SUSANA LIMA LESSA LÔBO

Avaliação da cinética de expressão *in vitro* de STATs em linfócitos humanos e sua correlação com secreção de citocinas e expressão de seus respectivos receptores

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2014

SUSANA LIMA LESSA LÔBO

Avaliação da cinética de expressão *in vitro* de STATs em linfócitos humanos e sua correlação com secreção de citocinas e expressão de seus respectivos receptores

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lôbo, Susana Lima Lessa

Avaliação da cinética de expressão *in vitro* de STATs em linfócitos humanos e sua correlação com secreção de citocinas e expressão de seus respectivos receptores / Susana Lima Lessa Lôbo. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Linfócitos T 2.Vias de sinalização 3.Fatores de transcrição STAT
4.Citocinas 5.Receptores de citocinas

USP/FM/DBD-374/14

*Dedico aos meus pais,
Valmir e Francisca, que
formaram os fundamentos do
meu caráter e me apontaram os
melhores caminhos da vida.*

*Dirijo minha maior gratidão a **Deus** pelas oportunidades que me foram dadas na vida, e ter vivido fases difíceis, que foram matéria-prima de aprendizado.*

*Aos meus pais, **Valmir e Francisca**, sem os quais não estaria aqui, por terem me fornecido condições para minha formação profissional. Obrigada por serem as minhas referências de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável, mesmo separados por tantos quilômetros.*

*Aos meus irmãos, **Gabriella e Henrique**. Tantos desafios e conquistas compartilhadas, alegrias e tristezas. Mesmo longe vocês fazem parte de todas as conquistas que fiz e farei.*

*A minha linda e amada “dinda” **Rita**, por ser minha inspiração em educar e mudar o mundo e minha família de coração brasiliense, **Família Horn**. Obrigada pelo apoio, carinho, alegria e amor.*

Aos familiares (cunhado, tios, primos) e amigos de perto e de longe, pelo amor e preocupação demonstrados através de ligações, e-mails, visitas e orações. Obrigada, vocês que aliviaram minhas horas difíceis, me alimentando de certezas, força e alegria.

*Ao meu orientador, **Dr. Gil Benard**, por ter me apresentado para pesquisa, pelos ensinamentos, supervisão e orientação neste trabalho.*

*A **Dra. Camila Cacere**, pela paciência de ensinar conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão desta dissertação. E a **Dra. Maria de Lourdes** por toda força, conselhos e consultas.*

*A minhas queridas amigas **Juliana Cristina, Carol Freggini e Andressa Vaz**, por toda a amizade e proporcionar momentos familiares inesquecíveis.*

*As grandes amizades conquistadas no LIM-56, **Adriana Ladeira, Thiago Bezerra, Liã Bárbara, Luanda, Rosana e Alana Dias**, pelos bons momentos juntos e alegria na rotina de experimentos e estudo.*

*Aos meus queridos “Correias”, **Juliana Pisok, Priscila Benevides, Juliana Ruiz, Grazielle Santana e Bruno Vinícius**. Por tornar minha saudade de casa um pouco menor com todo carinho e amizade dedicados a mim. A amizade e alegria de vocês proporcionam momentos inesquecíveis e únicos.*

As amigas **Karine** e **Nathália Moreira** pelo carinho, amizade, conselhos e discussões científicas.

Aos **doadores** que colaboraram com nosso estudo.

Ao **Prof. e Dr. Alberto José da Silva Duarte** pelo acolhimento e oportunidade de realizar meu Aprimoramento no LIM-56.

Ao grupo **Alunos Gil**, por toda troca de conhecimentos.

A **Noêmia Orij, Rosângela, Patrícia e Soraya** pelos valiosos ensinamentos, atenção e paciência em citometria de fluxo e cultura celular, pelas conversas, conselhos e carinho nos momentos tão difíceis de ausência familiar.

Ao **LIM-56**, ao **HC-FMUSP** e a **CAPES**, pelo auxílio técnico e financeiro.

A todos do **LIM-56**, pós-graduandos, técnicos, secretaria, informática, almoxarifado e limpeza e todos do Departamento de Dermatologia.

A banca do exame de qualificação, Profa. Dra. Maria Sato, Dr. Cyro Alves de Brito e Dra. Carolina Luque pelas correções e orientações para a conclusão desse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, fizeram parte desta fase paulista da minha vida e contribuíram para tornar a distância da família um pouco menor, os meus sinceros agradecimentos.

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptada de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

	Páginas
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Via de sinalização JAK-STAT.....	4
1.2 STAT 1, 3, 4, 5 e 6 e suas principais citocinas de ativação.	8
1.3 Regulação de STATs.....	11
1.4 Correlação de STATs e algumas doenças.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
3. CASUÍSTICA.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico.....	19
4.2 Cultura celular e obtenção de sobrenadantes de culturas após estímulo <i>in vitro</i> com mitógenos e antígenos.....	19
4.3 Detecção de STATs 1, 3, 4, 5 e 6 por citometria de fluxo.....	20
4.4 Detecção dos receptores de citocinas.....	21
4.5 Determinação de citocinas (<i>Cytometric Bead Array – CBA</i>)	21
4.6 Estratégias de análise dos resultados obtidos por aquisição em citômetro de fluxo.....	22
4.6.1 Controle de Qualidade da aquisição dos dados.....	22
4.6.2 Análise da cinética de expressão de STATs em células com e sem estímulo de PHA e CMV.....	23
4.6.3 Análise da cinética de expressão dos receptores de citocina.....	26
4.7 Estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Definição dos tempos de cultivo celular para cada estímulo.....	29
5.2 Cinética de expressão de células CD3+/CD69+.....	32

5.3 Análise <i>in vitro</i> da expressão intracelular de pSTATs.....	35
5.4 Análise da expressão <i>in vitro</i> dos receptores de citocinas.....	39
5.5 Produção <i>in vitro</i> de citocinas estimuladas com mitógeno e antígeno.	43
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	57
8. ANEXOS.....	60
ANEXO A – Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP.....	60
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	61
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor igual que
≥	Maior igual que
=	Igual
mL	Mililitro
μL	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
CMN	Células mononucleares
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	Estados Unidos da América
GAS	Sítio de gama ativado
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GM-CSFR	Receptor de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Vírus linfotrópico da célula humana
IFN	Interferon
IL	Interleucina
KDa	Kilo Dalton
LCT	Linfócitos T
MFI	Média do Índice de Fluorescência
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PE	R-Phycoerythrin
PercP	Peridinin chlorophyll protein
PMN	Células Polimorfonucleares
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SAB	Soro Albumina Bovina
SFB	Soro fetal bovino
Th	Células T auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estratégia de análise de citometria de fluxo no software FlowJo.....	23
Figura 2.	Demonstrativo de estratégia de análise das CMNs cultivadas por 24 horas, marcadas e adquiridas por citometria de fluxo.....	25
Figura 3.	Demonstrativo de estratégia de análise para obtenção dos valores de porcentagem de células anti-CD3PE-Cy5+/ anti-CD69APC-Cy7+/ antiSTAT1 AlexaFluor488+.....	26
Figura 4.	Demonstrativo de estratégia de análise dos receptores de citocinas	27
Figura 5.	Demonstrativo de uma cinética de expressão de células sem e com estímulo de PHA marcadas com anti-CD69 APC-Cy7 e anti-STAT1 Alexa Fluor 488.....	30
Figura 6.	Demonstrativo de uma cinética de expressão de células sem e com estímulo de CMV marcadas com anti-CD69 APC-Cy7 e anti-STAT1 Alexa Fluor 488.....	31
Figura 7.	Avaliação por citometria de fluxo da capacidade de expressão de CD69 em células estimuladas com PHA.....	32
Figura 8.	Avaliação por citometria de fluxo da capacidade de expressão de CD69 em células estimuladas com CMV.....	33
Figura 9.	Expressão da molécula anti-CD69 APC-Cy7 de células sem e com estímulo de PHA e CMV.....	34
Figura 10.	Mediana e percentis 25-75% da porcentagem de linfócitos T CD3+, CD69+ e anti-pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6 pós estímulo de PHA nos tempos de 4, 12, 24 e 36 horas.....	36
Figura 11.	Mediana e percentis 25-75% da porcentagem de linfócitos T CD3+, CD69+ e anti-pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6 pós estímulo de CMV nos tempos de 3, 4, 5 e 6 dias.....	38
Figura 12.	Expressão dos receptores de citocinas estimuladas com PHA.....	40
Figura 13.	Expressão dos receptores de citocinas estimuladas com CMV.....	42

Figura 14.	Determinação de citocinas IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-12 em CMNs estimuladas com PHA.	44
Figura 15.	Determinação de citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-6 em CMNs estimuladas com CMV.	46

LÔBO, S. L. L. **Avaliação da cinética de expressão *in vitro* de STATs em linfócitos humanos e sua correlação com secreção de citocinas e expressão de seus respectivos receptores.** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A modulação da resposta imune em muitas situações clínicas persiste como um dos problemas mais desafiadores em imunologia. Citocinas são fundamentais para esta regulação e são amplamente estudadas. Após a ligação com receptores específicos na superfície das células alvo, uma das principais vias de sinalização é o sistema JAKs/STATs. No entanto, em contraste com as citocinas, não existem estudos detalhados sobre a cinética expressão intracelulares de STAT *in vitro*. **Objetivo:** Determinar por citometria de fluxo, a cinética expressão de proteínas STAT 1, 3, 4, 5 e 6 fosforiladas, a produção de citocinas associadas e expressão de seus receptores em PBMC humanas estimuladas *in vitro* com fito-hemaglutinina (PHA) e antígeno de citomegalovírus (CMV). **Metodologia:** Foram avaliados CMNs de 23 doadores saudáveis em relação à cinética de expressão STATs (12 doadores estimulados com PHA e 11 estimulados com CMV), secreção de citocinas e expressão de seus receptores. **Resultados:** Em células estimulada com PHA e CMV, pSTAT1 e 6 tiveram sua expressão aumentada precocemente (4h e três dias, respectivamente). pSTAT3 teve sua expressão aumentada em momentos posteriores (respectivamente 36h e 6 dias). A indução de expressão de pSTAT4 e 5 foi observada nos tempos mais tardios da cinética em células estimuladas com PHA (24-36h), enquanto observamos constante baixo nível de expressão em todos os tempos analisados em células estimuladas com CMV. No que diz respeito à secreção de citocinas em células estimuladas com PHA, níveis maiores de IL-6, IL-10 e IL-4 foram detectados a partir de 12h, enquanto aumento da secreção de IFN- γ e IL-2 ocorreu a partir de 24h. Com CMV, apenas IL-6 mostrou um aumento da secreção nos dias 4 e 6. Os receptores de citocinas CD119 (IFN-g), CD126 (IL-6), CD210 (IL-10), CD212 (IL-12), CD25 (IL -2) e CD124 (IL-4) tiveram um aumento da expressão após 24-36h de estimulação com PHA. Com estímulo de CMV, CD126, CD212, CD25, também aumentaram a expressão em tempos tardios (5-6 dias), enquanto os outros receptores mantiveram níveis baixos de expressão em todos os momentos estudados. **Discussão:** Houve uma correlação entre a cinética de expressão de pSTAT3 e 5, e a cinética das citocinas associadas e de seus receptores (IL-6 / CD126, IL-10 / CD210 e IL-2 / CD25). A cinética de expressão de pSTAT4 se correlacionou com a expressão de CD212. (IL-12p70 não foi detectada no presente estudo). Entretanto a expressão de pSTAT1 e 6 precedeu à de IFN- γ / CD119 e IL-4 / CD124. **Conclusão:** A determinação da cinética de expressão pSTAT *in vitro* pode contribuir para a compreensão da regulação da resposta imune a patógenos distintos e, potencialmente, ajudar no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos bem como de novas estratégias destinadas a modular as vias de sinalização em diversas condições clínicas associadas à desregulação imunológica.

Descritores: 1)Linfócitos T; 2)Vias de sinalização; 3)Fatores de transcrição; 4)Citocinas; 5) Receptores de citocinas.

