

**INAÊ SANTIAGO DO NASCIMENTO**

**EFEITO DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NA EXPRESSÃO DE LIGANTES DE RECEPTORES DE MORTE E NA MORTE CELULAR INDUZIDA POR ATIVAÇÃO EM SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>**

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

São Paulo  
2013

**INAÊ SANTIAGO DO NASCIMENTO**

**EFEITO DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NA EXPRESSÃO DE LIGANTES DE RECEPTORES DE MORTE E NA MORTE CELULAR INDUZIDA POR ATIVAÇÃO EM SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>**

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2013

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

© reprodução total

Nascimento, Inaê Santiago do.

Efeito de prostaglandina E2 na expressão de ligantes de receptores de morte e na morte celular induzida por ativação em subpopulações de linfócitos TCD4+ / Inaê Santiago do Nascimento. -- São Paulo, 2012.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Apoptose de linfócitos T.

Versão do título para o inglês: Effect of prostaglandin E2 on the expression of death receptors ligands and activation induced cell death in CD4+T cells subsets.

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

ICB/SBIB0209/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Inaê Santiago do Nascimento.

Título da Dissertação: Efeito de prostaglandina E2 na expressão de ligantes de receptores de morte e na morte celular induzida por ativação em subpopulações de linfócitos TCD4+ .

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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 **87** nas fls. **90** do livro **01** uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Gustavo Pessini Amarante-Mendes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito de Prostaglandina E2 na expressão de ligantes de receptores de morte e na morte celular induzida por ativação em subpopulações de linfócitos TCD4+** do qual participam o(s) alunos **Inaê Santiago do Nascimento**, 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 **17.08.2010**, com **validade de 3 anos**.

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

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

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

Aos meus pais, Isaneide Santiago do Nascimento e João Jorge de Amorim do Nascimento, e familiares por nunca desistirem de mim.

Obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes, por ter me dado a grande oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e desenvolver este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular Rodolfo, Júlia, Tiago, Flávia, Maria Emília, Luciana, Narciso, Nathália, Jackie Jacysyn, Jackie Midori, Bárbara, Cristiane, Paola e Carol pelo auxílio e convivência, tornando-se mais que colegas e, sim amigos. E aos colegas que já saíram do laboratório, Maíra, Ricardo, Mariana e Welbert pelas discussões e trocas de conhecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos amigos e professores dentro do Departamento de Imunologia pela dedicação, incentivo, convivência e amizade.

Aos amigos maravilhosos que conheci no dia-a-dia fora da rotina de laboratório, especialmente Renan, Evandro, Walter, Fabiano, Ariadne e Carlos, os quais se tornaram a minha família na cidade de São Paulo.

“Acontece muitas vezes que, quando pensamos que estamos fazendo experiências com os outros, na verdade as fazemos conosco.”

Oscar Wilde



## RESUMO

SANTIAGO-NASCIMENTO, I. **Efeito da prostaglandina E<sub>2</sub> na expressão de ligantes de receptores de morte e na morte celular induzida por ativação em subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> são conhecidos pela capacidade de diferenciação em várias subpopulações com habilidades distintas para o combate às infecções. Dentre essas subpopulações, podemos citar as clássicas Th1 e Th2, assim como as mais recentemente descritas Th17 e Treg. Após o término da resposta imune, as células que foram ativadas, proliferaram e se diferenciaram em células efetoras, precisam ser eliminadas para restaurar a homeostase do sistema imunológico. Em um contexto de constante apresentação antigênica, como por exemplo, durante uma infecção crônica, o linfócito T CD4<sup>+</sup> é reestimulado via TCR, passa a expressar CD95L (FASL), o qual se liga ao seu receptor constitutivamente expresso nestas células, CD95 (FAS) e culmina no processo denominado morte celular induzida por ativação (AICD). Nosso grupo observou que o mediador lipídico prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), produzido por células apresentadoras de antígenos, é capaz de proteger hibridomas de linfócitos T DO11.10 da AICD. No presente estudo, buscamos investigar se a PGE<sub>2</sub> é capaz de conferir esta mesma proteção em células esplênicas diferenciadas e se estas apresentam diferentes sensibilidades ao processo de AICD. Para a geração das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estimulamos esplenócitos totais ou linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados de baço de camundongos C57Bl/6 selvagens com anticorpos anti-CD3 adsorvido em placa e anti-CD28 solúvel, na presença da citocina IL-12p70. Uma vez polarizadas, as células foram submetidas a ensaios de indução de morte por reexposição ao anti-CD3, na presença ou não de 1 µM PGE<sub>2</sub>. Quando utilizamos células esplênicas totais obtivemos cerca de 40% de células produtoras de IFN-γ, as quais não foram protegidas pela PGE<sub>2</sub>. Verificamos, então, como células T CD4<sup>+</sup> purificadas se comportariam nas mesmas condições. Neste caso, obtivemos cerca de 60% de células produtoras de IFN-γ, as quais, novamente, não responderam positivamente à PGE<sub>2</sub>, mesmo expressando EP2 e EP4. Estes dados corroboram outros resultados encontrados na literatura, sugerindo que as células Th1, não sofrem proteção pela PGE<sub>2</sub>, talvez para evitar o desenvolvimento de respostas exacerbadas e/ou autoimunes.

**Palavras-chave:** Apoptose. Morte celular induzida por ativação. Diferenciação *in vitro*, Prostaglandina E<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

SANTIAGO-NASCIMENTO, I. **Effect of Prostaglandin E<sub>2</sub> on the expression of death receptors ligands and activation-induced cell death in CD4<sup>+</sup> T Cells subsets.** 2012. 61 p. Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are known for their ability to differentiate into various subsets with distinct capacities to fight infections. Among these subsets, there are the classical Th1 and Th2 cells, as well as the more recently described, Th17 and Treg. Once these cells are activated, differentiated, clonally expanded and exerted their effector functions, it is necessary to get rid of most of them to restore homeostasis of the immune system. In the context of constant antigen presentation, such as chronic infections, elimination of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes occurs via a process called activation-induced cell death (AICD). AICD is the result of TCR-mediated upregulation of CD95L (FASL), which binds to its constitutively expressed receptor in the T cells, CD95 (FAS), thereby inducing apoptosis. Our group observed that the lipid mediator prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), produced by antigen-presenting cells, is able to protect naïve murine T lymphocytes and the T cell hybridoma DO11.10 from AICD. In the present study, we investigated whether PGE<sub>2</sub> exerts the same protective effect on *in vitro* differentiated murine splenocytes. For the generation of CD4<sup>+</sup> T cells subsets, we stimulated total splenocytes or purified splenic CD4 T cells with plate-bound anti-CD3 antibodies and soluble anti-CD28, in the presence of IL-12. Once polarized, these cells were induced to death by re-exposure to anti-CD3 in the presence or absence of 1 μM of PGE<sub>2</sub>. When using total spleen cells, we obtained approximately 40% of IFN-γ-producing cells, which were not protected by PGE<sub>2</sub>. Polarization of purified splenic CD4<sup>+</sup> T cells yielded around 60% of IFN-γ-producing cells, which were also not protected from AICD by PGE<sub>2</sub>, despite the expression of EP2 and EP4. These data corroborate other observations in the literature, suggesting that Th1 cells are not protected from AICD by PGE<sub>2</sub>, perhaps to avoid exacerbated immune responses with consequent autoimmune diseases.

**Keywords:** Apoptosis. Activation-induced cell death. *In vitro* differentiation. Prostaglandin E<sub>2</sub>.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Desenho esquemático da interação APC – Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....   | 13 |
| <b>Figura 2</b> - Fenotipagem de células esplênicas totais de camundongo C57Bl/6 selvagem.....   | 31 |
| <b>Figura 3</b> - Determinação da intensidade de estímulo de ativação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....                                     | 32 |
| <b>Figura 4</b> - Fenotipagem de células esplênicas após 4 dias de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28.....  | 33 |
| <b>Figura 5</b> - Níveis de FASL em células esplênicas após 4 dias de estímulo controle e indução de AICD, na presença ou não de IL-2.....       | 35 |
| <b>Figura 6</b> - Níveis de FASL em células esplênicas após 4 dias de estímulo controle e indução de AICD, na presença ou não de IL-2.....       | 36 |
| <b>Figura 7</b> - Avaliação de fragmentação de DNA após indução de morte por 20 h.....   | 37 |
| <b>Figura 8</b> - Diferenciação Th1 em células esplênicas totais.....  | 38 |
| <b>Figura 9</b> - Indução de AICD, na presença ou não de PGE <sub>2</sub> , em células esplênicas totais diferenciadas para Th1 .....            | 40 |
| <b>Figura 10</b> - Indução de AICD, na presença ou não de PGE <sub>2</sub> , em células esplênicas totais diferenciadas para Th1 .....           | 41 |
| <b>Figura 11</b> - Indução de AICD, na presença ou não de PGE <sub>2</sub> , em células DO11.10 .....  | 42 |
| <b>Figura 12</b> - Indução de AICD, na presença ou não de PGE <sub>2</sub> , em células DO11.10 .....  | 43 |
| <b>Figura 13</b> - Enriquecimento de linfócitos T pelo método da coluna de lã de nylon. ....   | 44 |
| <b>Figura 14</b> - Enriquecimento de linfócitos T pelo método da coluna de lã de nylon. ....   | 45 |
| <b>Figura 15</b> - Purificação de células CD3+CD4+, a partir de células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem, por <i>cell sorting</i> ..... | 46 |
| <b>Figura 16</b> - Expressão gênica de receptores de PGE <sub>2</sub> em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> purificados .....                         | 47 |
| <b>Figura 17</b> - Diferenciação Th1 a partir de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> purificados .....   | 48 |
| <b>Figura 18</b> - Indução de AICD em células Th1 na presença ou não de PGE <sub>2</sub> .....   | 49 |
| <b>Figura 19</b> - Indução de AICD em células Th1 na presença ou não de PGE <sub>2</sub> .....   | 50 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 12 |
| <b>1.1 Linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> .....   | 12 |
| <b>1.2 Linfócitos TH1</b> .....   | 16 |
| 1.2.1 <u>HISTÓRICO</u> .....  | 16 |
| 1.2.2 <u>GERAÇÃO E RETRAÇÃO</u> .....   | 16 |
| <b>1.3 Morte celular induzida por ativação</b> .....  | 18 |
| <b>1.4 Prostaglandina E<sub>2</sub></b> .....   | 20 |
| 1.4.1 <u>VIAS DE PRODUÇÃO</u> .....   | 20 |
| 1.4.2 <u>RECEPTORES DE PGE<sub>2</sub> E VIAS DE SINALIZAÇÃO</u> .....                            | 21 |
| 1.4.3 <u>FUNÇÕES DE PGE<sub>2</sub> NO SISTEMA IMUNOLÓGICO</u> .....                              | 21 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 23 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b> .....   | 23 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....  | 23 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 24 |
| <b>3.1 Obtenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> .....   | 24 |
| <b>3.2 Enriquecimento de linfócitos T pela técnica de Lã de Nylon</b> .....                       | 25 |
| <b>3.3 Diferenciação <i>in vitro</i> de linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> .....                    | 25 |
| <b>3.4 Indução de morte por anticorpos anti-CD3 (na presença ou não de PGE<sub>2</sub>)</b> ..... | 26 |
| <b>3.5 Imunofluorescência por citometria de fluxo</b> .....                                       | 26 |
| <b>3.6 Análise de fragmentação de DNA por iodeto de propídeo (PI)</b> .....                       | 27 |
| <b>3.7 Extração de RNA e conversão para cDNA</b> .....  | 27 |
| <b>3.8 PCR quantitativo para detecção dos receptores de PGE<sub>2</sub></b> .....                 | 28 |
| <b>3.9 Cálculo da expressão gênica relativa</b> .....   | 28 |
| <b>3.10 Análises Estatísticas</b> .....   | 29 |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | 30 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | 51 |
| <b>6 CONCLUSÕES</b> .....   | 55 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 56 |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, também conhecidos como linfócitos T auxiliares ou T *helpers* (Th), são as células centrais da imunidade adaptativa que atuam modulando a função de outros tipos celulares. Células T são ativadas apenas por antígenos proteicos que são processados em peptídeos e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs – *antigen presenting cells*) como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B via Complexo Principal de Histocompatibilidade da classe II (MHC-II) (VILLADANGOS; PLOEGH, 2000; WOLF; PLOEGH, 1995).

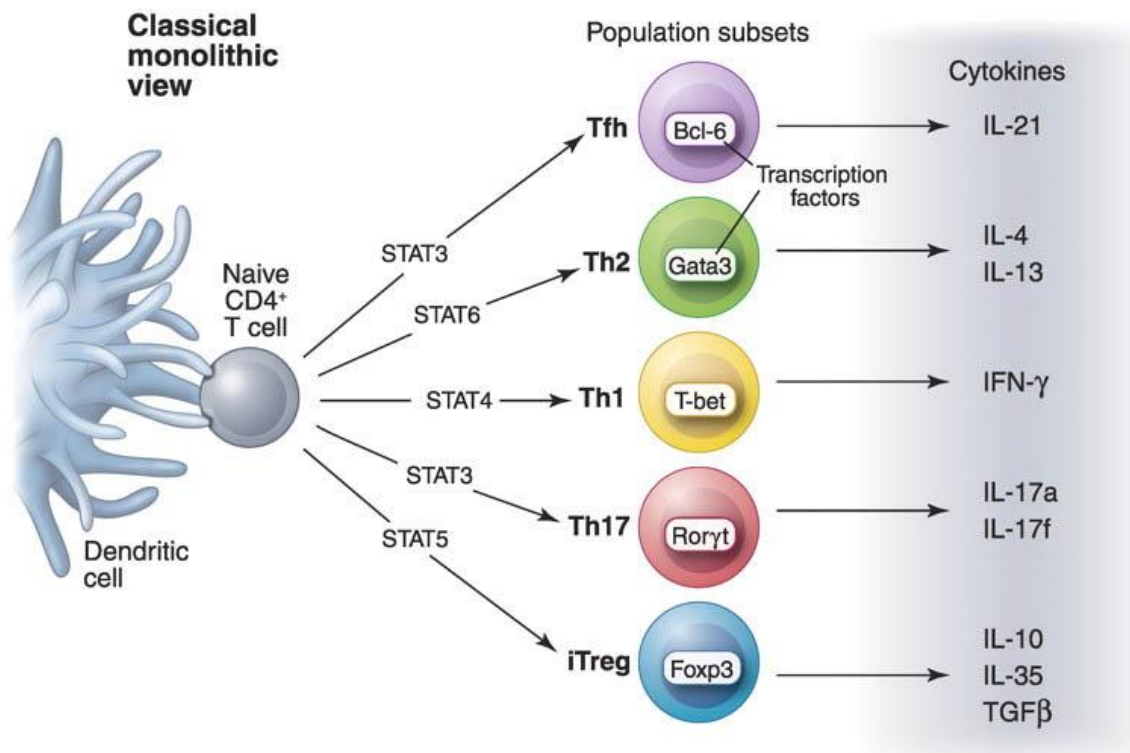
O complexo peptídeo – MHC-II é reconhecido pelo receptor de antígenos do linfócito T CD4<sup>+</sup> (TCR), culminando na ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, porém ativando-se somente o TCR, o não é sinal suficiente para induzir uma resposta imune, levando a célula para um estado de anergia ou de não-responsividade ao antígeno com o qual entrou em contato (COYLE; GUTIERREZ-RAMOS, 2001). Para tanto, além do sinal recebido pelo TCR, o linfócito T precisa de sinais de coestimulação, decorrentes da interação de suas moléculas CD28 com as moléculas coestimuladoras expressas em APCs maduras, como as da família B7, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), sinalizando para a célula T que o antígeno apresentado é estranho e deve ser combatido pelo sistema imunológico (BOISE et al., 1995; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

Citocinas produzidas por APCs são fundamentais para determinar a composição do microambiente onde essa apresentação antigênica ocorre, fazendo com que o linfócito T CD4<sup>+</sup> seja plenamente ativado, levando à diferenciação mais adequada para o tipo de antígeno que desencadeou o início da resposta imunológica e à produção de citocinas pelo próprio linfócito auxiliar (O’GARRA, 1998). Atualmente, é notória a existência de pelo menos três subpopulações importantes de linfócitos Th efetores, denominadas Th1, Th2, Th17, além de uma população reguladora chamada Treg (Figura 1).

No decorrer dos anos, vários estudos a respeito de desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram realizados e hoje podemos citar, além das Th1 e Th2, Th17 e Treg naturais e induzidas, já foram descritas as subpopulações Th3, Th9,

Th22 e Th foliculares e, com o avanço das técnicas de análise, esse número continua a crescer, exigindo atenção constante a como estes linfócitos atuam durante uma resposta imune (AKDIS et al., 2012; CECERE et al., 2012; GOSWAMI; KAPLAN, 2012; LEE et al., 2012). A polarização para um perfil Th1 ocorre, principalmente, em altas concentrações de IL-12 e/ou IFN- $\gamma$  e baixas concentrações de IL-4, enquanto que a polarização para Th2 acontece na condição oposta, ou seja, altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- $\gamma$ /IL-12. Além dessas duas subpopulações celulares, foi descrita uma terceira população de T CD4<sup>+</sup> efectoras, denominada Th17, caracterizada pela secreção de IL-17a e IL-17f. Sua diferenciação em camundongos ocorre na presença de IL-6 e TGF- $\beta$  ou IL-6, IL-1 e IL-23 em seres humanos (SHI et al., 2009).

