

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

*A via de sinalização de STING limita o
potencial patogênico de células T_H17*

Luis Eduardo Alves Damasceno

Ribeirão Preto
2023

Luis Eduardo Alves Damasceno

**A via de sinalização de STING limita o
potencial patogênico de células T_H17**

(Versão Corrigida)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Ribeirão Preto

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Damasceno, Luis Eduardo Alves

A via de sinalização de STING limita o potencial patogênico de células T_H17. Ribeirão Preto, 2023.

113 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho.

1. Células T_H17. 2. Patogenicidade. 3. STING. 4. AhR. 5. IL-10. 6. Ror γ t. 7. IRF3.

Nome: Luis Eduardo Alves Damasceno

Título: A via de sinalização de STING limita o potencial patogênico de células T_H17

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara. Instituição: ICB-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Larissa Dias da Cunha. Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Renata de Meirelles Santos Pereira. Instituição: UFRJ

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos nº 2018/17542-4 e nº 2021/08800-2).

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão,
e toda família pelo amor e apoio incondicionais.

Agradecimentos

A Deus, em Quem deposito minha fé, pelas oportunidades concedidas e pela força em superar os obstáculos com leveza e tranquilidade nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, professor José Carlos (Zeca) pela atenção, amizade e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional. Muito obrigado pela acolhida e incentivo!

Aos demais professores do Laboratório de Inflamação e Dor (LID), Fernando Cunha e Thiago Cunha, por também contribuírem para minha formação como cientista e pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto.

A todos os amigos e colegas do LID, em especial, Rafaela Guimarães, Bruno Marcel, Guilherme Cebinelli, Timna Varela, Beatriz Adjafre, Marcos Rosa, Juliana Toller, Maria Cláudia, Paulo Melo, Flávio Protásio, Douglas Prado, Miriam Fonseca, Daniela Nascimento, Camila Meirelles, Paula Viacava, Gabriel Públio, Caroline Vitória, João Paulo, Bruna Manuela, Diego Caetité, Paula Barbim, Cleyson Barros, Gabriella Chiari, Carlos Wagner, Glauce, Alexandre Maganin, Elidiane, Fábio Bonifácio, Isaac, Gabriel Victor, Anderson Ramos, Atlante Mendes, César Speck e Juliana Silva e pelo convívio amigável e cooperativo.

Ao professor Tim Sparwasser, por ter me recebido em seu laboratório na Universitätsmedizin Mainz, na Alemanha, para meu Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) e ter contribuído para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também aos amigos e colegas do Sparwasser AG e Berod AG: Luana Silva, Ayesha Dhillon-Labrooy, Sara Valejo, Yu-San Kao, Janet Godoy, Luís Almeida, Francesca Rampoldi, Elizaveta, Panagiota Mamareli, Fátima Boukhallouk e Aleksandra Lopez pelas discussões científicas e também pela amizade e acolhimento.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia em especial aos técnicos do LID, Kátia Santos (Katinha), Diva Souza, Ieda Santos, Marco Antônio, Sérgio Rosa, Vânia Fernandez e Marcela Grando pelo apoio técnico. Agradeço também aos

responsáveis pelo Biotério do Departamento de Farmacologia, Eliana e colaboradores, e do Centro de Criação de Camundongos Especiais, Dener, Júlio e todos os colaboradores.

Aos professores e discentes da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (IBA), pelos ensinamentos e discussões científicas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial à Ana S. Cristine Ferreira, secretária do IBA, pelo apoio, dedicação e solicitude. Agradeço também à Denise Ferraz, pelo auxílio com os experimentos de *cell sorting*.

Aos demais colaboradores desse projeto, em especial, o professor Marco Vinolo e sua aluna Mariane Font, do IB-UNICAMP, por me receber em seu laboratório e me auxiliar na padronização da técnica de imunoprecipitação da cromatina, e ao professor Sérgio Costa, do ICB-UFMG, por ter gentilmente fornecido os animais STING KO utilizados nesse estudo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, Luiz Damasceno e Jovineuda Damasceno, os quais me deram a vida e me ensinaram a vivê-la dignamente. Sou grato por todo apoio e incentivo constantes, pelas palavras valiosas e sábias, por todo amor, carinho, educação e compreensão. Ao meu irmão Henrique Damasceno, pelo incentivo, apoio, e por acreditar em meu potencial. Amo vocês!

Aos meus avós José Lima (*in memoriam*), Rita Lima (*in memoriam*), Manoel Damasceno (*in memoriam*) e Maria Damasceno, pelo exemplo de determinação, pelo amor, carinho, atenção, orações e confiança nas minhas conquistas. Agradeço à toda minha família, pelo suporte e pelos momentos de aconchego e compreensão.

Aos meus velhos e novos amigos, os quais de longe ou perto demonstram

companheirismo e incentivo, além de proporcionar alegria e descontração em vários momentos da minha vida.

Às fontes financiadoras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processos nº 2018/17542-4 (bolsa no país) e nº 2021/08800-2 (bolsa no exterior) – CNPq, CAPES, FAEPA e Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, bem como para a participação em eventos científicos, que foram de grande importância para minha formação acadêmica, científica e profissional.

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less."

Marie Curie

DAMASCENO, L.E.A. **A via de sinalização de STING limita o potencial patogênico de células T_H17.** 2023. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2023.

RESUMO

Ácidos nucleicos são carreadores essenciais da informação genética dos organismos vivos. Sabe-se que o processo inflamatório com lesão tecidual resulta em liberação de fragmentos de DNA que podem ativar respostas imunes. A proteína STING (*STimulator of INterferon Genes*) é um importante componente intracelular da maquinaria de reconhecimento de DNA citoplasmático, microbiano ou próprio, promovendo classicamente a expressão de IFNs do tipo I. Contudo, a sinalização STING está majoritariamente associada a respostas imunes inatas, sendo pouco explorada em células da imunidade adaptativa. Células T_H17 compreendem uma subpopulação de linfócitos T CD4 implicada na defesa do hospedeiro contra bactérias extracelulares e fungos, mas também por promover inflamação em doenças autoimunes. Fatores externos e/ou intrínsecos têm sido descritos por promover modificações transcricionais, epigenéticas e pós-traducionais que regulam o estado funcional destas células. De fato, as células T_H17 têm sido destacadas por apresentarem alta plasticidade de acordo com o contexto. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel de STING sobre a plasticidade e potencial patogênico de células T_H17. Inicialmente, observamos que STING é expresso e funcional em células T_H17 e sua ativação é capaz de limitar a produção de IL-17A, enquanto aumenta a expressão de IL-10 *in vitro*. Curiosamente, demonstramos que as células T_H17 não-patogênicas expressam níveis mais elevados de STING do que aquelas ativadas em condições patogênicas. De acordo, a atividade de STING acompanha reduzida expressão do marcador patogênico *Il23r* e aumento na expressão de *Il10* e *Cd5l*, os quais estão associados ao estado não-patogênico de células T_H17. Ainda, observamos que os efeitos induzidos por STING ocorrem de forma independente da sinalização de IFNs do tipo I. Mecanicamente, vimos que a produção de IL-10 induzida por STING requer parcialmente a sinalização do receptor AhR. Em paralelo, Ror γ t e IRF3 são capazes de interagir entre si, e que a forma ativa de IRF3 encontra-se no núcleo de células T_H17 exclusivamente após ativação de STING. Neste cenário, a localização de IRF3 ativado no núcleo coincide com a alta expressão de Ror γ t neste

compartimento. De fato, observamos que a sinalização desencadeada por STING reduz a ligação de Ror γ t à região CNS2 no gene *Il17a*, que é crucial para a transcrição e expressão de IL-17A. Em uma abordagem translacional, observamos que células T_H17 humanas ativadas com agonistas de STING *in vitro* recapitulam os efeitos observados em células murinas. Portanto, nossos achados revelam um papel intrínseco de STING em limitar o programa patogênico de células T_H17, propondo-o como um importante alvo farmacológico para doenças inflamatórias mediadas por células T_H17.

Palavras-chave: células T_H17. Patogenicidade. STING. AhR. IL-10. Ror γ t. IRF3.

DAMASCENO, L.E.A. **The STING signaling pathway limits the pathogenic potential of T_H17 cells**. 2023. Doctoral Thesis – Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil, 2023.

ABSTRACT

Nucleic acids are essential carriers of genetic information in living organisms. It is known that the inflammatory process along with tissue damage results in the release of DNA fragments that may activate immune responses. The STING protein (STimulator of INterferon Genes) is an important intracellular component of the microbial or self- cytoplasmic DNA recognition machinery, classically promoting the expression of type I IFNs. However, STING signaling is mostly associated with innate immune responses, being poorly explored in adaptive immunity cells. T_H17 cells comprise a subpopulation of CD4 T lymphocytes implicated in host defense against extracellular bacteria and fungi, but also in promoting inflammation in autoimmune diseases. External and/or intrinsic factors have been described to promote transcriptional, epigenetic and post-translational changes that regulate the functional state of these cells. In fact, T_H17 cells have been highlighted for presenting high plasticity according to the context. In this sense, the aim of this study was to evaluate the role of STING on the plasticity and pathogenic potential of T_H17 cells. Initially, we observed that STING is expressed and it is functional in T_H17 cells, and its activation is able to limit the production of IL-17A, while increasing the expression of IL-10 *in vitro*. Interestingly, we demonstrated that non-pathogenic T_H17 cells express higher levels of STING than those activated under pathogenic conditions. Accordingly, STING activity accompanies reduced expression of the pathogenic marker *Il23r* and increased expression of *Il10* and *Cd5l*, which are associated with the non-pathogenic state of T_H17 cells. Furthermore, we observed that STING-induced effects occur independently of type I IFN signaling. Mechanistically, we noticed that STING-induced IL-10 production partially requires AhR receptor signaling. In parallel, Ror γ t and IRF3 are able to interact with each other, and that the active form of IRF3 is found in the nucleus of T_H17 cells exclusively after activation of STING. In this scenario, the localization of activated IRF3 in the nucleus coincides with the high expression of Ror γ t in this compartment. Indeed, we observed that STING-triggered signaling reduces Ror γ t

binding to the CNS2 region in the *Il17a* gene, which is crucial for transcription and expression of IL-17A. In a translational approach, we observed that human T_H17 cells activated with STING agonists *in vitro* recapitulate the effects observed in murine cells. Therefore, our findings reveal an intrinsic role of STING in limiting the pathogenic program of T_H17 cells, proposing it as an important pharmacological target for inflammatory diseases mediated by T_H17 cells.

Keywords: T_H17 cells. pathogenicity. STING. AhR. IL-10. Ror γ t. IRF3.

Lista de figuras

Figura 1	–	Expressão de STING em células T _H 17.....	48
Figura 2	–	A cascata de sinalização clássica de STING é funcional em células T _H 17.....	49
Figura 3	–	A ativação de STING promove alterações no perfil de citocinas produzidas por células T _H 17.....	50
Figura 4	–	A expressão de STING é reduzida em células T _H 17 com maior potencial patogênico.....	51
Figura 5	–	STING regula o potencial patogênico de células T _H 17.	52
Figura 6	–	STING regula a expressão de genes associados ao perfil T _H 17.....	53
Figura 7	–	A inibição farmacológica de STING recapitula os efeitos obtidos com sua deleção gênica.....	54
Figura 8	–	A inibição farmacológica de STING reverte os efeitos de sua ativação sobre o perfil transcricional de células T _H 17.....	54
Figura 9	–	Mutação na proteína STING impede sua atividade em regular a expressão de IL-17A e IL-10 em células T _H 17.....	55
Figura 10	–	A expressão de IFN β aumenta após ativação de STING, mas não é responsável pela regulação do fenótipo T _H 17.....	56
Figura 11	–	Blimp-1 não é necessário para a produção de IL-10 induzida por STING em células T _H 17.....	57
Figura 12	–	Ativação de STING em células T _H 17 induz aumento na atividade de AhR.....	58
Figura 13	–	A expressão de AhR e STING estão associados ao perfil com menor potencial patogênico.....	59
Figura 14	–	AhR controla a expressão de IL-10 induzida pela ativação de STING em células T _H 17.....	60
Figura 15	–	A expressão de <i>Il10</i> induzida por STING é drasticamente reduzida em células T _H 17 deficientes de AhR.....	61
Figura 16	–	A ativação de STING não altera a expressão de IL-10 em células T _H 1.....	61

Figura 17 – A IL-10 induzida pela ativação de STING não atua no mecanismo pelo qual STING reduz a patogenicidade de células T _H 17	63
Figura 18 – Ativação de STING não altera a expressão de Ror γ t.....	63
Figura 19 – A ativação de STING regula negativamente o programa inflamatório de células T _H 17 terminalmente diferenciadas expostas à IL-23.....	64
Figura 20 – IRF3 interage com Ror γ t em células T _H 17.....	66
Figura 21 – A ativação de STING limita a expressão de IL-17A por reduzir a atividade transcricional de Ror γ t.....	67
Figura 22 – STING promove aumento nas taxas de fosforilação oxidativa em células T _H 17.....	68
Figura 23 – A cascata de sinalização de STING é funcional em células T _H 17 humanas.....	69
Figura 24 – A ativação de STING em células T _H 17 humanas reduz a produção de IL-17A sem alterar a expressão de Ror γ t.....	70
Figura 25 – A ativação de STING reduz a expressão de <i>IL17A</i> e <i>IL23R</i> em células T _H 17 humanas.....	71
Figura 26 – STING induz conversão de células T _H 17 humanas em células T _{reg} (Foxp3 ⁺).....	72
Figura 27 – Representação esquemática dos mecanismos pelos quais STING regula a patogenicidade de células T _H 17.....	84

Lista de Abreviaturas e Siglas

AhR	Receptor de Hidrocarbonetos de Arila
AIM2	Ausente em Melanoma 2
CDN	Dinucleotídeo Cíclico
ChIP	Imunoprecipitação de Cromatina
CNS2	Região Não Codificadora Conservada 2
cT _H 17	Células T <i>Helper</i> 17 Convencionais
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DMXAA	Ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético
dsDNA	DNA Fita Dupla
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
FAO	Oxidação de Ácido Graxos
FBS	Soro Fetal Bovino
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de Interferon- α/β
IL-	Interleucina
IP	Imunoprecipitação
IRF3	Fator Regulador de Interferon 3
ISG	Genes Estimulado por Interferon
LN	Linfonodo
NLR	Receptores Similares ao Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo
NPM	Nucleofosmina
OCR	Taxa de Consumo de Oxigênio
OXPPOS	Fosforilação Oxidativa
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
pT _H 17	Células T <i>Helper</i> 17 Patogênicas
RE	Retículo Endoplasmático
RLR	Receptores do Tipo RIG-I