LÔBO, S. L. L. **Kinetics of the *in vitro* expression of STATs in human lymphocytes and their correlation with cytokine secretion and receptor expression.** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction: Modulation of immune responses in many clinical situations persists as one of the most challenging issues in immunology. Cytokines are fundamental to this regulation and have already been extensively studied. After binding with its specific receptors on the surface of the target cells, the main signaling pathway is the JAKs/STATs system. However, in contrast to cytokines, there are no detailed studies on the *in vitro* intracellular expression kinetics of STATs. **Objective:** To determine by flow cytometry the kinetics of phosphorylated STAT1, 3, 4, 5 and 6 proteins expression in human PBMCs *in vitro* stimulated with phytohemagglutinin (PHA) and cytomegalovirus antigen (CMV), and the associated cytokine production and cytokine receptors expression. **Methodology:** We evaluated PBMCs from 23 healthy donors regarding the kinetics of STATs expression (12 donors stimulated with PHA and 11 stimulated with CMV), cytokine secretion and respective receptors expression. **Results:** In PHA and CMV stimulated cells, pSTAT 1 and 6 expression increased early, 4h and 3days respectively). pSTAT3 expression augmented at later times (respectively 36h and 6 days). pSTAT4 and 5 expression were observed late in PHA stimulated cells (24-36h), while there was a constantly low level of expression in all times analyzed. Regarding cytokine release In PHA stimulated cells, IL-6, IL10 and IL-4 secretion started to increase at 12h while IFN- γ and IL-2 increased at 24h. With CMV, only IL-6 showed increased expression at days 4 and 6. The cytokines receptors CD119 (IFN-g), CD126 (IL-6), CD210 (IL-10), CD212 (IL-12), CD25 (IL-2) and CD124 (IL-4) had increased expression at 24-36h with PHA stimulation. With CMV stimulation, CD126, CD212, CD25 also had increased expression at late times (5-6 days) while the other receptors maintained low expression levels at all times. **Discussion:** There was a correlation in between the pSTAT3 and 5 expression kinetics and the associated cytokines and cytokine receptors kinetics (IL-6/CD126, IL-10/CD210 and IL-2/CD25. pSTAT4 expression kinetics correlated with that of CD212 expression (IL-12p70 was not detected in the present study). The higher pSTAT1 and 6 expressions preceded that of IFN- γ /CD119 and IL-4/CD124, respectively. **Conclusion:** Determination of pSTAT expression kinetics *in vitro* can contribute to the understanding of the regulation of immune responses to distinct pathogens and potentially help in the design of new therapeutic targets as well as new strategies aimed at modulating signaling pathways.

Descriptors: 1)T-lymphocytes; 2)Signaling pathway; 3)STAT transcription factors; 4)Cytokines; 5) Cytokines receptors.

Os linfócitos são os principais protagonistas da resposta imune adaptativa, gerando especificidade, memória e são possuidores de grande repertório de receptores. Podem ser subdivididos em populações funcionalmente distintas, ou seja, linfócitos T auxiliares (Th) e os linfócitos T citotóxicos (Tc), caracterizados pela expressão de co-receptores CD4 e CD8, respectivamente. Os linfócitos T auxiliares (T helper), em resposta a estímulos, produzem proteínas solúveis denominadas citocinas e, classicamente, têm sido diferenciados em linfócitos Th1 ou Th2, de acordo com o seu padrão de secreção. Linfócitos Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-2 e TNF- β e estão ligados a uma resposta predominantemente celular, enquanto linfócitos Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão ligados a uma resposta humoral, ativação de linfócitos B e consequente secreção de anticorpos. Algumas citocinas como a IL-3, TNF- α e GM-CSF podem ser secretadas por linfócitos de padrão Th1 e Th2(1, 2).

Outros tipos específicos de linfócitos T auxiliares são descritos como novos alvos de estudos, como Th9, Th17 e T_{reg}. Células Th9 são caracterizados por secretar IL-9 que parece estar envolvida em uma resposta direcionada ao patógeno e resposta imune especializada em contextos de alergias. As células Th17 produzem principalmente as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que expressam o fator de transcrição *orphan nuclear hormone receptor* (ROR γ T). Funcionalmente as células Th17 contribuem para uma resposta inflamatória local pelo recrutamento de neutrófilos e parecem exercer um papel na patogênese das doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (3-5).

Os linfócitos se comunicam com o ambiente por meio de uma variedade de receptores de superfície celular que reconhecem moléculas presentes no ambiente extracelular, gerando sinais intracelulares. A ativação dos linfócitos T é regulada pelos receptores de células T (TCR), através da ligação de antígenos a esses receptores, conduzindo a expressão de diversos

marcadores de superfície celular que são expressos em diferentes fases de ativação celular, como exemplo, o marcador de superfície CD69 (6) que parece ser um dos primeiros marcadores de superfície presentes logo após a ativação dos linfócitos e que pode ser objeto de estudos para se compreender melhor a ativação de linfócitos em diferentes doenças.

Além da indução de moléculas de superfície celular, linfócitos ativados podem induzir a secreção de várias proteínas solúveis do sistema imunológico que exercem ações autócrinas e parácrinas e são capazes de regular as funções dos linfócitos e aspectos de desenvolvimento e diferenciação celular, as citocinas. As citocinas podem exercer seus efeitos através da interação de transdutores de sinal com receptores específicos da superfície celular, governando a diferenciação e proliferação celular e são produzidas por diversos tipos celulares em resposta a microorganismos e outros antígenos (2, 7, 8). Sua base principal para o reconhecimento e definição, é a capacidade de induzir a diferenciação e progressão de diferentes precursores de células específicas do sangue (9). São classificadas por similaridade estrutural em três principais classes: hematopoietinas (classe I – IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF), interferons (classe II – IFN- α , IFN- β e IFN- γ) e família TNF (TNF- α , TNF- β , LT- β , FasL [CD178] e CD40L [CD154]), sendo que algumas citocinas não são classificadas em nenhuma das famílias (p. ex. TGF- β , IL-10, IL-12 e IL-18).

O efeito desses polipetídeos de sinalização extracelular se dá após a ligação aos seus receptores transmembranares específicos ou complexos de receptores expressos na superfície da célula alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula, mediada por vias de sinalização celular, ou seja, uma comunicação do exterior com o interior celular e indução de produtos da sinalização intracelular, que reconhecidos, trabalham na reprogramação ou alteração nas vias de expressão gênica da célula alvo.

Esta comunicação intracelular acontece através de uma variedade de receptores de citocinas, convertendo os sinais extracelulares em diversas respostas bioquímicas intracelulares, através de proteínas que interagem entre si em variadas vias de sinalização intracelular. Após a ligação do ligante no receptor de citocina, iniciam-se diferentes atividades enzimáticas determinantes para o caráter específico da resposta, sendo as proteíno-quinases mais comumente vistas nesta atividade (10). Essas enzimas catalisam ligações covalentes de fosfato a uma proteína e ativam outras moléculas de sinalização dentro da célula.

Muitos receptores tem essa capacidade de fosforilação tirosino-quinase intrínseca na porção citoplasmática, mas outros não possuem essa capacidade intrínseca própria de tirosino-quinase, sendo necessários receptores de citocinas citoplasmáticos associados. No entanto, as duas classes de receptores são capazes de dimerizar ou agregar moléculas receptoras individuais, fosforilando sua região caudal ou da proteína associada e iniciam o sinal intracelular.

Associando os linfócitos, receptores de citocinas e as vias de sinalização, nosso estudo vem avaliar o mecanismo de transdução de sinal por meio de receptores de citocina em resposta a um antígeno, usando a via de sinalização JAK-STAT como mediador da resposta imune específica e indução da produção de citocinas da imunidade inata e adaptativa.

1.1 - Via de sinalização JAK-STAT

A sinalização intracelular dos receptores de citocinas de classe I e II envolvem tirosinoquinases citoplasmáticas da família Janus (JAKs) que têm como alvo os fatores ativadores de transcrição de sinal e transdutores de ativação (STATs), responsáveis pela ativação de genes de citocinas específicos (1). A sinalização por meio de receptores de superfície celular foi identificada pelo seu papel nas respostas a sinais protéicos extracelulares que promovem o crescimento, a proliferação, diferenciação ou sobrevivência das células (11) e a

via de sinalização JAK-STAT tem sido descrito na mediação do efeito de citocinas, utilizando os receptores de citocina tipo I e II, na imunorregulação, defesa do hospedeiro e imunopatologia, tornando mais reconhecido seus papéis complementares na diferenciação das subpopulações de células T *helper* (12).

As enzimas JAKs são compostas por mais de 1.000 aminoácidos de comprimento, variando em peso molecular de 120 a 180 kDA (13) e representam uma família distinta de tirosina quinases solúveis que tem sido fortemente implicadas na transdução do sinal de muitos membros da família de citocinas. Essas tirosino-quinases são encontradas constitutivamente e cataliticamente inativas em células em repouso, mas estão associadas aos domínios citoplasmáticos do receptor (14, 15), não sendo possível a fosforilação e ativação sem sua ligação ao receptor específico.

Algumas cadeias são específicas de um receptor em particular, enquanto outras são compartilhadas por vários receptores. Contudo, todos estão associados a uma ou várias JAKs (11), sendo possível sua ligação ao receptor isoladamente ou combinado a outros membros da família. Funcionalmente, JAKs são responsáveis pela mediação da ativação das STATs (14), através da fosforilação da tirosina no domínio citoplasmático do receptor. Sua família é composta por quatro tirosino-quinase: JAK 1, JAK 2, JAK 3 e Tyk2 e cada uma está associada a um receptor de citocinas (15, 16).

A ligação aproxima as JAKs da porção caudal dos receptores para que fosforilem uma a outra, aumentando a atividade dos seus domínios de tirosino-quinase. Uma vez fosforiladas nos receptores de citocinas, fornecem atividade catalítica quinase e criam sítios de ancoramento para que as STATs fosforilem, dando continuidade à cascata de sinalização (11, 13).

STATs são proteínas estruturais e funcionais, reconhecidas por sua dupla transdução de sinal no citoplasma e da ativação da transcrição do núcleo, definidas como um bloco de aminoácidos dispersos com variação de tamanho entre 750 a 850 aminoácidos e compreendem uma família de fatores de transcrição (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6) que são ativados por uma variedade de citocinas, hormônios e fatores de crescimento(13, 14, 17, 18).

A Indução de genes específicos por estas proteínas pode resultar em discretos e críticos efeitos biológicos na diferenciação, proliferação e imunidade celular (19). Tendo em vista a importante participação de STATs na resposta imune inata e adaptativa, o melhor entendimento da associação de algumas citocinas de padrão Th1 ou Th2 com STATs, estudos sobre esta via de sinalização tornaram-se indispensáveis para mediar a atividade biológica e indução de genes respondedores por estas citocinas, tornando possível entender a regulação da resposta imune.

Os sete membros da família STAT apresentam características comuns: 1) Um domínio amino-terminal (NH₂) envolvidos em interações proteína-proteína; 2) Um domínio de “bobina enrolada” que medeia as interações com outras proteínas; 3) Um domínio de ligação ao DNA (DBD); 4) Um domínio ligador; 5) Uma homologia Src 2 (SH2), domínio de ligação de receptores de STAT ativados e dimerização; e 6) Um domínio de transativação no terminal C. Todos os STATs contêm tirosina conservada (Y) entre o domínio SH2 e o domínio de transativação, com exceção do STAT2 por conter um sítio de fosforilação da serina no domínio de transativação (13, 20).

Apesar de STATs possuírem suas variadas características comuns e o domínio estrutural de STATs ser conservado, estas são ativadas em resposta a diferentes citocinas e fatores de crescimento e sua principal característica comum para compreensão de sua ativação é uma homologia Src 2 (SH2), onde acontecem a criação de sítios de ligação, por interação entre receptores e JAKs e sua capacidade de vincular-se a fosfotirosina, que recrutam STAT,

fosforilam e conduzem a passagem para o núcleo (13, 20). Desta forma, características estruturais comuns e variedade de citocinas e fatores de crescimento ativadores desta cascata conferem diferentes mecanismos para regulação do seu tráfego intracelular.

No entanto, mesmo STATs possuindo sítio de ligação comum, não se sabe como a via de sinalização JAK-STAT controla os padrões de expressão dos genes específicos, sendo que pode acontecer interações entre diferentes receptores de citocinas e diferentes combinações de JAK-STAT, já que estes podem dimerizar entre si e com outros membros da família, traduzindo diferentes informações em tipos celulares específicos de acordo com a expressão do gene e resposta da citocina (21).