**Figura 1** - Desenho esquemático da interação APC – Linfócitos T CD4<sup>+</sup>.



Célula dendrítica, apresentando antígeno para um linfócito T CD4<sup>+</sup> *naive* que, dependendo do fator de transcrição expresso nas subpopulações, determina juntamente com as citocinas presentes no microambiente, a produção de outras citocinas configurando a resposta mais adequada.

Fonte: O'Shea e Paul, 2010.

A polarização entre estas três subpopulações parece ocorrer de forma mutuamente excludente, já que as citocinas essenciais para determinada população inibem a diferenciação das outras como, por exemplo, o IFN- $\gamma$ , que inibe tanto o

aparecimento de Th2 como de Th17 e a IL-17/IL- 23, que inibe o desenvolvimento de Th1 (MONTELEONE et al., 2009). Estas subpopulações são também caracterizadas pela expressão diferencial de fatores de transcrição. Enquanto as Th1 expressam T-bet, as Th2 expressam GATA-3 e as Th17, ROR( $\gamma$ )t. Importante destacar que as células Treg também expressam particularmente um fator de transcrição denominado Foxp3. As células Th1 estão envolvidas na ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos, produção de anticorpos da classe IgG e, portanto, essenciais ao combate a infecções por patógenos intracelulares. A exacerbação destas respostas mediadas por Th1 estão relacionadas às principais doenças autoimunes, tais como lúpus e diabetes tipo I e hipersensibilidades do tipo tardia. Os linfócitos Th2, por sua vez, estão associados a respostas contra helmintos e organismos extracelulares, principalmente por sua capacidade de promover a produção de IgE. São também responsáveis pelo desenvolvimento de quadros atópicos (OXENIUS; ZINKERNAGEL; HENGARTNER, 1998; ROMAGNANI, 1997).

As células Th17 são importantes personagens na resposta a determinados tipos de fungos e também na ativação e recrutamento de neutrófilos, amplificando a inflamação tecidual. Estão fortemente associadas a diversas síndromes autoimunes, que anteriormente eram descritas como consequência da desregulação de linfócitos Th1, tais como a artrite reumatóide, doença de Alzheimer e colite (LAMBRACT-WASHINGTON et al., 2011). As Treg possuem duas categorias: as que surgem naturalmente no timo, sendo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (nTreg); e as iTreg que são induzidas por TGF- $\beta$  e são produzidas na periferia. Ambas as populações participam da manutenção da tolerância periférica e da prevenção de doenças autoimunes (CHEN et al., 2003).

Uma característica interessante no fenômeno de polarização dos linfócitos T é a plasticidade que há entre essas subpopulações. Era comum se pensar que quando uma resposta imunológica desvia-se para um determinado padrão efetor, a célula estaria comprometida com aquele padrão até sofrer o processo de apoptose (RADVANYI et al., 2006; ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). Atualmente, vários estudos demonstraram que os linfócitos T efetores podem mudar seus padrões de resposta se o microambiente também mudar. Tanto Th17 quanto Tregs necessitam de TGF- $\beta$  para sua geração durante uma resposta imunológica, o que determina polarização para Th17 é justamente o balanço de citocinas pró-inflamatórias presentes. Em

camundongos, níveis mais elevados de IL-6, em conjunto com TGF- $\beta$ , desviarão para o padrão Th17, porém se, durante a resposta, o microambiente apresentar níveis cada vez menores de IL-6, a célula, antes Th17 pode adquirir características mais reguladoras do que efectoras (HIRAHARA et al., 2011). Foi demonstrado que células Th17 geradas *in vitro* na presença de IL-1 apresentam uma capacidade muito maior de gerar autoimunidade em modelos experimentais do que as Th17 geradas apenas na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, sugerindo a necessidade de um microambiente altamente inflamatório para que estas células exerçam todo o seu potencial efector (SHI et al., 2009).

Para a manutenção destas subpopulações, enquanto exercem suas funções efectoras e reguladoras, é necessário que haja a presença de fatores de sobrevivência para estas células no microambiente no qual a resposta está acontecendo, um destes fatores é a citocina interleucina (IL) -2, produzida pelos linfócitos T ativados que vai agir nestas mesmas células, mas também será captada por Tregs, por possuírem uma expressão maior de CD25 ou cadeia alfa do receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ). Porém, estudos *in vitro* demonstraram que a IL-2 é muito importante também, não apenas na manutenção, mas na geração de células T reguladoras (ZHENG et al., 2007). A manutenção das células Th17 é garantida pela IL-23, importante para a manutenção da expressão do fator de transcrição ROR( $\gamma$ )t e, conseqüentemente, suas funções. Interessantemente, a IL-2 parece dificultar a manutenção da subpopulação Th17, através da diminuição da expressão do receptor IL-6R $\beta$  que, juntamente com IL-6R $\alpha$ , forma o IL-6R, impedindo a sinalização via STAT3, necessária para a geração de Th17 (BETTELI, 2006; BURCHILL et al., 2007; LIAO et al., 2011).

Alguns estudos com modelos experimentais murinos de autoimunidades como de esclerose múltipla, chamado encefalomielite autoimune experimental (EAE), sugerem que células Th17 podem se converter em produtoras de IFN- $\gamma$  para conseguirem penetrar a barreira hematoencefálica, o que estabeleceria o processo inflamatório no sistema nervoso central, complementando observações de que células IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> não possuem capacidade patogênica como a das células IL-17/IFN- $\gamma$  duplo-positivas (O'CONNOR et al., 2008).



## 1.2 Linfócitos TH1

### 1.2.1 HISTÓRICO

A resposta exercida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> sempre foi, de certa forma, intrigante para pesquisadores especialistas nessa linha de pesquisa, uma vez que constatou-se que estas células eram capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, o que gerava muita confusão. Em 1987, Mosmann e Coffman, responderam esta pergunta ao mostrarem que estas células, além de serem capazes de produzir uma variedade de citocinas com as mais diversas funções, poderiam também, após sua ativação, se diferenciar em duas subpopulações – que mais tarde, outros trabalhos mostrariam a existência de mais subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> - consideradas clássicas, Th1 e Th2. As células Th1 tornaram-se conhecidas por produzir IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha/\beta$  e seriam responsáveis por respostas imunes contra patógenos intracelulares e envolvidas em respostas exacerbadas que levavam a autoimunidades (MOSMANN; COFFMAN, 1989).

### 1.2.2 GERAÇÃO E RETRAÇÃO

Vários trabalhos já foram publicados em relação à geração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, mostrando tanto experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, nos últimos vinte anos, auxiliando na compreensão dos fenômenos de diferenciação e plasticidade destas células. Além dos sinais de ativação via complexo TCR e moléculas coestimuladoras, se faz necessária a presença de citocinas no microambiente para que estas células sejam desviadas para o padrão Th1, assim como o envolvimento de outras moléculas.

No momento da apresentação antigênica, juntamente com os sinais coestimuladores, o microambiente precisa estar rico em IL-12, cuja sinalização leva à expressão de uma proteína pertencente à família de proteínas *Signal Transducer and activation of transcription* (STAT), a STAT4, que sinaliza via Janus – cinases (JAK), regulando positivamente vários aspectos da diferenciação para Th1. Isso leva à expressão do fator de transcrição T-bet que é responsável pela regulação da expressão de vários genes relacionados ao padrão Th1, inclusive a produção de IFN- $\gamma$  (SZABO et

al., 2000, 2002). A sinalização do IFN- $\gamma$ , por sua vez induz a expressão de STAT1 que, em conjunto com STAT4 mantém a expressão de T-bet. Este ciclo se faz extremamente necessário para a manutenção do perfil Th1 (AFKARIAN, 2002; YANG et al., 2007). Porém ainda não está claro se o T-bet endógeno regula sua própria expressão ou se isso depende de IFN- $\gamma$  ou IL-12R $\beta$ 2, estudos sugerem que IL-12 e IFN- $\gamma$  são redundantes na indução de expressão de T-bet, mas também não é requerido para sua própria expressão na presença destas citocinas (ZHU; PAUL, 2010).

Além da sinalização de IL-12, as células T CD4<sup>+</sup> quando ativadas são capazes de produzir grandes quantidades de citocina IL-2, que funciona como fator de sobrevivência para que a expansão clonal continue ocorrendo. Essa produção pode ser regulada pelo silenciamento do gene *il2* pelo fator de transcrição *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (BLIMP-1) que é ativado pela própria IL-2, consistindo em um mecanismo de feedback negativo (MARTINS et al., 2008). O reconhecimento da IL-2 se dá por dois receptores: o dimérico, que consiste no CD122, também conhecido por IL-2R $\beta$ , e a cadeia  $\gamma$ -comum (CD132) que também é encontrada em receptores de outras citocinas como IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Outro receptor para IL-2 é o trimérico que consiste, além das duas cadeias anteriormente citadas, em mais uma cadeia que passa a ser expressa quando células T estão ativadas, chamada de IL-2R $\alpha$  (CD25) que não parece estar envolvida com sinalização, mas sim com o aumento da afinidade do receptor de IL-2 com seu ligante (TANIGUCHI; MINAMI, 1993).

Além de atuar como um fator de sobrevivência, a IL-2 também tem função de indução de morte em linfócitos T que, quando recorrentemente expostos a esta citocina, passam a expressar mais receptores de morte e seus ligantes levando a vias de processos apoptóticos (LENARDO, 1991). Em um contexto de infecção, antígenos são constantemente apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o que pode resultar em mais células *naive* sendo ativadas ou, então, uma célula ativada e que já exerceu sua função efetora pode ter seu TCR reestimulado. Esse reestímulo gera uma sinalização para o interior celular avisando que o linfócito deve ser eliminado. Isso evita o desenvolvimento de autoimunidades decorrentes de respostas imunológicas exacerbadas e desnecessárias pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Para que esse sistema de eliminação de células T reestimuladas seja ativado, a célula passa a expressar ligante do receptor de morte FAS (FASL) que se liga ao seu receptor constitutivamente

expresso, desencadeando um processo de morte celular conhecido como morte celular induzida por ativação (VAN PARIJS et al., 1999).

### 1.3 Morte celular induzida por ativação

Uma vez que linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram ativados, diferenciados, expandiram seus clones, uma fase chamada de fase de expansão, exerceram suas funções efetoras, é necessário que estas células sejam eliminadas para que a homeostase seja reestabelecida. (KRAMMER; ARNOLD; LAVRIK, 2007). Um linfócito T CD4<sup>+</sup>, já diferenciado, pode entrar novamente em contato com um peptídeo antigênico, havendo uma reestimulação do seu TCR. Este reestímulo pode ser extremamente nocivo, pois pode resultar em respostas exacerbadas, deixando de ser um elemento de cura e podendo causar doenças. Porém isto pode ser evitado por um mecanismo fisiológico de eliminação das células reestimuladas, chamado morte celular induzida por ativação (AICD, *activation-induced cell death*) (VAN PARIJS et al., 1999).

A AICD é uma forma de morte celular por apoptose que inicia-se quando um linfócito T CD4<sup>+</sup>, previamente ativado, sofre um reestímulo em seu TCR e passa a expressar FASL que se liga ao receptor de morte FAS, constitutivamente expresso nos linfócitos. O trímero de FASL liga-se ao trímero de FAS que, através de domínios DD (*death domain*) em sua cauda citoplasmática, associa-se a uma proteína adaptadora chamada FADD. Esta, por sua vez, possui um domínio DED (*death effector domain*), que interage com o domínio DED presente na caspase-8, recrutando-a. Este complexo multimolecular recebe o nome DISC (*death-inducing signaling complex*). A pró-caspase-8, antes inativa, ativa-se autocataliticamente, o que leva ao desacoplamento de DISC e consequente ativação de caspases efetoras como caspase-3, -6 e -7, levando ao início da apoptose (BRUNNER et al., 1995; BUDIARDJO et al., 1999; DHEIN et al., 1995; EARNSHAW; MARTINS; KAUFMANN, 1999).

É importante destacar que esta via de indução de apoptose pode ser bloqueada pela expressão de uma proteína chamada c-FLIP (*FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme*)-*inhibitory protein*), que possui homologia com a caspase-8, apresentando um domínio DED intacto, mas com uma troca na sequência de aminoácido do sítio catalítico, impedido que tenha atividade proteolítica. Portanto, c-FLIP é um inibidor competitivo

da ligação da caspase-8 ao complexo DISC, impedindo a propagação do sinal apoptótico (LAVRIK; KRAMMER, 2012). Durante o processo apoptótico há uma série de eventos característicos, como o “*flip-flop*” da membrana plasmática, caracterizado pela externalização de resíduos de fosfatidilserina (PS) e os resíduos de fosfatidilcolina são internalizados, fragmentação de DNA e condensação da cromatina, o que provoca uma retração no tamanho da célula. A célula apoptótica é fagocitada sem a necessidade de estabelecimento de uma resposta inflamatória, porém, há a ocorrência de um fenômeno *in vitro* chamado necrose secundária, uma vez que não há fagócitos para eliminar estas células (HOTZ; TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1992; HOTZ et al., 1994).

O processo de AICD é sabidamente importante para a manutenção da homeostase e evitando, assim, processos patológicos. Em camundongos, pode-se observar quadro semelhante em camundongos MRL/lpr, que são deficientes no receptor FAS e camundongos MRL/gld, que são deficientes em FASL, ambos apresentam baços e linfonodos aumentados em relação a animais que possuem as duas moléculas (ANDREWS et al., 1978; ROTHS; MURPHY; EICHER, 1984; WATSON et al., 1992). Em humanos, foi descrita a Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS), que consiste na ausência de receptor FAS ou do seu ligante FASL, o que impossibilita que as células morram pela via extrínscica de apoptose, resultando em acúmulo de linfócitos T em órgãos linfoides secundários (POPPEMA et al., 2004), demonstrando a importância deste sistema para a normalidade do organismo.

Além da importância do reestímulo do TCR, a AICD também pode ser regulada pela ação de citocinas. A mais importante é a IL-2, produzida por células ativadas, acompanhada da expressão de CD25, favorecendo a proliferação destes linfócitos e atuando como fator de sobrevivência (VAN PARIJS et al., 1999). A IL-2 também se faz necessária para sensibilizar linfócitos T ativados, garantindo sua eliminação, cujos mecanismos ainda não estão bem claros, porém sugere-se que aumento nos níveis de FASL e diminuição de c-FLIP sejam dependentes dessa sensibilização por IL-2, a qual não é observada em camundongos que não produzem IL-2 ou CD25 (REFAELI et al., 1998).

## 1.4 Prostaglandina E<sub>2</sub>

### 1.4.1 VIAS DE PRODUÇÃO

Mediadores lipídicos foram, primeiramente, descritos como reguladores da inflamação e da homeostase. A maior família de mediadores lipídicos é a família de prostanóides, composta por prostaglandinas, prostaciclina (PGs) e tromboxanos (TXs). Estas moléculas tem sua origem em complexas cascatas de sinalização enzimática que tem início com a degradação do ácido araquidônico (AA). Quando uma célula é ativada, fosfolípidios de membranas são liberados no citoplasma em sua forma solúvel, o AA, devido à ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) para depois sofrer ação de enzimas ciclooxigenases (COX), as quais possuem duas isoformas: COX-1, que é expressa constitutivamente nas células e é descrita por estar envolvida com a manutenção da homeostase. COX-2 tem sua expressão induzida quando a célula é ativada por uma variedade de estímulos pró-inflamatórios, especialmente durante infecções e processos tumorais (PHIPPS; STEIN; ROPER, 1991).

Ao sofrer a ação destas enzimas, dá-se origem à PGH<sub>2</sub> que, por sua vez, é catalisada por três PGE sintases, sendo uma citosólica e outras duas ligadas à membrana (mPGES) chamadas de mPGES-1 e mPGES-2. PGE sintase citosólica e a mPGES-2 são expressas constitutivamente e expressão de mPGES-1 é induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios e mitogênicos, com concomitante expressão de COX-2 (SILJEHAV et al., 2012). Isso culmina na produção de PGE<sub>2</sub> que está envolvida em diversos papéis fisiológicos e é produzida em diversos locais diferentes do organismo em processos patológicos, o que é interessante, devido à sua ação local e alta taxa de degradação regulada pela enzima *15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase* (15-PGDH) que, por sua vez, pode ser suprimida pela ação da mPGES-1, mantendo o ciclo de produção e degradação da PGE<sub>2</sub> diante estímulos (BRECHT et al., 2011; YAN et al., 2009). Este mediador é altamente específico e é reconhecido por quatro receptores de alta afinidade (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999).

#### 1.4.2 RECEPTORES DE PGE<sub>2</sub> E VIAS DE SINALIZAÇÃO

Após sua produção, a PGE<sub>2</sub> precisa se ligar aos seus receptores específicos, os E prostanoídes (EP), que são quatro: EP1, EP2, EP3 e EP4. EPs apresentam caudas citoplasmáticas curtas, portanto, incapazes de gerar, por si próprios, sinalização intracelular e, para tanto, estes receptores se encontram acoplados a proteínas G. Todos estes receptores são de alta afinidade e dependendo a qual proteína G estão acoplados podem exercer funções variadas. EP1 comumente encontra-se associado à proteína G $\alpha_q$ , sinalizando através da via da fosfolipase C (PLC)/*inositol-1,4,5-trisphosphate* (IP3) levando à formação do segundo mensageiro diacilglicerol (DAG), resultando em aumento dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular (ALFRANCA et al., 2006).