R γ yt	Receptor Órfão Relacionado ao Ácido Retinóico Gama T
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
SFB	Bactérias Filamentosas Segmentadas
STING	Estimulador de Genes de Interferon
TBK1	Quinase 1 de Ligação à TANK
T _H 17	Células T <i>Helper</i> 17
TLR	Receptores do Tipo <i>Toll</i>
T _{reg}	Células T Reguladoras
WB	Western Blot

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. A via de sinalização de STING e suas funções	21
1.2. STING como regulador da resposta imune	26
1.3. Células T _H 17 e sua plasticidade	28
2. HIPÓTESE	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Animais	39
4.2. Ferramentas farmacológicas.....	39
4.3. Cultura de células T murinas <i>in vitro</i>	39
4.4. Cultura de células T _H 17 humanas <i>in vitro</i>	40
4.5. Citometria de fluxo	41
4.6. Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).....	42
4.7. Western Blot e imunoprecipitação	43
4.8. Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP).....	45
4.9. Análise da taxa de consumo de oxigênio (OCR)	45
4.10. Análise estatística	46
5. RESULTADOS	47
5.1. STING é expressa em células T _H 17 e sua ativação regula o perfil de citocinas	48
5.2. A expressão e a atividade de STING estão inversamente associadas ao potencial patogênico de células T _H 17	50
5.3. A expressão de IL-10 mediada por STING em células T _H 17 é parcialmente dependente da sinalização de AhR	55
5.4. A ativação de STING reduz a atividade transcricional de Ror γ t	62
5.5. Impacto da ativação de STING no metabolismo oxidativo de células T _H 17	68
5.6. Os efeitos da ativação de STING são recapitulados em células T _H 17 humanas	69

6.	DISCUSSÃO.....	73
7.	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	105

1. Introdução

1.1. A via de sinalização de STING e suas funções

O sistema imune inato compreende a primeira linha de defesa de um hospedeiro, reconhecendo infecções microbianas por meio de receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors*; PRRs). Esses receptores reconhecem estruturas conservadas importantes para o ciclo de vida dos patógenos chamadas de padrões moleculares associadas a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*; PAMPs), cujo processo desencadeia vias de sinalização intracelular que culmina na ativação de fatores de transcrição e produção de citocinas para conter a infecção (BRUBAKER et al., 2015). Desta forma a resposta imune inata auxilia ainda a geração de uma resposta adaptativa eficiente.

Uma variedade de PRRs são descritos atualmente, incluindo receptores do tipo Toll (TLRs), os similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs) e do tipo RIG-I (RLRs), os quais diferem quanto ao compartimento celular em que estão localizados, bem como a natureza do PAMP e tipo de patógeno que reconhecem (KANNEGANTI, 2020). Por exemplo, a entrada da maioria de vírus e bactérias nas células hospedeiras ocorre por endocitose, e nesse contexto, os TLRs 3, 7, 8, 9 e 13 estão localizados em endolisossomos com a finalidade de reagirem a distintos ácidos nucleicos derivados destes patógenos (FITZGERALD; KAGAN, 2020). Enquanto isso, sensores do tipo RLRs (ex. RIG-I, MDA5 e LGP2) reconhecem RNA de fita única (*single-stranded RNA*; ssRNA) ou dupla fita (*double-stranded RNA*; dsRNA) liberados no citoplasma das células hospedeiras no curso de uma infecção (REHWINKEL; GACK, 2020). Logo, considerando que microrganismos invasores utilizam DNA e/ou RNA para replicação (ex. vírus), liberando o genoma no citoplasma de células hospedeiras, o reconhecimento de ácidos nucleicos surgiu como importante mecanismo da imunidade inata para iniciar as respostas antimicrobianas (TAN et al., 2018).

Sob condições fisiológicas, as moléculas de DNA em células eucariotas estão confinadas ao núcleo e mitocôndrias, e, portanto, o acúmulo de DNA no citoplasma pode ser indicativo de infecção. Além disso, eventual estresse e dano celular pode acarretar na liberação de DNA próprio do hospedeiro, que passa a atuar como um sinal endógeno de perigo ou padrão molecular associado ao dano (*damage-associated molecular pattern*; DAMP). Em ambos os casos, DNA citoplasmático

próprio ou de origem microbiana são capazes de ativar sensores de DNA no citoplasma para induzir respostas imunes robustas (WU; CHEN, 2014).

Neste cenário, destacam-se duas importantes vias para reconhecimento de DNA citoplasmático, as quais envolvem a proteína ausente em melanoma 2 (*absent in melanoma 2*; AIM2) e a ativação do Estimulador de Genes de Interferon (*Stimulator of Interferon Genes*; STING). A ativação de AIM2 por DNA leva ao recrutamento da proteína ASC para formação do complexo inflamassoma, desta forma, permite a ativação de caspase-1 para maturação e produção de IL-1 β e IL-18 por clivagem proteolítica, bem como indução de piroptose (KUMARI et al., 2020). Por outro lado, a ativação da via de sinalização de STING ocorre principalmente por intermédio de sensores de DNA como a GMP-AMP cíclico sintase (*cyclic GMP-AMP synthase*; cGAS), que medeia a produção de dinucleotídeos cíclicos que se ligam ao STING, desencadeando a ativação da quinase 1 de ligação à TANK (*TANK-binding kinase 1*; TBK1) e Fator Regulador de Interferon 3 (*Interferon Regulatory Factor 3*; IRF-3) para a produção de interferons (IFN) do tipo I (HOPFNER; HORNUNG, 2020). Embora AIM2 tenha um papel importante na imunidade contra patógenos, a resposta mais proeminente ao DNA citoplasmático se dá pela indução de IFNs do tipo I (ISHII et al., 2006; STETSON; MEDZHITOV, 2006).

A proteína STING (também conhecida como MITA, ERIS ou MPYS), codificada pelo gene *TMEM173* (*Tmem173* em camundongos), foi descrita como essencial para a resposta imune inata a ácidos nucleicos (ISHIKAWA; BARBER, 2008; SUN et al., 2009; ZHONG et al., 2008). STING é expressa em uma variedade de células imunes como macrófagos, células dendríticas, células natural *killer* (NK), e células T e B, bem como em células não hematopoiéticas, incluindo células epiteliais, endoteliais e neurônios e em diferentes tecidos como coração, pulmão e baço (ANASTASIOU et al., 2021; ISHIKAWA; BARBER, 2008; LARKIN et al., 2017; NAZMI et al., 2012; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES et al., 2013; WALKER et al., 2018).

STING é uma proteína adaptadora composta por 379 (humano) ou 378 (camundongo) aminoácidos, que em condições homeostáticas está localizada no citoplasma junto ao retículo endoplasmático (RE) na forma de homodímeros consistindo de uma região N-terminal, um domínio transmembrana com quatro segmentos, uma região conectora, um domínio citosólico de ligação ao ligante (*ligand-binding domain*; LBD) e uma calda C-terminal (*C-terminal tail*; CTT) (HUANG et al., 2012; OUYANG et al., 2012; SHANG et al., 2012, 2019; ZHANG et al., 2013).

STING pode ser ativado por diferentes sensores de DNA citoplasmáticos, incluindo a proteína 16 induzida pelo interferon gama (*interferon-gamma inducible protein 16*; IFI16) (JØNSSON et al., 2017; UNTERHOLZNER et al., 2010), *DEAD-box helicase 41* (DDX41) (ZHANG et al., 2011b), e cGAS (também conhecida como MB21D1), este último sendo amplamente descrito na literatura. cGAS possui um domínio catalítico e dois sítios de ligação ao DNA, desta forma, cGAS é capaz de ligar-se ao dsDNA citoplasmático, o que a torna enzimaticamente ativa para a síntese do dinucleotídeo cíclico (*cyclic dinucleotide*; CDN) cGAMP utilizando ATP e GTP como substratos (ABLASSER et al., 2013a; SUN et al., 2013). Recentemente, demonstrou-se que além de ligar-se e ativar STING intracelular, os CDNs produzidos também podem ser exportados para o meio extracelular, os quais atuam como imunotransmissores por ativar STING em outras células imunes presentes no ambiente (CAROZZA et al., 2020).

Ao interagir com STING, tanto cGAMP como os outros CDNs c-di-AMP e c-di-GMP (segundos mensageiros de origem bacteriana) (BURDETTE et al., 2011; ISHIKAWA; MA; BARBER, 2009), promovem mudanças conformacionais e a oligomerização de STING, levando ao seu translocamento do RE para compartimentos perinucleares, como o compartimento intermediário RE-Golgi (*ER-Golgi intermediate compartments*; ERGICs), o complexo de Golgi, endossomos e autofagossomos por meio de um processo dependente de vesículas do complexo II de proteínas do envoltório (*coat protein complex II*; COPII) (DOBBS et al., 2015; MUKAI et al., 2016; SAITOH et al., 2009; ZHANG et al., 2019). Ainda, tem sido demonstrado que STING pode se ligar diretamente a dsDNA de forma independente de outros sensores, entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual essa interação ocorre (ABE et al., 2013). De todo modo, a ativação de STING é um processo chave em resposta ao reconhecimento de dsDNA citoplasmático.

Com sua ativação e translocamento, STING expõe o domínio CTT que serve como sítio de ancoragem para TBK1, a qual é autofosforilada (resíduo S172), promove a fosforilação de STING (S366 em humano; S365 em camundongo). Além disso, uma outra característica da ativação de STING é a palmitoilação dos resíduos de STING nos resíduos C88 e C91 após sua translocação para o complexo de Golgi, cuja modificação pós-traducional é descrita como essencial para sinalização de STING (MUKAI et al., 2016). Juntamente com a ativação de STING, TBK1 também estimula o recrutamento e fosforilação (S396) do fator de transcrição IRF3 (CHEN; SUN;

CHEN, 2016; TANAKA; CHEN, 2012; ZHANG et al., 2019), o que promove a dimerização de IRF3, seguido de translocação para o núcleo, onde inicia a transcrição de genes inerentes à resposta imune inata, com destaque para os IFNs do tipo I (LIU et al., 2015; TANAKA; CHEN, 2012). De uma forma menos expressiva, a ativação do eixo STING-TBK1 é capaz de recrutar a quinase I κ B (*I κ B kinase*; IKK), que por sua vez fosforila o inibidor do fator nuclear κ B (*nuclear factor- κ B (NF- κ B) inhibitor*, I κ B α), facilitando a ativação e translocamento nuclear de NF- κ B para transcrição de genes inflamatórios (ABE; BARBER, 2014; DUNPHY et al., 2018). Entretanto, a montagem do sinalossoma STING-TBK1-IRF3 representa a via canônica de ativação de STING.

Os IFNs do tipo I, com destaque para IFN α e IFN β , são citocinas pleiotrópicas que agem de forma parácrina e autócrina por meio de sua ligação a receptores heterodímeros IFNAR1 e IFNAR2, culminando na ativação da quinase Janus 1 (*Janus kinase 1*; JAK1) e tirosina quinase 2 (*tyrosine kinase 2*; TYK2) (STARK; DARNELL, 2012). Essas quinases promovem a fosforilação dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1 (*signal transducers and activators of transcription 1*; STAT1) e 2 (STAT2), os quais formam heterodímeros e translocam para núcleo, onde induzem a expressão de genes estimulados por IFN (*IFN stimulated genes*; ISGs) (SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014; STANIFER; PERVOLARAKI; BOULANT, 2019). As proteínas codificadas pelos ISGs medeiam diversos mecanismos de combate a infecção, como bloqueando a tradução de proteínas virais, impedindo a replicação viral e induzindo a degradação de ácidos nucleicos virais além de regular quimiotaxia, migração e proliferação celular (CHEN; LIU; CAO, 2017; SCHOGGINS, 2019).

Além de promover o estado antiviral na célula, a cascata de sinalização induzida por IFN do tipo I compreende ainda outras vias que promovem a expressão de efetores antibacterianos, outras citocinas, quimiocinas e moléculas metabólicas, o que faz da sinalização mediada por IFN do tipo I diversa, com funções pro-inflamatórias e anti-inflamatórias (IVASHKIV; DONLIN, 2014). Por exemplo, IFNs do tipo I são descritos por induzir a produção de IL-10, uma potente citocina imunossupressora com amplos efeitos em células do sistema imune inato e adaptativo (CHANG et al., 2007; JIANG et al., 2016; MCNAB et al., 2014).

Os estudos iniciais sobre a sinalização de STING apontaram sua importante função na defesa do hospedeiro a infecções. Posteriormente, observou-se que em

alguns contextos, o acúmulo de DNA próprio citoplasmático devido a disfunções em exonucleases que degradam eventual DNA presente no citoplasma ou mutações na proteína STING, estaria associado ao surgimento de doenças auto-inflamatórias, caracterizada por uma produção excessiva de IFN do tipo I, denominadas interferonopatias do tipo I (CROW; STETSON, 2022). O exemplo mais proeminente é a rara vasculopatia associada ao STING com início durante a infância (*STING-Associated Vasculopathy With Onset in Infancy*; SAVI), que ocorre devido a uma mutação de ganho de função de STING que constitutivamente promove produção de IFN do tipo I e surgimento de inflamação sistêmica com doença pulmonar intersticial, lesões na pele e vasculopatia grave (LIU et al., 2014). Nesse sentido, cientistas geraram animais com a mutação N153S em STING (que corresponde a N154S em humanos) como modelo experimental de SAVI, os quais compartilham características clínicas da doença, entretanto, foi observado que isso ocorre de forma independente de IFN do tipo I (LUKSCH et al., 2019; WARNER et al., 2017).

Considerando os fatos acima, evidências apontam para funções de STING independentes da produção de IFNs do tipo I. Por exemplo, recentemente foi demonstrado que enquanto animais com deficiência total de STING sucumbem após a infecção com HSV-1, camundongos com mutação em STING restrita ao resíduo S365 (que é essencial para indução de IFN do tipo I) são resistentes à infecção por HSV-1, indicando que STING é crucial para conter a infecção de modo independente de IFN do tipo I (YAMASHIRO et al., 2020). STING também participa diretamente de processos celulares. Por exemplo, existem evidências de que quando localizado na ERGIC, STING promove autofagia, bem como a própria degradação para evitar sua ativação excessiva. Isso ocorre por meio do recrutamento e interação com a cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (*microtubule-associated light chain 3*; LC3), favorecendo a lipidação de LC3 e a formação do autofagossomo. Assim, a degradação autofágica subsequente à fusão do autofagossomo e lisossomo auxilia na remoção de DNA e vírus do citoplasma (GUI et al., 2019; LIU et al., 2019). Adicionalmente, STING está envolvido no controle da proliferação celular, uma vez que células tumorais deficientes de STING apresentam antecipação do início do ciclo celular e alto grau de instabilidade cromossômica, concomitante com maior ativação de quinase dependente de ciclina 1 (*cyclin-dependent kinase 1*; CDK1), favorecendo a tumorigênese (RANO et al., 2019).