A sinalização JAK-STAT se inicia quando uma citocina acopla ao seu receptor específico localizado na membrana celular, levando a mudanças estruturais e conformacionais na sua porção citoplasmática, permitindo a ativação rápida por transfosforilação em sua proximidade com membros da família JAKs. A JAK irá iniciar a fosforilação de resíduos específicos de tirosina do receptor, que servirá de encaixe para a porção STAT, encontrada no citoplasma em estado latente (13, 21, 22).

STAT são recrutados para o domínio citoplasmático do receptor, pelo acoplamento de JAK ao receptor específico e sua fosforilação na porção tirosino-quinase, sendo STAT fosforilado em um único resíduo de tirosina. O recrutamento de STATs ao domínio citoplasmático do receptor ativado acontece por meio da ligação específica entre a proteína e o domínio SH2 e os resíduos de fosfotirosina do receptor. Esta interação SH2-fosfotirosina é altamente específica desta via de sinalização e pode ser um passo crítico para determinar a especificidade do receptor mediada pela ativação de STAT (13, 22).

Para se dissociarem do receptor, após sua fosforilação, e ganharem acesso ao núcleo, pSTATs dimerizam no domínio onde foram acoplados (domínio SH2) para formar homo ou heterodímeros, translocam para o núcleo e se ligam à membrana do GAS (Sítio de Gama Ativado), induzindo a expressão dos seus respectivos genes, ligando-se a elementos promotores específicos. Ao final, STATs translocam de volta para o citoplasma dando assim continuidade a cascata de sinalização (9, 13, 18, 23).

A fosforilação da família STAT (pSTATs) parece ser um mecanismo importante para conferir a especificidade da regulação da transcrição e por ser um processo transitório, ou seja, não há tempo determinado, pode variar de minutos a algumas horas de duração em células normais (9). Entretanto, a cinética de expressão ainda não é conhecida, justificando a proposta do estudo: observar a cinética de ativação de proteínas STATs através da expressão de STATs fosforilados (pSTAT), ativação dos receptores específicos e produção de citocinas das CMNs do sangue periférico induzidas por mitógeno e antígeno.

As proteínas STATs podem estar associadas à desregulação imunológica, presente em várias doenças humanas, e a elucidação das modificações de perfil de expressão destas proteínas nestas doenças podem contribuir para um melhor entendimento da imunopatogenia e para a busca de novos alvos terapêuticos (24).

1.2 – STAT 1, 3, 4, 5 e 6 e suas principais citocinas de ativação.

Na tentativa de entender como os interferons (IFNs) exerciam seus efeitos, estudiosos iniciaram suas pesquisas sobre a via de sinalização e expressão gênica desta citocina (25), sendo os primeiros passos, a descoberta da ligação de IFNs a receptores de superfície específicos, resultando na ativação de múltiplas cascatas de sinalização intracelular e levando a síntese de proteínas que podem mediar respostas antivirais, inibidores de crescimento e imunomoduladores. Esta sinalização, mediada por IFNs, mostrou-se ser também dependente da

ativação do receptor tirosinoquinase JAK1/JAK2/Tyk2 e posterior recrutamento de STAT 1 e 2 que são supostas moléculas-alvo para a intervenção terapêutica em doenças inflamatórias e proteção contra patógenos (20, 21, 23, 25, 26).

Vários trabalhos já correlacionaram o aumento da ativação de STAT1 e expressão de IFNs a diferentes doenças inflamatórias crônicas (23, 27, 28). Foi observado também um aumento da ativação de STAT1, em monócitos e neutrófilos, em doenças inflamatórias intestinais (23). STAT1 medeia as respostas do tipo I e II, portanto, é essencial para combater as infecções virais e bacterianas, conferindo propriedades antiproliferativas. Monócitos, quando expostos a um estímulo, podem secretar posteriormente IFNs induzindo a ativação da via JAK-STAT e assim, fosforilação de STAT1 (29). A ausência de STAT1 pode resultar na desregulação do crescimento celular e prejudicar a função imune (24). STAT2 está envolvido na resposta biológica de interferons tipo I (IFNs α e β) e alguns estudos mostram um elevado nível de expressão de IFN- γ e STAT1 em pacientes com doença inflamatória intestinal (14, 20, 30).

STAT3 emergiu como um importante regulador da diferenciação das células T, bem como de sobrevivência a apoptose. Originalmente identificado como um fator de resposta de fase aguda (KISSELEVA, *et al.*, 2002) ativado principalmente por IL-6, STAT3 revelou ser um importante fator de transcrição para mediar a resposta inflamatória, tumorigênica e indutor de apoptose (24, 31). A IL-6 é principalmente produzida pelas células mononucleares fagocitárias, porém, podem ser produzidos por linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea. Por influência de IL-6, os linfócitos B se diferenciam em células maduras e secretam imunoglobulinas. Já IL-10 é uma citocina imunorregulatória com múltiplos efeitos biológicos em diferentes tipos celulares e importante indutor de STAT3. A diminuição destas citocinas contribui para o desenvolvimento de um ambiente inflamatório. Portanto, IL-6 e IL-10 estão importantemente envolvidas no processo de

ativação da sinalização JAK-STAT (24) por mediação do acoplamento ao seu receptor específico.

Entre os ativadores de transcrição, STAT4 medeia as respostas às citocinas pró-inflamatórias e estabiliza a produção de linfócitos T helper. A expressão de STAT4 foi descrita ser limitada a células NK, dendríticas e linfócitos T e sua ativação é mediada principalmente por IL-12, citocina importante para o desenvolvimento do subtipo celular Th1, no desvio de reposta Th1 para Th17 e que direciona a produção de IFN (13, 16, 21). A inibição da sinalização de STAT4 demonstrou suprimir o desenvolvimento da artrite, induzida por colágeno em um modelo de murino, e, portanto é considerado um alvo potencial para o tratamento de artrite crônica (20). REMMERS *et al*, 2007⁽³²⁾, descreveram um alelo variante de STAT4 como aumento de risco para artrite reumatóide e também lupus eritematoso sistêmico. Estes achados fornecem suporte para a expansão do conceito que existem genes comuns de risco a vários distúrbios auto-imunes e sugere o envolvimento entre estas diferentes doenças (33).

A estimulação das células T pela citocina IL-2 leva a fosforilação de STAT5, um processo importante para o crescimento e diferenciação de células T (29) e expressão dos genes que promovem a sobrevivência hematopoiética (21). Essa proteína pode ser encontrada codificada em dois genes ligados, STAT5a e STAT5b e estão mais ativas em diversos tipos de tumores humanos, incluindo leucemias, câncer de mama, câncer uterino, câncer de próstata e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (20, 34).

Finalmente, STAT6 pode ser expresso em todos os tecidos, mas foi inicialmente extraída do processo de sinalização pela citocina IL-4, assim, assumindo um papel crucial na regulação da imunidade adquirida e patogênese da asma (13). Além dos linfócitos Th2, IL-4, é derivada de basófilos, células NK, eosinófilos e mastócitos e em linfócitos B pode promover a diferenciação e

secreção de IgE e IgG1, podendo ser um grande alvo de estudo na patogênese da asma (16, 20).

1.3 - Regulação de STATs

O entendimento destas proteínas, em diversas funções celulares normais e resposta imune, podem ser descritas como funções críticas a erros ou ser regulado inadequadamente em doenças, sendo um dos principais alvos de estudo para a compreensão de potenciais correções terapêuticas (25). Vários processos bioquímicos já foram descritos para a desregulação da via de sinalização JAK-STAT, mas seus mecanismos de regulação ainda não foram claramente discretos.

Tendo em vista os diversos mecanismos de regulação positiva ou negativa, a proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS) é descrita como um dos principais inibidores fisiológicos de STATs, atuando através do acoplamento com o receptor de citocina ou JAK, inibindo a ativação de STATs (6) e foi descrita como possível mecanismo de controle do desenvolvimento e progressão de doenças no fígado (26).

Inibidores das proteínas STATs ativada (PIAS) podem se ligar a dímeros da proteína fosforiladas impedindo o reconhecimento do DNA e assim os genes alvo não serão transcritos (22). Ainda podem ser descritos mecanismos de regulação que fosforilam JAK, modificações da proteína STAT, reguladores positivos das funções de STAT, fosforilação da porção serina do receptor de citocina, bem como a interação com outros fatores de transcrição e proteínas celulares (13). Os efeitos de todos os processos de regulação, tanto positiva como negativa, da via de sinalização será determinante para a taxa de transdução de STATs no núcleo e a transcrição do gene alvo.

1.4 - Correlação de STATs e algumas doenças

Pouco se conhece sobre o estado de ativação da via JAK/STAT na infecção por HIV apesar de ser a via de transdução de sinal para a regulação positiva ou negativa de citocinas e interferons na infecção pelo HIV. A análise da ativação das proteínas STATs pode ser útil em acompanhamento da reconstituição imune de indivíduos infectados pelo HIV-1 após terapêutica. BOVOLENTA *et al.*, 2002⁽³⁵⁾ observou a ativação de STAT5 e STAT1 *in vivo* e *in vitro*, na maioria dos indivíduos do estudo infectados por HIV e HTLV, em contraste com controles saudáveis e soronegativos, sendo STAT1 encontrado em baixos níveis *in vivo* e apenas possível detectar sua expressão após estímulo mitogênico, correlacionando com a secreção de IFN- γ .

STOIBER *et al.*, 2001⁽³⁶⁾ afirmam que macrófagos, com exposição de curta duração a bactéria gram-positiva *Listeria monocytogenes*, não ativadas com IFN- χ , aumentaram rapidamente a fosforilação de STAT1, aumentando sua atividade macrofágica e expressão do gene induzido de IFN- χ . Em modelo de infecção persistente por estas bactérias, observou-se uma diminuição da fosforilação do STAT1, associada ao aumento da indução de supressor de sinalização, a proteína SOCS3, sugerindo assim uma influência na fase tanto tardia como imediata da infecção por *Listeria*. Com isso, demonstra-se a importância do estudo com moléculas sinalizadoras na infecção por *Listeria monocytogenes*. Já GOLLOB *et al.*, 2000⁽³⁷⁾, demonstraram que IL-12 desempenha um papel fundamental na estimulação da resposta imunológica contra infecções intracelulares, como *Salmonella*. Foi relatado no estudo um paciente com deficiência nas respostas funcionais a IL-12, indicando que a ativação de STAT4 pode ser suficiente para a indução de uma atividade citolítica por IL-12, mas pode não ser suficiente para a indução da proliferação celular e produção de IFN- χ , sendo necessária a participação de outros STATs nesta resposta.

Em um estudo realizado em 2003 por KINCAID e ERNST⁽³⁸⁾, observou-se a redução da resposta para IFN- χ em células infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* por mecanismos

diferentes de qualquer supressor de sinalização de citocina, apesar da ativação normal de STAT1 nos macrófagos infectados, indicando que outros mecanismos de inibição de IFN- γ podem ser exercidos por *Mycobacterium tuberculosis*, possivelmente ao nível de transcrição da molécula.

A modulação da resposta imune em várias situações clínicas persiste como um dos objetivos mais desafiadores da imunologia clínica. Sabe-se que as citocinas são fundamentais para esta regulação, tendo sido já classicamente estudadas. Mais recentemente foram caracterizadas proteínas intracelulares que medeiam à sinalização de citocinas, entre as vias JAKs-STATs. Alteração no perfil dessa sinalização em diferentes situações clínicas, seja diminuindo ou exacerbando a resposta inflamatória, tem sido descrita em algumas doenças. Entretanto não há relatos recentes na literatura, demonstrando um estudo detalhando a cinética de expressão intracelular de STATs em linfócitos humanos estimulados *in vitro* por mitógenos e antígenos, e sua correlação com o padrão de secreção de citocinas concomitantemente, assim como o padrão de expressão de receptores destas.

Com estes resultados poderemos, no futuro, estabelecer novos alvos terapêuticos para diferentes quadros imunológicos que possam modular a resposta imune de forma positiva ou negativa, aumentando sua eficácia e diminuindo possíveis efeitos adversos.

O projeto teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de proteínas pSTATs, bem como sua correlação com algumas citocinas envolvidas na cascata de ativação JAK/STAT e seus receptores, em células submetidas a estímulo com mitógeno e antígeno em indivíduos saudáveis.