EP2 e EP4 estão acoplados à proteína G $\alpha_s$ , o que ativa o sistema de adenilato ciclases (AC) com consequente aumento nos níveis do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC), resultando na ativação da proteína cinase A (PKA) pela dissociação das subunidades reguladoras e catalíticas desta cinase. Estas subunidades catalíticas iniciam a transativação do fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein*) que se liga a regiões CRE (*cAMP response elements*) do DNA, estimulando a expressão de genes. O EP3, por sua vez, encontra-se acoplado à proteína G $\alpha_i$  cuja sinalização inibe AC, diminuindo os níveis de AMPC, porém a porção C-terminal de EP3 possui variantes, sendo EP3 $\alpha$  e EP3 $\beta$  associados à diminuição de AC e EP3 $\gamma$  pode se acoplar tanto à proteína G $\alpha_i$  quanto G $\alpha_s$ , levando a um aumento dos níveis de AMPC, assim como os observados na sinalização por EP2 e EP4 (ALFRANCA et al., 2006; NARUMYIA et al., 1999). As sinalizações por EPs culminam em diversos efeitos no organismo, inclusive no sistema imunológico.

#### 1.4.3 FUNÇÕES DE PGE<sub>2</sub> NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Por ser um mediador lipídico produzido por uma grande variedade de tipos celulares, a PGE<sub>2</sub> possui uma diversidade de funções por todo o organismo, sendo que esse prostanoíde exerce várias funções fisiológicas no organismo, atuando também no sistema imunológico. Em células da imunidade inata, a PGE<sub>2</sub>, via seu receptor EP4, foi descrita como inibidora da ação de células *Natural killers* (NK), diminuindo processos

metastáticos (YAKAR et al., 2003). Em 2009, Yao e colaboradores verificaram que baixas concentrações de PGE<sub>2</sub>, produzidas por células dendríticas, pela sinalização do receptor EP4, favoreceram a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> para um perfil Th1 e, em conjunto com a citocina IL-23, facilitou a expansão de linfócitos Th17. Porém, há dados na literatura que mostram que a PGE<sub>2</sub>, via sinalização EP2, inibe a proliferação de linfócitos T (CHEMNITZ et al., 2006; CHOUAIB et al., 1985) e parece ter uma ação no desvio da resposta imune, favorecendo uma resposta mais Th2 (KAUR et al., 1999).

A PGE<sub>2</sub> também exerce função na sobrevivência das células tumorais e do sistema imune. Em estudo realizado com linhagem de células de colangiocarcinoma, foi observado que a indução de COX-2, importante enzima na produção de PGE<sub>2</sub>, diminuiu o processo de apoptose mediado por FAS, porém não observaram resultado significativo na redução de apoptose mediada pelos ligantes TRAIL e TNF- $\alpha$  (NZEAKO et al., 2002). Estudos envolvendo linhagens humanas de tonsilas revelaram que há uma expressão das enzimas responsáveis pela síntese de mediadores lipídicos como as prostaglandinas, assim como, prostaciclina e quando há indução de AICD por reestímulo com anti-CD3, essa expressão diminuiu, sugerindo que realmente há uma participação destes mediadores na proteção a AICD com consequente prolongamento da vida dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante uma resposta imunológica (LEE et al., 2008).

Nosso grupo também já demonstrou a importância da PGE<sub>2</sub> em processos de AICD, mostrando que sobrenadantes de culturas de macrófagos e células dendríticas estimulados com o agonista de receptor do tipo Toll – 4 (TLR-4), o lipopolissacarídeo (LPS), continham PGE<sub>2</sub> e que hibridomas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> DO11.10, quando induzidos à AICD, na presença deste mediador lipídico eram protegidos deste processo apoptótico, o que também foi mostrado quando PGE<sub>2</sub> sintética foi utilizada (WEINLICH et al., 2008). Baseado nestes dados, desenvolvemos a hipótese de que, uma vez que hibridomas DO11.10 provavelmente são células pré-ativadas, portanto Th0 ainda não diferenciadas, procuramos avaliar se a PGE<sub>2</sub> exerceria o mesmo efeito protetor em células T já diferenciadas e com capacidades efetoras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar se, assim como em hibridomas DO11.10, linfócitos T CD4<sup>+</sup> diferenciados *in vitro* para o padrão Th1 também são protegidos do processo de AICD pela PGE<sub>2</sub>.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para a subpopulação Th1, provenientes de células esplênicas totais ou de linfócitos purificados;
- fenotipagem das células Th1 por citometria de fluxo;
- realização de ensaios de AICD em células Th1 provenientes de células esplênicas totais ou de linfócitos purificados;
- realizar tratamento de células Th1 reestimuladas por anti-CD3, verificando se houve ou não proteção pela PGE<sub>2</sub>.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Baço de camundongos machos C57Bl/6 selvagens, de 6-8 semanas de idade, foi utilizado para a obtenção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Após a maceração dos órgãos com auxílio de lâminas foscas e lise das hemácias com tampão hemolítico ACK por dois minutos em temperatura ambiente, as células foram submetidas ao ensaio de adesão em placa por 2 h, no qual as células aderentes foram depletadas.

Outro método para obtenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foi a utilização de kit comercial EasySep da empresa Stem Cell, de acordo com as especificações do fabricante. Após a preparação da suspensão celular, neste caso, com a lise de hemácias sendo feita com água destilada por 20 segundos, esta foi transferida a uma concentração de  $1 \times 10^8$  células/ml de meio recomendado pelo kit (PBS 1x; 1 mM EDTA e 2% soro fetal bovino) para um tubo de poliestireno estéril de 5 ml. Para cada ml de amostra, foram adicionados 50 µL de soro de rato (fornecido pelo kit) e 50 µL de Cocktail 1 (kit) de anticorpos, passando por um tempo de incubação a 4 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Cocktail 2 (kit) com tempo de incubação a 4 °C por mais 15 minutos. Foram adicionados, então, 100 µL de esferas (*beads*) magnéticas, incubando com a amostra e os demais reagentes a 4 °C por 5 minutos. Após este tempo, foram adicionados ao tubo, volume suficiente de meio recomendado pelo kit para atingir o volume total de 2,5 ml. O tubo foi colocado em uma base magnética por 5 minutos, para que o campo magnético pudesse atrair as células marcadas para as margens do tubo. Após este tempo, o tubo, ainda na base magnética foi invertido em tubo novo e estéril, o qual continha as células CD4<sup>+</sup> purificadas e prontas para serem utilizadas. Outra técnica usada para purificação foi a partir de *cell sorting*, marcando-se  $3 \times 10^8$  células com anti-CD4-APC.Cy7 e anti-CD3-FITC, sendo as amostras separadas em citômetro de fluxo de modelo FACS Aria III da B.

### 3.2 Enriquecimento de linfócitos T pela técnica de Lã de Nylon

Após processamento dos baços dos camundongos e preparo da suspensão celular após lise de hemácias, estas células passaram por uma coluna de lã de nylon. Primeiramente, pesou-se 1 g de lã de Nylon, sendo logo em seguida, muito bem desfiada e depois compactada em uma seringa de vidro de 20 ml que, posteriormente, foi autoclavada para garantir sua esterilidade. Antes de iniciar o procedimento, uma torneira de três vias foi acoplada à parte inferior da seringa. Para o início deste método, o meio de cultura sempre foi mantido a uma temperatura de 37 °C o qual foi adicionado à coluna de lã de nylon 25 a 50 ml para equilibrar a coluna. Foram removidas as bolhas de ar batendo firmemente nos lados da coluna até que nenhuma área branca (seca) ficasse visível. A lã foi, então, compactada com o auxílio de uma pipeta estéril, retirando qualquer ar que tenha permanecido. Fechou-se a torneira de 3 vias e a lã foi coberta com 3 ml de meio, evitando que a lã ressecasse. A coluna foi vedada e incubada em estufa a 37 °C por 45 minutos. Em seguida, abriu-se a torneira, deixando o meio drenar completamente e adicionando imediatamente a suspensão celular deixando passar por completo. Adicionou-se 1 ml de meio aquecido para assegurar que todas as células tenham aderido às fibras da lã de nylon. A torneira foi fechada e foram adicionados 3 ml de meio para evitar que a coluna secasse, a coluna foi vedada e incubada a 37 °C em estufa por 45 minutos. Após o período de incubação, o volume da coluna foi completado com meio aquecido. Abriu-se a torneira e as células efluentes e não-aderentes foram coletadas em um tubo cônico estéril de 50 ml. Foram coletados os primeiros 15 ml para garantir o melhor enriquecimento de linfócitos T (HATHCOCK, 2001).

### 3.3 Diferenciação *in vitro* de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

5x10<sup>6</sup> células/poço purificadas foram estimuladas por 48 h, em placa de 12 poços, com 1 µg/ml anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa por 2 h a 37° C, 1 µg/ml de anti-CD28 solúvel, na presença das citocinas necessárias para a polarização. Para a geração de Th1, adicionamos IL-12p70 (10 ng/ml). Após 48 h, foram adicionadas à cultura 2-16 ng/ml de IL-2 para manutenção da viabilidade destas células. Ao final de

quatro dias de diferenciação, a confirmação da correta polarização foi realizada através de marcação intracelular de citocina padrão do perfil Th1. IL-12p70 foi adquirida da empresa Biolegend e a IL-2 é proveniente da empresa Preprotech.

### **3.4 Indução de morte por anticorpos anti-CD3 (na presença ou não de PGE<sub>2</sub>)**

Após polarização,  $2,5 \times 10^5$  células diferenciadas foram expostas por 8 h, 18 h e 20 h a anticorpos anti-CD3 (clone 145.2C11), adsorvidos em placa por 2 h, em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> na presença ou não de PGE<sub>2</sub> a uma concentração de  $10^{-6}$ M (1 µM). Para imobilização dos anticorpos, 1 µg/ml de anti-CD3 foram diluídos em tampão Tris 50 mM pH9,0 e plaqueados em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo reto por 2 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.5 Imunofluorescência por citometria de fluxo**

Aproximadamente,  $2,5 \times 10^5$  células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 200 µl de PBS 1x enriquecido com 2% Soro Fetal Bovino e 0,1% azida sódica. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 25 µl da mesma solução contendo os anticorpos desejados na concentração determinada para cada um deles. Após 30 minutos de incubação a 4 °C no escuro, as células foram lavadas duas a três vezes em 200 µl de PBS contendo 0,1% azida e, em seguida, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo FACSCanto II. Para marcações intracelulares, antes da incubação com os anticorpos, foi realizada a permeabilização e fixação das células com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), conforme instruções do fabricante. Esta metodologia foi utilizada para fenotipagem das células esplênicas antes e após o protocolo de diferenciação, assim como, para a expressão de superfície celular de CD95L e marcação intracelular de citocinas padrão das subpopulações Th. Neste último caso, as células passam por um estímulo adicional de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) e Ionomicina por 4 h, com adição de Brefeldina A nas últimas 2 h do estímulo, para facilitar a marcação das proteínas intracelulares. Os anticorpos anti-CD4-APC.Cy7, anti-CD19-APC, anti-CD11b-PerCP.Cy5.5, anti-CD11c-Pe.Cy7, anti-CD95L-PE foram adquiridos da BD Pharmingen; os anticorpos anti-IL-4-PE e anti-IFN-γ-PerCP.Cy5.5

foram provenientes da empresa Biolegend. O anticorpo anti-CD3-FITC foi produzido, purificado e conjugado ao FITC em nosso laboratório.

### **3.6 Análise de fragmentação de DNA por iodeto de propídeo (PI)**

Cerca de  $2,5-5 \times 10^5$  células induzidas ou não ao processo de AICD por 20 h foram lavadas com 500  $\mu$ l PBS 1x gelado e centrifugadas por 5 minutos a 450 g a 4 °C. O pellet foi ressuspenso em 100  $\mu$ l de PBS 1x e 900  $\mu$ l de etanol 70% gelado para permeabilização das células, que foram mantidas em gelo por 1 minuto. Foi realizada nova centrifugação, a 600 g por 5 minutos a 4 °C. As células foram lavadas com 1 ml PBS 1x e centrifugadas a 500 g por 5 minutos a 4 °C. As células foram ressuspenso em 500  $\mu$ l de PBS 1x juntamente com 500  $\mu$ l de tampão de extração de DNA (NaHPO<sub>4</sub> 0,2 M e 0,1% Triton 100x) seguido de incubação a TA por 5 minutos. Centrifugação a 500 g, por 5 minutos a 4 °C e foram ressuspenso em solução de marcação de DNA (iodeto de propídeo e PBS). As células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur e os eventos considerados positivos para a marcação com PI encontraram-se à esquerda nos histogramas.

### **3.7 Extração de RNA e Conversão para cDNA**

Para a extração de RNA,  $1 \times 10^6$  células diferenciadas foram centrifugadas a 500 g por 3 minutos. Ao precipitado, adicionando-se 0,5 ml de Trizol e, após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, foram adicionados 0,1 ml de clorofórmio, seguida de nova incubação por 2 minutos e 0,25 ml de isopropanol e 10  $\mu$ g de glicogênio, seguido por uma incubação em TA por 2 h. Após nova centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 75%, secado e ressuspenso em 30  $\mu$ l de água livre de RNase e DNase. Após quantificação por espectrofotometria, 1-3  $\mu$ g de RNA foi diluído em 11  $\mu$ l de água livre de RNases, adicionando-se 1,0  $\mu$ l oligo dT (500 ug/ml), seguido de aquecimento a 70 °C por 10 min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 8  $\mu$ l do mix Superscript III (4  $\mu$ l de Tampão 5x; 1  $\mu$ l de dNTP 10 mM; 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M e 1,0  $\mu$ l Superscript R/T III 200 U/ $\mu$ l) e incubou-se a 42 °C por 50

minutos. A enzima foi inativada incubando-se a 70 °C por 15 minutos seguidos por 5 minutos a 4 °C. O volume final foi acertado para 100 µl com água livre de RNAses.

### 3.8 PCR quantitativo para detecção dos receptores de PGE<sub>2</sub>

As PCRs quantitativas foram feitas utilizando-se a tecnologia TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Em resumo, às amostras de cDNA foi adicionado o mastermix (que contem os oligonucleotídeos, a sonda, os tampões e a polimerase) e então foi feita a reação de PCR numa termocicladora Stratagene 3000, com o seguinte ciclo: 120 s/50 °C, 600 s/95 °C e 50x (15 s/95 °C + 60 s/60 °C).

### 3.9 Cálculo da expressão gênica relativa

Duas análises podem ser utilizadas para quantificar a expressão gênica, a quantificação absoluta e quantificação relativa. Os métodos de comparação de Ct (quantificação relativa) foram utilizados para comparar a expressão relativa dos genes estudados, até o presente momento. 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 de fitas molde, mais cedo a fluorescência poderá ser observada. O valor “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 ( $\delta Ct$ ) 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  $\delta Ct$  da amostra controle do valor de  $\delta Ct$  das outras amostras. Finalmente, o valor de  $2^{-\delta\delta Ct}$  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 (LIVAK et al., 2001).

### **3.10 Análises estatísticas**

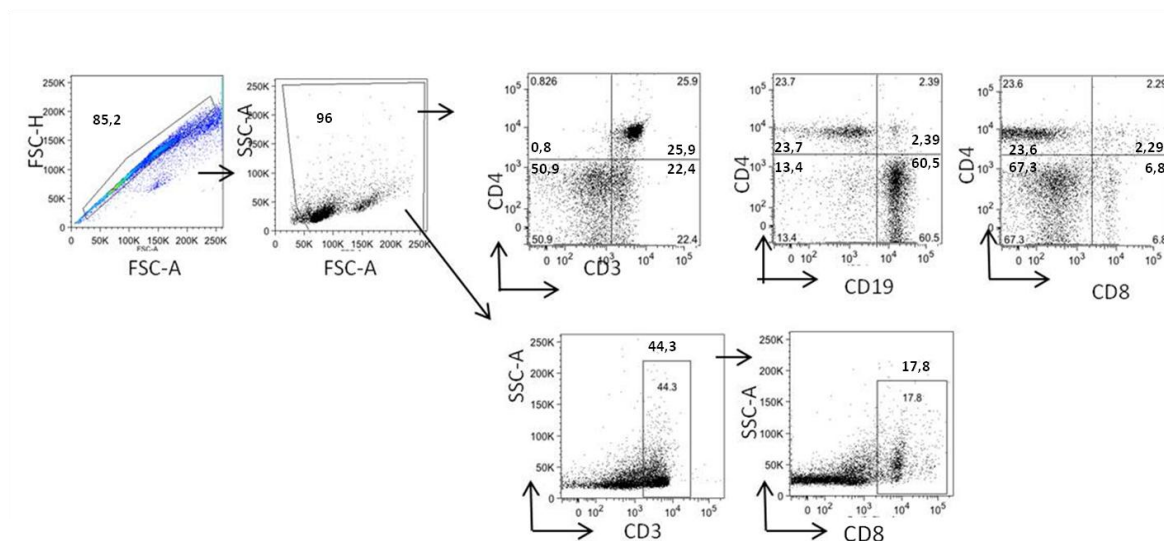
Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um software computacional chamado Graphpad Prism, da companhia Graphpad Software Incorporation, versão 5.0. Para a maior parte dos experimentos planejados, o teste a ser usado foi o ANOVA. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4 RESULTADOS

Antes de dar início aos nossos ensaios de diferenciação, primeiramente, realizamos a fenotipagem das células esplênicas para caracterizar a presença de cada população linfocitária existente no baço. Como mostra a figura 2, nossa estratégia de análise foi, inicialmente, selecionar apenas os eventos que foram adquiridos isoladamente pelo citômetro de fluxo (*singlets*), a partir dos parâmetros *Forward Scatter – area-FSC-A* (área do parâmetro tamanho) e *Forward Scatter - height-FSC-H* (altura do parâmetro tamanho).

