da percepção de patógenos através de seus TLRs, que induziria uma maior produção de PGE₂. Em condições infecciosas,

a presença desse mediador lipídico prolongaria a vida dos linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos durante a persistência do patógeno e de seus padrões moleculares associados.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a regulação da expressão de FASL em linfócitos T CD4⁺ ocorre durante o processo de apresentação antigênica, quando na presença de um padrão molecular associado à patógeno (LPS e CFA). Esta modulação ocorre, ao menos em parte, pela atuação de PGE₂ e tem um impacto na morte das células envolvidas promovendo a sobrevivência dos linfócitos específicos.

REFERÊNCIAS*

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
2. Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Seminars in immunology*. 2004;16(1):27-34.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2004;5(10):987-95.
4. Huang AY, Qi H, Germain RN. Illuminating the landscape of in vivo immunity: insights from dynamic in situ imaging of secondary lymphoid tissues. *Immunity*. 2004;21(3):331-9.
5. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annual review of immunology*. 1994;12:635-73.
6. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature medicine*. 2007;13(2):139-45.
7. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in immunology*. 2007;19(6):400-8.
8. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*. 2002;16(6):759-67.
9. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Current opinion in immunology*. 2002;14(3):354-9.
10. Van Parijs L, Peterson DA, Abbas AK. The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity*. 1998;8(2):265-74.
11. Zhou S, Ou R, Huang L, Moskophidis D. Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *Journal of virology*. 2002;76(2):829-40.
12. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology today*. 1995;16(1):39-43.
13. Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leukemia & lymphoma*. 2004;45(3):423-31.
14. Vella AT, McCormack JE, Linsley PS, Kappler JW, Marrack P. Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death. *Immunity*. 1995;2(3):261-70.

*De acordo com:

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

15. Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell death and differentiation*. 2008;15(12):1901-9.
16. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000;18:767-811.
17. Adema GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunology letters*. 2009;122(2):128-30.
18. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nature immunology*. 2005;6(2):163-70.
19. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*. 1998;16:225-60.
20. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunological reviews*. 2003;192:161-80.
21. Schwartz R. Induction of tolerance to self in T lymphocytes. *Nature*. 1984;308(5961):690-1.
22. Schwartz RH. T cell anergy. *Annual review of immunology*. 2003;21:305-34.
23. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(12):984-93.
24. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
25. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
26. Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *Comptes rendus biologies*. 2004;327(6):581-9.
27. Beutler B. Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nature reviews Immunology*. 2004;4(7):498.
28. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216.
29. Liu J, Xu C, Hsu LC, Luo Y, Xiang R, Chuang TH. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. *Molecular immunology*. 2010;47(5):1083-90.
30. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-76.
31. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009;113(7):1399-407.

32. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(11):1777-82.
33. Campos MA, Gazzinelli RT. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators of inflammation*. 2004;13(3):139-43.
34. Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CA, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(32):4195-201.
35. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology*. 2000;1(5):398-401.
36. Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell death and differentiation*. 2006;13(5):798-815.
37. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
38. Al-Ojali SM, Tara Moore CB, Fernandez-Cabezudo MJ, Al-Ramadi BK. IFN γ expression by an attenuated strain of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium improves vaccine efficacy in susceptible TLR4-defective C3H/HeJ mice. *Medical microbiology and immunology*. 2013;202(1):49-61.
39. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, et al. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nature medicine*. 2002;8(8):878-84.
40. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(47):33419-25.
41. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(9):672-6.
42. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1518(1-2):157-61.
43. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(6):798-806.
44. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, et al. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of immunology*. 2000;164(2):554-7.
45. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*. 2003;424(6949):643-50.

46. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1522-6.
47. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
48. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-5.
49. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology*. 2002;20:709-60.
50. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(3):513-20.
51. Li XD, Chen ZJ. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *eLife*. 2012;1:e00102.
52. Hidmark A, von Saint Paul A, Dalpke AH. Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *Journal of immunology*. 2012;189(6):2717-21.
53. Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*. 2012;337(6098):1111-5.
54. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current opinion in immunology*. 1999;11(1):13-8.
55. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997;278(5343):1612-5.
56. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature immunology*. 2006;7(10):1074-81.
57. Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, et al. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *Journal of immunology*. 2007;179(3):1449-57.
58. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nature immunology*. 2000;1(3):199-205.
59. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2001;2(10):947-50.
60. Cooke A. Th17 cells in inflammatory conditions. *The review of diabetic studies : RDS*. 2006;3(2):72-5.
61. Park HJ, Kim DH, Lim SH, Kim WJ, Youn J, Choi YS, et al. Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity. *Immune network*. 2014;14(1):21-9.