Primeira etapa:

- Avaliar a cinética da expressão dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição fosforilados (pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6) em CMNs humanas ativadas *in vitro*.
- Avaliar a expressão dos receptores IL-2R (CD25), IFNGR1 (CD119), IL-4R (CD124), IL-6R (CD126), IL10R (CD210) e IL-12R (CD212) destas mesmas citocinas correlacionando com a expressão de seus STATs correspondentes.

Segunda etapa:

- Avaliar o perfil de secreção de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ pelas CMNs, correlacionando com a expressão de seus respectivos STATs.

Indivíduos saudáveis sem histórico de doenças e com sorologia positiva para citomegalovírus (CMV) foram selecionados no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP LIM - 56 – HCFMUSP. Foram incluídos 23 indivíduos saudáveis adultos com idade superior a 18 anos, sendo 20 mulheres e três homens.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Cappesq nº 0134/11) **(ANEXO A)** e todos foram informados ao termo de consentimento e livre esclarecido para posteriormente serem incluídos no estudo **(ANEXO B)**.

4.1 Obtenção de células mononucleares (CMN) do sangue periférico

Foram coletados 40 mL de sangue heparinizado por punção venosa, com consentimento do paciente ou dos responsáveis, implicando sempre em risco mínimo, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Para a realização dos experimentos das células mononucleares dos controles e análise da cinética de expressão de STATs e seus respectivos receptores, foram obtidas suspensões de células mononucleares (CMNs) de sangue periférico heparinizado por gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, *New Jersey, USA*), após centrifugação por 20 minutos a 2200 rpm. As CMNs isoladas foram lavadas em solução fisiológica a 1500 rpm por 10 minutos e cuidadosamente ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco by *Life Technologies*™, *New York, USA*) suplementado com gentamicina e 10% Soro AB humano (SAB – Sigma *Life Science*, *USA*). Uma alíquota foi utilizada para avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan e quantificadas em câmara de Neubauer, tanto para obtenção da viabilidade, bem como para ajustar a concentração de células para uso.

4.2 Cultura celular e obtenção de sobrenadantes de culturas após estímulo in vitro com mitógenos e antígenos

A suspensão de CMN, como descrito no item 4.1, diluídas em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro AB humano normal inativado (SAB), foram distribuídas na concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL por orifício e cultivadas em placas de 24 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) na ausência ou presença de estímulo mitogênico (fitohemaglutinina [PHA], 40 µg/mL; Gibco BRL, NY, USA) e antigênico (citomegalovírus [CMV], 3,2 ng/mL gentilmente cedido pelo laboratório de virologia da FMUSP) a 37°C and 5%. Para análise de pSTATs e receptores de superfície citocina (CD25, CD119, CD124, CD126, CD210, CD212) das

células estimuladas com PHA, foram determinados os tempos de 4, 12, 24 e 36 horas de cultura e para células estimuladas com CMV, 3, 4, 5 e 6 dias.

Para análise das citocinas nos sobrenadantes de culturas, as CMNs foram distribuídas na concentração de $2,5 \times 10^6$ células/orifício e incubados a 37° C com 5% de CO₂ na ausência ou presença de PHA e CMV por 4, 12, 24 e 36 horas e 3, 4, 5, e 6 dias, respectivamente. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, aliquotados e congelados a -80° C para posterior dosagem de citocinas (CBA – BD™ Cytometric Beads Array) por citometria de fluxo (BD LSRFortessa).

4.3 Detecção de STATs 1, 3, 4, 5 e 6 por citometria de fluxo

Após os períodos de cultura descritos anteriormente, as CMNs foram cuidadosamente coletadas da placa, lavadas com solução salina e centrifugadas por 5 minutos em 2500 rpm. As células obtidas foram cuidadosamente ressuspensas em tampão específico (PBS - Na₂HPO₄/NaCl/KCl/KH₂PO₄ 5%, adicionado de 5% de Soro Fetal bovino – SFB(Gibco® by life Technologies™, New York, USA)) e subdivididas em microtubos (1,5 mL) para marcação com anticorpos monoclonais de superfície Mouse Anti-Human CD3 PE-Cy™5 e Mouse Anti-Human CD69 APC-Cy™7 (BD Pharmingen™) e as proteínas fosforiladas intracelulares Mouse Anti-Human pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6 Alexa Fluor® 488 fosforilado (BD™ Phosflow), e então submetidas a análise por citometria de fluxo (BD LSRFortessa).

Para a marcação celular, primeiramente foram adicionados 1 mL do tampão de fixação (PBS, pH=7,3 adicionado de 1% de paraformaldeído (PFA) (Sigma, USA)) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esta incubação, as células foram lavadas com PBS/FBS 5% por 5 minutos a 0,4g, o sobrenadante desprezado, e acrescidos 1 mL de Metanol absoluto (Sigma, USA) por 10 minutos a 4°C. Em seguida, estas células foram submetidas a uma nova centrifugação, ressuspensas em tampão específico e marcadas com os anticorpos de superfície

CD3 e CD69. A marcação intracelular foi realizada acrescentando-se, concomitantemente os anticorpos pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6, separadamente. Após 30 minutos de incubação em local escuro, as células foram lavadas em tampão PBS/FBS 5% e ressuspensas para análise por citometria de fluxo (BD LSRFortessa).

4.4 Detecção dos receptores de citocinas

A quantificação dos receptores de citocinas foi realizada em paralelo as marcações das proteínas pSTATs, ou seja, nos mesmos períodos e nas mesmas condições de cultura para os dois estímulos usados no estudo. As CMNs plaqueadas e incubadas nos tempos descritos anteriormente, foram cuidadosamente retiradas da placa, lavada com solução salina e centrifugada por 5 minutos em 2500 rpm. Em seguida, ressuspensas em PBS e subdivididas em microtubos de 1,5mL para marcação com anticorpos monoclonais de superfície Mouse Anti-Human CD3 PE-CyTM5 (BD PharmingenTM) em todos os microtubos e com os anticorpos de receptores de citocinas pertinentes ao trabalho: Mouse Anti-Human CD25 PE; Mouse Anti-Human CD119 PE; Mouse Anti-Human CD124 PE; Mouse Anti-Human CD126 PE; Rat Anti-Human CDw210 PE e Rat Anti-Human CD212 PE (BD PharmingenTM) em tubos separadamente. Após 30 minutos de incubação em local escuro, as células foram lavadas em tampão PBS (pH=7,3) , ressuspensas e então submetidas a análise por citometria de fluxo (BD LSRFortessa).

4.5 Determinação de citocinas (*Cytometric Bead Array* - CBA)

As dosagens de citocinas nos sobrenadantes de cultura estimuladas com PHA e CMV, nos tempos descritos anteriormente, foram realizadas pelo método Cytometric Bead Array (CBA), utilizando-se o kit: Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF) (BD Pharmingen, CA, USA). Em resumo, os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com seis populações de microesferas de captura com distintas intensidades de fluorescência, conjugadas a um anticorpo de captura específico para cada citocina e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina

(PE) lido no canal FL3 do citômetro FACSFortessa (BD). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 0,2g. O sobrenadante foi desprezado e com 300µL da solução de lavagem as amostras foram ressuspensas para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACSFortessa (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os tubos foram homogenizados e incubados por três horas no escuro, em temperatura ambiente. Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando o BD CBA Analysis Software.

Limites de detecção:

CBA Th1/Th2: IL-2 (2,6 pg/mL), IL-4 (2,6 pg/mL), IL-10 (2,8 pg/mL), TNF-α (2,8 pg/mL), IFN-γ (7,1 pg/mL).

4.6 Estratégias de análise dos resultados obtidos por aquisição em citômetro de fluxo

Todos os sinais gerados pela aquisição das amostras são amplificados e convertidos pelo citômetro de fluxo em pulsos, permitindo a construção de gráficos. Os dados obtidos pela aquisição das amostras preparadas e marcadas por citômetro BD LSRFortessa foram analisados no software de análise FlowJo (v7.6.5). Os tópicos abaixo exemplificam a estratégia de análise utilizada para obter os dados que serão descritos posteriormente.

4.6.1 Controle de qualidade da aquisição dos dados

Para um melhor controle de qualidade dos dados gerados por citometria de fluxo, alguns gráficos são solicitados para avaliar a confiabilidade da aquisição das amostras. Observando o gráfico de complexidade celular pelo tempo de aquisição da amostra, pode-se observar possíveis interferências durante a passagem das células pelo citômetro. Desta forma, inicia-se a estratégia de análise dos dados selecionando em um *gate* denominado time (**Figura 1A**), as

células que possivelmente não tenham sofrido interferências em sua aquisição. Entretanto, mesmo avaliando o tempo de aquisição, é comum a formação de agrupamentos celulares, denominados *doublets* celulares. Assim, duas células agrupadas podem ser consideradas pelo citômetro como um único evento e levar a um valor superestimado da porcentagem de células que serão estudadas. Seguindo a análise das células dependentes do *gate* denominado *time*, um gráfico *dot plot* de altura do tamanho celular no eixo das ordenadas, versus a área do tamanho celular no eixo das abscissas, permite a exclusão dos *doublets* e seleção do *gate* denominado *singlets* (**Figura 1B**), finalizando a estratégia de análise do controle de qualidade da população celular isolada purificada pelas estratégias.

Figura 112. Estratégia de análise de citometria de fluxo no software FlowJo. **A)** complexidade celular versus tempo de aquisição das amostras. Gráfico analisado para observar possíveis erros durante a aquisição das amostras no citômetro. **B)** Altura do tamanho celular versus área do tamanho celular. Gráfico analisado para observar possível aquisição de agrupamentos celulares, chamados de *doublets*, e seleção apenas de células isoladas, chamadas de *singlets*.

4.6.2 Análise da cinética de expressão de STATs em células com e sem estímulo de PHA e CMV

Iniciando a análise das aquisições marcadas com os monoclonais, após retirar interferências que possam ter ocorrido durante a aquisição no citômetro e os *doublets*, as células foram analisadas em um *dot plot* de complexidade celular (*Side Scatter*) no eixo das ordenadas,

versus tamanho celular (*forward scatter*) para ajuste da população de linfócitos, que tem um pequeno tamanho celular e baixa complexidade, permitindo a visualização de duas populações celulares distintas no gráfico. Desta forma, na **Figura 2A** consegue-se definir a população estudada em um *gate*, denominado linfócitos. Construindo um novo *dot plot* de complexidade celular versus as células marcadas com CD3 dependentes do *gate* de linfócitos, selecionando as células consideradas CD3 positivas (**Figura 2B**).

No entanto, a tentativa de analisar a expressão de STATs na população de células CD3 positivas, não obteve resultado satisfatório por sua expressão ser de baixa intensidade para um grande número de células. Por este motivo, a partir do gráfico de células CD3 positivas, foram isoladas apenas as células CD69 positivas, sendo este um marcador de ativação celular. Para melhor avaliação da expressão do marcador CD69 foi analisado inicialmente o estímulo de PHA (**Figura 2C**) para definição o *gate* dessas células. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado para o estímulo de CMV (**Figura 2D**).

A partir do *gate* de células CD3 e CD69 positivas, realizamos as análises de expressão de pSTATs. Com esta estratégia de *gate* foi possível analisar um histograma e a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) destas células, onde em seguida realizamos a sobreposição de fluorescências de células com e sem estímulo de PHA (**Figura 2E**) e CMV para observar o deslocamento da intensidade de fluorescências das células.

Figura 2. Demonstrativo de estratégia de análise das CMNs cultivadas por 24 horas, marcadas e adquiridas por citometria de fluxo. **A)** Complexidade celular versus tamanho celular. Gráfico para a seleção de *gate* de linfócitos. **B)** Complexidade celular versus PE-Cy5. Gráfico dependente do *gate* de linfócitos para seleção das células anti-CD3 positivas marcadas com o fluorocromo PE-Cy5. **C)** Complexidade celular versus APC-Cy7. Células dependentes do *gate* anti-CD3 PE-Cy5 para delimitar as células marcadas com o fluorocromo APC-Cy7. O gráfico mostra células cultivadas sem estímulo, consequentemente com uma pequena marcação de células anti-CD69 APC-Cy7 no *gate* delimitado no gráfico. **D)** Complexidade celular versus APC-Cy7. Células dependentes do *gate* de anti-CD3 PE-Cy5 para delimitar as células marcadas com o fluorocromo APC-Cy7. Gráfico de células cultivadas com o estímulo de PHA por 24 horas e seu *gate* delimitado a partir das células cultivadas sem estímulo (basais). **E)** Overlay de células anti-CD3 PE-Cy5+/ anti-CD69 APC-Cy7+/ anti-STAT1 Alexa Fluor 488+ cultivadas sem e com estímulo de PHA por 24 horas para observar o deslocamento da população basal e estimulada e consequente análise do MFI dessas células positivas.