Selecionamos estes eventos isolados para incluir somente células viáveis na análise, selecionamos os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (*Side Scatter - SSC-A*) e observamos que, dentro desta população, a frequência de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> era de cerca de 25%, enquanto de linfócitos B CD19<sup>+</sup> foi de, aproximadamente, 60% da população celular do baço. Fizemos duas análises para verificar a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, primeiro observando apenas a marcação para a molécula CD8, porém esta se apresentou muito aquém do que se é esperado, cerca de 7%, por isso, fizemos a segunda análise, levando em consideração a dupla marcação para as moléculas CD3 e CD8. Dentro do *gate* de células viáveis, selecionamos o parâmetro granulosidade e positividade para CD3. Analisamos, então, que na população selecionada havia uma frequência de cerca de 18% de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o que condiz com a frequência esperada desta população no baço.

**Figura 2** - Fenotipagem de células esplênicas totais de camundongo C57Bl/6 selvagem.



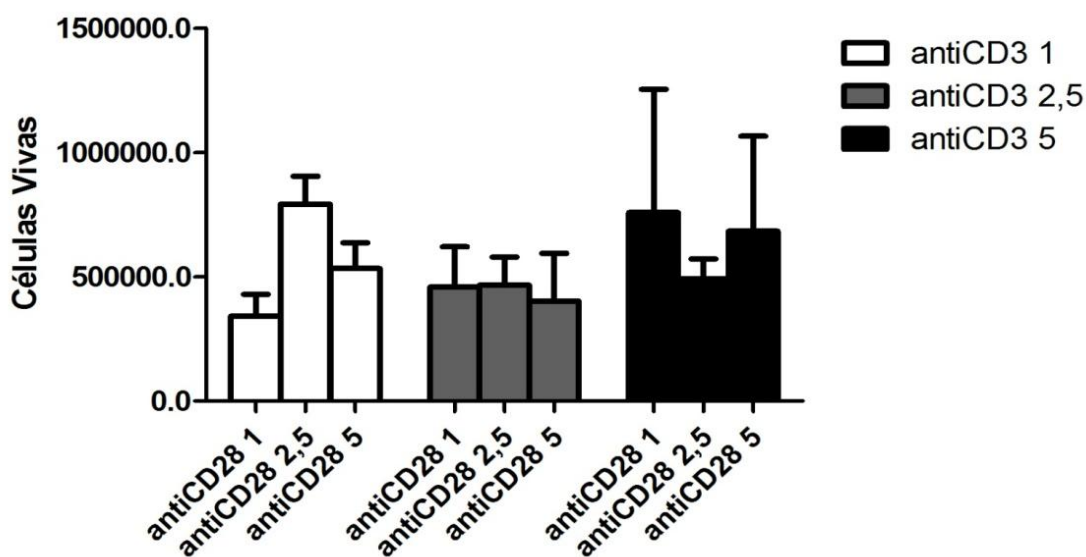
Células esplênicas extraídas de camundongo C57Bl/6 selvagem, marcadas para citometria de fluxo de marcadores de superfície CD3, CD4, CD8 e CD19 .

Realizamos experimentos de diferenciação controle, que consiste em células esplênicas que recebem no dia 0 estímulo de anti-CD3 adsorvido em placa e de anti-CD28 solúvel, sem adição de citocinas polarizantes e, após 48 h receberam 160 U/ml de IL-2 como fator de sobrevivência para os linfócitos até o final de quatro dias de cultura. Utilizamos células esplênicas totais, pois nosso objetivo foi avaliar como estes linfócitos, em condições aproximadas ao que ocorre no organismo, se comportariam quando submetidas a ensaios de diferenciação e de indução de morte celular.

Testamos diferentes concentrações de anti-CD3 e anti-CD28 para otimizar o sinal de ativação para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e verificamos, por contagem, utilizando o corante vital azul de Trypan, de células vivas recuperadas ao final dos quatro dias de cultura fizemos a contagem celular em todas as condições e, apesar de parecer que houve diferença, não achamos relevância estatística, portanto optamos utilizar as menores concentrações de ambos os estímulos (Figura 3):



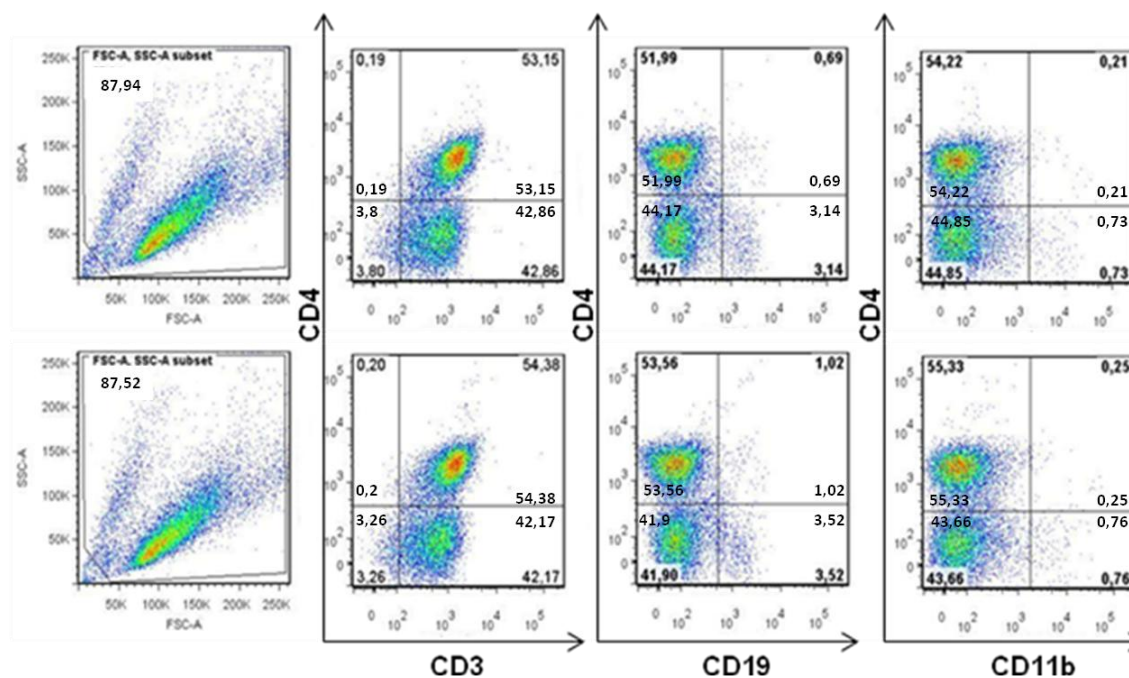
**Figura 3** - Determinação da intensidade de estímulo de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.



Células esplênicas totais de camundongos C57Bl/6 selvagem submetidas a 4 dias de culturas com diferentes concentrações e combinações de anti-CD3 e anti-CD28, ambas numa escala que compreendia 1 µg/ml; 2,5 µg/ml e 5 µg/ml. Foi realizado o teste estatístico de agrupamento TWO-WAY ANOVA. Não houve diferença estatisticamente significativa. Dado representativo de três experimentos independentes.

Realizamos experimentos de estímulo controle com anti-CD3 e anti-CD28, nas concentrações determinadas, com o intuito de fenotipar a cultura após os quatro dias de estímulo. Como mostra a figura 4, ao final da cultura, cerca de 55% da cultura é composta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, 42% de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, pois também respondem aos estímulos de anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 e; cerca de 3% de linfócitos B, outrora a maior população da cultura, após quatro dias sem estímulos específicos de sobrevivência, sofrem retração.

**Figura 4** - Fenotipagem de células esplênicas após 4 dias de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28.



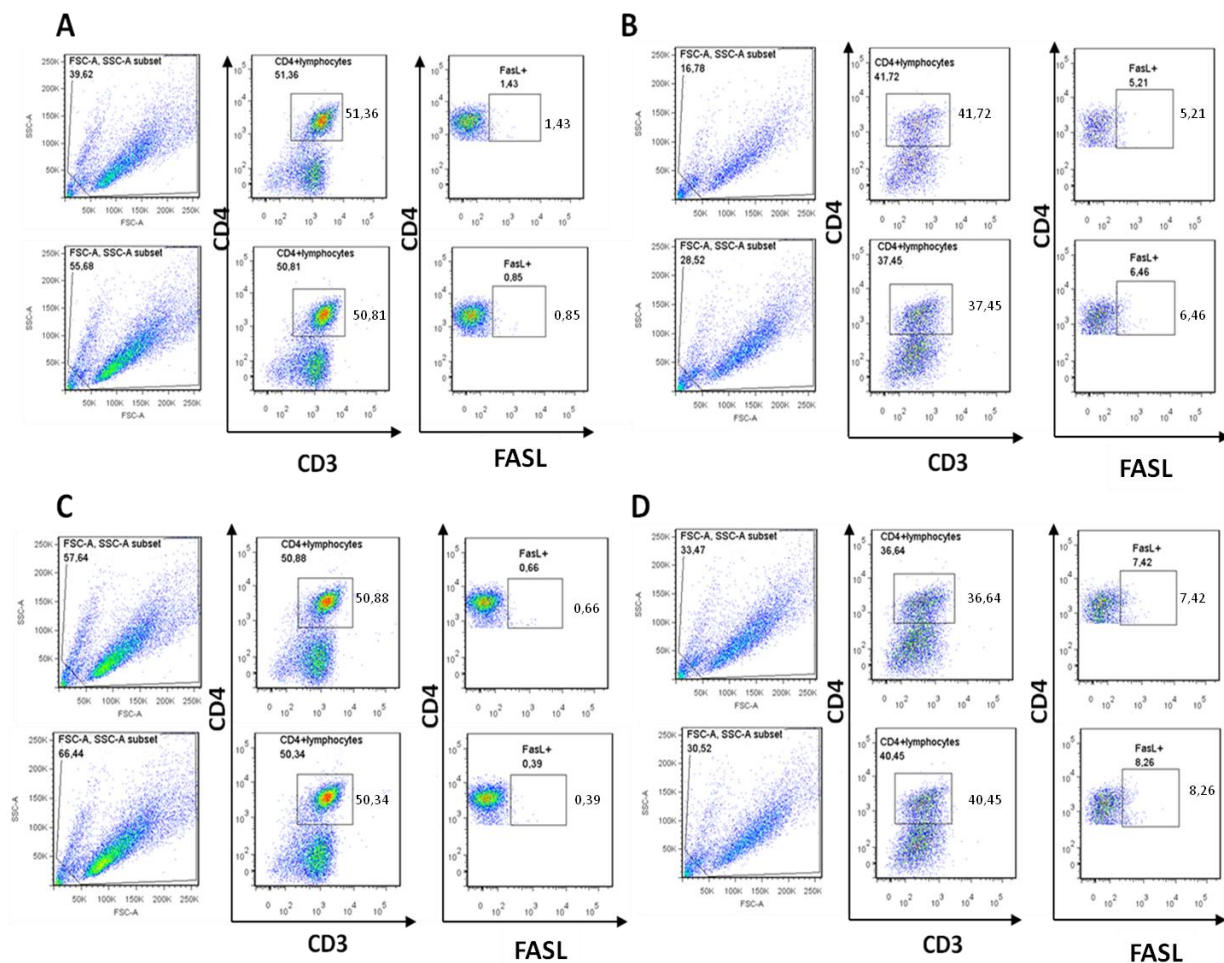
Células esplênicas mantidas em cultura por 4 dias com estímulo de anti-CD3 e anti-CD28. Representação de gráficos pseudocolor de duplicatas realizadas neste experimento para marcações de CD3, CD4, CD19 e CD11b.

Porém, observamos que muitas das células em cultura morriam, o que poderia representar um obstáculo para realizar nossos ensaios de indução de morte. Portanto, o próximo passo foi submeter células esplênicas totais que passaram pelo estímulo controle com anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 por quatro dias a ensaios de morte de 8 h a 20 h, e vimos se a adição de IL-2 se faria necessária para proteger as células não reestimuladas da morte espontânea da cultura.

Primeiramente, realizamos o ensaio de morte por reestímulo do TCR, expondo ou não estas células a 8h de tratamento com anti-CD3 adsorvido em placa. Como mostra a figura 5, observamos a duplicata de blastos que foram ou não reestimulados com anti-CD3, na presença ou não de IL-2 na cultura. Primeiramente, pode-se observar que obtemos cerca de 51% de linfócitos T  $CD4^+$ , levando em consideração o gate com dupla marcação para os marcadores CD3 e CD4. Quando as células não são induzidas ao processo de morte celular (A e C) há uma nítida separação da população  $CD3^+CD4^+$ , o que não acontece quando há a indução da apoptose (B e D).

Isso pode ser devido à internalização de CD4 após o reestímulo, assim como a perda de expressão de CD3, uma vez que o anti-CD3 pode estar bloqueando esta molécula na superfície dos linfócitos. A **figura 5A** representa as células controle, ou seja, não tratadas com anti-CD3 na presença de IL-2 mostram uma expressão basal de FASL de cerca de 1%, expressão esta que aumenta para aproximadamente 6% quando estas células são induzidas à morte, também na presença de IL-2, como mostra o painel 5B. Na figura 5C, as células não foram tratadas com anti-CD3 e, dessa vez, não receberam tratamento com a IL-2, mostrando uma expressão basal de FASL de aproximadamente 0,5%. Quando estas células não estimuladas com IL-2 foram tratadas com anti-CD3, a expressão de FASL aumentou para cerca de 7,8%, como visto no painel 5D, porém, este aumento não difere do mostrado nas células induzidas à morte na presença de IL-2 (painel 5B), sugerindo que a adição de IL-2 em nosso tratamento com anti-CD3 não é necessária, uma vez que não houve diferença na expressão de FASL em ambas as condições de tratamento.

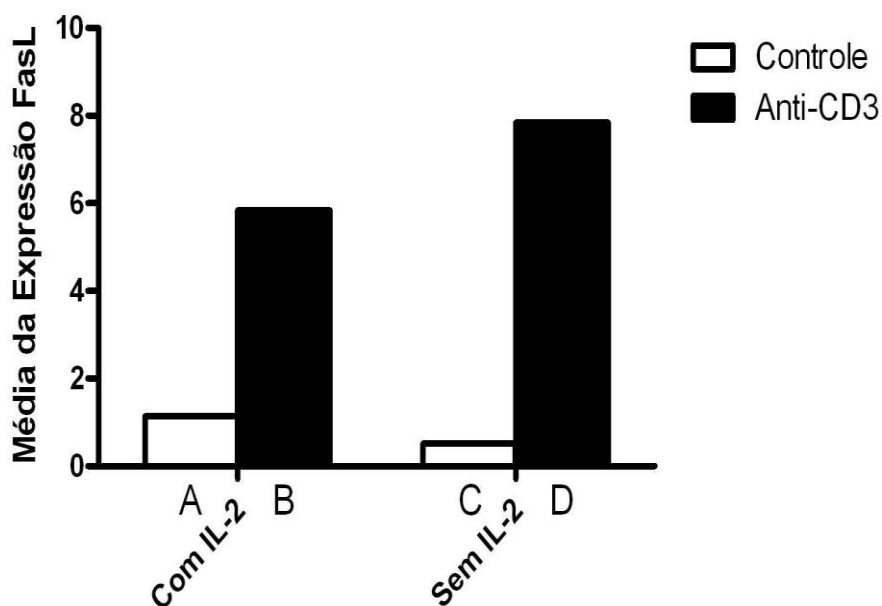
**Figura 5** - Níveis de FASL em células esplênicas após 4 dias de estímulo controle e indução de AICD, na presença ou não de IL-2.



Células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem submetidos ao protocolo de estímulo controle por anti-CD3 e anti-CD28 por 4 dias, seguido de tratamento com anti-CD3 durante 8h, na presença ou não de IL-2. **A** Duplicatas de células não tratadas com anti-CD3 na presença de IL-2. **B** Duplicatas de células tratadas com anti-CD3 na presença de IL-2. **C** Duplicatas de células não tratadas com anti-CD3 na ausência de IL-2. **D** Duplicatas de células tratadas com anti-CD3 na ausência de IL-2.

Na figura 6, estão representadas as médias dos valores obtidos na citometria de fluxo para a expressão de FASL, na qual há um visível aumento deste ligante nas amostras tratadas com anti-CD3 em relação às não tratadas.

**Figura 6** - Níveis de FasL em células esplênicas após 4 dias de estímulo controle e indução de AICD, na presença ou não de IL-2.