Os achados descritos acima demonstram o potencial de STING em mediar vias celulares não-canônicas. De fato, apesar da proteína STING ser amplamente conservada entre os filos animais, a cauda C-terminal (CTT) que é crucial para sinalização que leva a produção de IFNs do tipo I somente está presente em vertebrados, o que sugere que as funções de STING vão além da produção dessas citocinas (MARGOLIS; WILSON; VANCE, 2017).

1.2. STING como regulador da resposta imune

Sabe-se que o reconhecimento de DNA próprio pelo sistema imune pode levar a quebra de tolerância e promover doenças autoimunes, o que tem levado pesquisadores a investigar como o reconhecimento de DNA endógeno está envolvido nesse processo (ZHANG et al., 2022). De modo geral, a produção crônica de IFNs do tipo I tem sido associado ao desenvolvimento dessas doenças.

Lúpus eritematoso sistêmico (*systemic lupus erythematosus*; SLE) é uma doença autoimune crônica que se caracteriza pelo acúmulo de anticorpos anti-nucleares contra ácidos nucleicos próprios, afetando vários órgãos (KAUL et al., 2016). Tem sido descrito que PBMCs isolados de cerca de 15% de uma coorte de pacientes com SLE apresentam níveis elevados de 2'3'-cGAMP, enquanto nenhum dos indivíduos do grupo controle expressam esse ativador de STING nos PBMCs (AN et al., 2017). Ainda, os PBMCs da maior parte de pacientes com SLE possuem uma assinatura de genes induzidos por IFN (CROW, 2014). Por outro lado, estudos utilizando animais que desenvolvem SLE espontaneamente (MRL/Lpr) deficientes de STING demonstram que a deficiência de STING promove níveis mais altos de auto-anticorpos, citocinas inflamatórias e glomerulonefrite lúpica em relação aos animais WT MRL/Lpr, indicando uma exacerbação da inflamação sistêmica. Isso sugere que STING pode funcionar como um regulador negativo na SLE (SHARMA et al., 2015).

A esclerose múltipla (*multiple sclerosis*; MS) é uma doença autoimune crônica que afeta o sistema nervoso central (SNC), causando neuroinflamação e desmielinização. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um modelo animal para MS, no qual camundongos são imunizados com o peptídeo glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) e desenvolvem características clínicas que se assemelham aos da MS (BIRMPILI et al., 2022). Lemos e colegas (2014) demonstraram que a ativação de STING exerce um papel protetor na EAE, uma vez

que o tratamento com nanopartículas de DNA (DNPs) ou com o CDN c-di-GMP foram igualmente capazes de reduzir os sinais clínicos da doença, acompanhado da baixa produção de citocinas inflamatórias (ex. IL-17, IL-6 e IFN γ) por esplenócitos após reestimulação antigênica com MOG₃₅₋₅₅ *in vitro* (LEMOS et al., 2014). Neste cenário, a ativação de STING foi capaz de induzir a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (*indoleamine 2,3 dioxigenase*; IDO1) em células hematopoiéticas. Esta enzima está envolvida com o metabolismo de triptofano, mas também tem se destacado por suas funções tolerogênicas, como a regulação negativa da produção de citocinas inflamatórias e suprimir a resposta mediada por células T, prevenindo autoimunidade (MUNN; MELLOR, 2013). Recentemente, outro estudo demonstrou que a abordagem terapêutica com injeção de micropartículas encapsuladas com o CDN cGAMP (cGAMP MP) em animais com EAE, culminou na diminuição dos parâmetros clínicos e início tardio da doença, por induzir a produção de IL-27 através de mecanismos dependentes e independentes de IFNs do tipo I. De acordo, esses efeitos foram perdidos em animais que apresentam mutação disfuncional em STING (JOHNSON et al., 2021).

A mucosa intestinal é uma das principais interfaces de interação entre a microbiota e o hospedeiro, onde a manutenção da homeostase tecidual se dá pelo equilíbrio entre tolerância imunológica aos microrganismos comensais e resposta imune contra patógenos (ROOKS; GARRETT, 2016). Logo, alterações por fatores ambientais ou desequilíbrio nas respostas imunes podem levar a inflamação intestinal. A microbiota intestinal secreta vários metabólitos que controlam esses mecanismos, além de serem a fonte de CDNs encontrados no trato gastrointestinal em condições fisiológicas (DANILCHANKA; MEKALANOS, 2013; ROOKS; GARRETT, 2016). Nesse cenário, Canesso e seus colaboradores (2018) demonstraram que CDNs produzidos pela microbiota intestinal são capazes de ativar o eixo STING-IFN do tipo I para manutenção da homeostase local. Além disso, os autores observaram que a deficiência de STING foi suficiente para o agravamento da colite induzida por dextran sulfato de sódio (*dextran sulfate sodium*; DSS), que foi associada a baixos níveis de IL-10 nos linfonodos mesentéricos e concentração aumentada de IL-17 no cólon dos animais. Adicionalmente, experimentos utilizando modelo de colite induzida por transferência de células T demonstraram que células T CD4⁺ deficientes de STING foram suficientes para induzir inflamação intestinal mais grave (CANESSO et al., 2018). Em corroboração a estes achados, outro estudo demonstrou que CDNs

derivados da microbiota ativam STING em fagócitos mononucleares e induzem a produção de IL-10 para prevenir inflamação e promover a homeostase intestinal (AHN et al., 2017).

Embora os estudos destacados acima tenham esclarecido que STING pode suprimir respostas inflamatórias, nenhum deles explorou o papel intrínseco desta proteína em células T, as quais são essenciais no desenvolvimento e manutenção de diversas doenças inflamatórias, incluindo as autoimunes (YASUDA; TAKEUCHI; HIROTA, 2019). Ainda, a produção de IFN do tipo I é amplamente associada a função de células inatas durante uma resposta antiviral, sendo este aspecto até recentemente, pouco explorado em células da imunidade adaptativa (MURIRA; LAMARRE, 2016). No entanto, ainda na década de 80, um grupo francês demonstrou que a estimulação *in vitro* de linfócitos T murinos com 10-carboximetil-9-acridanona (10-carboxymethyl-9-acridanone; CMA), atualmente conhecido como um ativador de STING, induziu a secreção de IFN β por estas células (STORCH et al., 1986).

Nos últimos anos, alguns estudos revelaram que a estimulação de TCR em células T na presença de ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid; DMXAA), um agonista sintético de STING, leva a expressão de IFNs do tipo I (LARKIN et al., 2017). Contudo, sabe-se que a ativação do TCR não é suficiente para que estas células adquiram funções relevantes nas respostas imunes, as quais dependem do *milieu* de citocinas disponíveis no ambiente para manterem-se viáveis e adquirirem distintos fenótipos que desempenham funções de acordo com o contexto da resposta imune (LUCKHEERAM et al., 2012). Logo, embora a ativação de STING possa levar a respostas tolerogênicas ou imunogênicas de acordo com a doença e o tipo de celular, ainda não está bem claro sobre o seu papel na diferenciação e função de subpopulações de células T.

1.3. Células T_H17 e sua plasticidade

Os estudos iniciais com foco na biologia de células T CD4 assumiam que após maturação e ativação, estas células eram capazes de se diferenciar em subpopulações específicas estáveis que exerciam funções de acordo com o tipo de resposta imune a ser montada (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; MOSMANN et al., 1986). Ao longo dos anos percebeu-se que estas células, mesmo após diferenciação, são passíveis de alterações transcricionais, epigenéticas e pós-traducionais induzidas

por diversos fatores extrínsecos e intrínsecos que afetam sua função (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014). Atualmente, é aceito que células T possuem uma plasticidade que reflete a heterogeneidade de suas funções, entretanto os mecanismos que regulam esse processo ainda não estão completamente elucidados. Neste contexto, as células T_H17 tem sido destaque por sua complexa capacidade de transdiferenciação em diferentes estados funcionais de acordo com o contexto (STADHOUDERS; LUBBERTS; HENDRIKS, 2018).

Células T_H17 estão implicadas na defesa do hospedeiro em barreiras epiteliais, particularmente orquestrando a imunidade contra bactérias extracelulares e fungos, bem como na manutenção da homeostase intestinal. Por outro lado, estas células também possuem um papel deletério no desenvolvimento de doenças inflamatórias autoimunes (BHAUMIK; BASU, 2017; BLASCHITZ; RAFFATELLU, 2010; YASUDA; TAKEUCHI; HIROTA, 2019). A diferenciação destas células requer a interação cooperativa das vias de sinalização evocadas por IL-6 e TGF β , que direciona uma ativação sustentada do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (*Signal Transduction and Activation of Transcription 3*; STAT3), um dos primeiros fatores de transcrição a ser expresso durante a polarização de células T_H17, sendo importante para a expressão de *Il17a*, *Il17f* e *Il23r*, bem como de *Rorc* (DURANT et al., 2010; YANG et al., 2007; YOSEF et al., 2013). Este último gene codifica o receptor órfão relacionado ao ácido retinóico gama t (*Retinoic Acid-Related Orphan Receptor (ROR) gamma t*; ROR γ t), considerado um fator de transcrição chave para a diferenciação destas células (IVANOV et al., 2006). Além disso, um outro membro de da família de receptores ROR, o fator de transcrição Ror α , age em sinergismo com Ror γ t para induzir a expressão de citocinas de assinatura T_H17 como IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, bem como do receptor IL-23R. Essa cooperação é essencial para o comprometimento ao fenótipo T_H17, já que células T CD4 deficientes de ambos Ror γ t e Ror α não conseguem se diferenciar em células T_H17, enquanto a ausência de apenas um desses fatores promove apenas bloqueio parcial da diferenciação (YANG et al., 2008b). Adicionalmente, IL-21 é descrita por agir conjuntamente com TGF β para geração de células T_H17 em humanos (YANG et al., 2008a).

A citocina pleiotrópica IL-17A promove seus efeitos biológicos por sinalizar através do complexo de receptores IL-17RA/IL-17RC expressos em células mesenquimais como células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais, mas também

células imunes. Essa citocina tem importante papel contra infecções bacterianas e fúngicas em mucosas, induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos, metaloproteinases de matriz, citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (MCGEACHY; CUA; GAFFEN, 2019). Por outro lado, a produção excessiva de IL-17A está associada a patogênese de doenças inflamatórias crônicas como esclerose múltipla, psoríase e artrite reumatoide e doença de Crohn (KUWABARA et al., 2017). Logo, a investigação de mecanismos pelos quais regulam a produção de IL-17 pode ser benéfica para o desenvolvimento de terapias para doenças inflamatórias crônicas.

Células T CD4 naive não expressam o receptor de IL-23 (IL-23R), cuja expressão apenas ocorre em resposta à IL-6 ao longo da polarização de células T_H17 (IVANOV et al., 2006; MCGEACHY et al., 2007; PARHAM et al., 2002). Constatou-se que embora a IL-23 não seja indutora da diferenciação desta subpopulação, essa citocina é essencial para expansão, sobrevivência e estabilização de células T_H17 previamente comprometidas com o fenótipo (STRITESKY; YEH; KAPLAN, 2008). De modo interessante, polimorfismos em *IL23R* em humanos estão associados a ao desenvolvimento de doenças autoimunes (NAIR et al., 2008). Além disso, estudos iniciais evidenciaram que a IL-23 é crucial na indução do programa patogênico de células T_H17. A IL-23 é uma citocina heterodimérica composta por uma subunidade própria (p19) juntamente com a subunidade p40, a qual também pode ser compartilhada com a p35 para formar a citocina IL-12. O papel da IL-23 no desenvolvimento de doenças autoimunes foi evidenciando quando se observou que animais deficientes de p19, mas não de p35, eram resistentes ao desenvolvimento da EAE (CUA et al., 2003). Posteriormente, por meio de experimentos com transferência adotiva de células T, Langrish e colaboradores (2005) demonstraram que linfócitos T CD4⁺ reestimulados com antígeno na presença de IL-23 expandiam, produziam IL-17 e eficazmente promoviam EAE, enquanto a exposição a IL-12 não induzia neuroinflamação (LANGRISH et al., 2005). Logo, assumiu-se que células T_H17 requerem IL-23 para aquisição de suas funções patogênicas (MCGEACHY et al., 2009). Por exemplo, a sinalização de IL-23 promove função encefalitogênica por induzir células T_H17 a produzir GM-CSF no SNC, que age em células mielóides para amplificação da neuroinflamação (EL-BEHI et al., 2011).

Nos últimos anos tem sido demonstrado que estas células são um grupo heterogêneo que compreende um espectro de estados funcionais, que podem ir de um fenótipo com menor ou maior potencial patogênico. Como dito, IL-6 + TGFβ são

fatores que induzem a geração de células T_H17 convencionais (cT_H17), também denominadas não-patogênicas, por falharem em promover inflamação tecidual (BETTELLI et al., 2006; MCGEACHY et al., 2007). Por outro lado, a exposição de células T CD4 à combinação IL-6 + IL-1 β + IL-23 induz um perfil patogênico (pT_H17), que se assemelha ao de células T_H17 que medeiam o desenvolvimento da EAE (GHORESCHI et al., 2010; LEE et al., 2012). Neste aspecto, a aquisição de funções patogênicas não ocorre somente pelo aumento da expressão de genes inflamatórios associados a resposta T_H17 (ex. *Il23r*, *Il17a*, *Il17f*, *Tbx21*, *Csf2*), mas também pela redução na expressão de genes do módulo regulador (ex. *Il10*, *Il9*, *Ahr*, *Maf*) (GHORESCHI et al., 2010; LEE et al., 2012).

Utilizando a tecnologia de sequenciamento de RNA de célula única (*single-cell RNA sequencing*; scRNA-seq), um estudo comparou células CD3⁺CD4⁺IL-17A/GFP⁺ isoladas de linfonodos (LN) e do SNC de animais com EAE, com células diferenciadas em condições para cT_H17 e pT_H17 *in vitro* (GAUBLOMME et al., 2015). Neste caso, células do LN são consideradas pouco ou não-patogênicas e precursoras de células T_H17, as quais posteriormente adquirem um perfil efetor altamente patogênico no SNC. Neste aspecto, os autores observaram alto grau de similaridade na assinatura transcricional entre células diferenciadas em condições patogênicas *in vitro* com as células extraídas do SNC, enquanto células dos LN estão mais relacionadas ao perfil de células não-patogênico obtidas *in vitro*, demonstrando uma trajetória progressiva do estado patogênico destas células (GAUBLOMME et al., 2015). Esse achado evidencia que a abordagem *in vitro*, embora limitada, pode auxiliar na identificação de alvos que regulam a resposta inflamatória mediada por células T_H17.