Para obter resultados em porcentagem de células basais e estimuladas com PHA e CMV, o *gate* delimitadas anteriormente como CD3 positivo foi submetido à construção de um *dot plot* do marcador CD69 no eixo das abscissas, e pSTAT no eixo das ordenadas, estabelecendo quadrantes de possíveis células CD3 positivas, CD69 positivas e pSTAT 1, 3, 4, 5 ou 6 positivo, denominado de CD69+STAT+. Na **Figura 3A**, demonstra as células sem estímulo (basal) e na **Figura 3B**, as células estimuladas com PHA por quatro horas. Desta forma, os dados de porcentagem descritos no presente trabalho foram obtidos através da porcentagem de células

CD69+/pSTAT+ no *gate* total de células CD69+. Isso quer dizer, na **Figura 3** os valores de porcentagem do quadrante Q2 foram divididos pela soma de Q2 e Q3 multiplicados por 100.

Figura 13. Demonstrativo de estratégia de análise para obtenção dos valores de porcentagem de células anti-CD3 PE-Cy5 +/- anti-CD69 APC-Cy7 +/- anti-STAT1 Alexa Fluor 488 +. **A)** Cruzamento das fluorescências de anti-STAT1 Alexa Fluor 488 versus anti-CD69 APC-Cy7 dependentes das células anti-CD3 PE-Cy5 positivas de células cultivadas sem estímulo por 24 horas. **B)** Cruzamento das fluorescências de anti-STAT1 Alexa Fluor 488 versus anti-CD69 APC-Cy7 dependentes das células anti-CD3 PE-Cy5 positivas de células cultivadas com estímulo de PHA por 24 horas e seu quadrante delimitado a partir do gráfico de células cultivadas sem estímulo.

4.6.3 Análise da cinética de expressão dos receptores de citocinas

Para analisar cada receptor de citocina, foram delimitados *gates* de linfócitos (**Figura 4A**) e células CD3+ (**Figura 4B**), para posterior seleção da população de cada receptor estudado e sua comparação entre células sem estímulo (**Figura 4C**) e estimuladas com PHA (**Figura 4D**) e CMV, nos tempos descritos anteriormente.

Figura 4. Demonstrativo de estratégia de análise dos receptores de citocinas. **A)** Complexidade celular *versus* tamanho celular. Gráfico para a seleção de *gate* de linfócitos. **B)** Complexidade celular *versus* PE-Cy5. Gráfico dependente do *gate* de linfócitos para seleção das células anti-CD3 positivas marcadas com o fluorocromo PE-Cy5. **C)** Complexidade celular *versus* fluorescência PE. Gráfico dependente de células anti-CD3 PE-Cy5 positivas cultivadas sem estímulo por 24 horas. **D)** Complexidade celular *versus* fluorescência PE. Gráfico dependente de células anti-CD3 PE-Cy5 positivas cultivadas com estímulo de PHA por 24 horas e seu “*gate*” de células positivas delimitado seguindo a marcação das células cultivadas sem estímulo.

4.7 Estatística

Para analisar a diferença de expressão de cultura de células estimulada em diferentes tempos foi utilizado o método não paramétrico pareado de Wilcoxon. Os valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significantes.

5.1 Definições dos tempos de cultivo celular para cada estímulo

Baseado no protocolo previamente padronizado em nosso estudo (monografia de aprimoramento apresentada ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da FUNDAP intitulada: Padronização da cinética de expressão das moléculas STATs fosforiladas avaliada por Citometria de Fluxo em células mononucleares do sangue periférico, 2011) foram utilizados os cultivos celulares estimulados com PHA e CMV em diferentes tempos de estímulo, observando que a cinética da resposta a antígenos difere da resposta a mitógenos, sendo que o aparecimento da resposta antígeno específica ocorre, em geral, após mais dias de cultura, iniciando em três dias. Desta forma, diferentes porcentagens de células estimuladas, estabelecidas no trabalho como células CD3⁺/CD69⁺, foram encontradas em comparação aos estímulos celulares utilizados e seus diferentes períodos de incubação.

Foram realizados ensaios com CMNs de 23 controles em experimentos com estímulos de PHA, 12, e CMV, 11 cinéticas, com a finalidade de estabelecer a hora ou dia mais adequado para avaliação do aumento de expressão de cada pSTAT estudado. As células foram mantidas em cultura para detecção da expressão, como já descrito anteriormente, modificando-se apenas os dias de coleta para cada estímulo.

Para melhor visualização das tendências ao deslocamento de expressão das células CD69 e pSTATs positivamente marcadas com anticorpos monoclonais, é possível observar uma cinética de expressão de células cultivadas, sendo dependentes de células CD3 positivas (**Figura 1B e Figura 2B**), seguindo os tempos descritos anteriormente e sobrepondo cultivos sem e com estímulos de PHA (**Figura 1**) e CMV (**Figura 2**).

Uma vez estabelecida todas as estratégias de análise dos resultados gerados por citometria de fluxo, observou-se através da sobreposição de gráficos, no software FlowJo, a modulação do aumento de expressão das células CD69 positivas em comparação as células

cultivadas sem estímulo, confirmando uma maior expressão do marcador CD69 nas células estimuladas com PHA (**Figura 1**) e CMV (**Figura 2**). Sendo comparado aos picos de expressão dos controles estimulados com PHA *versus* CMV, as células estimuladas com o mitógeno apresentam uma tendência a deslocamentos de ativação celular visíveis em tempos bem menores de cultivo, iniciando a cinética em quatro horas. Esses resultados já eram esperados, visto que PHA é um estímulo mitogênico inespecífico.

Figura 5. Demonstrativo de uma cinética de expressão de células sem e com estímulo de PHA marcadas com anti-CD69 APC-Cy7 e anti-STAT 1 Alexa Fluor 488. **A)** células sem marcação de anticorpos monoclonais em um gráfico de complexidade celular *versus* a fluorescência PE-Cy5. **B)** células cultivadas e marcação com anticorpos monoclonais em um gráfico de complexidade celular *versus* a fluorescência PE-Cy5 para delimitar o *gate* de células anti-CD3 positivas. Histogramas de células cultivadas sem (linha vermelha) e com estímulo de PHA (linha azul) foram sobrepostos nas fluorescências de anti-CD69 APC-Cy7 e anti-STAT 1 Alexa Fluor 488 para observar o deslocamento da intensidade de fluorescência em cada tempo da cinética (4, 12, 24 e 36 horas).

Figura 6. Demonstrativo de uma cinética de expressão de células sem e com estímulo de CMV marcadas com anti-CD69 APC-Cy7 e anti-STAT1 Alexa Fluor 488. **A)** células sem marcação de anticorpos monoclonais em um gráfico de complexidade celular versus a fluorescência PE-Cy5. **B)** células cultivadas e marcação com anticorpos monoclonais em um gráfico de complexidade celular versus a fluorescência PE-Cy5 para delimitar o *gate* de células anti-CD3 positivas. Histogramas de células cultivadas sem (linha vermelha) e com estímulo de CMV (linha azul) foram sobrepostos nas fluorescências de anti-CD69 APC-Cy7 e anti-STAT Alexa Fluor 488 para observar o deslocamento da intensidade de fluorescência em cada tempo da cinética (3, 4, 5 e 6 dias).

Essas observações supõem existir uma diferença na expressão de pSTAT em diferentes tempos de cultivo celular com estímulos de 4 a 36 horas e de 3 a 6 dias para PHA e CMV respectivamente, deixando assim possível uma análise dos dados gerados em porcentagem de todas as cinéticas que serão demonstradas posteriormente.

5.2 Cinéticas de expressão de células CD3+/CD69+

Quando realizada a análise de expressão de células CD69 positivas para cada controle sem e com estímulo de PHA e CMV, foi observado um aumento da porcentagem deste marcador em ambos os estímulos comparados com as células basais, garantindo assim a confiabilidade da expressão de células estimuladas. Sendo assim, a análise da curva de expressão de células CD3+/CD69+ estimuladas com PHA (**Figura 7**) e CMV (**Figura 8**) foi utilizada para validar a utilização dos dados encontrados em porcentagem para pSTATs, visto que, não seria possível avaliar a expressão de pSTAT em cinéticas que não tiveram a expressão de células ativadas quando comparados sem e com estímulo de PHA e CMV.

Figura 7. Avaliação da capacidade de expressão de CD69 em células estimuladas com PHA. Linfócitos de 12 indivíduos saudáveis foram previamente estimulados com PHA nos tempos de 4, 12, 24 e 36 horas. Em seguida, anti-CD3 e anti-CD69 foram adicionados para marcação e análise por citometria de fluxo. A **linha vermelha** descreve as células com secreção espontânea, basais. A **linha azul** descreve as células estimuladas com PHA nos tempos descritos

anteriormente. A cinética de expressão de células CD3+/CD69+ foi considerado o parâmetro para validação e utilização dos resultados encontrados para os pSTATs.

Figura 14. Avaliação por citometria de fluxo da capacidade de expressão de CD69 em células estimuladas com CMV. Linfócitos de 11 indivíduos saudáveis foram previamente estimulados por CMV nos tempos de 3, 4, 5 e 6 dias. Em seguida, anti-CD3 e anti-CD69 foram adicionados para marcação e análise por citometria de fluxo. A **linha vermelha** descreve as células com secreção espontânea, basais. A **linha verde** descreve as células estimuladas com CMV nos tempos descritos. A cinética de expressão de células CD3+/CD69+ foi considerado o parâmetro para validação e utilização dos resultados encontrados para os pSTATs.

No entanto, observando o resultado da mediana dos controles, a expressão de células CD3+/CD69+ foi maior nas células estimuladas com PHA, por este ser um estímulo inespecífico. Para as células estimuladas com PHA (**Figura 9A**) foi possível observar um aumento de expressão de células anti-CD69+ a partir de 12 horas de estímulo, e para as células cultivadas

com CMV, a partir do terceiro dia na maioria dos casos, mantendo uma visível expressão por até seis dias pós-estímulo (**Figura 9B**).

Figura 9. Expressão da molécula anti-CD69 APC-Cy7 de células sem e com estímulo de PHA e CMV. Expressão da molécula de CD69 nas células estimuladas com PHA e CMV ($n = 12$ e 11 , respectivamente). **A)** Porcentagem de células CD69 positivas *versus* o tempo de cultura celular (4, 12, 24 e 36 horas) sem (linha vermelha) e com estímulo de PHA (linha azul). **B)** Porcentagem de células CD69 positivas *versus* o tempo de cultura celular (3, 4, 5 e 6 dias) sem (linha vermelha) e com estímulo de CMV (linha verde).

5.3 Análise *in vitro* da expressão intracelular de pSTATs

Após observar a cinética de ativação das células cultivadas sem e com estímulo de PHA e CMV, foi possível analisar a cinética de expressão de pSTAT1, 3, 4, 5 e 6 dessas mesmas células, anti-CD3+ e anti-CD69+.

Para avaliar a expressão de pSTATs induzida pelos estímulos de PHA e CMV, foram comparados os diferentes tempos de estímulo.

Analisando de forma conjunta as CMNs dos 12 controles sob o estímulo com PHA, a **Figura 10A** mostra um significativo aumento de pSTAT1 com quatro horas de estímulo quando comparados aos demais tempos, 12, 24 e 36 horas. O aumento de expressão de pSTAT1 foi detectado significativo no tempo de 12 horas quando comparado a 36 horas. A expressão de pSTAT6 seguiu este mesmo padrão: observou-se uma maior expressão nos tempos iniciais, mas apenas com 12 e 24 horas houve expressão significativamente maior que no tempo de 36 horas (**Figura 10E**).