62. Zhang X, Ing S, Fraser A, Chen M, Khan O, Zakem J, et al. Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):131-9.
63. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology*. 2008;9(12):1347-55.
64. Jabeen R, Goswami R, Awe O, Kulkarni A, Nguyen ET, Attenasio A, et al. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4641-53.
65. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*. 1995;373(6513):441-4.
66. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *International immunology*. 1994;6(10):1545-53.
67. Zhang Y, Xu G, Zhang L, Roberts AI, Shi Y. Th17 cells undergo Fas-mediated activation-induced cell death independent of IFN-gamma. *Journal of immunology*. 2008;181(1):190-6.
68. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(7):532-42.
69. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407(6805):789-95.
70. Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in immunology*. 2004;25(11):610-5.
71. Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, Choisy-Rossi CM, Stonebraker AC, Beighton RA, et al. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity*. 2007;26(5):629-41.
72. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of experimental medicine*. 1978;148(5):1198-215.
73. Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *The Journal of experimental medicine*. 1984;159(1):1-20.
74. Watanabe T, Sakai Y, Miyawaki S, Shimizu A, Koiwai O, Ohno K. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 19, including the *lpr*, *Ly-44*, and *Tdt* genes. *Biochemical genetics*. 1991;29(7-8):325-35.
75. Hubner A, Barrett T, Flavell RA, Davis RJ. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Molecular cell*. 2008;30(4):415-25.
76. Hutcheson J, Scatizzi JC, Siddiqui AM, Haines GK, 3rd, Wu T, Li QZ, et al. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity*. 2008;28(2):206-17.

77. Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A, Bouillet P. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*. 2008;28(2):197-205.
78. Green DR. Fas Bim boom! *Immunity*. 2008;28(2):141-3.
79. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995;373(6513):444-8.
80. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*. 1996;4(3):321-8.
81. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995;267(5203):1449-56.
82. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(1):71-7.
83. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*. 1995;373(6513):438-41.
84. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nature medicine*. 1998;4(1):31-6.
85. Ishiwatari-Hayasaka H, Kawashima H, Osawa T, Nagata S, Miyasaka M. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors. *International immunology*. 1997;9(4):627-35.
86. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *Journal of immunology*. 1996;157(7):2909-15.
87. Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Current opinion in immunology*. 1998;10(5):552-8.
88. Rosen A, Casciola-Rosen L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;64(1):50-4.
89. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1):1-16.
90. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481-90.
91. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation*. 2000;7(12):1166-73.
92. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.

93. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997;388(6638):190-5.
94. Bentele M, Lavrik I, Ulrich M, Stosser S, Heermann DW, Kalthoff H, et al. Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *The Journal of cell biology*. 2004;166(6):839-51.
95. Schmitz I, Krueger A, Baumann S, Schulze-Bergkamen H, Krammer PH, Kirchhoff S. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *Journal of immunology*. 2003;171(6):2930-6.
96. Schmitz ML, Bacher S, Dienz O. NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(15):2187-93.
97. Kirchhoff S, Muller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *Journal of immunology*. 2000;165(11):6293-300.
98. Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(3):196-204.
99. Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annual review of immunology*. 2003;21:457-81.
100. Muppidi JR, Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nature immunology*. 2004;5(2):182-9.
101. Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*. 1996;4(4):397-405.
102. Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *Journal of immunology*. 1997;158(10):4602-11.
103. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*. 1996;14:649-83.
104. Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(2):987-92.
105. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*. 1997;7(6):803-12.
106. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993;75(5):875-86.
107. Gourley TS, Chang CH. Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *Journal of immunology*. 2001;166(5):2917-21.

108. Lee MO, Kang HJ, Kim YM, Oum JH, Park J. Repression of FasL expression by retinoic acid involves a novel mechanism of inhibition of transactivation function of the nuclear factors of activated T-cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002;269(4):1162-70.
109. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(2):231-9.
110. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(3):862-77.
111. Campopiano JC. Influência da ativação de macrófagos via receptores do tipo Toll (TLRs) na produção de fatores moduladores da sobrevivência de linfócitos T [Dissertação (Mestrado em ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2010.
112. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998;12(12):1063-73.
113. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*. 2002;23(3):144-50.
114. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S423-8.
115. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(21):13926-31.
116. Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005;315(1):1-7.
117. Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammarstrom S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annual review of biochemistry*. 1978;47:997-1029.
118. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:145-82.
119. Radmark O, Samuelsson B. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and 5-lipoxygenase: potential drug targets in cancer. *Journal of internal medicine*. 2000;248(1):5-14.
120. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacological reviews*. 2007;59(3):207-24.
121. Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(3):114-7.
122. Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Japanese journal of pharmacology*. 2000;83(4):279-85.

123. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(10):787-95.
124. Kobayashi T, Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002;68-69:557-73.
125. Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(8):1229-35.
126. Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Molecular pharmacology*. 1996;50(4):1031-7.
127. Rubin JE, Titus L, Nanes MS. Prostaglandin E2 induction of monoblastic differentiation utilizes both cAMP and non-cAMP dependent signalling systems. *Biochimica et biophysica acta*. 1991;1091(1):87-95.
128. Jing H, Yen JH, Ganea D. A novel signaling pathway mediates the inhibition of CCL3/4 expression by prostaglandin E2. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(53):55176-86.
129. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001;41:661-90.
130. Sugimoto Y, Namba T, Shigemoto R, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Distinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *The American journal of physiology*. 1994;266(5 Pt 2):F823-8.
131. Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *Journal of leukocyte biology*. 2003;73(6):756-63.
132. Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nature medicine*. 2003;9(6):744-9.
133. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(1):15-23.
134. Goetzl EJ, An S, Zeng L. Specific suppression by prostaglandin E2 of activation-induced apoptosis of human CD4+CD8+ T lymphoblasts. *Journal of immunology*. 1995;154(3):1041-7.
135. Chemnitz JM, Driesen J, Classen S, Riley JL, Debey S, Beyer M, et al. Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of Ick: implications in Hodgkin's lymphoma. *Cancer research*. 2006;66(2):1114-22.
136. Chouaib S, Welte K, Mertelsmann R, Dupont B. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression. *Journal of immunology*. 1985;135(2):1172-9.
137. Kaur K, Harris SG, Padilla J, Graf BA, Phipps RP. Prostaglandin E2 as a modulator of lymphocyte mediated inflammatory and humoral responses. *Advances in experimental medicine and biology*. 1999;469:409-12.

138. Bowolaksono A, Nishimura R, Hojo T, Sakumoto R, Acosta TJ, Okuda K. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and F2alpha in bovine luteal steroidogenic cells. *Biology of reproduction*. 2008;79(2):310-7.
139. Iwase M, Takaoka S, Uchida M, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, et al. Accelerative effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on Fas-mediated apoptosis in human neutrophils. *International immunopharmacology*. 2006;6(3):334-41.
140. Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, Gores GJ. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*. 2002;35(3):552-9.
141. Porter BO, Malek TR. Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. *European journal of immunology*. 1999;29(7):2360-5.
142. Yarovinsky TO, Hunninghake GW. Lung fibroblasts inhibit activation-induced death of T cells through PGE(2)-dependent mechanisms. *American journal of physiology*. 2001;281(5):L1248-56.
143. Pace E, Bruno TF, Berenger B, Mody CH, Melis M, Ferraro M, et al. Elevated expression of prostaglandin receptor and increased release of prostaglandin E2 maintain the survival of CD45RO+ T cells in the inflamed human pleural space. *Immunology*. 2007;121(3):427-36.
144. Casado M, Molla B, Roy R, Fernandez-Martinez A, Cucarella C, Mayoral R, et al. Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology*. 2007;45(3):631-8.
145. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(6):1693-702.
146. Thompson BS, Mata-Haro V, Casella CR, Mitchell TC. Peptide-stimulated DO11.10 T cells divide well but accumulate poorly in the absence of TLR agonist treatment. *European journal of immunology*. 2005;35(11):3196-208.
147. Titus RG, Chiller JM. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *Journal of immunological methods*. 1981;45(1):65-78.
148. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
149. Refaelli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*. 1998;8(5):615-23.
150. Palacios R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *Journal of immunology*. 1982;128(1):337-42.
151. Ando Y, Yasuoka C, Mishima T, Ikematsu T, Uede T, Matsunaga T, et al. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2014;50(4):313-20.
152. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology*. 2011;23(5):598-604.

153. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(2):695-706.
154. Bezouska K, Nepovim A, Horvath O, Pospisil M, Hamann J, Feizi T. CD 69 antigen of human lymphocytes is a calcium-dependent carbohydrate-binding protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;208(1):68-74.
155. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2006;57 Suppl 5:113-24.
156. Allen IC. Delayed-type hypersensitivity models in mice. *Methods in molecular biology*. 2013;1031:101-7.
157. Adam J, Pichler WJ, Yerly D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(5):701-7.
158. Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *The Journal of experimental medicine*. 1983;157(4):1149-69.
159. Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney international*. 1994;45(1):150-8.
160. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science*. 1990;250(4988):1720-3.
161. Lee WT, Cole-Calkins J, Street NE. Memory T cell development in the absence of specific antigen priming. *Journal of immunology*. 1996;157(12):5300-7.
162. Van Parijs L, Refaelli Y, Lord JD, Nelson BH, Abbas AK, Baltimore D. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity*. 1999;11(3):281-8.
163. Torgler R, Jakob S, Ontsouka E, Nachbur U, Mueller C, Green DR, et al. Regulation of activation-induced Fas (CD95/Apo-1) ligand expression in T cells by the cyclin B1/Cdk1 complex. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(36):37334-42.
164. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation*. 2002;9(12):1287-93.
165. Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC, Morita A, Bergstresser PR, Yagita H, et al. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *Journal of immunology*. 1999;162(9):5287-98.
166. Chen M, Wang YH, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu YJ, et al. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science*. 2006;311(5764):1160-4.
167. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 2009;137(6):1100-11.

168. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 2004;304(5676):1500-2.
169. Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, et al. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity*. 2004;21(6):877-89.
170. Funk JO, Walczak H, Voigtlander C, Berchtold S, Baumeister T, Rauch P, et al. Cutting edge: resistance to apoptosis and continuous proliferation of dendritic cells deficient for TNF receptor-1. *Journal of immunology*. 2000;165(9):4792-6.
171. Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J. Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Molecular immunology*. 2007;44(10):2558-65.
172. Luster MI, Dean JH, Boorman GA. Cell-mediated immunity and its application in toxicology. *Environmental health perspectives*. 1982;43:31-6.
173. Helleberg L. Clinical Pharmacokinetics of indomethacin. *Clinical pharmacokinetics*. 1981;6(4):245-58.
174. Dresser DW. Effectiveness of lipid and lipidophilic substances as adjuvants. *Nature*. 1961;191:1169-71.
175. Chiller JM, Habicht GS, Weigle WO. Kinetic differences in unresponsiveness of thymus and bone marrow cells. *Science*. 1971;171(3973):813-5.
176. Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology*. 1995;84(1):31-5.
177. Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(6):2237-47.
178. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(4):1413-24.
179. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology*. 1996;14:233-58.
180. Maca RD. The effects of prostaglandins on the proliferation of cultured human T lymphocytes. *Immunopharmacology*. 1983;6(4):267-77.
181. Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, Yamada H, Boumpas DT. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene expression at multiple levels. *Journal of immunology*. 1992;148(9):2845-52.
182. Rincon M, Tugores A, Lopez-Rivas A, Silva A, Alonso M, De Landazuri MO, et al. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *European journal of immunology*. 1988;18(11):1791-6.

183. Chouaib S, Robb RJ, Welte K, Dupont B. Analysis of prostaglandin E2 effect on T lymphocyte activation. Abrogation of prostaglandin E2 inhibitory effect by the tumor promotor 12.0 tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *The Journal of clinical investigation*. 1987;80(2):333-40.
184. Choudhry MA, Ahmad S, Sayeed MM. Role of Ca²⁺ in prostaglandin E2-induced T-lymphocyte proliferative suppression in sepsis. *Infection and immunity*. 1995;63(8):3101-5.
185. Bastin B, Payet MD, Dupuis G. Effects of Modulators of Adenylyl Cyclase on Interleukin-2 Production, Cytosolic Ca²⁺ Elevation, and K⁺ Channel Activity in Jurkat T-Cells. *Cell Immunol*. 1990;128(2):385-99.
186. Leung KC, Li MY, Leung BC, Hsin MK, Mok TS, Underwood MJ, et al. Thromboxane synthase suppression induces lung cancer cell apoptosis via inhibiting NF-kappaB. *Experimental cell research*. 2010;316(20):3468-77.
187. Shim J, Kim BH, Kim YI, Kim KY, Hwangbo Y, Jang JY, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands, pioglitazone and 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), have antineoplastic effects against hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2010;36(1):223-31.
188. Takeda K, Takahashi NH, Yoshizawa M, Shibahara S. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as a regulator of the retinoic acid signalling in melanocytes. *Journal of biochemistry*. 2010;148(2):139-48.
189. Dionne S, Levy E, Levesque D, Seidman EG. PPARgamma ligand 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 sensitizes human colon carcinoma cells to TWEAK-induced apoptosis. *Anticancer research*. 2010;30(1):157-66.