Células T_H17 possuem complexa plasticidade. Experimentos de *fate-mapping* utilizando animais *reporter* evidenciaram que durante a neuroinflamação autoimune, células T_H17 passam a produzir também IFN γ , a qual é geralmente associada a respostas do tipo T_H1 (HIROTA et al., 2011). Estas células foram denominadas exT_H17, as quais passam adquirir esse fenótipo após estimulação com IL-23. Nesse contexto, a presença de IL-23 também é necessária para o desenvolvimento de doença inflamatória intestinal (YEN et al., 2006). De fato, tem sido demonstrado que a transição de células T_H17 para células produtoras de IFN γ é fundamental para a patogênese da colite experimental (HARBOUR et al., 2015). Omenetti e colegas (2019) evidenciaram a complexa heterogeneidade das respostas T_H17 ao

compararem o perfil de células T_H17 do cólon de animais livre de patógenos (*germ-free*) reconstituídos com bactérias filamentosas segmentadas, que compõem a microbiota comensal (*segmented filamentous bacteria*; SFB), com animais infectados com a bactéria patogênica *Citrobacter rodentium*, que induz uma resposta inflamatória com lesão tecidual (OMENETTI et al., 2019). Os autores observaram que células T_H17 induzidas por SFB tem um perfil homeostático que não induz genes inflamatórios e apresentam maior expressão de *Il10*, enquanto células T_H17 induzidas por *Citrobacter* aumentam a produção de $IFN\gamma$, necessária para o *clearance* do patógeno. Isso evidencia o papel do microambiente para o estado funcional dessa subpopulação.

A capacidade plástica de células T_H17 permite a adequação de suas funções aos diferentes estágios do desenvolvimento de uma doença e das necessidades do organismo. Evidências demonstram que células T_H17 podem ainda adquirir funções imunossupressoras que influenciam o desfecho da doença (WU; TIAN; WANG, 2018). Nesse cenário, Gagliani e seus colegas (2015) demonstraram em um estudo elegante usando ferramentas para *fate-mapping*, que durante a inflamação intestinal induzida por ativação de TCR (com injeções de anti-CD3), bem como o desenvolvimento da EAE, células T_H17 inflamatórias se transdiferenciam em células produtoras de $IL-10^+$ com atividade supressora, auxiliando na resolução da inflamação. Mecanicamente, os autores demonstraram que a sinalização de $TGF\beta$ induz aumento na expressão do receptor de hidrocarbonetos de arila (*aryl hydrocarbon receptor*; AhR), o medeia a produção de IL-10 (GAGLIANI et al., 2015). AhR atua como um fator de transcrição ativado por ligantes endógenos e toxinas ambientais, sendo expresso em diferentes células imunes e inicialmente descrito por intensificar a diferenciação de células T_H17 (QUINTANA et al., 2008; VELDHOEN et al., 2008). Contudo, estudos posteriores revelaram seu importante papel na transcrição de *Il10* em células T, sendo atualmente considerado um marcador de células T_H17 não-patogênicas (APETOH et al., 2010; LEE et al., 2012).

Levando em consideração as informações acima, atualmente grupos de pesquisa tem buscado alvos que, ao invés de bloquear totalmente respostas T_H17 , possam seletivamente regular a plasticidade entre os estados funcionais destas células. Por exemplo, ao analisar o transcriptoma de células cT_H17 e pT_H17 , Wang e colaboradores (2015) notaram que células não-patogênicas apresentam uma alta expressão da proteína CD5L (AIM), um membro da superfamília de receptores *scavenger* ricos em cisteína que regula o metabolismo de lipídios (WANG et al., 2015).

Os autores observaram que a deficiência dessa molécula induz maior expansão e conversão de células T_H17 para um perfil patogênico durante o desenvolvimento da EAE, cujos efeitos foram associados a maior expressão de IL-17A e IL-23R e menor de IL-10. Juntamente a estes achados, notou-se que CD5L promove níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*; PUFA) em células cT_H17 , o que afeta a síntese de colesterol. Derivados do colesterol são importante fonte para ligantes endógenos de Ror γ t, portanto, os autores viram que CD5L restringe a disponibilidade desses ligantes e, conseqüentemente, a atividade transcricional de Ror γ t (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Embora a caracterização do espectro funcional do fenótipo T_H17 tenha avançado nos últimos anos, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente elucidados.

Sabe-se que o processo inflamatório agudo ou crônico é acompanhado por liberação de mediadores inflamatórios e moléculas sinalizadoras provenientes da lesão tecidual, como DNA e possivelmente CDNs. STING compreende um importante eixo para reconhecimento de DNA, cujo papel é extensamente descrito nas respostas inatas, mas pouco explorado em células da imunidade adaptativa. STING tem sido descrito por induzir tanto respostas imunogênicas como imunorreguladoras, dependendo da célula e contexto, e, portanto, essa característica deve ser considerada em abordagens terapêuticas. Logo, o entendimento do papel diferencial de STING em células imunes, como as células T_H17 , podem contribuir para criação de terapias mais direcionadas e eficazes para doenças inflamatórias.

2. Hipótese

Levando em consideração as informações descritas anteriormente, a hipótese deste estudo é de que STING limita o potencial patogênico de células T_H17.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel de STING sobre a plasticidade e potencial patogênico de células T_H17.

3.2. Objetivos específicos

- I. Analisar a expressão de STING e componentes da sua via clássica de sinalização em células T_H17 diferenciadas *in vitro*;
- II. Avaliar a expressão diferencial e função de STING em células T_H17 geradas sob condições convencionais e patogênicas *in vitro*;
- III. Determinar o requerimento de STING para regulação do perfil de células T_H17 por meio do uso de ferramentas farmacológicas e células geneticamente modificadas;
- IV. Explorar mecanismos moleculares pelos quais STING regula o potencial patogênico de células T_H17;
- V. Verificar se os efeitos da ativação de STING sobre células T_H17 murinas são recapitulados em células T_H17 humanas *in vitro*.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos selvagens (*Wild Type*; WT) da linhagem C57BL/6 provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (USP/RP). Camundongos IL-10 KO (B6.129P2-Il10tm1Cgn/J), IFNAR KO (B6(Cg)-Ifnar1tm1.2Ees/J), STING^{Gt} (C57BL/6J-Tmem173gt/J), TdTomato reporter (Ai14; B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J), *Il17a*-Cre (Il17atm1.1(icre)Stck/J), *Prdm1*-floxed (B6.129-Prdm1tm1Clme/J), CD4-Cre (Tg(Cd4-Cre)1Cwi/BfluJ) foram obtidos da The Jackson Laboratories. Camundongos STING KO (ISHIKAWA; BARBER, 2008) foram fornecidos pelo Prof. Dr. Sergio Costa Oliveira (UFMG, Brasil), e animais AhR KO (FERNANDEZ-SALGUERO et al., 1995) fornecidos pelo Prof. Dr. Bernhard Ryffel (CNRS Orleans, França). Os animais utilizados nos experimentos foram acondicionados no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, com temperatura ambiente 23-25°C, ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso livre à comida e água. Camundongos de 8-10 semanas de idade e pareados por sexo foram utilizados para experimentação. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com o protocolo no 095/2019.

4.2. Ferramentas farmacológicas

Os seguintes agonistas de STING foram utilizados em culturas de células T murinas: DMXAA (3-30 µM), c-di-AMP (3-30 µM), c-di-GMP (3-30 µM) e 2'3'-c-di-AM(PS)₂ (Rp, Rp) (15 µM), todos obtidos pela Invivogen. 2'3'-c-di-AM(PS)₂ (Rp, Rp) (10 µM) também foi utilizado em cultura de células T_H17 humanas. O inibidor de STING, C-176 (1 µM), foi obtido pela Sigma-Aldrich. O antagonista de AhR, CH223191 (30 µM), foi adquirido pela Tocris.

4.3. Cultura de células T murinas *in vitro*

Células T CD4 foram enriquecidas a partir de linfonodos e baço de camundongos utilizando *microbeads* anti-CD4 (L3T4) e sistema de separação

magnética de células AutoMACS (Miltenyi Biotec) de acordo com as especificações do fornecedor. Em seguida, estas células foram submetidas a *cell sorting* usando o equipamento FACSAria III (BD Biosciences) para isolamento de células T CD4 naíve ($CD4^+CD62L^{high}CD44^{low}$). As células purificadas foram estimuladas com *plate-bound* anti-CD3 ϵ (4 μ g/mL) e anti-CD28 (2 μ g/mL) (BD Biosciences) em meio IMDM completo (10% FBS, L-glutamina, β -mercaptoetanol, penicilina-streptomicina). As células foram então cultivadas, a menos que seja indicado o contrário, por 72 h (37°C, 5% CO₂) sob as seguintes condições de diferenciação: 1 ng/mL rhTGF- β 1 (eBioscience) + 25 ng/mL rmlL-6 (R&D Systems) para cT_H17; 25 ng/mL rmlL-6 + 20 ng/mL rm-IL-1 β + 30 ng/mL rmlL-23 (todos da R&D Systems) para pT_H17; 1 ng/mL rhTGF- β 1 para iT_{reg}; 20 ng/mL rmlL-12 + 20 ng/mL rmlL-2 (ambos da R&D Systems) para T_H1. Para as culturas de segundo *round*, células cT_H17 foram obtidas, seguida de estímulo com *plate-bound* anti-CD3 ϵ (2 μ g/mL) e anti-CD28 (2 μ g/mL) (BD Biosciences) na presença de 20 ng/mL rmlL-23 (R&D Systems) por 48 h.

4.4. Cultura de células T_H17 humanas *in vitro*

Bolsas de sangue de indivíduos saudáveis foram fornecidas pelo hemocentro Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz, Alemanha. Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram obtidas por meio de centrifugação por gradiente de densidade usando BioColl® Trennlösung (Bio&SELL GmbH). Células T CD4 naíve humanas ($CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$) foram purificadas utilizando o EasySep Human Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Stemcell Technologies). Após purificação, estas células foram estimuladas com *plate-bound* anti-CD3 ϵ (5 μ g/mL) e anti-CD28 solúvel (2 μ g/mL) (ambos da Biolegend) em meio X-VIVO 15 (Lonza) por 5 d (37°C, 5% CO₂), sob as seguintes condições de diferenciação: 2 ng/mL rhTGF- β 1 + 50 ng/mL rhIL-6 + 20 ng/mL rh-IL-1 β + 50 ng/mL rhIL-23 + 40 ng/mL rh-IL-21 (todas obtidas da Peprotech) e 10 nM NaCl.

4.5. Citometria de fluxo

Para marcação intracelular de citocinas, células T foram estimuladas com forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) (50 ng/mL; Sigma-Aldrich) e ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich) na presença de um inibidor do transporte de proteínas contendo monensina (*GolgiStop* 1.5 mg/mL; BD Biosciences) em meio IMDM completo ou X-VIVO 15 por 4 h (37°C, 5% CO₂). Para marcação de moléculas de superfície, as células foram inicialmente incubadas com um corante fixável de viabilidade celular (1:3000, *Fixable Viability Dye eFluor™ 780*; Invitrogen) para excluir células mortas, seguida de incubação com anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromo contra os marcadores indicados. Posteriormente, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando um kit de fixação/permeabilização (*Foxp3 Fixation/Permeabilization Kit*; Invitrogen) de acordo com as especificações do fornecedor. A marcação dos alvos intracelulares foi então realizada na sequência utilizando anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromo. As células foram então lavadas, ressuspendidas em 1X PBS e adquiridas em citômetro de fluxo (FACSVerse ou FACSCanto II; BD Biosciences ou CytoFLEX S; Beckman Coulter Life Sciences). Os dados obtidos foram analisados usando o software FlowJo™ v10 (BD Biosciences).

Os seguintes anticorpos foram utilizados para citometria de fluxo: rat anti-mouse CD4-FITC (clone RM4-5); rat anti-mouse CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RM4-5); rat anti-mouse CD4-APC (clone RM4-5); rat anti-mouse CD44-APC (clone IM7); rat anti-mouse CD62L-PE (clone MEL-14); rat anti-mouse IL17A-BV421 (clone TC11-18H10); rat anti-mouse IL-17A-PE (clone TC11-18H10); rat anti-mouse IL-17A-APC (clone TC11-18H10); rat anti-mouse IL-10-APC (clone JES5-16E3); rat anti-mouse IL-10-BV421 (clone JES5-16E3); mouse anti-mouse Ror γ t-AF647 (clone Q31-378); mouse anti-mouse Ror γ t-PerCP-Cy5.5 (clone Q31-378); rat anti-mouse IL-10-PE (clone JES5-16E3); rat anti-mouse IFN γ -FITC (clone XMG1.2); mouse anti-human Foxp3-eFluor 450 (236A/E7); mouse anti-human-PE-Cy7 (eBio64DEC17); mouse anti-human CD4-FITC (SK3 (SK-3)).