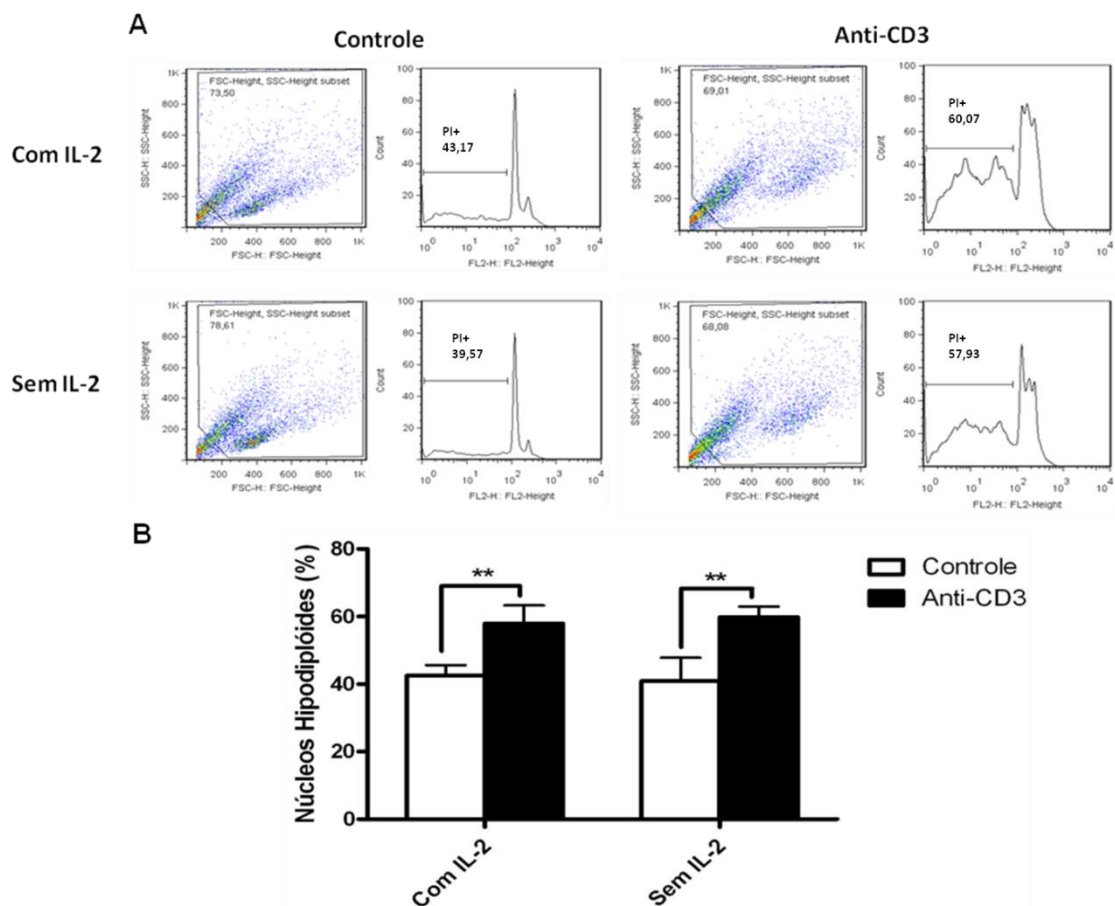
Células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem submetido ao protocolo de estímulo controle de anti-CD3 e anti-CD28 por 4 dias, seguidos de tratamento com anti-CD3 durante 8 h, na presença ou não de IL-2. Representação gráfica da média dos valores obtidos nas duplicatas dos painéis A, B, C e D da figura 5.

Entretanto, para que pudéssemos ter certeza de que a adição de IL-2, durante os ensaios de morte, seria necessária ou não, realizamos um experimento com as células esplênicas totais, que passaram por estímulo controle de quatro dias, de reestímulo do TCR, expondo estas células a um tratamento de 20 h com anti-CD3 adsorvido, para que pudéssemos avaliar eventos mais tardios da apoptose como a fragmentação do DNA. Para avaliarmos isto, fixamos as células para que não se rompessem, permeabilizamos e coramos com iodeto de propídeo, que se intercala no DNA de dupla-fita. Quando há uma diminuição da marcação por PI, isso indica que houve fragmentação. Na figura 6, observamos que o controle com IL-2 apresentou uma morte de cerca de 41%, o qual não houve diferença estatística entre as amostras tratadas sem IL-2, que teve aproximadamente 39% de morte.

Entre as amostras tratadas com anti-CD3, na presença de IL-2, houve uma morte em torno de 60%, mais uma vez, não apresentando diferença estatística em relação às amostras induzidas à morte celular na ausência de IL-2, com valores obtidos

de aproximadamente 61%. Por outro lado, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa no tratamento com anti-CD3 (AICD) entre as amostras com e sem IL-2, indicando, ainda, que a indução de morte funcionou.

**Figura 7** - Avaliação de fragmentação de DNA após indução de morte por 20 h.

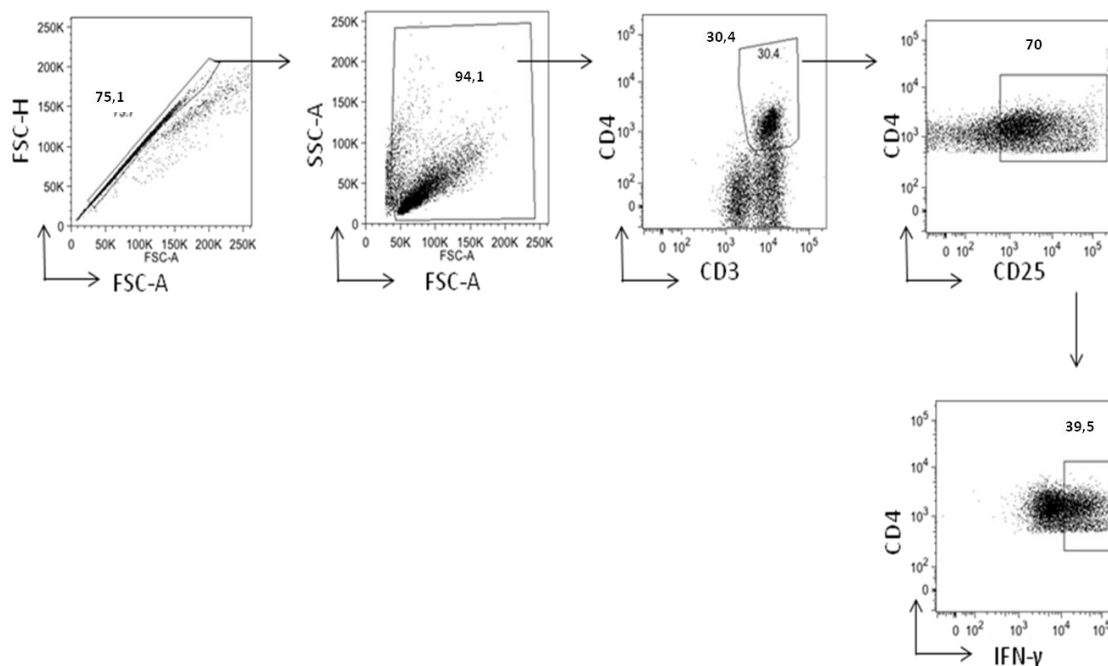


Células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem submetidos ao protocolo de diferenciação por 4 dias, seguidos de indução de AICD por anti-CD3 durante 20 h. **A** mostra a citometria de fluxo das células tratadas ou não com anti-CD3. **B** Representação gráfica das triplicatas realizadas neste mesmo experimento.  $p < 0.01$  (\*\*).

Prosseguimos para realizar experimentos de diferenciação *in vitro* para a subpopulação Th1, para isso, extraímos células esplênicas totais de camundongo C57Bl/6 selvagem e colocamos em cultura com anti-CD3 previamente adsorvido em placa, anti-CD28 solúvel e adicionamos IL-12 (10 ng/ml), após 48 h foi adicionada a IL-2 (100 ng/ml) e, ao final de quatro dias de cultura fenotipamos estas células. Os marcadores utilizados foram CD3, CD4, CD25 e IFN- $\gamma$ , este último, por ser uma

proteína solúvel que é produzida e rapidamente secretada, utilizamos estímulos de PMA, Ionomicina e Brefeldina A, sendo que os dois primeiros estímulos são inespecíficos, ativando vias de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e o NFAT, fazendo com que a célula produza em maior quantidade o que ela já está produzindo. A adição de Brefeldina A garante que estas proteínas produzidas pelas células T diferenciadas sejam retidas no retículo endoplasmático rugoso, impedindo que sejam secretadas, facilitando assim, a sua detecção por citometria de fluxo. Na figura 8, observamos que ao final da cultura, conseguimos recuperar cerca de 30% de células  $CD3^+CD4^+$ , das quais 70% apresentavam marcação positiva para CD25, estando assim, ativadas. Dentro de células ativadas, conseguimos obter quase 40% de células produtoras de IFN- $\gamma$ , caracterizando células que foram polarizadas para Th1.

**Figura 8** - Diferenciação Th1 em células esplênicas totais.



Células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem submetidas a condições polarizantes para subpopulação Th1, na presença de anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) adsorvido em placa, anti-CD28 solúvel (1  $\mu$ g/ml) e IL-12 (10 ng/ml). A fenotipagem das células foi realizada por marcações extracelulares para CD3, CD4, CD25 e intracelular para IFN- $\gamma$ .

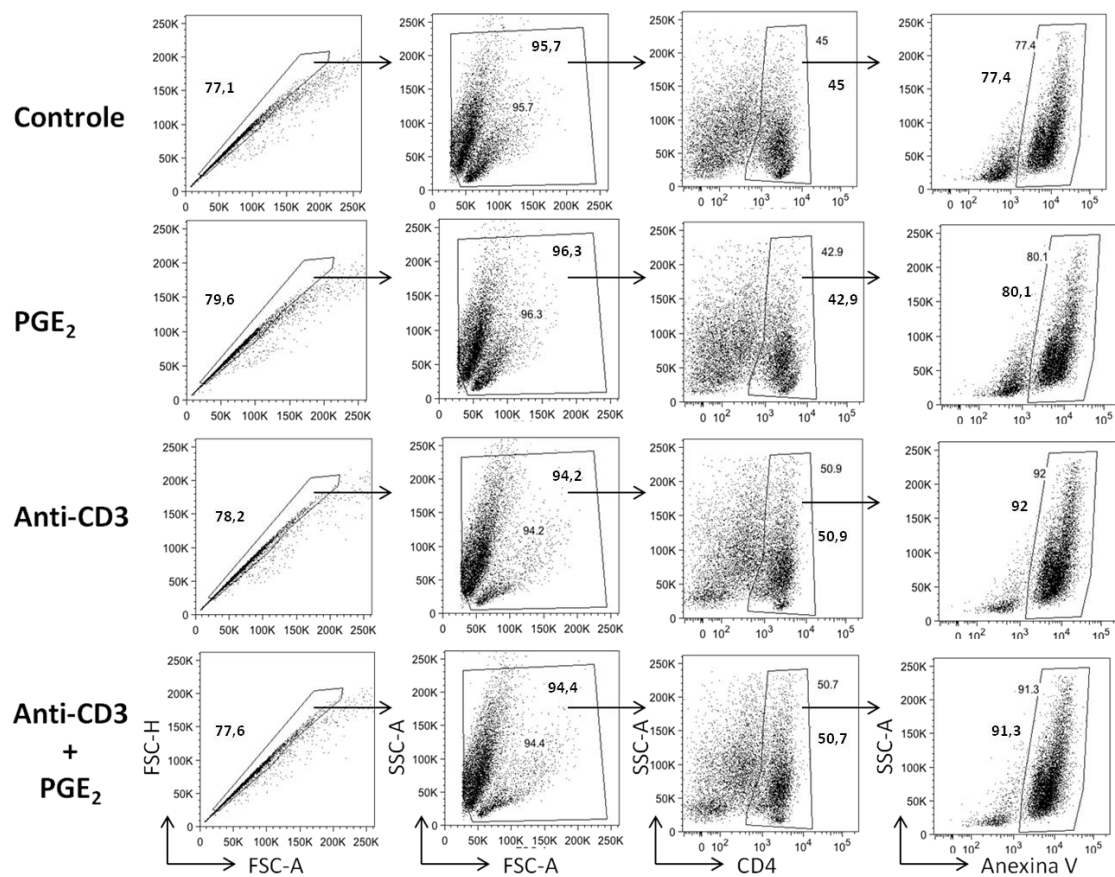
O próximo passo foi verificar se estas células diferenciadas para Th1, quando induzidas ao processo de AICD por reestímulo de TCR com anti-CD3, seriam ou não protegidas de morte celular pela PGE<sub>2</sub>. Porém, levamos em consideração que o estímulo com PMA e ionomicina ativam as mesmas vias de sinalização que o estímulo exercido pelo anti-CD3, por isso, sempre realizamos a fenotipagem separadamente dos ensaios de morte, sendo que nestes últimos não realizamos a marcação para IFN- $\gamma$ .

Na figura 9, induzimos AICD por tratamento com anti-CD3 adsorvido em placa por 18 h, em células esplênicas totais polarizadas para Th1, na presença ou não de anti-CD3 e de PGE<sub>2</sub> a uma concentração de 1  $\mu$ M. Observamos que, na amostra Controle, ou seja, que não foi tratada nem com anti-CD3 e nem com PGE<sub>2</sub>, a morte basal foi de 77%, uma taxa de morte alta, porém normal levando-se em consideração o estado de ativação das células após diferenciação e o estresse adicional sofrido com a separação feita por gradiente de concentração Ficoll-Paque. Quando adicionamos apenas o mediador lipídico, a morte basal teve um sutil aumento para, aproximadamente 80%.

Nas amostras tratadas com apenas anti-CD3, as células morreram quase que completamente, podendo-se observar uma morte de cerca de 92% das células CD4<sup>+</sup>. Interessantemente, quando plaqueamos as células com anti-CD3 juntamente com PGE<sub>2</sub>, estas células não foram protegidas do processo de morte celular induzida por ativação. A figura 10 mostra a representação gráfica das triplicatas, mostrando que houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e a amostra tratada com anti-CD3, porém não houve proteção pela PGE<sub>2</sub>, pois talvez realmente não haja o efeito protetor por esse mediador lipídico e estaria, na verdade, causando a morte destas células Th1 por outras vias, como mostrado no tratamento exclusivo com PGE<sub>2</sub>.

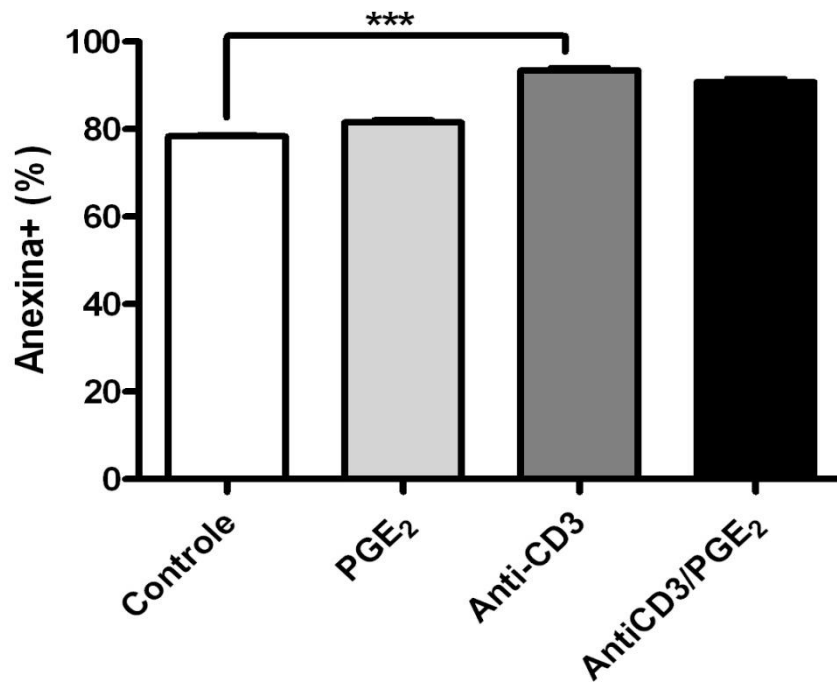


**Figura 9** - Indução de AICD, na presença ou não de PGE<sub>2</sub>, em células esplênicas totais diferenciadas para Th1.



Células esplênicas de camundongo C57Bl/6 submetidas ao protocolo de diferenciação *in vitro* para Th1 por 4 dias, na presença de anti-CD3 (1 µg/ml) adsorvido em placa, anti-CD28 solúvel (1 µg/ml), seguido de ensaio de AICD por 18h na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/ml) e PGE<sub>2</sub> (1 µM). Frequência de morte medida pela marcação com Anexina V. Experimento realizado em triplicatas.