Por outro lado, níveis de expressão *in vitro* significativamente mais elevados de pSTAT3, 4 e 5 foram observados após 36 horas de estímulo mitogênico que com 4 e 12 horas. O perfil de expressão de pSTAT3 foi encontrado baixo com 4 e 12 horas pós estímulo, aumentando gradativamente até 36 horas. Houve significância estatística nos tempos de 24 e 36 horas quando comparados a 4 e 12 horas, o que leva a acreditar em uma estabilidade de expressão nos tempos de 24 e 36 horas e possivelmente uma queda dos valores de porcentagem em tempos maiores aos estipulados no estudo (**Figura 10B**). pSTAT4 seguiu o perfil de expressão de pSTAT3, mas não foi possível observar diferença estatística quando comparados aos tempos de 4 e 24 horas de estímulo. Para as células expressando pSTAT5 (**Figura 10D**), apenas o tempo de 36 horas mostrou-se significativamente maior quando comparado a 4 e 12 horas pós estímulo.

Figura 10. Mediana e percentis 25-75% da porcentagem de linfócitos T CD3+, CD69+ e anti-pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6 pós estímulo de PHA nos tempos de 4, 12, 24 e 36 horas. Porcentagem de linfócitos pSTAT positivos de 12 indivíduos saudáveis nos diferentes tempos de cultivo com PHA para pSTAT 1 (A), pSTAT3 (B), pSTAT4 (C), pSTAT5 (D) e pSTAT6 (E). * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$.

Para analisar a capacidade das CMNs em expressão de pSTATs induzidas por antígenos, foram realizadas culturas de CMN de 11 indivíduos estimuladas por 3, 4, 5 e 6 dias com citomegalovírus (CMV).

A **Figura 11** mostra que a expressão de pSTAT em CMNs estimuladas com CMV segue uma tendência similar às células estimuladas com PHA para pSTAT1, 3 e 6. pSTAT1 (**Figura11A**) e pSTAT6 (**Figura11E**) tem sua expressão aumentada precocemente, três dias, e pSTAT3 (**Figura.11B**) tem sua maior expressão tardiamente, seis dias, como visto na cinética de expressão com PHA. Os resultados evidenciam que há um padrão de expressão diferenciado para pSTAT1 e 3 em células estimuladas com PHA e CMV, sendo os tempos ótimos para análise de expressão destas proteínas, em linfócitos CD3+CD69+, 4 e 36 horas para o estímulo com PHA e 3 e 6 dias com CMV, respectivamente.

Apesar da cinética de expressão de pSTAT6 seguir um padrão de expressão próximo ao das CMNs estimuladas com PHA, com maior expressão no tempo inicial da cinética e decrescendo nos tempos posteriores, não foi possível demonstrar diferenças significativas de expressão entre estes. Já a expressão de pSTAT4 e pSTAT5 foi menor que a das outras proteínas, sem distinção significativa entre os diferentes tempos da análise.

Figura 11. Mediana e percentis 25-75% da porcentagem de linfócitos T CD3+, CD69+ e anti-pSTAT 1, 3, 4, 5 e 6 pós estímulo de CMV nos tempos de 3, 4, 5 e 6 dias. Porcentagem de linfócitos pSTAT positivos de 11 indivíduos saudáveis nos diferentes tempos de cultivo com CMV para pSTAT 1 (A), pSTAT3 (B), pSTAT4 (C), pSTAT5 (D) e pSTAT6 (E). * $P \leq 0,05$.

5.4 Análise da expressão *in vitro* dos receptores de citocinas

A ligação de receptores de citocinas à tirosino-quinases da cascata JAK/STAT é crucial para fosforilação e posterior translocação para o núcleo das proteínas STATs. Com o objetivo de avaliar o início desta cascata, foram analisadas CMNs estimuladas com PHA e CMV com marcadores de receptores de citocinas em paralelo as análises para pSTATs.

Foram estudados os receptores: IL-2R (CD25), IFN- γ R α (CD119), IL-4R α (CD124), IL-6R α (CD126), IL-10R (CD210) e IL-12R β (CD212) em CMNs de 11 indivíduos com estímulo de PHA e 11 com CMV.

Analisando a expressão desses marcadores comparando-se os tempos de estímulos, verificamos que para as CMNs estimuladas com PHA, apenas a expressão de CD212 (**Figura 12F**) não apresentou aumento significativo, mas é possível observar crescente expressão entre 4 a 36 horas. Os marcadores CD25 (**Figura 12A**), CD119 (**Figura 12B**), CD124 (**Figura 12C**), CD126 (**Figura 12D**) e CD210 (**Figura 12E**) apresentaram pequena expressão precoce (quatro horas) e alta expressão com 36 horas, havendo diferença significativa entre estes dois tempos. Em resumo, esses marcadores foram mais bem expressos nos tempos de 24 e 36 horas.

Figura 12. Expressão dos receptores de citocinas estimuladas com PHA. Culturas de CMNs de 11 indivíduos saudáveis foram estimuladas por 4, 12, 24 e 36 horas com PHA. A determinação da expressão dos receptores de citocinas ao final de cada tempo foi analisada por citometria de fluxo nos linfócitos CD3+CD69+. **A)** Expressão de CD25, receptor de IL-2. **B)** Expressão de CD119, receptor de IFN- γ . **C)** Expressão de CD124, receptor de IL-4. **D)** Expressão de CD126, receptor de IL-6. **E)** Expressão de CD210, receptor de IL-10. **F)** Expressão de CD212, receptor de IL-12. * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$.

Para as CMNs estimuladas em cultura com CMV, os marcadores dos receptores de citocinas CD25 (**Figura 13A**), CD126 (**Figura 13D**) e CD212 (**Figura 13F**) parecem seguir um padrão parecido com PHA. O marcador do receptor de citocina IL-2R, mostrou expressão significativa nos dias 5 e 6 de estímulo quando comparados aos terceiro e quarto dias. A cinética de expressão de CD126 foi significante maior entre o terceiro e sexto dia de cultura com CMV e para CD212 mostrou resultados significantes com cinco e seis dias de estímulo quando comparados aos tempos mais precoces. CD119 (**Figura 13B**), CD124 (**Figura 13C**) e CD210 (**Figura 13E**) não apresentaram diferenças estatísticas em suas cinéticas de expressão.

Figura 13. Expressão dos receptores de citocinas estimuladas com CMV. Culturas de CMNs de 11 indivíduos saudáveis foram estimuladas por 3, 4, 5 e 6 dias com CMV. A determinação da expressão dos receptores de citocinas ao final de cada tempo foi analisada por citometria de fluxo em linfócitos CD3+CD69+. **A)** Expressão de CD25, receptor de IL-2. **B)** Expressão de CD119, receptor de IFN- γ . **C)** Expressão de CD124, receptor de IL-4. **D)** Expressão de CD126, receptor de IL-6. **E)** Expressão de CD210, receptor de IL-10. **F)** Expressão de CD212, receptor de IL-12. * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$.

5.5 Produção *in vitro* de citocinas estimuladas com mitógeno e antígeno.

Com o propósito de averiguar se a produção de citocinas por CMNs induzidas por um estímulo mitogênico e antigênico seguiam o mesmo padrão de expressão dos seus receptores e STATs, o passo seguinte foi determinar a secreção de citocinas pelas CMNs estimuladas nos tempos estudados para os receptores e STATs. As citocinas foram determinadas nos sobrenadantes de cultura por CBA.

Os níveis basais, ou seja, secreção espontânea sem estímulo das citocinas estudadas, não apresentaram valores relevantes, ficando abaixo do limite de detecção do kit. Desta forma, foram analisadas de forma comparativa as células estimuladas nos diferentes tempos da cinética.

As CMNs estimuladas com PHA (**Figura 14**) apresentaram resultados significantes para todas as citocinas estudadas. IFN- γ e IL-10 apresentaram cinéticas similares, com maior secreção em 24 e 36 horas quando comparados aos tempos de 4 e 12 horas, sugerindo que estas citocinas são secretadas mais tardiamente em CMNs estimuladas com PHA. O aumento da capacidade de secreção de IL-6 foi observado no tempo de 12 horas, mantendo os níveis aumentados de secreção com 24 e 36 horas. O tempo de quatro horas foi significativamente abaixo dos demais tempos estudados, o que ressalta a hipótese de não ser o melhor tempo para avaliação da secreção desta citocina.

Níveis significativamente elevados de IL-4 foram observados com 12, 24 e 36 horas quando comparados ao tempo precoce, mas quando analisados os tempos de 24 e 36 horas, foi possível observar uma diminuição significativa de produção de IL-4 em 36 horas de estímulo mitogênico. A secreção da citocina IL-2 em CMNs estimuladas com PHA foi superior em 24 horas comparado aos demais tempos e comparando o tempo inicial e final da cinética, foi possível observar uma diminuição significativa no último tempo de estímulo.

Figura 14. Determinação de citocinas IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-12 em CMNs estimuladas com PHA. Sobrenadantes retirados de cultura de células estimuladas com PHA por 4, 12, 24 e 36 horas de indivíduos controles (n=12) foram avaliados por CBA (pg/mL). As linhas horizontais representam mediana e percentis 25-75%. * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$.

Em paralelo, a capacidade de secreção das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foram avaliadas em CMNs estimuladas com CMV (**Figura 15**) nos mesmos tempos descritos para as cinéticas de expressão de STATs e os receptores de citocinas.

A **Figura 15** mostra que as produções de IFN- γ e IL-10 não apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos avaliados, inviabilizando a possibilidade de descrever um melhor tempo de expressão dessas citocinas em células estimuladas com CMV. Entretanto, a produção de IL-6 mostrou um aumento significativo nos tempos de 12 e 36 horas, e diminuição nos tempos de 4 e 24 horas. Seria interessante, neste caso, avaliar-se tempos posteriores a 36 horas para verificar possível diminuição da secreção desta citocina.

Figura 15. Determinação de citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-6 em CMNs estimuladas com CMV. Sobrenadantes retirados de cultura de células estimuladas com CMV por 3, 4, 5 e 6 dias de indivíduos controles ($n = 12$) foram avaliados por CBA e descritos em pg/mL. As linhas horizontais representam mediana e percentis 25-75%. *** $P \leq 0,001$.

Respostas imunes reguladas por linfócitos T são iniciadas por antígenos apresentados no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ao sítio de ligação do receptor de células T (TCR), seguidas de sinalização complementar por moléculas coestimuladoras que permitem a ativação celular. Vários estímulos *in vitro* objetivam reproduzir a ativação dos linfócitos *in vivo*, com o intuito de investigar os mecanismos implicados na patogênese de diversas doenças auto-imunes, infecciosas e oncológicas (39). Enquanto as vias de ativação de linfócitos induzidas por citocinas isoladamente já são bem conhecidas (40) entendemos a importância de estudar vias de sinalização de linfócitos utilizando estímulos que possam corresponder a um cenário mais fisiológico, ou seja, de resposta imune induzida via TCR, como ocorre na resposta a diferentes patógenos. A PHA é uma proteína vegetal polimérica classificada como lectina, comumente usada como ativador policlonal de células T, através da ligação a glicoproteínas na superfície da célula T, incluindo TCR e CD3, causando sua ativação (41). As células estimuladas com PHA não fornecem os sinais co-estimuladores que normalmente são emitidos pelas APCs na resposta a antígenos microbianos. Sendo assim, optamos por estudar a resposta ao estímulo com CMV para a avaliação da modulação da via de sinalização frente a uma resposta imune específica.

A ligação ao CD3 resulta em sinalização intracelular, proliferação e produção de citocinas. Portanto, na tentativa de monitorar a ativação de linfócitos T, iniciamos a avaliação com a expressão dos marcadores de superfície CD3/CD69. Esta última molécula, uma lectina transmembrana tipo C de superfície celular (42), identificada como CD69, é reconhecida como marcador precoce de ativação dos linfócitos. A indução de alta porcentagem de células CD3+/CD69+ observada com estímulo com PHA indicou que este mitógeno pode servir como um controle positivo da ativação celular. Observamos aumento da porcentagem de células expressando CD69 em 12 horas, continuando este aumento em 24 horas e queda da

porcentagem em 36 horas de estímulo. Estes mesmos dados foram encontrados em estudo de linfócitos T ativados com PHA, PMA-ionomicina e SEB com maior expressão de CD69 em 24 horas (39).