4.6. Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

A extração de RNA total de células TH17 foi realizada usando o kit RNeasy Isolation Kit (Qiagen) de acordo com as instruções de fabricante. A concentração de RNA total foi determinada usando o equipamento NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Em seguida, foi realizada a conversão de 500 ng de RNA total a cDNA usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). A RT-qPCR foi realizada utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix e o equipamento stepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reação teve um volume final de 10 µL, dos quais continha: 5 µL de SYBR-green®, 0,5 µL de primers (*forward* + *reverse*), 3,5 µL de água ultra-pura DNase/RNase-free e 1 µL de cDNA. A expressão gênica foi determinada em relação a *Gapdh*, que foi usado como controle endógeno e o *fold change* calculado de acordo com o método comparativo de “*cycle threshold*” ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os *heat maps* de expressão gênica mostrados nesse estudo foram gerados usando o software Morpheus (disponível em: <https://software.broadinstitute.org/morpheus>). As médias das replicatas foram calculadas e a expressão gênica correlacionada com a intensidade da cor, normalizado por linha (*row min*, *row max*). Os seguintes primers foram utilizados nesse estudo:

Camundongo

Ii23r fwd: 5'-GCCAAGAAGACCATTCCCGA-3'

Ii23r rev: 5'-TCAGTGCTACAATCTTCTTCAGAGGACA-3'

Ii17a fwd: 5'-GCTCCAGAAGGCCCTCAG-3'

Ii17a rev: 5'-CTTTCCTCCGCATTGACA-3'

Ii22 fwd: 5'-CAGCTCCTGTACATCAGCGGT-3'

Ii22 rev: 5'-AGGTCCAGTTCCCAATCGCCT-3'

Ifnb1 fwd: 5'-CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC-3'

Ifnb1 rev: 5'-GGCAGTGTA ACTCTTCTGCAT-3'

Maf fwd: 5'-AGCAGTTGGTGACCATGTCTG-3'

Maf rev: 5'-TGGAGATCTCCTGCTTGAGG-3'

Ahr fwd: 5'-CAAATCAGAGACTGGCAGGA-3'
Ahr rev: 5'-AGAAGACCAAGGCATCTGCT-3'
Ahrr fwd: 5'-ACAGGGCAGACATTGTGGTT-3'
Ahrr rev: 5'-CCTGAGGCACAGACATGAAG-3'
Cd5l fwd: 5'-GAGGACACATGGATGGAATGT-3'
Cd5l rev: 5'-ACCCTTGTGTAGCACCTCCA-3'
Cyp1a1 fwd: 5'-GTTCTTGGAGCTTCCCCGAT-3'
Cyp1a1 rev: 5'-CTGACACGAAGGCTGGAAGT-3'
I110 fwd: 5'-ATAACTGCACCCACTTCCCA-3'
I110 rev: 5'-GGGCATCACTTCTACCAGGT-3'
Gapdh fwd: 5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'
Gapdh rev: 5'-CGGCCAAATCCGTTTCCAC-3'
Tmem173: IDT assay ID Mm.PT.58.7864131.g
Gapdh: IDT assay ID Mm.PT.39a.1

Humano

IL23R fwd: 5'-AACAGCAATGTTGTGAAAATGC-3'
IL23R rev: 5'-AGGCTTGTGTTCTGGGATGA-3'
IL17A fwd: 5'-ACCAATCCCAAAGGTCCTC-3'
IL17A rev: 5'-GGGGACAGAGTTCATGTGGT-3'
IFNB1 fwd: 5'-GCTTGGATTCCTACAAAGAAGCA-3'
IFNB1 rev: 5'-ATAGATGGTCAATGCGGCGTC-3'
IL10 fwd: 5'-GCCTAACATGCTTCGAGATC-3'
IL10 rev: 5'-CTCATGGCTTTGTAGATGCC-3'
GAPDH fwd: 5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3'
GAPDH rev: 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'

4.7. Western Blot e imunoprecipitação

RIPA Buffer® (Sigma-Aldrich) contendo coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Cell Signaling) foi utilizado para obtenção de lisado celular. As concentrações de proteínas foram determinadas por meio método de BCA (*Bicinchoninic Acid Protein Assay*; Sigma-Aldrich). Amostras de lisado celular foram

incubadas com tampão de amostra Laemmli (Bio-Rad) contendo β -mercaptoetanol e submetidas à desnaturação (95 °C, 5 min). Para separação por eletroforese, 10 μ g de proteína de cada amostra foi aplicada em gel pré-moldado 4-20% Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad) e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o pacote de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). As membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (0.1% TBS-Tween20 + 5% leite em pó desnatado) por 1 h, T.A. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra alvos de interesse diluídos em solução 0.1% TBS-Tween20 + 5% BSA (*overnight*; 4 °C). Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-fosfo-IRF3(S396) (clone D6O1M; 1:500), anti-IRF3 (clone D83B9; 1:1000), anti-fosfo-TBK1(S172) (clone D52C2; 1:500), anti-TBK1 (clone D1B4; 1:1000), anti-fosfo-STING(S365) (clone D8F4W; 1:500), anti-STING (clone D2P2F; 1:1000), Anti-fosfo-STING(Ser366) (clone E9A9K; 1:1000) (todos obtidos da Cell Signaling), anti-AhR (policlonal; 1:3000) (Enzo Life Sciences) e anti-Roryt (clone EPR20006; 1:1000) (Abcam). β actina ou GAPDH (1:1000; Cell Signaling) foram utilizados como controle endógeno. Os anticorpos primários foram detectados com apropriados anticorpos secundários conjugados à HRP (Sigma-Aldrich; 1:5000), que foram incubados com as membranas por 2 h T.A. Em seguida, as membranas foram reveladas com o reagente ECL prime (GE Healthcare) e os sinais de quimiluminescência registrados pelo sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Os dados foram analisados utilizando o software Image Lab (Bio-Rad). Para extração das frações citoplasmática e nuclear foi utilizado o kit NE-PER (ThermoFisher Scientific), de acordo com as recomendações do fornecedor. GAPDH e nucleofosmina (NPM) (ambos 1:1000; Cell Signaling) foram usados como controles endógenos citoplasmático e nuclear, respectivamente.

A imunoprecipitação foi realizada usando o kit Pierce co-IP (ThermoFisher Scientific), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, anti-Roryt (clone EPR20006; Abcam) foi imobilizado em resina de acoplamento AminoLink Plus. Quantidades iguais das amostras de lisado celular foram *pre-cleared*, e em seguida incubadas com resina acoplada ao anticorpo anti-Roryt (*overnight*; 4 °C). O imunoprecipitado foi eluído e posteriormente as análises de *Western Blot* foram realizadas como descrito acima.

4.8. Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

Os ensaios de ChIP foram realizados utilizando o kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (Life Technologies). De forma sucinta, células T_H17 foram cultivadas por 72 h na ausência (meio) ou presença de agonista de STING. Em seguida, $4,5 \times 10^6$ células foram incubadas com 1% formaldeído metanol-free (ThermoFisher Scientific) por 10 min, T.A. para fixação das proteínas associadas à cromatina (*cross-linking*). O processo foi interrompido pela adição de glicina (0.125 M) por 5 min. As amostras foram lavadas e ressuspensas em tampão de lise contendo inibidores de protease e fosfatase. Logo, as amostras foram submetidas à sonicação, para obtenção de fragmentos de cromatina (*shearing*) entre 200- a 500-bp. Para isso, foi utilizado o sistema de sonicação Bioruptor Plus (Diagenode), nas seguintes condições: 14 ciclos, 30 seg ON, 30 seg OFF, *high setting*. Em seguida, os complexos cromatina-proteína foram submetidos à imunoprecipitação usando 5 µg de anti-Rorγt (clone AFKJS-9; Invitrogen) ou controle IgG que foram previamente acoplados à *beads* magnéticas Protein A/G Dynabeads™ (Invitrogen) *overnight*, sob rotação, 4 °C. Posteriormente, o *cross-linking* foi revertido (*decrosslinking*) e o DNA resultante foi eluído e purificado de acordo com as instruções do fornecedor. Após a purificação, o DNA foi usado para análise de qPCR utilizando iQ™SYBR Green real-time PCR kit (Bio-Rad) e *primers* específicos para a região CNS2 do gene *Il17a* (ZHANG; MENG; STROBER, 2008), cujas sequências são: *Il17a* CNS2 fwd: 5'-CCGTTTAGACTTGAAACCCAGTC-3' e *Il17a* CNS2 rev: 5'-GTACCTATGTGTTAGGAGGCGC-3'. Os dados foram calculados ($2^{-(\Delta CT IP - \Delta CT controle)}$) e apresentados como *Fold Enrichment* em relação ao controle IgG.

4.9. Análise da taxa de consumo de oxigênio (OCR)

A taxa de OCR, que reflete a OXPHOS mitocondrial, foi determinada através do analisador de Fluxo Extracelular XF96 Seahorse Bioscience (Agilent). Células T_H17 foram coletadas e ressuspensas em meio Seahorse XF RPMI 1640 suplementado com 2,5 mM de glicose, 1 mM de piruvato e 2 mM de L-glutamina. Microplacas Seahorse XF96 foram previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich)

overnight, 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e as células plaqueadas em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço, seguido de incubação por 1 h, 37 °C e na ausência de CO₂. Posteriormente, as células foram submetidas ao protocolo do teste de *Mito Stress*, que consiste na adição sequencial de 1 µM de oligomicina, 1.5 µM de carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (*carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*; FCCP) e 0.5 µM de rotenona/antimicina A (todos da Sigma-Aldrich). As medidas de cada experimento foram realizadas em triplicata. Os parâmetros foram calculados da seguinte forma: Respiração basal: OCR antes da oligomicina - OCR após rotenona/antimicina A; Respiração máxima: OCR após FCCP - OCR após rotenona/antimicina A; Produção de ATP: respiração basal - valor mínimo de OCR após oligomicina.

4.10. Análise estatística

Análise de variância ANOVA de uma ou duas vias, seguido do pós-teste de Tukey foram utilizadas para comparações múltiplas. Para se comparar dois grupos de variáveis não-pareadas, foi utilizado o teste *t* de Student. Para os experimentos com células T_H17 humanas, os grupos foram comparados utilizando teste *t* de Student pareado. Os dados foram expressos como Média ± E.P.M., sendo representativos de 2-4 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas e confecção gráfica foram realizadas através do programa estatístico GraphPad Prism 8.0.

5. Resultados

5.1. STING é expressa em células T_H17 e sua ativação regula o perfil de citocinas

A via de sinalização de STING tem recebido importante atenção nos últimos anos por ser um fator chave no reconhecimento de DNA citoplasmático, associada majoritariamente a respostas antimicrobianas, sendo seu papel intrínseco pouco explorado em células da imunidade adaptativa, como as células T (LI; WILSON; KISS-TOTH, 2017). Inicialmente, investigamos se STING é expresso e funcional em células T_H17 diferenciadas *in vitro*. Observamos que tanto células T CD4 naive como células submetidas a ativação de TCR (T_H0) expressam mRNA para STING (*Tmem173*), entretanto em menores níveis quando comparada com a expressão gênica de STING em células diferenciadas sob condições direcionadas ao perfil T_H17 (**Figura 1A**). Em corroboração, avaliamos os níveis proteicos de STING ao longo da diferenciação destas células e observamos que sua expressão aumenta progressivamente, atingindo um pico em 72 h após o início da cultura (**Figura 1B**).

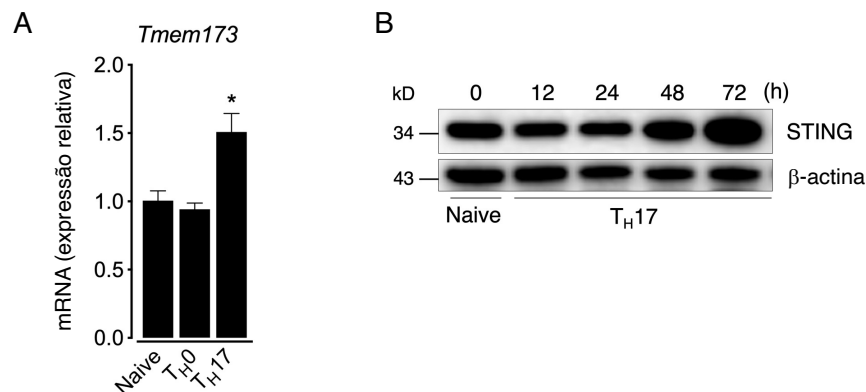


Figura 1. Expressão de STING em células T_H17. A) Células T CD4 naive foram isoladas de animais C57BL/6 e ativadas apenas com anti-CD3/anti-CD28 (T_H0) ou submetidas a condições de diferenciação de células T_H17 (IL-6+TGFβ). Após 48 h foram coletadas para análise da expressão de *Tmem173* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo naive. B) Células T_H17 foram cultivadas e coletadas em diferentes tempos (0–72 h) para avaliação temporal da expressão de STING por *Western Blot*. β-actina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de uma (A) seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Em seguida, nos perguntamos se a via clássica de ativação de STING, que culmina na formação do sinalossoma STING-TBK1-IRF3 (**Figura 2A**), também ocorre em células T_H17. Para isto, utilizamos a droga *5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid*

(DMXAA), um agonista sintético de STING murino (PRANTNER et al., 2012). Observamos que a adição do agonista em culturas de células T_H17 levou a fosforilação de STING (S365), da quinase TBK1 (S172), bem como do fator de transcrição IRF3 (S396) (**Figura 2B**), demonstrando que a ativação de STING normalmente desencadeia a clássica cascata de sinalização para produção de IFNs do tipo I em células T_H17.

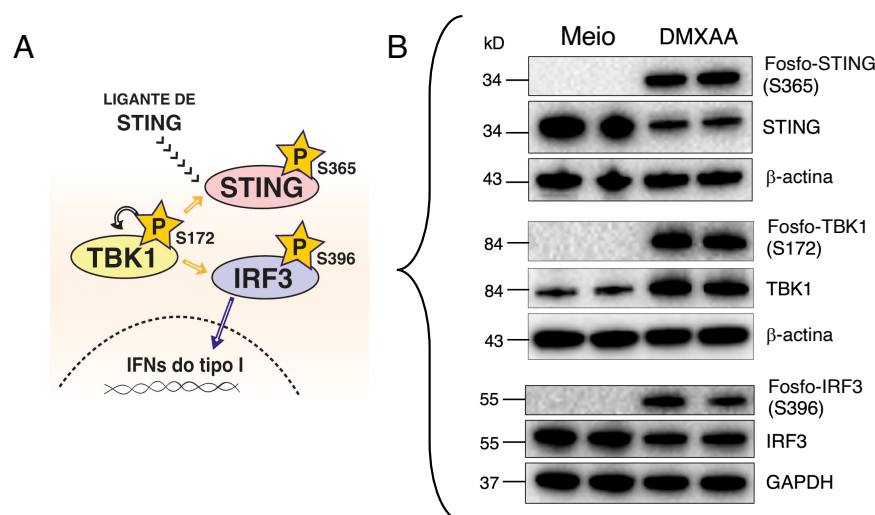


Figura 2. A cascata de sinalização clássica de STING é funcional em células T_H17. A) Representação esquemática da formação do sinalossoma STING-TBK1-IRF3 induzida por agonistas de STING. B) Células T CD4 nausência (meio) ou presença de DMXAA (10 µM) e coletadas após 72 h para *Western Blot*. β-actina ou GAPDH foram utilizados como controle endógeno de expressão proteica. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

A via de sinalização de STING é desencadeada como resposta ao reconhecimento DNA. Embora STING possa se ligar a moléculas de DNA diretamente como um sensor (ABE et al., 2013), essa proteína adaptadora é principalmente ativada por CDNs, que são segundos mensageiros produzidos em bactéria ou células de mamíferos (BURDETTE et al., 2011; SUN et al., 2013). Neste sentido, ao adicionar os dinucleotídeos cíclicos c-di-AMP e c-di-GMP sobre cultura de células T_H17, percebemos que a ativação de STING reduziu a população de células produtoras de IL-17A, enquanto parte destas células deu origem a uma população produtora de IL-10, uma citocina anti-inflamatória pleiotrópica (**Figura 3**). Além disso, o agonista sintético DMXAA promoveu efeitos similares aos dos CDNs quando comparados ao grupo controle (meio).