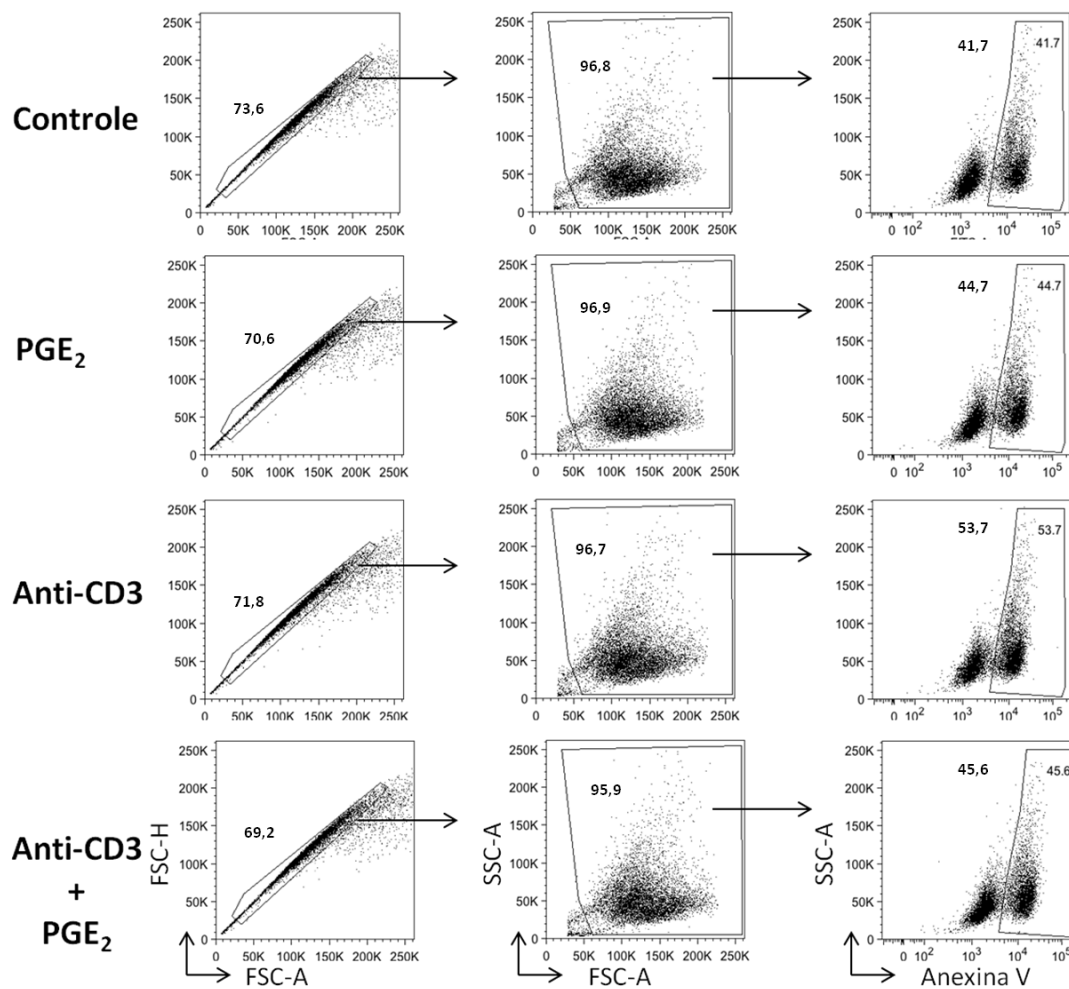
**Figura 10** - Indução de AICD, na presença ou não de PGE<sub>2</sub>, em células esplênicas totais diferenciadas para Th1.



Representação gráfica das triplicatas obtidas de experimento com células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem da figura 9, submetidas ao protocolo de diferenciação para Th1e, posteriormente, ao ensaio de AICD por 18 h na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/ml) e PGE<sub>2</sub> (1 µM). Frequência de morte medida pela marcação com Anexina V. Teste estatístico TWO-WAY ANOVA.  $P < 0,001$  (\*\*\*)

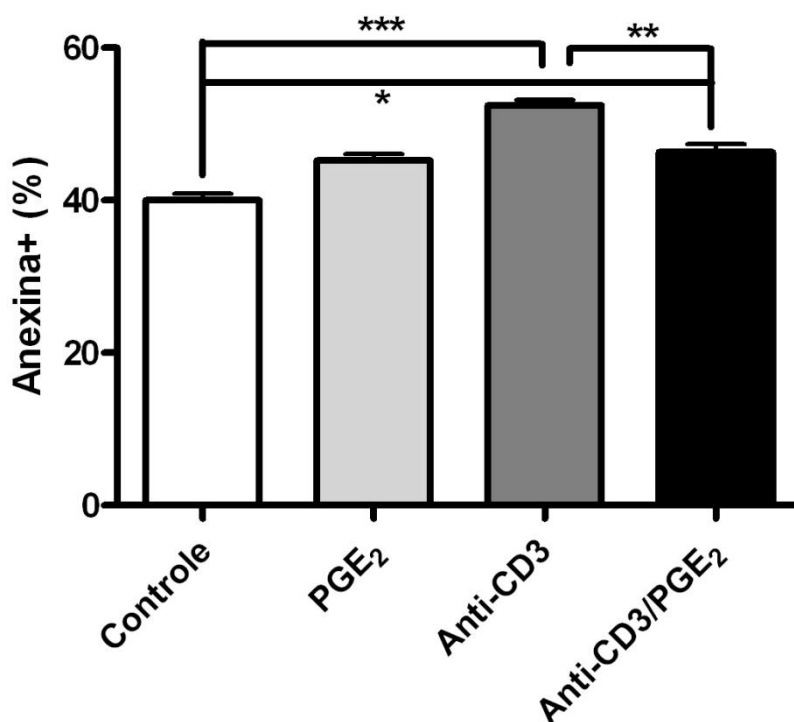
Para validar este resultado, usamos como controle positivo, hibridomas DO11.10 que já foram descritos, por nosso grupo de pesquisa, serem protegidos de AICD quando expostos à PGE<sub>2</sub>. E como mostram as figuras 11 e 12, hibridomas DO11.10 expostos às mesmas condições de ensaio de morte, descritas anteriormente para células Th1, foram protegidas do processo de morte quando PGE<sub>2</sub> foi adicionada à cultura na presença do anti-CD3 e, vale ressaltar que a proteção exercida é parcial, uma vez que há uma diminuição de morte, porém não retorna aos mesmos valores do controle.

**Figura 11** - Indução de AICD, na presença ou não de PGE<sub>2</sub>, em células DO11.10.



Hibridomas DO11.10 submetidos ao ensaio de AICD por 18 h, na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/ml) e PGE<sub>2</sub> (1 µM). Frequência de morte medida pela marcação de Anexina V. Experimento realizado em triplicatas.

**Figura 12** - Indução de AICD, na presença ou não de PGE<sub>2</sub>, em células DO11.10.



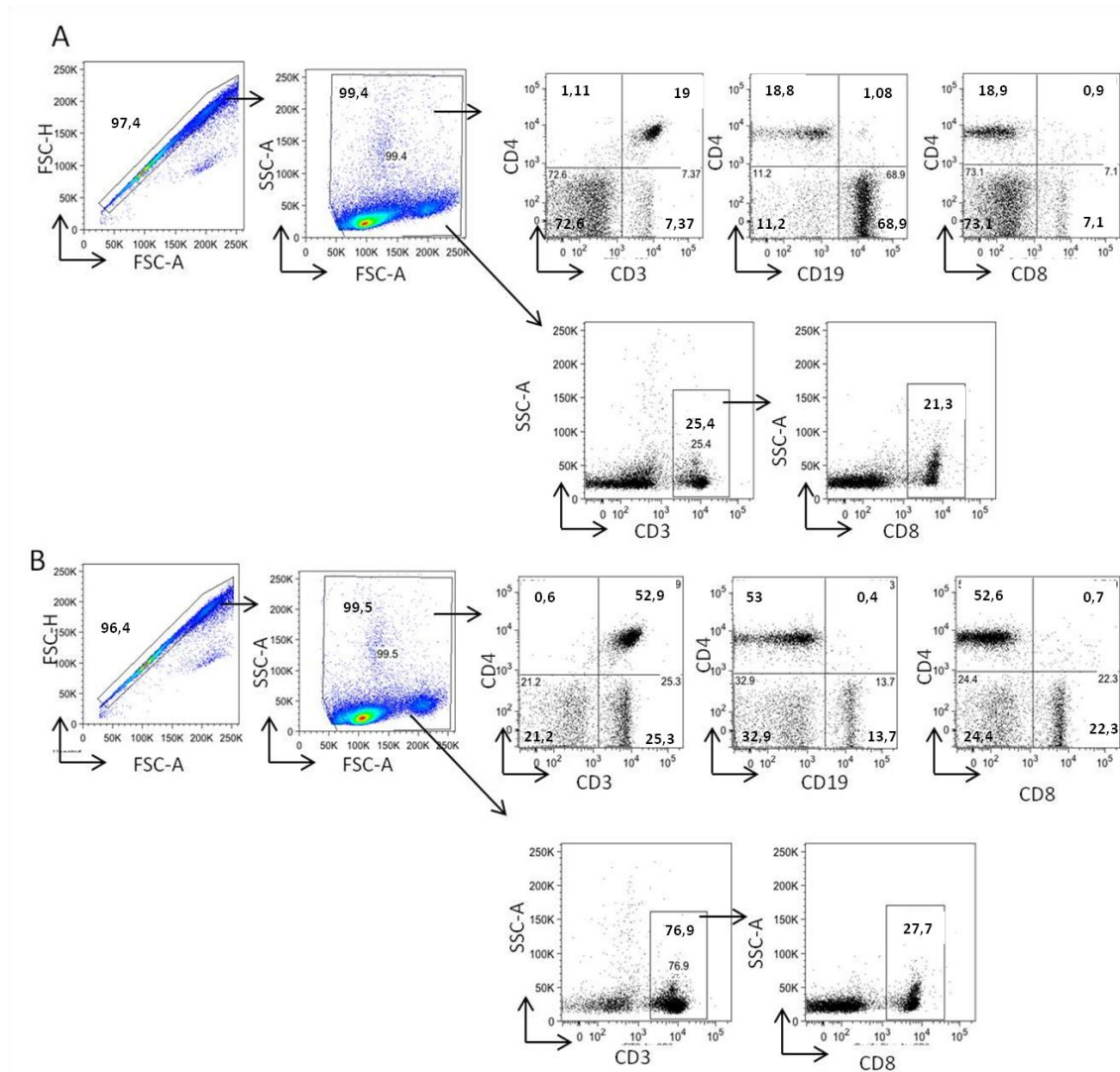
Representação gráfica de hibridomas DO11.10 submetidos ao ensaio de AICD por 18 h, na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/ml) e PGE<sub>2</sub> (1 µM). Experimento realizado em triplicatas. Teste estatístico TWO-WAY ANOVA.  $P < 0,001$  (\*\*\*) ,  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*).

Para termos certeza de que os linfócitos Th1 gerados por nosso protocolo, realmente não foram responsivos ao efeito protetor da PGE<sub>2</sub>, utilizamos células T CD4<sup>+</sup> purificadas para fazer verificar se esses linfócitos expressam os todos ou alguns receptores para este mediador lipídico. Para a obtenção destas células purificadas utilizamos tanto a técnica de cell sorting, precedido de depleção de linfócitos B por lâ de nylon, quanto kit comercial de separação celular. Primeiramente, realizamos enriquecimento de linfócitos T pela coluna de lâ de nylon, como descrito em Material e Métodos, a partir de células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem.

Na figura 13A, a qual representa células esplênicas antes de serem submetidas ao protocolo de lâ de nylon, observamos que a frequência de células T CD4<sup>+</sup> de 19%, 68% de linfócitos B e 21% de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Na figura 13B, vimos a fenotipagem das células após purificação em coluna de Nylon e observamos que houve enriquecimento. Passamos a ter uma população CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> de cerca de 53%, linfócitos T CD8<sup>+</sup> tiveram sua frequência sutilmente aumentada para 27% e linfócitos B diminuíram para, aproximadamente, 13%, evidenciando que houve um eficiente enriquecimento de

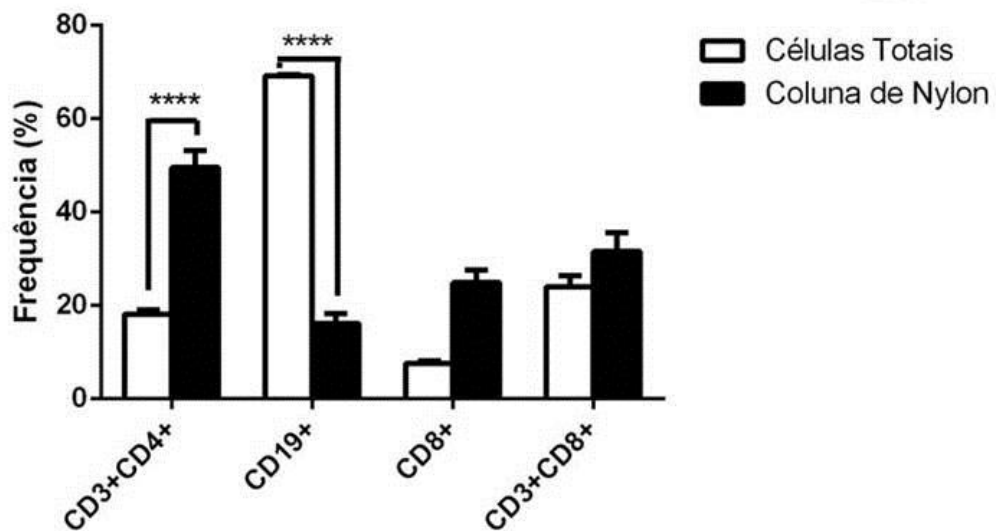
linfócitos T. Na figura 14, observamos a representação gráfica deste experimento que mostram que houve significância estatística no enriquecimento de linfócitos T.

**Figura 13** - Enriquecimento de linfócitos T pelo método da coluna de lã de nylon.



Células esplênicas totais de camundongo C57Bl/6 selvagem submetidas ao ensaio de depleção de linfócitos B pelo método da coluna de lã de Nylon. **A.** Fenotipagem de células antes do ensaio de coluna de lã de Nylon. **B.** Fenotipagem de células após ensaio de coluna de lã de Nylon. Experimento realizado em triplicatas.

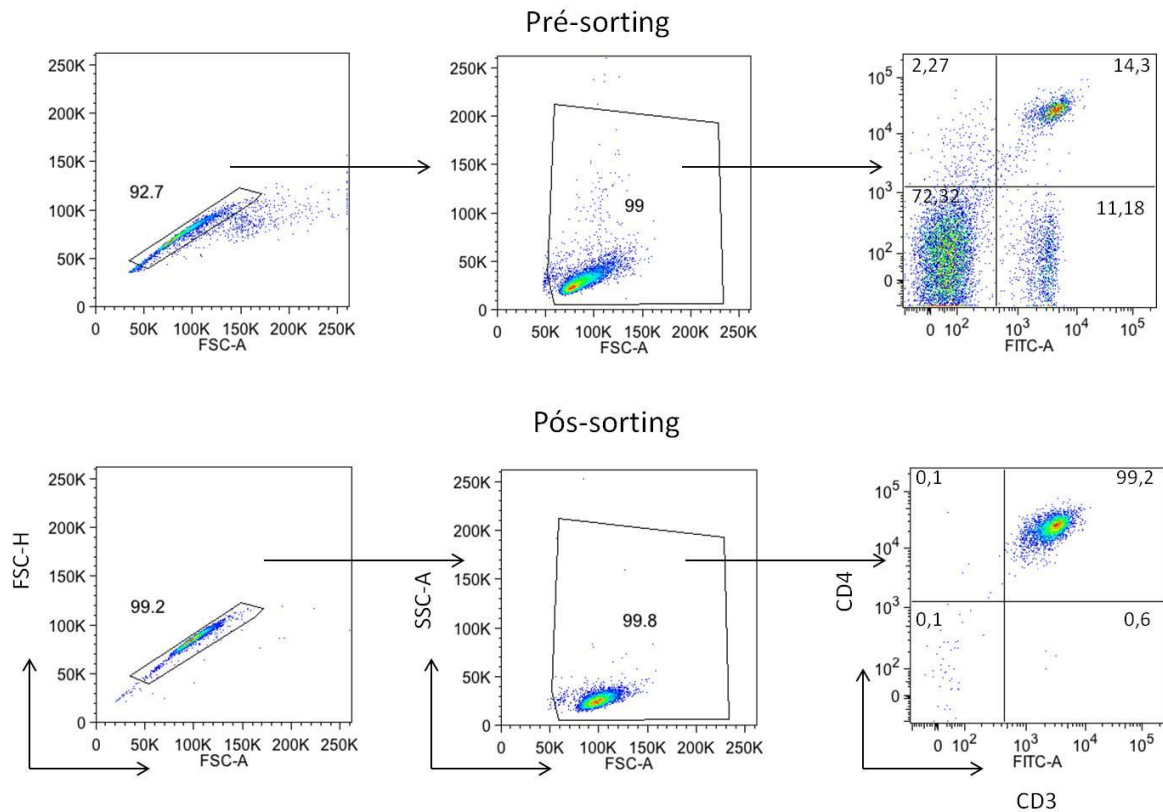
**Figura 14** - Enriquecimento de linfócitos T pelo método da coluna de lã de nylon.



Representação gráfica da fenotipagem de células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem submetidas ao ensaio de depleção de linfócitos B pelo método da coluna de lã de Nylon. Teste estatístico TWO-WAY ANOVA  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Uma vez que conseguimos enriquecer a população de linfócitos T, prosseguimos para a realização do *cell sorting*, no qual fizemos marcação para CD3 e CD4 e separamos a população duplo-positiva para estas moléculas. A Figura 15 mostra a eficiência da separação pós-sorting, passando de 14% para 99,2% de pureza.