As células estimuladas com CMV também apresentaram um aumento de expressão de CD69 já no tempo mais precoce de estímulo analisado, três dias, quando comparado com as células não estimuladas (basais). Diferentemente da expressão de células CD69 estimuladas com PHA, o estímulo com CMV em CMNs manteve parâmetros parecidos nos demais tempos e o tempo mais tardio sugere uma diminuição de expressão de CD69. Tempos maiores que seis dias de análise são necessários para se confirmar esta observação. Os resultados apresentados até o momento mostram que os estímulos de PHA e CMV são capazes de modular funções de células do sistema imune, possibilitando a continuidade da avaliação de modulação de citocinas, receptores e pSTATs utilizando estes estímulos inespecífico.

No presente estudo, utilizando o “gate” em linfócitos T CD69+, como marcador de células ativadas, foi possível tentar estabelecer a cinética de expressão de pSTATs em um tempo apropriado, em resposta a diferentes condições de estímulo, a fim de interpretar com precisão os efeitos *in vitro* destas proteínas na ativação imune e suas aplicações em futuros estudos *in vitro* envolvendo respostas imunitárias.

Os dados foram analisados conjuntamente em porcentagem, bem como MFI. Os dados encontrados em MFI, não demonstrados, se mostraram menos relevantes, o que pode ser explicado por se tratar de uma análise de média de fluorescência em um pequeno número de células, já que foram selecionadas apenas as células CD3+/CD69+. Estes resultados corroboram com o estudo de Gavasso e colaboradores em 2014, avaliando a expressão de pSTATs em diferentes tipos celulares em diferentes tempos de estímulo com IFN- β e seus resultados mostraram dados não significantes quando analisados em MFI. Desta forma, as

análises da cinética de expressão de STATs do presente estudo foram analisadas apenas em porcentagem de células..

Vários trabalhos já correlacionaram o aumento da ativação de STAT1 e expressão de IFNs em resposta a diferentes doenças inflamatórias crônicas (23, 27, 28), visto que células estimuladas neste modelo de doença, regulam a produção de IFNs, os quais são responsáveis por induzir a fosforilação de STAT1 (29), modulando respostas do tipo I e II. Respostas do tipo I e II são essenciais para combater as infecções virais e bacterianas conferindo propriedades antiproliferativas e resposta inflamatória.

Observando o tempo ótimo de expressão de pSTAT1 fosforilado, avaliado pela porcentagem de células marcadas intracelularmente para esta molécula sinalizadora, sua indução foi iniciada em 4 horas de estímulo com PHA e 3 dias com CMV, tempos iniciais das cinéticas. Contudo, pode-se prever que pSTAT1 tenha uma expressão precoce tanto para estímulos mitogênicos, bem como antigênicos. A citocina mais comumente descrita como ativadora da via de sinalização JAK/STAT1 pode ser considerado um produto final da transcrição do gene após a transdução do sinal por pSTAT1, já que foi possível observar uma maior expressão de IFN- γ em 36 horas de estímulo com PHA, o mesmo resultado encontrado na avaliação da cinética de expressão do receptor de IFN- γ , CD119.

Enquanto o mitógeno PHA não requer a apresentação via APCs, estímulos frente a antígenos resultam da apresentação destes pelas APCs, ligação da molécula apresentadora de antígeno ao TCR do linfócito e ligação a moléculas co-estimuladoras das APCs. Entretanto, não foi possível observar resultados significativos de IFN- γ e CD119 em CMNs estimuladas com CMV.

STAT3 revelou ser importante mediador a resposta inflamatória, tumorigênica e indutor de apoptose (24, 31), podendo também contribuir na diferenciação de células Th2 (43). Nosso estudo mostrou STAT3 como transdutor de sinal mais tardio quando comparado com os outros STATs, sendo observado seus tempos ótimos de expressão em 36 horas para PHA e 6 dias para CMV.

IL-6 pode contribuir na diferenciação de células Th17 mediada pela regulação de STAT3 e sua ligação a diferentes genes (44). IL-10 por outro lado é uma citocina imunorregulatória com múltiplos efeitos biológicos e um importante indutor de STAT3. A diminuição dos níveis de IL-6 e IL-10 podem contribuir para o desenvolvimento de um ambiente inflamatório e ambas estão envolvidas no processo de ativação da sinalização JAK-STAT (24) por mediação do acoplamento ao seu receptor específico. A capacidade *in vitro* da secreção de citocinas IL-6 e IL-10 por CMNs induzidas por PHA foi avaliada em paralelo à expressão de seus respectivos receptores, CD126 e CD210. Um aumento significativo da expressão de ambos foi observado a partir de 12 horas de estímulo, com consequente aumento no decorrer da cinética. Estes dados, em conjunto com os maiores níveis de expressão dos receptores CD126 e CD210 com 36 horas de estímulo, evidenciam a ocorrência de maior ativação de pSTAT3 concomitante ao pico de transcrição do gene e de produção de citocinas, podendo assim considerar-se o último tempo da cinética de secreção das citocinas, da expressão de seus receptores, e da expressão de STAT3 fosforilado como o tempo ótimo para avaliação da via de sinalização JAK/STAT3.

O aumento da expressão de pSTAT4, proteína que sinaliza para a diferenciação de células Th1 juntamente com STAT1 (45), foi similar ao tempo de maior expressão de pSTAT3. STAT4 pode ser considerado como um transdutor de sinal tardio, segundo os tempos estipulados na cinética estudada, por ter maior expressão após 24 e 36 horas. Apesar dos resultados da cinética do receptor de citocina IL-12, CD212, não terem mostrado diferença

significativa de expressão em células estimuladas com PHA, quando comparados os tempos entre si, podemos considerar seus tempos tardios como melhores pontos para avaliar a expressão desta molécula. Este dado são consistentes com os dados encontrados em CMNs estimuladas com CMV que tiveram valores significantes de expressão após 5 e 6 dias quando comparados a 3 dias, ou seja, para antígenos e mitógenos, os tempos mais tardios possivelmente resultarão na observação de maior expressão de CD212. .

Alguns estudos descreveram um alelo variante de STAT4 como associado ao aumento de risco para artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (32), sugerindo o envolvimento de IL-12 e STAT 4 em diferentes entidades clínicas. A dificuldade que encontramos para dosar IL-12 nos sobrenadantes, impossibilitou a avaliação da expressão da citocina mais comumente descrita como ativadora JAK/STAT4.

A proteína STAT5 pode ser encontrada codificada em dois genes ligados, STAT5a e STAT5b, e estão mais ativas em diversos tipos de tumores humanos (20, 34). Em nosso estudo, esta proteína pôde ser observada com maior expressão em 36 horas de estímulo com PHA. Induzidos por IL-2, STAT5a e STAT5b podem se ligar diretamente a genes específicos e promover a sua expressão (43). Entretanto, STAT5a e STAT5b também podem favorecer respostas das células Th1 (46) e podem ser cruciais na regulação da diferenciação de células T regulatórias (Treg) (12). A secreção de IL-2 foi detectada em maiores níveis em 24 horas de estímulo mitogênico e seu receptor de ligação na membrana da célula, CD25, teve um aumento de expressão também em 24 horas. Estes dados em conjunto sugerem IL-2 como ativador da cascata de sinalização JAK/STAT5 em 24 horas e maior expressão de pSTAT5 em 36 horas.

Para a cinética de expressão de pSTAT5 estimulada com CMV não foi possível descrever um ponto de maior expressão, apenas confirmando o aumento de expressão de CD212 nos tempos mais tardios. Os resultados de secreção de IL-2 ficaram abaixo do limite de

detecção do kit utilizado para dosagem de citocinas e não foi possível descrever sua cinética de expressão.

STAT6 foi inicialmente descrito como sendo induzido por IL-4, mas sua ativação também pode ser induzida por IL-13. Além dos linfócitos Th2, IL-4 é derivada de basófilos, células NK, eosinófilos e mastócitos e em linfócitos B pode promover a diferenciação e secreção de IgE e IgG1, podendo ser um importante alvo de estudo na patogênese da asma (13, 16, 20). Em nosso estudo, a cinética de expressão de pSTAT6 se mostrou bem parecida com a encontrada em pSTAT1, com início de expressão em 12 horas. Mesmo com o aumento de expressão de pSTAT6 já ocorrendo no primeiro tempo estudado, a citocina mais comumente descrita como ativadora de STAT6, IL-4 e o receptor de IL-4 foram observados em tempos mais tardios da cinética, 24 e 36 horas, respectivamente. Não foi possível descrever uma cinética de expressão de pSTAT6 em CMNs estimuladas com CMV, nem mesmo expressão de CD124 e IL-4.

Nossos resultados indicam diferentes perfins de cinética de expressão das proteínas STATs fosforiladas. Esta observação está provavelmente associada à diversidade na via de sinalização JAK/STAT, que interliga a diferentes receptores e combinações das proteínas JAK-1, 2, 3 e T2yK com STAT1 a 6, levando a diversos padrões de expressão dos genes específicos e de citocinas (21).

A avaliação da expressão destas moléculas sinalizadoras de citocinas pode se constituir em importante ferramenta para o entendimento da regulação da resposta imune e, consequentemente, da elaboração de estratégias de modulação desta resposta. Citocinas estão crucialmente envolvidas em todas as etapas da resposta imune, incluindo sua indução, direcionamento, regulação e “desligamento”. O conhecimento das diferentes formas que as citocinas estão envolvidas em cada uma destas etapas passa, necessariamente, pelo entendimento dos mecanismos de sinalização das mesmas. Portanto, a possibilidade de analisar

o envolvimento de STATs em diferentes modelos de resposta imune *ex vivo* ou *in vitro*, e poder eventualmente interferir em sua modulação, nos parece bastante atraente.

Nossa hipótese inicial de que haveria cinéticas distintas para as diferentes STATs foi confirmada neste estudo. As cinéticas com PHA parecem se correlacionar com a função de cada uma das proteínas sinalizadoras, exceto STAT1 e STAT6. Nestas duas, a expressão da proteína fosforilada ocorreu nos tempos iniciais da cinética, enquanto a expressão de seu receptor e citocina se deram mais tardiamente. Em relação a STAT3 observamos uma resposta relativamente concomitante entre a expressão desta molécula e as respectivas citocinas envolvidas na sua fosforilação, IL-6 e IL-10, e seus receptores em linfócitos T, CD126 e CD210, ocorrendo todos estes eventos nos tempos mais tardios da cinética com PHA. Já com STAT4, observou-se correlação entre a expressão da proteína fosforilada e o receptor da citocina mais importante na sua ativação, CD212; IL-12p70 infelizmente não pode ser detectada nos sobrenadantes deste trabalho. Também observamos concomitância entre os parâmetros avaliados, expressão de STAT5, IL-2 e CD25, que ocorreram nos tempos mais tardios da cinética.

Com CMV, observou-se correlação entre STAT3 e IL-6 e seu receptor, todos ocorrendo também mais tardiamente; a expressão de IL-10 e de seu receptor foi reduzida em todos os tempos avaliados. Em relação a pSTAT1, da mesma que com PHA, observamos aumento da expressão na fase inicial da cinética, enquanto a expressão de IFN- γ e de seu receptor se mantém uniformemente baixa em todos os tempos. Também não foi possível observar uma cinética de expressão de pSTAT4, 5 e 6, havendo entretanto uma expressão significativa de pSTAT5 e 6 (10-20% das células CD3+/CD69+): pSTAT4 foi expresso por reduzida porcentagem de células (<10%) nos quatro tempos avaliados. Desta forma não foi possível correlacionar esta proteína com as respectivas citocinas e seus receptores.

A avaliação destes mesmos parâmetros em situações patológicas específicas pode ajudar no entendimento da regulação imunológica. Neste trabalho definimos tempos de análise de expressão de citocinas, receptores de citocinas e STATs para chegar a um tempo ótimo de expressão, para cada STAT estudado, e assim tentar reproduzir, futuramente, estas análises para diferentes estímulos antigênicos em pacientes com diversas condições clínicas.

A importância das citocinas e receptores de citocinas como alvo terapêutico e suas perspectivas de direcionamento de sinalização intracelular, nos levou a avaliar diferentes pontos da cascata de sinalização JAK/STAT, como a expressão de citocinas e seus receptores para tentar mostrar a possibilidade de novos alvos de eventuais drogas imunomoduladoras. Sendo assim, diferentes STATs podem se constituir em alvos terapêuticos, por intermédio de bloqueio da fosforilação, ligação com os receptores, ou interferir na ligação com a molécula de DNA, modulando tanto resposta imune inata bem como adaptativa.