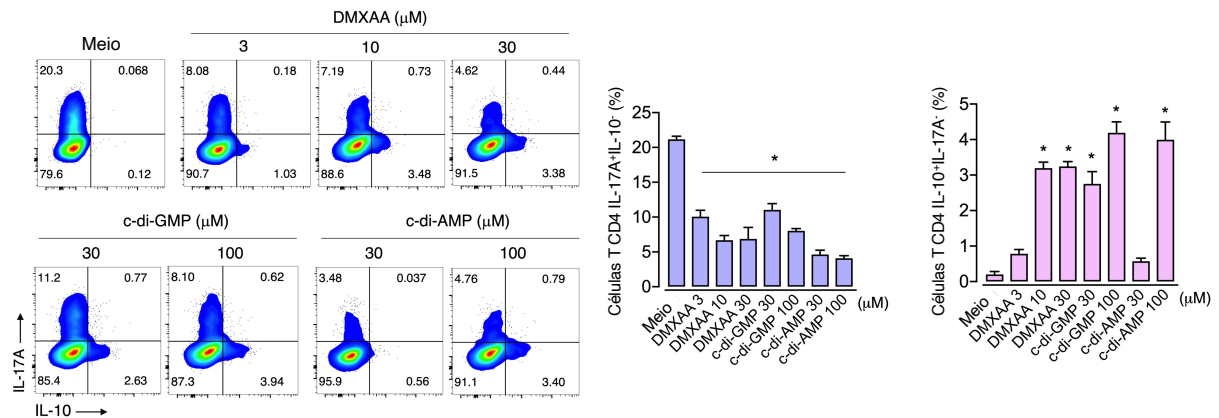


Figura 3. A ativação de STING promove alterações no perfil de citocinas produzidas por células TH17. Células T CD4 naive foram diferenciadas em células TH17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de diferentes concentrações de DMXAA, c-di-GMP ou c-di-AMP por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Logo, assumindo que células TH17 produtoras de IL-10 são descritas por regular a inflamação, ao invés de promovê-la (MCGEACHY et al., 2007), hipotetizamos que STING está associado a um perfil de células TH17 com menor potencial inflamatório.

5.2. A expressão e a atividade de STING estão inversamente associadas ao potencial patogênico de células TH17

Nos últimos anos, estudos tem consolidado protocolos de polarização de células TH17 utilizando diferentes combinações de citocinas *in vitro*, com a finalidade de possibilitar a investigação de fatores associados a patogenicidade de células TH17 (GAUBLomme et al., 2015). Assim, utilizamos IL-6+TGF β para diferenciação de células TH17 convencionais com perfil não-patogênico (cTH17) (BETTELLI et al., 2006; MCGEACHY et al., 2007), enquanto a combinação de IL-6+IL-23+IL-1 β foi usada para geração de células patogênicas (pTH17) (GHORESCHI et al., 2010).

Ao compararmos os dois fenótipos de células TH17 ao longo do processo de diferenciação, observamos que células geradas em condições não-patogênicas apresentam uma maior a expressão gênica de *Tmem173* após 48 h de cultura,

enquanto células pT_H17 apenas apresentam um pequeno aumento transitente nos níveis de mRNA de *Tmem173* em 48 h, que é rapidamente revertido em 72 h (**Figura 4A**). Vale ressaltar que em 48 h e 72 h os níveis de expressão de *Tmem173* em células pT_H17 já são mais baixos que os encontrados em células cT_H17 nos mesmos tempos. Em corroboração a esses achados, percebemos que os níveis proteicos de STING também estão aumentados em células cT_H17, em comparação com células pT_H17 (**Figura 4B**), demonstrando que sua expressão é inversamente associada a patogenicidade destas células.

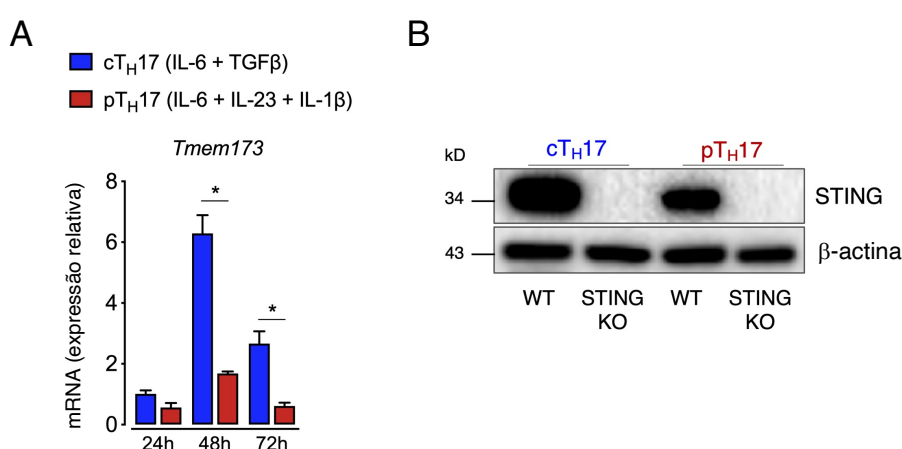


Figura 4. A expressão de STING é reduzida em células T_H17 com maior potencial patogênico. A) Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGFβ) ou pT_H17 (IL-6+IL-23+IL-1β) e coletadas em diferentes tempos (24, 48 e 72 h) para análise da expressão de *Tmem173* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (cT_H17 24 h). B) Células cT_H17 e pT_H17 WT e STING KO foram coletadas após 72 h para análise dos níveis proteicos de STING por *Western Blot*. β-actina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias (A), seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Os dados anteriores demonstram que a ativação de STING aumenta a produção de IL-10 e reduz a expressão de IL-17A por células em diferenciação para o perfil T_H17. Para validação dos efeitos observados com os ligantes de STING, cultivamos células T CD4 naive deficientes de STING (STING KO) sob condições cT_H17 e pT_H17. Com isso, mais uma vez observamos que a ativação de STING induz redução de IL-17A não só em células cT_H17, mas também em células pT_H17, acompanhada de aumento na produção de IL-10 (**Figura 5A e B**). De fato, esses efeitos ocorrem de forma dependente de STING, uma vez que eles não foram observados em células STING KO expostas ao DMXAA. De modo interessante,

notamos ainda que a ausência de STING torna as células, em ambas condições, mais propensas a produção de IL-17A, sugerindo que STING desempenha um papel intrínseco nestas células. Concomitante a esses achados, observamos uma maior expressão de IL-10 após a ativação de STING não só em cultura de células cT_H17, mas também nas culturas diferenciadas no fenótipo pT_H17, embora em níveis mais baixos (**Figura 5A e B**). Contudo, esse aumento na expressão de IL-10 foi perdido na ausência de STING, demonstrando que STING está envolvido nesse fenômeno.

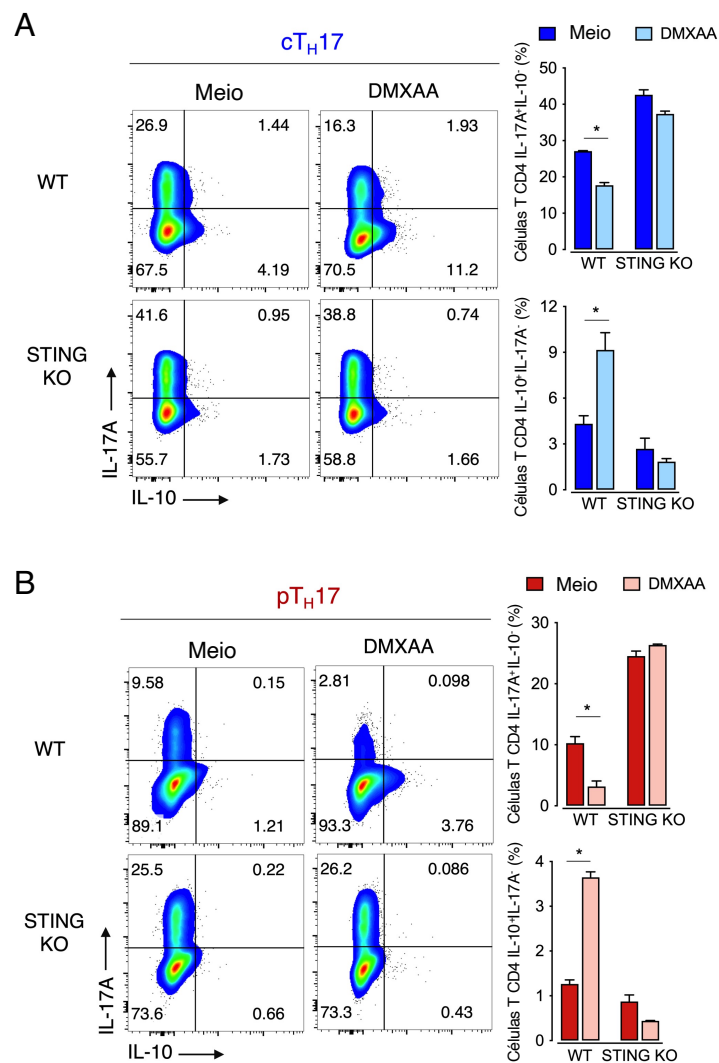


Figura 5. STING regula o potencial patogênico de células T_H17. Células T CD4 naíve WT ou STING KO foram cultivadas em condições polarizantes para A) cT_H17 (IL-6+TGFβ) ou B) pT_H17 (IL-6+IL-23+IL-1β) na ausência (meio) ou presença ou ausência de DMXAA por 72 h e a expressão intracelular de IL-17A e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias (A e B), seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Em corroboração a estes achados, observamos ainda que 48 h após o início das culturas de ambos perfis cT_H17 e pT_H17, houve um aumento nos níveis de mRNA de *Il10* e redução de *Il23r* (**Figura 6**), os quais são considerados marcadores de células T_H17 com perfil regulador (não-patogênico) e inflamatório (patogênico), respectivamente. Mais uma vez, esses efeitos ocorreram de forma dependente de STING. Nossos achados demonstraram claramente que STING regula a produção de IL-17A e IL-10 em ambos os perfis de células T_H17 avaliados. Embora células pT_H17 passem a produzir IL-10 após a ativação de STING, os níveis são baixos. Portanto, para estudarmos os mecanismos pelos quais STING regula o fenótipo T_H17 utilizamos células cT_H17 na maioria dos experimentos.

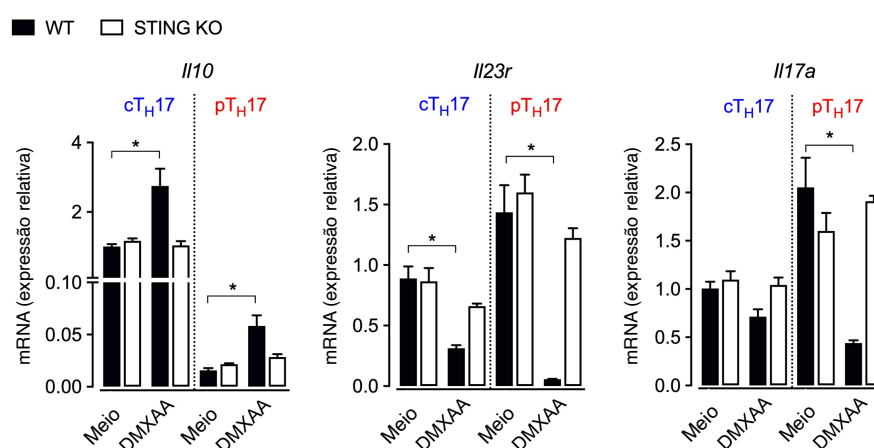


Figura 6. STING regula a expressão de genes associados ao perfil T_H17. Células T CD4 naive WT ou STING KO foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGFβ) ou pT_H17 (IL-6+IL-23+IL-1β) na ausência (meio) ou presença ou ausência de DMXAA por 48 h para análise da expressão de *Il10*, *Il23r* e *Il17a* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle, meio WT. Dados são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Em seguida, buscamos avaliar se a inibição farmacológica de STING recapitula os efeitos vistos com células STING KO. Para isto, utilizamos a droga C-176, recentemente descrita como um potente inibidor seletivo de STING (HAAG et al., 2018). De fato, observamos que a inibição de STING foi capaz de reverter os efeitos induzidos pelo agonista de STING, elevando novamente os níveis de IL-17A e abolindo os de IL-10 (**Figura 7**).

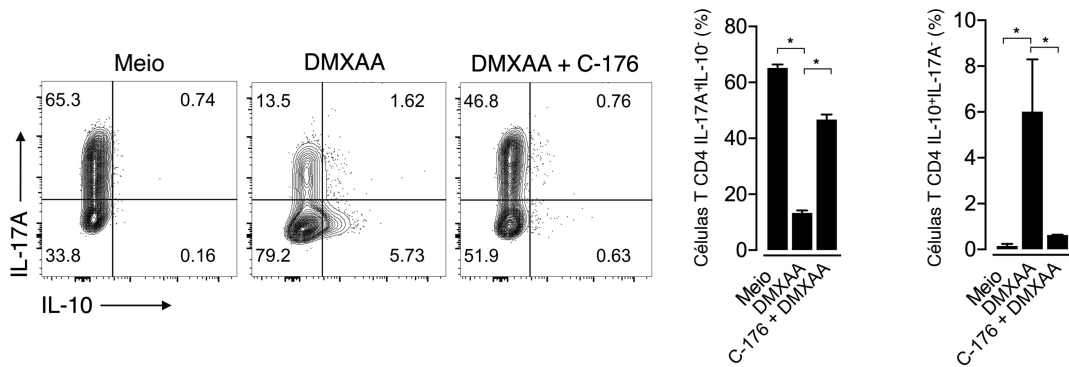


Figura 7. A inibição farmacológica de STING recapitula os efeitos obtidos com sua deleção gênica. Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para c_TH17 (IL-6+TGFβ) na presença de C-176 (1 μM) *overnight*, seguido da adição de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Dados são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Analizamos ainda o impacto da inibição farmacológica de STING sobre o perfil transcricional de células T_H17 que foram submetidas a ativação de STING. Inicialmente, vimos que de fato a ativação de STING induz a expressão de *Irfb1* em células T_H17, que foi revertida com a inibição de STING (**Figura 8**). Esse achado valida a abordagem farmacológica empregada nesses experimentos. Nesse cenário, observamos que C-176 foi capaz de reverter a redução na expressão dos marcadores inflamatórios *I17a* e *I23r* induzidos pela ativação de STING, enquanto reverteu o aumento nos níveis de mRNA para os marcadores não-patogênicos *I10* e *Cd5l*, este último sendo um regulador do metabolismo lipídico associado a células T_H17 com perfil regulador (**Figura 8**) (WANG et al., 2015).