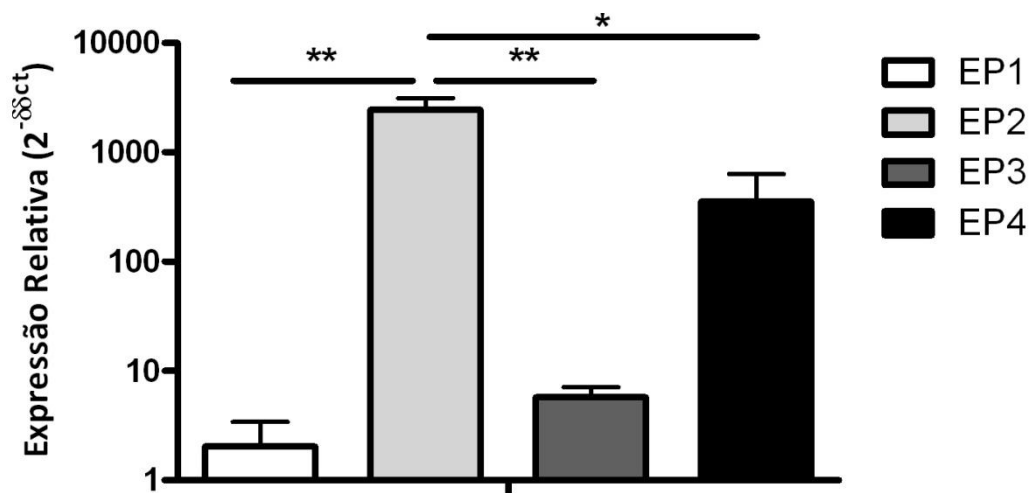
**Figura 15** - Purificação de células  $CD3^+CD4^+$ , a partir de células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem, por *cell sorting*.



Células esplênicas de camundongos C57Bl/6 selvagens marcadas para as moléculas CD3 e CD4, submetidas à técnica de separação celular por citometria de fluxo em aparelho FACS Aria III.

Ao purificar estas células, as submetemos ao ensaio de diferenciação para Th1, investigamos a expressão de receptores de  $PGE_2$ , ao nível gênico, por qPCR, para nos certificarmos que células Th1 não respondem mais à proteção do mediador lipídico, provavelmente por seu estágio de desenvolvimento e não por ausência de expressão de EPs. Isso é confirmado pela figura 16, que mostra que os receptores mais expressos são EP2 e EP4, seguidos de EP3 e EP1, dando suporte à ideia de que a falta de responsividade não se deve a uma ausência de expressão de receptores EPs.

**Figura 16** - Expressão gênica de receptores de PGE<sub>2</sub> em linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados.

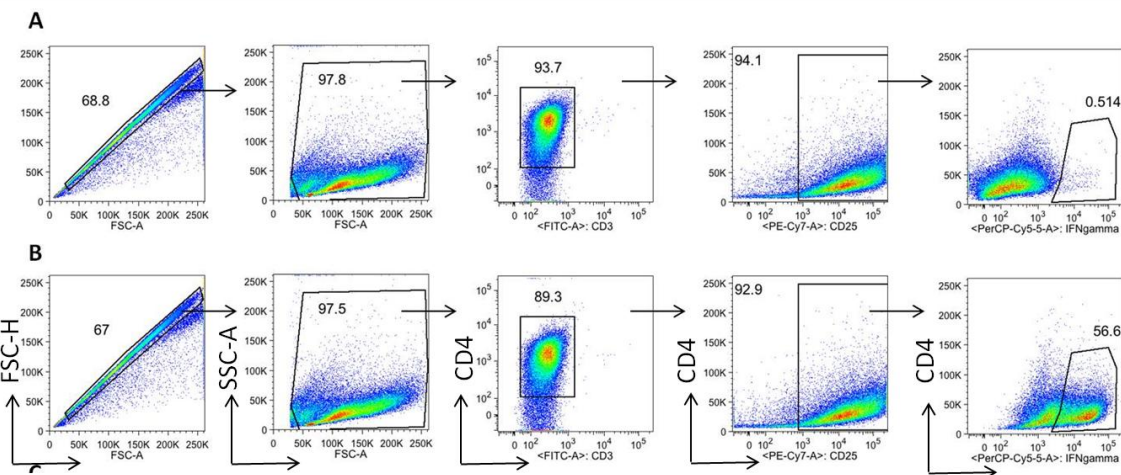


Linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados submetidos ao ensaio de diferenciação *in vitro* para subpopulação Th1, na presença de anti-CD3 adsorvido em placa, anti-CD28 solúvel e IL-12. Expressão relativa de EP1, EP2, EP3 e EP4, em relação ao *housekeeping* gapdh. Experimento realizado em triplicatas. Teste estatístico TWO-WAY ANOVA.  $P < 0,01$  (\*\*) e  $P < 0,05$  (\*).

Com linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados por kit comercial, realizamos ensaio de diferenciação *in vitro* para Th1, nas mesmas condições descritas anteriormente, porém com uma concentração de menor de IL-2 (20 U/ml), pois observamos que colocar 100 U/ml, resultou na morte de quase totalidade dos linfócitos. Isso sugere que a IL-2 produzida por estes linfócitos purificados, como não está sendo consumida por outros tipos celulares, não necessita do auxílio de uma concentração grande de IL-2 exógena. Na figura 17, observamos que conseguimos obter uma população de mais de 55% produtora de IFN- $\gamma$  dentro da população CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.



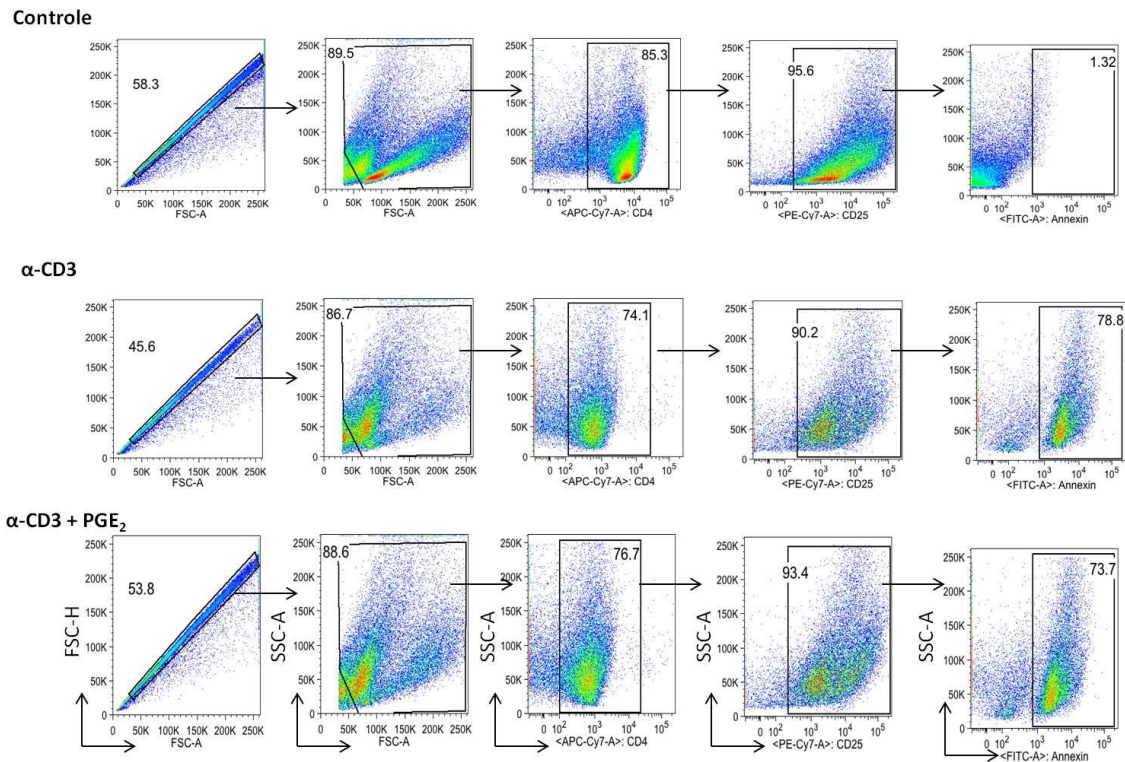
**Figura 17** - Diferenciação Th1 a partir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados.



Linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados, submetidos ao ensaio de diferenciação *in vitro* para subpopulação Th1, na presença de anti-CD3 (1 µg/ml) adsorvido em placa, anti-CD28 (1 µg/ml) solúvel e IL-12 (10 ng/ml). **A** Células não estimuladas com PMA/ionomicina e Brefeldina A. **B** Células estimuladas com PMA, ionomicina por 4h e Brefeldina A, nas últimas 2 h de tratamento. Experimento realizado em triplicatas.

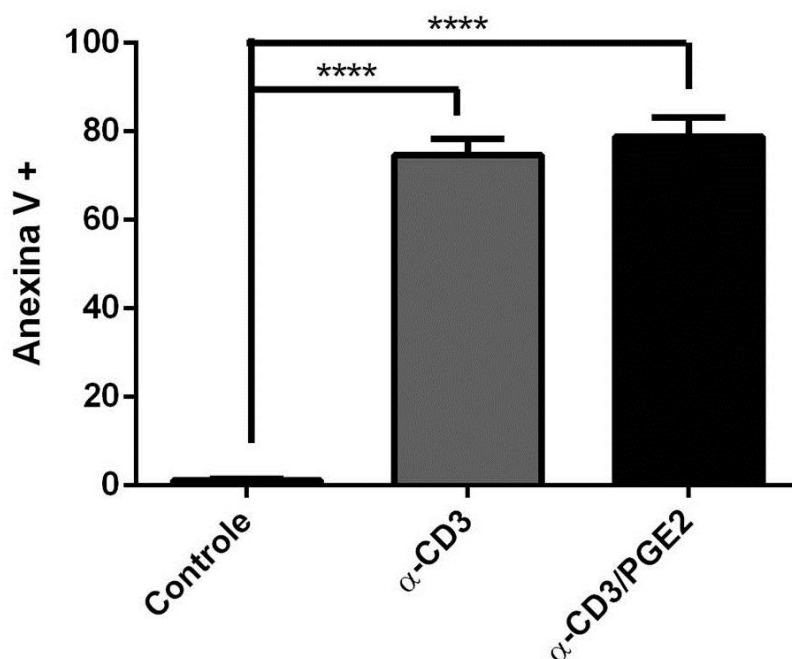
Uma vez que estas células purificadas foram polarizadas para Th1, finalmente realizamos experimento de indução de morte por 18 h com anti-CD3 e PGE<sub>2</sub>. Por uma limitação de rendimento de células obtidas após purificação com kit, neste experimento submetemos as células a apenas três condições: controle, anti-CD3 e anti-CD3 com adição de PGE2 a 1 µM, como mostram as figuras 18 e 19:

**Figura 18** - Indução de AICD em células Th1 na presença ou não de PGE<sub>2</sub>.



Linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados a partir de células esplênicas de camundongo C57Bl/6 selvagem, submetidos à condição de diferenciação Th1 por 4 dias e, posteriormente, reestimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa, por 18 h. Gráficos pseudocolor de amostras não tratadas com anti-CD3 (Controle), amostras tratadas com anti-CD3 e amostras tratadas com anti-CD3 na presença de PGE<sub>2</sub>.

**Figura 19** - Indução de AICD em células Th1 na presença ou não de PGE<sub>2</sub>.



Representação gráfica das triplicatas de amostras nas três diferentes condições do experimento. Os valores obtidos no Controle apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação às outras condições, enquanto não houve diferenças estatísticas significativas entre os gráficos de anti-CD3 e anti-CD3/PGE<sub>2</sub>. ONE-WAY ANOVA.  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Observamos que, assim como as células Th1 obtidas a partir de células esplênicas totais, as células Th1 obtidas a partir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados, também não sofreram proteção pela PGE<sub>2</sub>, reforçando o dado encontrado em nossos experimentos que sugerem que a célula Th1 por já se encontrar em um estágio avançado de desenvolvimento, pode não ser mais uma vantagem que sejam resgatadas da morte e devam cumprir seu ciclo biológico com retração clonal, evitando assim, possíveis quadros de autoimunidade.

## 5 DISCUSSÃO

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, seguramente, podem ser considerados as células centrais do Sistema Imunológico, pois, quando ativados e diferenciados, podem modular as respostas imunológicas contra os mais diversos tipos de patógenos e lesões que acometem a normalidade do nosso organismo. Porém, para que sejam adequadamente ativados, estes linfócitos precisam de dois sinais: 1) O complexo TCR precisa reconhecer um peptídeo antigênico associado a uma molécula de MHC de classe II e; 2) Sinais coestimuladores de moléculas CD28 presentes em linfócitos T que se ligam às moléculas CD80 e CD86 expressas em APCs (BOISE et al., 1995; YOKOSUKA et al., 2008).

Em nossos protocolos, utilizamos um anticorpo anti-CD3 que é um estímulo direto ao complexo TCR na ausência de uma apresentação antigênica, acompanhado do estímulo de um anticorpo anti-CD28 para o segundo sinal coestimulador (SHARPE; FREEMAN, 2002). A principal função da co-estimulação do CD28 é aumentar e sustentar as respostas das células T iniciadas pela sinalização do antígeno aumentando a produção de citocinas, principalmente o fator de crescimento autócrino da célula T, a IL-2, através do aumento da transcrição e estabilização de seu RNA mensageiro, fazendo com que as células T entrem no ciclo celular (MUKHERJEE et al., 2006).

Boise et al (1995), sugeriram que a co-estimulação pelo CD28 pode promover estímulos intrínsecos que podem aumentar a sobrevivência das células T ativadas, não apenas pelo aumento da produção de IL-2, mas pela super-regulação da expressão do fator de sobrevivência celular Bcl-X<sub>L</sub> e pela indução da expressão do gene que codifica outra molécula anti-apoptótica, Bcl-2, sendo que o pico da expressão do Bcl-X<sub>L</sub> coincide com o pico da resistência a sinais endógenos de morte induzidos por FAS. Além disso, a expressão de ambos os fatores, extrínseco (IL-2) e intrínseco (Bcl-X<sub>L</sub>) podem ter um importante papel garantindo a sobrevivência inicial das células T ativadas pelo TCR.

Discute-se, também, que a presença das citocinas no microambiente funcionaria como um terceiro sinal de ativação para essas células T CD4<sup>+</sup>. Terceiro sinal ou não de ativação, é notório que a presença das mais variadas citocinas no microambiente de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> é importantíssima para determinar o

padrão para o qual estas células polarizarão, respondendo assim, da forma mais adequada aos desafios do sistema imunológico (O'GARRA, 1998). Utilizando células esplênicas totais ou linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados, os estimulamos com anti-CD3 e anti-CD28 e adicionamos IL-12 à cultura. Quando, no momento da apresentação antigênica, houver elevados níveis de IL-12, geralmente liberada pelas APCs após o reconhecimento de um patógeno intracelular, induz a expressão de STAT4. Em conjunto com a expressão de STAT4 e STAT1, há uma indução da expressão do fator de transcrição T-bet, que culmina na diferenciação para o tipo Th1. Por sua vez, estas células secretam IFN- $\gamma$  e IL-2, responsáveis pela manutenção da expressão de IFN- $\gamma$  e proliferação da população linfocitária ativada. Estas células, então, passam a exercer suas funções efetoras, predominantemente, pró-inflamatórias, comumente associadas ao combate a patógenos intracelulares (KOCH et al., 2009).

A IL-2 é um importante fator de sobrevivência para que linfócitos T ativados atinjam todos os seus estágios de desenvolvimento, porém a exposição recorrente a esta citocina também é capaz de sensibilizar ao processo de apoptose, aumentando os níveis celulares de FASL e do receptor FAS, utilizamos uma concentração baixa de IL-2 (20 U/ml) para verificamos se a adição desta citocina em nossos ensaios de indução de AICD seria necessária para proteger as células controle da morte espontânea, ao mesmo que tempo que não induzisse por si a AICD, como já foi descrito anteriormente (LENARDO, 1991). Vimos que não houve alterações quando comparamos células sem tratamento com anti-CD3 e IL-2 com as células que foram induzidas à apoptose. Como utilizamos uma concentração relativamente baixa, de 20 U/ml em uma cultura com células esplênicas totais, a IL-2 pode ter sido consumida por outros tipos celulares.

Após determinarmos que IL-2 seria utilizada apenas nos ensaios de diferenciação Th1, porém não em ensaios de morte, foi dado prosseguimento à polarização para este perfil, inicialmente, utilizando células esplênicas totais, com intuito de mimetizar um microambiente que mais se assemelhasse ao que ocorre no organismo do camundongo. Conseguimos obter cerca de 40-50% de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , ressaltando que incluímos na análise células positivas para CD25, que é a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, cuja expressão induzida pela ativação destas células, aumenta de afinidade do receptor à citocina, garantindo assim que considerássemos apenas células ativadas que produzem IFN- $\gamma$ .

Uma vez polarizadas, induzimos morte nestas células com tratamento com anti-CD3, na presença ou não de PGE<sub>2</sub> e, de forma surpreendente, vimos que estas células Th1 não foram protegidas de morte celular pelo mediador lipídico, um efeito contrário ao observado em linfócitos Th0, portanto indiferenciados. Nosso grupo de pesquisa (WEINLICH et al., 2008) mostrou que hibridomas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> DO11.10, os quais possuem seu TCR específico para peptídeo de ovalbumina, portanto possuem o TCR pré-ativado, mas provavelmente ainda devem se encontrar em estágios mais precoces de ativação, a proteção pela PGE<sub>2</sub> seria necessária para o aumento da sobrevivência destas células para que pudessem se diferenciar em linfócitos auxiliares efetores.