Com o objetivo de avaliar cinética de expressão de STATs, definimos inicialmente a cinética de ativação celular com estímulo mitogênico (PHA) e antigênico (CMV) pela expressão da molécula CD69.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a cinética da expressão de STATs em células CD3+CD69+ mostrou-se variável de acordo com a proteína analisada:

- pSTAT1 e pSTAT6 foram expressas por maior porcentagem de células nos tempos mais precoces de ativação (4 horas com mitógeno e 3 dias com antígeno);
- pSTAT3 foi expressa por maior porcentagem de células nos tempos mais tardios de ativação (24-36 horas com mitógeno e 6 dias com antígeno);
- pSTAT 4 e 5 foram expressas por maior porcentagem de células nos tempos mais tardios de ativação (24-36 horas) com mitógeno, porém com antígeno não se observou diferença entre os vários tempos avaliados;

A expressão dos seis receptores de citocinas induzida por mitógeno se deu tardiamente, 24-36 horas (CD119, CD126, CD210, CD212, CD25 e CD124); com antígeno, apenas CD126, CD212, CD25 apresentaram uma cinética com maior expressão entre 5 e 6 dias; CD119, CD210 e CD124 não apresentaram cinética, com níveis de expressão baixos em todos os tempos.

Em relação às citocinas induzidas por mitógeno, IFN- γ e IL-2 foram mais expressas a partir de 24 horas; IL-6, IL-4 e IL-10 a partir de 12 horas. Com antígeno, apenas IL-6 foi induzida, com maior expressão em 4 e 6 dias.

Melhores correlações entre os três parâmetros imunológicos estudados foram observados apenas com estímulo mitogênico. A expressão de pSTAT1 e 6 precederam a síntese

das citocinas e receptores a elas associadas (IFN- γ /CD119 e IL-4/CD124), enquanto para pSTAT3 e 5, houve concomitância na maior expressão dos parâmetros (respectivamente IL6/CD126, IL-10/CD210 e IL-2/CD25). Com pSTAT4 observamos concomitância com a maior expressão de CD212 (IL-12 não foi detectado).

Em conclusão, nossos dados permitem sugerir parâmetros para avaliação destas proteínas sinalizadoras em diferentes condições clínicas, podendo contribuir para o entendimento dos mecanismos de regulação da resposta imune nestas condições, e desta forma, identificar novos alvos terapêuticos para modulação da resposta imune inata e adaptativa.

ANEXO A - Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/05/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0134/11**, intitulado: "**AValiação da Cinética de Expressão in Vitro de Stats em Linfócitos Humanos e sua Correlação com Secreção de Citocinas e Expressão de seus Respetivos Receptores**", apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Gil Benard**

Pesquisador (a) Executante: **Susana Lima Lessa Lobo**

Co-autores: **Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, Dra. Camila Rodrigues Cacere, Dra. Maria de Lourdes Palermo Neves e Dra. Maria Angela Bianconcini Trindade**

CAPPesq, 17 de Maio de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:..... SEXO : .M ☐ F ☐

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL SEXO: M ☐ F ☐

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da cinética de expressão *in vitro* de STATs em linfócitos humanos e sua correlação com secreção de citocinas e expressão de seus respectivos receptores.

PESQUISADOR : Gil Benard

CARGO/FUNÇÃO: Docente –MS3 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 48049

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de dermatologia – LIM 56

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS.

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

O Laboratório de Investigação Médica nº56, da Faculdade de Medicina da USP, está desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender o funcionamento da resposta imune às infecções fazendo um estudo detalhado de componentes do soro humano e de proteínas intracelulares, chamadas STATs. Com estes resultados, espera-se, futuramente, contribuir com o estabelecimento de

novos alvos terapêuticos (intracelulares) que possam modular a resposta imune positiva ou negativamente de forma mais efetiva e com menos efeitos adversos.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Se concordar em participar desta pesquisa será coletado 40 mL de sangue do antebraço para realização de exames laboratoriais. Este volume é necessário para a obtenção de número adequado de células do sangue periférico para os testes de cultura celular e citometria de fluxo.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Serão coletadas amostras de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

Como em qualquer coleta de sangue pode haver desconforto local. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça. Sempre que possível esta coleta será junto com os exames de rotina evitando assim uma coleta extra.

5 – Benefícios para o participante:

Este estudo não prevê benefícios ou diretos para participantes, mas poderá ajudar no desenvolvimento de novos métodos terapêuticos que possam modular a resposta imune.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não se aplicam.

7 – Garantia de acesso:

Os participantes terão acesso ao Dr. Gil Benard para esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 3069-6442 ou ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br. O principal investigador é o **Dr Gil Benard** que pode ser encontrado no endereço: R. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3º andar Telefone(s) (11) 3061-7499.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição:

Estou ciente de que posso suspender o tratamento ou as coletas de sangue a qualquer momento, sem que este fato implique qualquer forma de constrangimento entre mim e meu medico, que se dispõe a continuar me tratando em quaisquer circunstâncias

.09 – Direito de confidencialidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:

Caso alguma informação obtida a partir dessa pesquisa possa ser útil a mim, a equipe fará todo o possível para repassá-la o mais rápido possível.

11 – Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa:

O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da cinética de expressão *in vitro* de STATs em linfócitos humanos e sua correlação com secreção de citocinas e expressão de seus respectivos receptores.” Eu discuti com o Dr. Gil Benard sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

1. MURPHY KM, REINER SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):933-44.
2. PAUL WE. *Fundamental Immunology*. 5th ed. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkan, editor. United States: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkan; 2003.
3. VARZANEH FN, KELLER B, UNGER S, AGHAMOHAMMADI A, WARNATZ K, REZAEI N. Cytokines in common variable immunodeficiency as signs of immune dysregulation and potential therapeutic targets - a review of the current knowledge. *J Clin Immunol*. 2014;34(5):524-43.
4. KAWAGUCHI M, ADACHI M, ODA N, KOKUBU F, HUANG SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1265-73; quiz 74.
5. KAPLAN MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*. 2013;252(1):104-15.
6. KNOSP CA, JOHNSTON JA. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology*. 2012;135(2):101-11.
7. TONET AC, NÓBREGA ODT. Immunosenescence: the association between leukocytes, cytokines and chronic diseases. 2008.
8. BILATE AM. O reumatologista revisita a: inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. *TEMAS DE REUMATOLOGIA CLÍNICA*. 2007:86-90.
9. BROMBERG J and DARNELL, JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. - Abstract - Europe PubMed Central. 2000.
10. MURPHY K, TRAVERS P, WALPORT M. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. ed2008.
11. RAFF M, LEWIS J, ROBERT K, ALBERT B, JOHNSON A, WALTER P. *Biologia molecular da célula*. 4th ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
12. O'SHEA JJ, PLENCE R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*. 2012;36(4):542-50.
13. KISSELEVA T, BHATTACHARYA S, BRAUNSTEIN J, SCHINDLER CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002;285(1-2):1-24.

14. C SCHINDLER A, J E DARNELL J. Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway. <http://dxdoiorg/101146/annurevbi64070195003201>. 2003.
15. CHEN E, STAUDT LM, GREEN AR. Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma. *Immunity*. 2012;36(4):529-41.
16. COMMINS SP, BORISH L, STEINKE JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S53-72.
17. PAUKKU K, SILVENNOINEN O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(6):435-55.
18. CUMMINGS HE, TULADHAR R, SATOSKAR AR. Cytokines and Their STATs in Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *BioMed Research International*. 2010;2010.
19. REICH NC. STATs get their move on. *JAKSTAT*. 2013;2(4):e27080.
20. BERG T. Signal Transducers and Activators of Transcription as Targets for Small Organic Molecules. *ChemBioChem*. 9(13):2039-44.
21. MURRAY PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007;178(5):2623-9.
22. AARONSON DS, HORVATH CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002;296(5573):1653-5.
23. SCHREIBER S, ROSENSTIEL P, HAMPE J, NIKOLAUS S, GROESSNER B, SCHOTTELIUS A, KÜHBACHER T, HÄMLING J, FÖLSCH UR AND SEEGER D. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. 2002.
24. YANG J, STARK GR. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Research*. 2008;18(4):443-51.
25. STARK GR, DARNELL JE, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012;36(4):503-14.
26. GAO B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol*. 2005;2(2):92-100.

27. SAMPATH D, CASTRO M, LOOK DC, HOLTZMAN MJ. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. 1999.
28. YOKOTA A, NARAZAKI M, SHIMA Y, MURATA N, TANAKA T, SUEMURA M, *et al.* Preferential and persistent activation of the STAT1 pathway in rheumatoid synovial fluid cells. 2001.
29. BLADON J and TAYLOR P. Extracorporeal Photopheresis Differentially Regulates the Expression of Phosphorylated STAT-1 and STAT-5 in Treated Monocytes and T cells, Respectively. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery: Incorporating Medical and Surgical Dermatology*. 2004;8(3):148-56.
30. LEAL RF, COY CSR, VELLOSO AL, AYRIZONO MLS, FAGUNDES JJ, MILANSKI M, COOPE A and GÓES JRN. Processo Inflamatório em Mucosa de Reservatório Ileais de Doentes Assintomáticos. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2008:443-8.
31. TAKEDA K, KAISHO T, YOSHIDA N, TAKEDA J, KISHIMOTO T, AKIRA S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*. 1998;161(9):4652-60.
32. REMMERS EF, PLENGE RM, LEE AT, GRAHAM RR, HOM G, BEHRENS TW, BAKKER PIW, LE JM, LEE H, BATLIWALLA F, LI W, MASTERS SL, BOOTY MG, *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2007;357(10):977-86. [\[1\]](#)
33. GREGERSEN PK, BEHRENS TW. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet*. 2006;7(12):917-28.
34. SCHINDLER C, STREHLOW I. Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol*. 2000;47:113-74.
35. Bovolenta C, Pilotti E, Mauri M, Panzeri B, Sassi M, Dall'Aglio P, BERTAZZONI U, POLI G and CASOLI C. Retroviral interference on STAT activation in individuals coinfecting with human T cell leukemia virus type 2 and HIV-1. *J Immunol*. 2002;169(8):4443-9.

36. STOIBER D, STOCKINGER S, STEINLEIN P, KOVARIK J, DECKER T. *Listeria monocytogenes* modulates macrophage cytokine responses through STAT serine phosphorylation and the induction of suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol.* 2001;166(1):466-72.
37. GOLLOB JA, VEENSTRA KG, JYONOUCHI H, KELLY AM, FERRIERI P, PANKA DJ, ALTARE F, FIESCHI C, CASANOVA JL, FRANK DA AND MIER JW. Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections. *J Immunol.* 2000;165(7):4120-6.
38. KINCAID EZ, ERNST JD. *Mycobacterium tuberculosis* Exerts Gene-Selective Inhibition of Transcriptional Responses to IFN- γ Without Inhibiting STAT1 Function. 2003.
39. REDDY M, EIRIKIS E, DAVIS C, DAVIS HM, PRABHAKAR U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods.* 2004;293(1-2):127-42.
40. GAVASSO S, MOSLETH EF, MARØY T, JØRGENSEN K, NAKKESTAD HL, GJERTSEN BT, MYHR KM AND VEDELER C. Deficient phosphorylation of Stat1 in leukocytes identifies neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *PLoS One.* 2014;9(2):e88632.
41. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. *Imunologia celular e molecular.* 6º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
42. CASTELLANOS MEC, LÓPEZ-GIRAL S, LÓPEZ-CABRERA M, DE LANDÁZURI MO. Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69. *Eur J Immunol.* 2002;32(11):3108-17.
43. LIAO W, SCHONES DE, OH J, CUI Y, CUI K, ROH TY, ZHAO K and LEONARD WJ. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol.* 2008;9(11):1288-96.
44. DURANT L, WATFORD WT, RAMOS HL, LAURENCE A, VAHEDI G, WEI L, TAKAHASHI H, SUN HW, KANNO Y POWRIE F and O'SHEA JJ. Diverse targets of the

transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. 2010;32(5):605-15.

45. SCHULZ EG, MARIANI L, RADBRUCH A, HOFER T. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity*. 2009;30(5):673-83.
46. LIAO W, LIN JX, LEONARD WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):598-604.