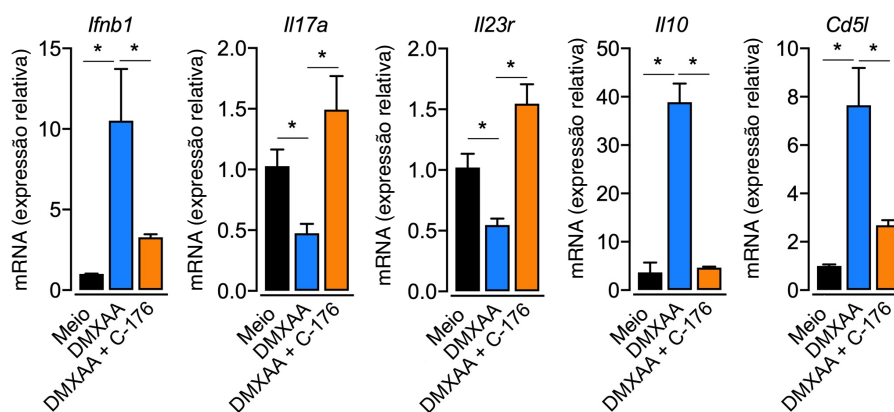


Figura 8. A inibição farmacológica de STING reverte os efeitos de sua ativação sobre o perfil transcricional de células T_H17. Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na presença de C-176 (1 μ M) *overnight*, seguido da adição de DMXAA por 72 h. As células foram coletadas para análise da expressão de *Irfn1*, *Il17a*, *Il23r*, *Il10* e *Cd5l* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (meio). Dados são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Além de células deficientes de STING e do inibidor seletivo, utilizamos ainda células T CD4 de animais STING^{Gt} (*Goldenticket*), que possuem uma mutação (substituição I199N) na proteína STING, tornando-a inativa (SAUER et al., 2011). Percebemos que estas células, quando diferenciadas em perfil T_H17, se comportaram de modo similar às células deficientes de STING, uma vez que os efeitos sobre a expressão IL-17A e IL-10 induzidos pelo ligante de STING foram abolidos (**Figuras 9**).

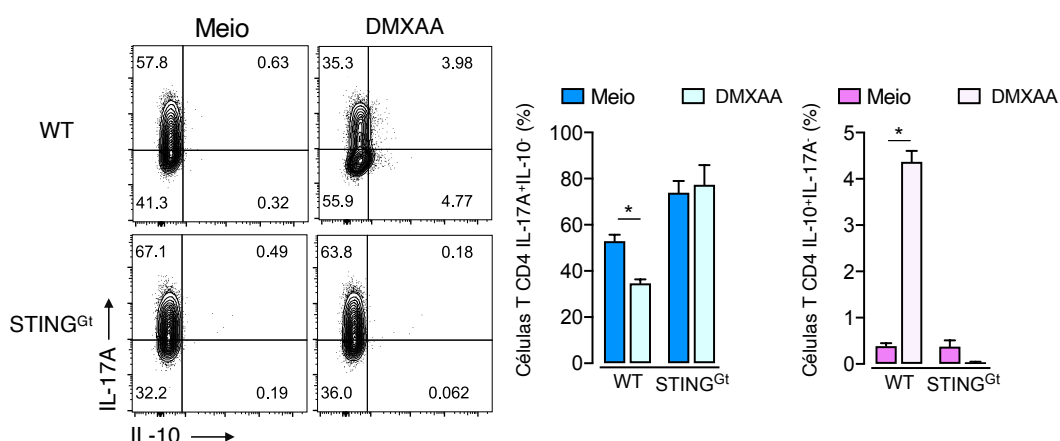


Figura 9. Mutação na proteína STING impede sua atividade em regular a expressão de IL-17A e IL-10 em células T_H17. Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

5.3. A expressão de IL-10 mediada por STING em células T_H17 é parcialmente dependente da sinalização de AhR

Há evidências de que a produção de IL-10 mediada por STING previne

inflamação intestinal (AHN et al., 2017), entretanto, o mecanismo pelo qual STING induz a expressão de IL-10 não foi explorado. Após sua ativação, STING desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na produção de IFN β (ISHIKAWA; BARBER, 2008). Sabe-se que IFN β induz a expressão de IL-10 e redução das respostas inflamatórias mediadas por células T_H17 (RAMGOLAM et al., 2009; ZHANG et al., 2011a). Logo, nos perguntamos se a ativação de STING estaria regulando o perfil T_H17 por meio da sinalização de IFN β , que ocorre via receptores IFNAR.

Inicialmente, observamos que células deficientes de IFNAR tem maior capacidade de se diferenciarem em células T_H17, sugerindo um papel intrínseco dessa sinalização. De fato, percebemos que já que existe uma expressão basal de *Irfb1* durante a diferenciação destas células, entretanto, a ativação de STING induziu um aumento substancial na expressão desse gene (**Figura 10A**). Todavia, observamos que a adição de DMXAA induziu redução dos níveis de IL-17A e aumento da expressão de IL-10 de forma similar em células WT e IFNAR KO (**Figura 10B**). Estes achados sugerem que, embora IFN β seja descrito como um regulador negativo de células T_H17, a ativação de STING parece induzir mecanismos independentes de IFN β para regulação deste fenômeno.

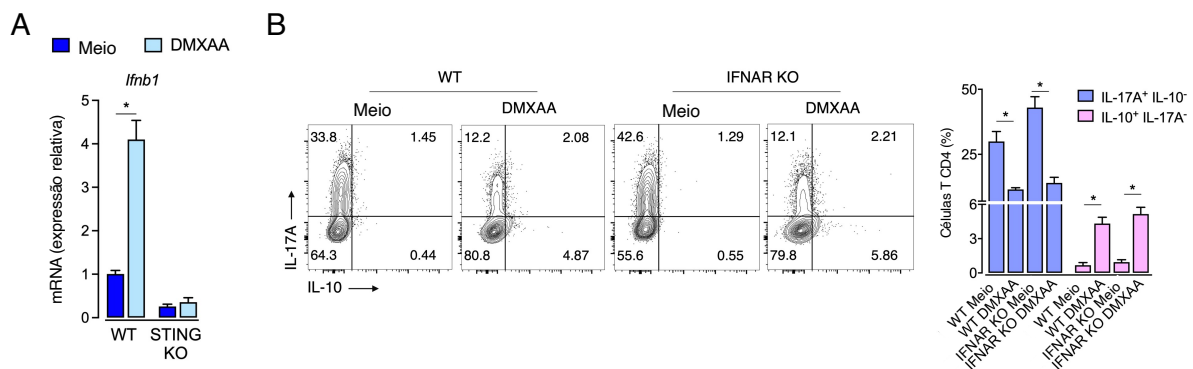


Figura 10. A expressão de IFN β aumenta após ativação de STING, mas não é responsável pela regulação do fenótipo T_H17. A) Células T CD4 naive WT ou STING KO foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. As células foram coletadas para análise da expressão de *Ifnb1* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (WT meio). B) Células T CD4 naive de animais WT e IFNAR KO foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias (A e B), seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Levando em conta que a ativação de STING induz a expressão de IL-10 por células T_H17, decidimos investigar os mecanismos envolvidos neste processo. A proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B (Blimp-1), codificada pelo gene *Prdm1*, é um repressor transcricional descrito por promover a expressão de IL-10 em células T_H1 e células T_H17 (quando expostas à IL-27) (HEINEMANN et al., 2014; NEUMANN et al., 2014). Para investigar se a produção de IL-10 mediada por STING em células T_H17 requer Blimp-1, cultivamos células T CD4 naive WT ou Blimp-1-deficientes (CD4-Cre *Prdm1*^{fl/fl}) sob condições polarizantes para T_H17 com DMXAA. Curiosamente, a ausência de Blimp-1 não afetou a expressão de IL-10 induzida por STING em células T_H17, descartando o papel de Blimp-1 neste processo (**Figura 11**).

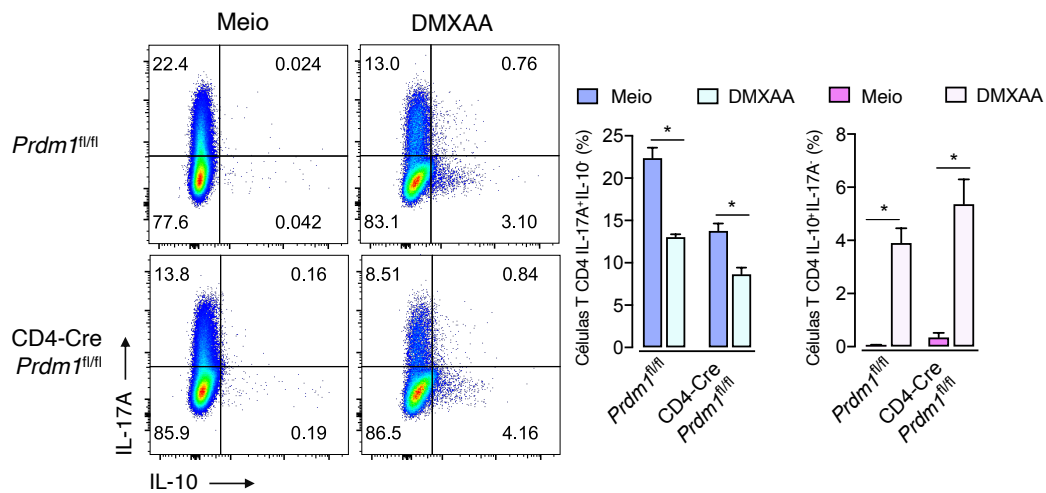


Figura 11. Blimp-1 não é necessário para a produção de IL-10 induzida por STING em células T_H17. Células T CD4 de camundongos WT (*Prdm1*^{fl/fl}) e Blimp-1-deficientes (CD4-Cre *Prdm1*^{fl/fl}) foram cultivadas sob condições de cT_H17 (IL-6+TGFβ) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Dados são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

AhR é um fator de transcrição ativado por ligante (ex. compostos xenobióticos ou ligantes endógenos), e foi descrito por auxiliar a geração de células T_H17 (QUINTANA et al., 2008; VELDHOEN et al., 2008). Além disso, o AhR também pode cooperar com o fator de transcrição cMaf para induzir a produção de IL-10 em células T_R1 (APETOH et al., 2010; XU et al., 2009). Nesse contexto, avaliamos a expressão de *Maf* e *Ahr* em células T_H17 ativadas com o ligante de STING, e não percebemos alterações significativas nos níveis de mRNA destes fatores de transcrição. Por outro

lado, notamos que a ativação de STING induziu aumento na expressão dos genes *Cyp1a1* e *Ahrr*, os quais são *readouts* da atividade transcricional de AhR (**Figura 12**). Confirmamos ainda que o aumento da expressão destes genes ocorreu de forma dependente de STING.

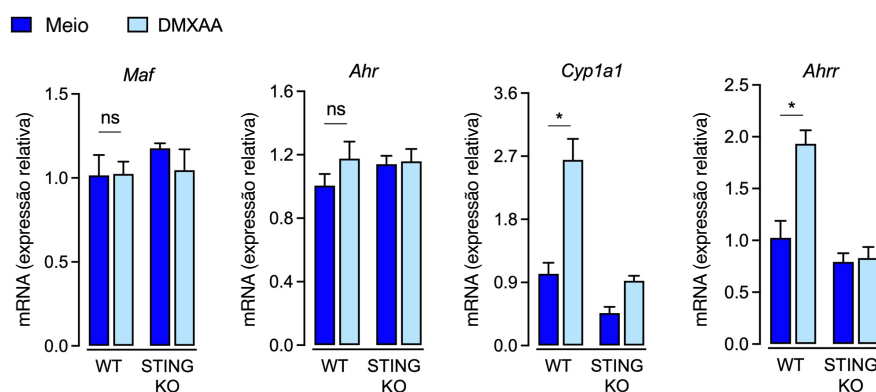


Figura 12. Ativação de STING em células T_H17 induz aumento na atividade de AhR. Células T CD4 naive WT e STING KO foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 48 h. As células foram coletadas para análise da expressão de *Maf*, *Ahr*, *Cyp1a1* e *Ahrr* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (WT meio). Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Ao compararmos a expressão de AhR em diferentes subpopulações de células T CD4, observamos que de fato a expressão de AhR é maior em células cT_H17, enquanto células pT_H17 apresentam baixa expressão desse fator de transcrição (**Figura 13A**). De modo interessante, percebemos que a alta expressão de AhR em células não-patogênicas coincide com a alta expressão de STING nestas mesmas células (**Figura 13A**). Uma vez que AhR é um marcador de células com baixo potencial patogênico, nossos resultados corroboram com a ideia de que a expressão de STING também pode ser atribuída ao perfil não-patogênico de células T_H17. Nossos achados demonstraram também que a deficiência de STING está relacionada à baixa expressão de AhR em células T_H17 (**Figura 13B**), o que mais uma vez sugere uma função intrínseca de STING sobre o fenótipo destas células.

Analizamos ainda a expressão de AhR ao longo da diferenciação de células T_H17 após ativação de STING. Não observamos diferenças substanciais até 72 h,

quando sua expressão foi reduzida (**Figura 13C**), possivelmente por degradação proteossômica que ocorre subsequente a sua intensa atividade transcricional (DAVARINOS; POLLENZ, 1999). Portanto, hipotetizamos que STING pode cooperar com AhR para indução do programa não-patogênico em células T_H17.