Outra possibilidade que precisava ser averiguada era se esses linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes dos camundongos C57Bl/6 selvagem expressavam receptores para PGE<sub>2</sub> (EPs). Existem quatro EPs (1-4) e podem ser distintos pelas funções quando entram em contato com seu ligante. Geralmente, as vias de sinalização desencadeadas pela ativação de EPs estão sob o controle do segundo mensageiro AMPc (NARUMIYA, 2009). EP2 e EP4 estão relacionados com o aumento de níveis de AMPc (YAO et al., 2009). Weinlich et al. (2008) observaram que em hibridomas DO11.10 tratados com forskolina, um ativador direto da AC, inibia AICD, sugerindo que os receptores envolvidos nesta proteção era EP2 e EP4, propondo que, provavelmente, a PGE<sub>2</sub> produzida por APCs ativadas por LPS, agia em linfócitos T CD4<sup>+</sup> através de seus receptores EP2 e EP4, aumentando os níveis de AMPc, inibindo assim, a expressão de FASL com consequente proteção de morte celular.

Para que pudéssemos inferir isto sobre nossas células, primeiramente realizamos a purificação para que tivéssemos certeza de avaliar apenas os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e observamos que, em nível gênico, nossas células expressam em maior quantidade EP2 e EP4 e, em menor quantidade EP1 e EP3. Com isso, seria esperado que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados e polarizados para Th1 apresentassem uma proteção da AICD pela PGE<sub>2</sub>, porém, assim como células Th1 geradas a partir de células esplênicas totais, não foi observado o efeito protetor exercido pelo mediador lipídico, sendo este resultado validado pelo uso de células DO11.10 como controle positivo para o ensaio de AICD. Nossos resultados sugerem que células Th1, sejam originadas de células esplênicas totais ou de linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados, mesmo expressando receptores para PGE<sub>2</sub>, já não respondem ao seu efeito de inibição de morte celular.

Estes dados revelam que as células Th1 são extremamente suscetíveis à morte celular induzida por ativação, sugerindo que estas células, por já se encontrarem diferenciadas e exercendo suas funções efetoras, não seria interessante que houvesse uma proteção por parte da PGE<sub>2</sub>.

É notório que células Th1 são mais suscetíveis à morte por apoptose, isto pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela produção de IFN- $\gamma$  por estas células, citocina esta que é associada à modulação da morte celular induzida por ativação (REFAELI et al., 2002) e poderia estar se sobrepondo à ação protetora da PGE<sub>2</sub>. Fang et al. (2010), fizeram um trabalho comparativo de morte entre Th1, Th2 e Th17 induzidas ao processo de AICD, assim como realizado neste estudo, por estímulo com anti-CD3, as células Th1 foram as que apresentaram a maior taxa de morte celular em relação às duas outras subpopulações de linfócitos T auxiliares. Em estudo recentemente publicado, foi mostrado que células Th1 provenientes linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados de camundongos da linhagem Balb/c e da linhagem C3H/OuJ também não são protegidas do processo de morte celular, dando suporte aos resultados que obtivemos (KAUL et al., 2012). Um estudo publicado em 2011, por Tan et al., comparando suscetibilidade à AICD entre células Th1 e Th17, mostrou que células Th1 são mais sensíveis à morte, pois apresentam uma expressão maior de ligantes de receptores de morte como FASL e TRAIL e de moléculas pró-apoptóticas como BAK e BAX, o que poderia ser o caso das células obtidas em nosso estudo, porém seriam necessários experimentos adicionais para confirmar a hipótese.

## 6 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados, em conjunto com outros dados da literatura, mostraram que células Th1 provenientes de camundongos C57Bl/6 selvagem, além de serem notavelmente sensíveis à morte celular, quando reestimuladas via TCR. Na presença de PGE<sub>2</sub>, ao contrário do que já foi observado por nosso grupo de pesquisa em hibridomas DO11.10, as células Th1 geradas a partir de células esplênicas totais e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> não são protegidas do processo de morte celular induzida por ativação, apesar de expressarem receptores para este mediador lipídico, sugerindo que por estas células encontrarem-se em um estágio avançado de diferenciação, já não poderiam mais ser resgatadas do seu destino de retração clonal.



## REFERÊNCIAS\*

AFKARIAN, M.; SEDY, J. R.; YANG, J.; JACOBSON, N. G.; CEREB, N.; YANG, S. Y.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4<sup>+</sup> T cells. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 549-557, 2002.

AKDIS, M.; PALOMARES, O.; VAN DE VEEN, W.; VAN SPLUNTER, M.; AKDIS, C. A. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 129, n. 6, p. 1438-1449, 2012.

ALFRANCA, A.; INIGUEZ, M. A.; FRESNO, M.; REDONDO, J. M. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. **Cardiovasc. Res.**, v. 70, p. 446–456, 2006.

ANDREWS, B. S., EISENBERG, R. A., THEOFILOPOULOS, A. N.; IZUI, S.; WILSON, C. B.; MCCONAHEY, P. J.; MURPHY, E. D.; ROTHS, J. B.; DIXON, F. J. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. **J. Exp. Med.**, v. 148, p. 1198-1215, 1978.

BETTELLI, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235–238, 2006.

BOISE, L. H.; MINN, A. J.; NOEL, P. J.; JUNE, C. H.; ACCAVITTI, M. A.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C. B. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-X<sub>L</sub>. **Immunity**, v. 3, p. 87-98, 1995.

BRECHT, K.; WEIGER, A.; HU, J.; POPP, R.; FISSLTHALER, B.; KORFF, T.; FLEMING, I.; GEISLINGER, G; BRÜNE, B. Macrophages programmed by apoptotic cells promote angiogenesis via prostaglandin E<sub>2</sub>. **FASEB J.**, v. 25, p. 2408-2417, 2011.

BRUNNER, T.; MOGIL, R. J.; LAFACE, D.; YOO, N. J.; MAHBOUBI, A.; ECHEVERRI, F.; MARTIN, S. J.; FORCE, W. R.; LYNCH, D. H.; WARE, C. F. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 441-444, 1995.

BUDIARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BURCHILL, M. A.; YANG, J.; VOGTENHUBER, C.; BLAZAR, B. R.; FARRAR, M. A. IL-2 receptor  $\beta$ -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3 regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 280–290, 2007.

CECERE, T. E.; TODD, S. M.; LEROITH, T. Regulatory T cells in arterivirus and coronavirus infections: do they protect against disease or enhance it? **Viruses**, v. 4, n. 5, p. 833-846, 2012.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHEMNITZ, J. M.; DRIESEN, J.; CLASSEN, S.; RILEY, J. L.; DEBEY, S.; BEYER, M.; POPOV, A.; ZANDER, T.; SCHULTZE, J. L. Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of I $\kappa$ B: implications in Hodgkin's lymphoma. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 1114-1122, 2006.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875-1886, 2003.

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. **J. Immunol.**, v. 135, n. 2, p. 1172-1179, 1985.

COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus." **Immunol. Today**, v. 12, n. 4, p. 105-110, 1991.

COYLE, A. J.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. **Nature Immunology**, v. 2, p. 203-209, 2001.

DHEIN, J.; WALCZAK, H.; BAUMLER, C.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). **Nature**, v. 373, p. 438-441, 1995.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 383-424, 1999.

FANG, Y.; YU, S.; ELLIS, J. S.; SHARAV, T.; BRALEY-MULLEN, H. Comparison of sensitivity of Th1, Th2, and Th17 cells to Fas-mediated apoptosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 87, p. 1019-1028, 2010.

GOSWAMI, R.; KAPLAN, M. H. Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. **J. Immunol.**, v. 189, n. 6, p. 3026-3033, 2012.

HATHCOCK, K. S. T cell enrichment by nonadherence to nylon. **Curr. Protoc. Immunol.**, cap. 3, u. 3.2, 2001.

HIRAHARA, K.; VAHEDI, G.; GHORESCHI, K.; YANG, X. P.; NAKAYAMADA, S.; KANNO, Y.; O'SHEA, J. J.; LAURENCE, A. Helper t-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. **Immunology**, v. 134, p. 235-245, 2011.

HOTZ, M. A.; GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. Flow cytometric detection of apoptosis: Comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. **Cytometry**, v. 15, p. 237-244, 1994.

HOTZ, M. A.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. Changes in nuclear chromatin related to apoptosis or necrosis induced by the DNA topoisomerase II inhibitor fostriecin in MOLT-4 and HL-60 cells are revealed by altered DNA sensitivity to denaturation. **Exp. Cell Res.**, v. 201, p. 184-191, 1992.

KAUL, V.; VAN KAER, L.; DAS, G.; DAS, J. Prostanoid receptor 2 signaling protects T helper 2 cells from BALB/c mice against activation-induced cell Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25434–25439, 2012.

KAUR, K.; HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; GRAF, B. A., PHIPPS, R. P. Prostaglandin E2 as a modulator of lymphocyte mediated inflammatory and humoral responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 12, n. 469, p. 409-412, 1999.

KOCH, M. A.; TUCKER-HEARD, G.; PERDUE, N. R.; KILLEBREW, J. R.; URDAHL, K. B.; CAMPBELL, D. J. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nat. Immunol.**, v. 10, p. 595-602, 2009.

KRAMMER, P. H.; ARNOLD, R.; LAVRIK, I. N. Life and death in peripheral T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 532–542, 2007.

LAMBRACHT-WASHINGTON, D.; QU, B. X.; FU, M.; ANDERSON, L. D. Jr.; STÜVE, O.; EAGAR, T. N.; ROSENBERG, R. N. DNA immunization against amyloid beta 42 has high potential as safe therapy for Alzheimer's disease as it diminishes antigen-specific Th1 and Th17 cell proliferation. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 31, n. 6, p. 867-874, 2011.

LAVRIK, I. N.; KRAMMER, P. H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 36–41, 2012.

LEE, I. Y.; CHO, W.; KIM, J.; PARK, C. S.; CHOE, J. Human follicular dendritic cells interact with T cells via expression and regulation of cyclooxygenases and prostaglandin E and I synthases. **J. Immunol.**, v. 180, n. 3, p. 1390-1397, 2008.

LEE, S. K.; SILVA, D. G.; MARTIN, J. L.; PRATAMA, A.; HU, X.; CHANG, P. P.; WALTERS, G.; VINUESA, C. G. Interferon- $\gamma$  excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 880-892, 2012.

LENARDO, M. J. Interleukin-2 programs mouse  $\alpha\beta$  T lymphocytes for apoptosis. **Nature**, v. 353, p. 858-861, 1991.

LIAO, W.; LIN, J.; WANG, L.; LI, P.; LEONARD, W. J. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. **Nat. Immunol.**, v. 12, n. 6, p. 551–559, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of the relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MARTINS, G. A.; CIMMINO, L.; LIAO, J. MAGNUSDOTTIR, E.; CALAME, K. Blimp-1 directly represses *il2* and the *il2* activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 1959-1965, 2008.

MONTELEONE, I.; PALLONE, F. Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 2009, p. 1-7, 2009.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MUKHERJEE, S.; AHMED, A.; MALU, S.; NANDI, D. Modulation of cell cycle progression by CTLA4-CD80/CD86 interactions on CD4+ T cells depends on strength of the CD3 signal: critical role for IL-2. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 1, p. 66-74, 2006.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol. Rev.**, v. 79, n. 4, p. 1193-1226, 1999.

NZEAKO, U. C.; GUICCIARDI, M. E.; YOON, J. H.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 552-559, 2002.

O'CONNOR, R. A.; PREDERGAST, C. T.; SABATOS, C. A.; LAU, C. W.; LEECH, M. D.; WRAITH, D. C.; ANDERTON, S. M. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 181, p. 3750-3754, 2008.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, p. 275-283, 1998.

OXENIUS, A.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. CD4+ T cell induction and effector functions: a comparison of immunity against soluble antigens and viral infections. **Advances in Immunology**, v. 70, p. 313-367, 1998.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Today**, v. 12, p. 349-352, 1991.

POPPEMA, S.; MAGGIO, E. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. **Leuk Lymphoma**, v. 45, n. 3, p. 423-431, 2004.

RADVANYI, L. G.; SHI, Y. F.; VAZIRI, H.; RADVANYI, L. G.; SHI, Y. F.; VAZIRI, H.; SHARMA, A.; DHALA, R.; MILLS, G. B.; MILLER, R. G. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1788-1798, 1996.

REFAELI, Y.; VAN PARIJS, L.; ALEXANDER, S. I.; ABBAS, A. K. Interferon [Gamma] is required for activation-induced death of T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 999-1005, 2002.

REFAELI, Y.; VAN PARIJS, L.; LONDON, C. A.; TSCHOPP, J.; ABBAS, A. K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. **Immunity**, v. 8, p. 615-623, 1998.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunology Today**, v. 18, p. 263-267, 1997.

ROTHS, J. B.; MURPHY, E. D.; EICHER, E. M. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. **J. Exp. Med.**, v. 159, p. 1-20, 1984.

SHI, G.; RAMASWAMY, M.; VISTICA, B. P.; COX, C. A.; TAN, C.; WAWROUSEK, E. F.; SIEGEL, R. M.; GERY, I. Unlike Th1, Th17 cells mediate sustained autoimmune inflammation and are highly resistant to restimulation-induced cell death. **The Journal of Immunology**, v.183, p. 7547-7556, 2009.

SILJEHAV, V.; OLSSON-HOFSTETTER, A.; JAKOBSSON, P. J.; HERLENIUS, E. mPGES-1 and prostaglandin E(2): vital role in inflammation, hypoxic response, and survival. **Pediatr. Res.**, v. 72, n. 5, p. 460-467, 2012.

SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. T cell activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 591-619, 2009.

SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, p. 655-669, 2000.

SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; STEMMANN, C.; SATOSKAR, A. R.; SLECKMAN, B. P.; GLIMCHER, L. H. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- $\gamma$  production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, v. 295, p. 338-342, 2002.

TAN, C.; RAMASWAMY, M.; SHI, G.; VISTICA, B. P.; SIEGEL, R. M.; GERY, I. Inflammation-inducing Th1 and Th17 cells differ in their expression patterns of apoptosis-related molecules. **Cellular Immunology**, v. 271, p. 210-213, 2011.

TANIGUCHI, T.; MINAMI, Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. **Cell**, v. 73, p. 5-8, 1993.

VAN PARIJS, L.; REFAELI, Y.; LORD, J. D.; NELSON, B. H.; ABBAS, A. K.; BALTIMORE, D. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. **Immunity**, v. 11, p. 281-288, 1999.

VILLADANGOS, J. A.; PLOEGH, H. L. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? **Immunity**, v. 12, p. 233-239, 2000.

WATSON, M. L.; RAO, J. K.; GILKESON, G. S.; RUIZ, P.; EICHER, E. M.; PISETSKY, D. S.; MATSUZAWA, A.; ROCHELLE, J. M.; SELDIN, M. F. Genetic analysis of MRL-lpr mice:

relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 6, p. 1645-1656, 1992.

WEINLICH, R.; BORTOLUCI, K. R.; CHEHAB, C. F.; SEREZANI, C. H.; ULBRICH, A. G.; PETERS-GOLDEN, M.; RUSSO, M.; AMARANTE-MENDES, G. P. TLR4/MyD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE<sub>2</sub> by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1901-1909, 2008.

WOLF, P. R.; PLOEGH, H. L. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. **Annual Review of Developmental and Cell Biology**, v. 11, p. 267-306, 1995.

YAKAR, I.; MELAMED, R.; SHAKHAR, G.; SHAKHAR, K.; ROSENNE, E.; ABUDARHAM, N.; PAGE, G. G.; BEN-ELIYAHU, S. Prostaglandin E2 suppresses NK activity in vivo and promotes postoperative tumor metastasis in rats. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 10, p. 469-479, 2003.

YAN, M.; MYUNG, S. J.; FINK, S. P.; LAWRENCE, E.; LUTTERBAUGH, J.; YANG, P.; ZHOU, X.; LIU, D.; RERKO, M.; WILLIS, J. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase inactivation as a mechanism of resistance to celecoxib chemoprevention of colon tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 9409- 9413, 2009.

YANG, Y.; OCHANDO, J. C.; BROMBERG, J. S.; DING, Y. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN $\gamma$ /Stat1 signals. **Blood**, v. 110, p. 2494–2500, 2007.

YAO, C.; SAKATA, D.; ESAKI, Y.; LI, Y.; MATSUOKA, T.; KUROIWA, K.; SUGIMOTO, Y. and NARUMIYA, S. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. **Nat. Med.**, v. 15, n. 6, p. 633-640, 2009.

YOKOSUKA, T.; KOBAYASHI, W.; SAKATA-SOGAWA, K.; TAKAMATSU, M.; HASHIMOTO-TANE, A.; DUSTIN, M. L.; TOKUNAGA, M.; SAITO, T. Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters and protein kinase C  $\theta$  translocation. **Immunity**, v. 29, n. 4, p. 589-601, 2008.

ZHENG, S. G.; WANG, J.; WANG, P.; GRAY, J. D.; HORWITZ, D. A. IL-2 is essential for TGF- $\beta$  to convert naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and for expansion of these cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 2018-2027, 2007.

ZHOU, L.; CHONG, M. M. W.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. **Immunity**, v. 30, p. 646-655, 2009.

ZHU, J.; PAUL, W. E. (2010). Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. **Immunol. Rev.**, v. 238, p. 247–262, 2010.