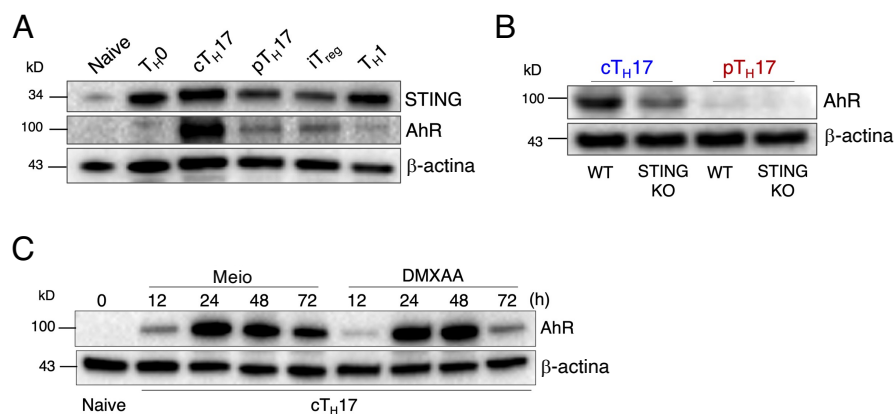


Figura 13. A expressão de AhR e STING estão associados ao perfil com menor potencial patogênico. A) Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para diferentes subpopulações por 72 h, seguida da análise de expressão proteica de STING e AhR por *Western Blot*. B) Células T CD4 naive WT e STING KO foram cultivadas em condições de diferenciação para cT_H17 (IL-6+TGFβ) ou pT_H17 (IL-6+IL-23+IL-1β) por 72 h e a expressão proteica de STING avaliada por *Western Blot*. C) Células cT_H17 foram cultivadas na ausência (meio) ou presença de DMXAA e coletadas em diferentes tempos (0, 12, 24, 48 e 72 h) para análise da expressão proteica de AhR por *Western Blot*. β-actina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

Considerando a maior atividade de AhR diante ativação de STING em células T_H17, nos perguntamos se a ativação de STING estaria promovendo a expressão de IL-10 via ativação de AhR. Para isto, utilizamos o antagonista de AhR CH223191 sobre células T_H17 cultivadas na presença ou ausência do ativador de STING. Notamos que a ativação de STING mais uma vez reduziu e aumentou a expressão de IL-17A e IL-10, respectivamente. Como esperado, o antagonista de AhR *per se* foi capaz de reduzir a expressão de IL-17A, cujo efeito é comparável àquele promovido pela ativação de STING (**Figura 14A**). De modo interessante, observamos que a inibição de AhR, sobre a ativação de STING, causou redução substancial na capacidade de produção de IL-10 induzida por STING em células T_H17 (**Figura 14A**). Em corroboração, observamos redução na expressão gênica de *Il17a* e *Il23r* após ativação de STING, como demonstrado anteriormente. Por outro lado, o aumento nos níveis de mRNA de *Il10* induzida pela ativação de STING foi substancialmente revertida na presença do antagonista de AhR (**Figura 14B**). Adicionalmente, o

aumento na expressão de *Cyp1a1* e *Il22* (ambos *readouts* da ativação de AhR) induzidos por STING foi drasticamente reduzido com a inibição de AhR, o que valida nossa abordagem experimental em inibir a sinalização de AhR (**Figura 14B**). Além disso, observamos que todos os efeitos visualizados nos dados de citometria de fluxo bem como nas análises de expressão gênica, ocorreram de forma dependente de STING, já que foram perdidos em células STING KO (**Figura 14A e B**).

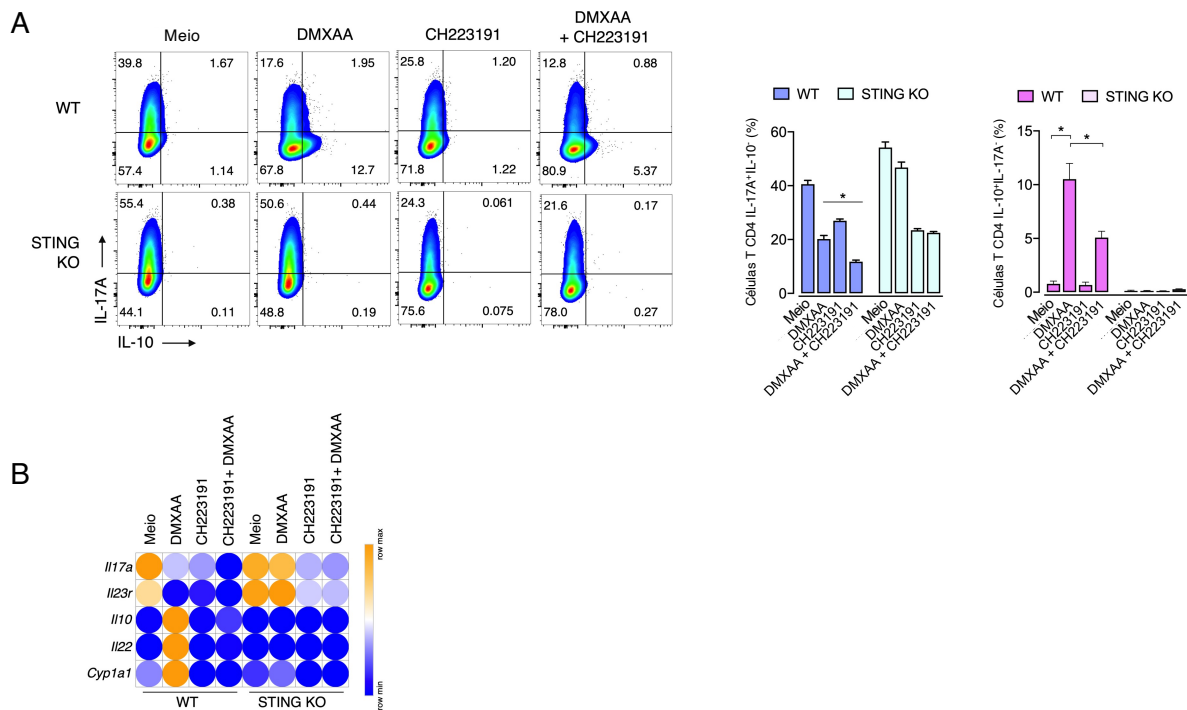


Figura 14. AhR controla a expressão de IL-10 induzida pela ativação de STING em células TH17. A) Células T CD4 naive WT e STING KO foram cultivadas em condições polarizantes para cTH17 (IL-6+TGFβ) na ausência (meio) ou presença de DMXAA, CH223191 (30 μM) ou a combinação de DMXAA + CH223191 por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. B) As células foram coletadas para análise da expressão de *Il17a*, *Il23r*, *Il10*, *Il22* e *Cyp1a1* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (meio). Dados estão representados em *heat map*. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias (A), seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Posteriormente, decidimos confirmar estes achados por meio do uso de células deficientes de AhR. Para isto, cultivamos células TH17 WT e AhR KO na presença ou ausência do ativador de STING e avaliamos a expressão de genes associados ao fenômeno observado. No geral, notamos que a ativação de STING sobre células AhR KO recapitulou os efeitos obtidos com o bloqueio farmacológico com CH223191

(Figura 15). Vale ressaltar que a deficiência de AhR não afetou a expressão de *Irfb1*. Além disso, os altos níveis de expressão de *Il10* induzidos pela ativação de STING em células WT foram amplamente perdidos na ausência de AhR (Figura 15).

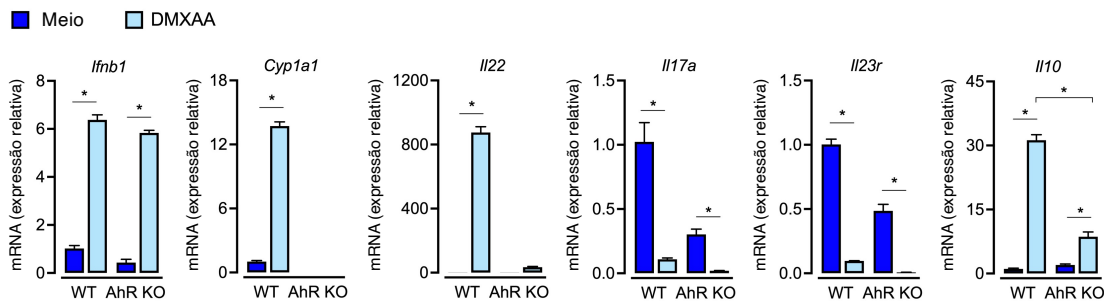


Figura 15. A expressão de *Il10* induzida por STING é drasticamente reduzida em células T_H17 deficientes de AhR. A) Células T CD4 naive WT e AhR KO foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. As células foram coletadas para análise da expressão de *Irfb1*, *Cyp1a1*, *Il22*, *Il17a*, *Il23r* e *Il10* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (WT meio). Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Sabe-se que células T_H1 apresentam apenas uma leve expressão de AhR (Figura 13A) (QUINTANA et al., 2008; VELDHOEN et al., 2008). Ao analisar os efeitos da ativação de STING sobre células T_H1 , observamos nenhuma alteração na produção de IL-10, embora uma leve redução na frequência de células produtoras de IFN γ tenha sido percebida (Figura 16). Coletivamente, os dados acima indicam que a indução de IL-10 a partir da ativação de STING em células T_H17 ocorre de forma parcialmente dependente de AhR.

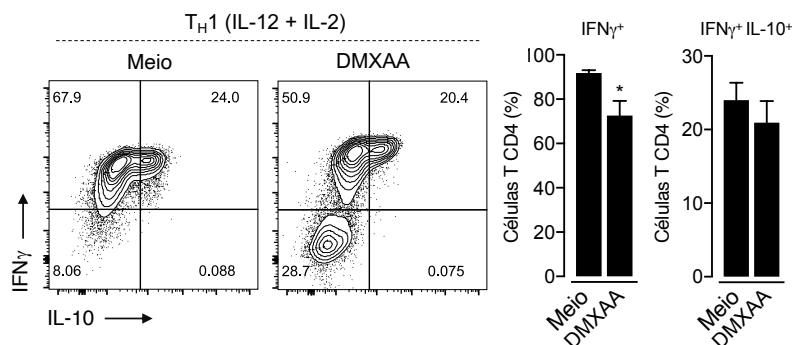


Figura 16. A ativação de STING não altera a expressão de IL-10 em células T_H1 . Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para T_H1 (IL-12+IL-2) na ausência (meio) ou

presença de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IFN γ e IL-10 avaliada por citometria de fluxo. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por teste *t* de Student. **P* < 0,05.

Vale ressaltar que em ambas abordagens, usando o antagonista e células deficientes de AhR, notamos que a ativação de STING, em sinergismo com a inibição da atividade de AhR, amplificaram a redução na expressão de *Il17a* e *Il23r*, quando comparada aos seus efeitos separadamente. De fato, esse achado vai ao encontro de trabalhos na literatura que demonstram o envolvimento de AhR na geração de células T_H17 (QUINTANA et al., 2008; VELDHONEN et al., 2008). Logo, isso sugere que STING é capaz de regular a atividade de AhR sobre a transcrição de *Il10*, sem afetar seu papel na regulação de *Il17a*. Isso sugere que STING pode modular a produção de IL-17A e IL-10 por mecanismos distintos.

5.4. A ativação de STING reduz a atividade transcricional de Ror γ t

Estudos demonstram que por meio do seu receptor (IL-10R), a IL-10 é capaz de reduzir a diferenciação e função inflamatória de células T_H17 (HUBER et al., 2011; ZHANG et al., 2011a). Logo, nos perguntamos se a IL-10 produzida a partir da ativação de STING *in vitro* poderia afetar a expressão de IL-17A de maneira autócrina/parácrina. Para isso, utilizamos células T CD4 naive WT e IL-10 KO e as diferenciamos em perfil T_H17 na presença ou ausência de DMXAA. Curiosamente, observamos que a redução na expressão de IL-17A após a ativação de STING foi mantida em células IL-10 KO (**Figura 17A**). Ainda, o tratamento com o agonista de STING reduziu os níveis de mRNA de *Il23r* e *Il17a* também em células deficientes de IL-10 (**Figura 17B**), sugerindo que STING regula o potencial patogênico de células T_H17 independente do papel anti-inflamatório da IL-10 sobre estas células.

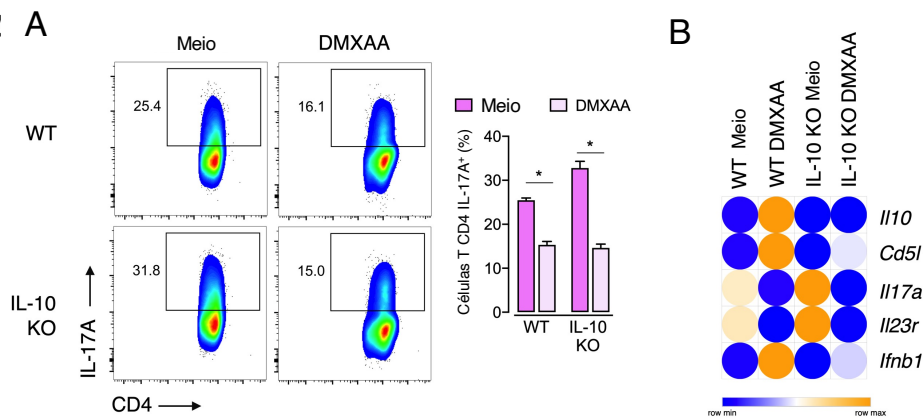


Figura 17. A IL-10 induzida pela ativação de STING não atua no mecanismo pelo qual STING reduz a patogenicidade de células TH17. A) Células T CD4 naive WT e IL-10 KO foram cultivadas em condições polarizantes para cTH17 (IL-6+TGFβ) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A avaliada por citometria de fluxo. B) As células foram coletadas para análise da expressão de *Il10*, *Cd5l*, *Il17a*, *Il23r*, e *Ifnb1* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (WT meio). Dados estão representados em *heat map*. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de duas vias (A), seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

A diferenciação e função de células TH17 requer a atividade do fator de transcrição *Roryt* (IVANOV et al., 2006; LEE et al., 2012; YANG et al., 2008b). Contudo, observamos que após a ativação de STING, a produção de IL-17A é reduzida, enquanto a expressão de *Roryt* é mantida em níveis similares, sugerindo que STING regula a atividade deste fator de transcrição sem alterar sua expressão (Figura 18A e B).

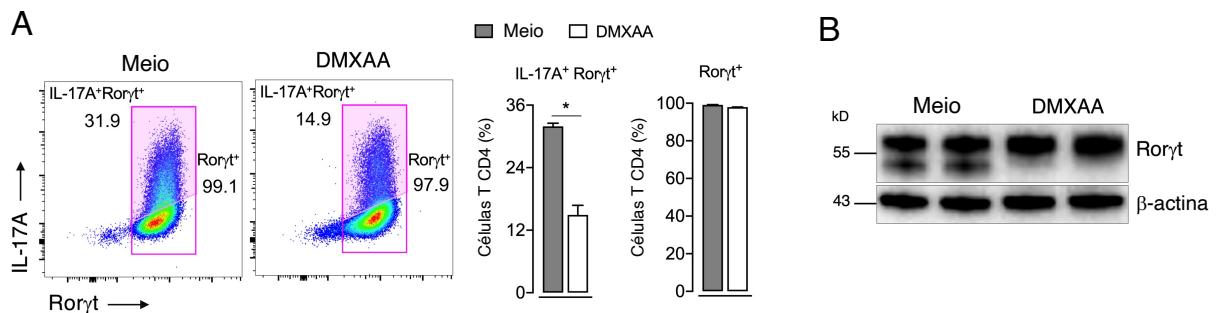


Figura 18. Ativação de STING não altera a expressão de Roryt. A) Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cTH17 (IL-6+TGFβ) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. A expressão intracelular de IL-17A e *Roryt* avaliada por citometria de fluxo. B) Células foram coletadas após 72 h para análise dos níveis proteicos de *Roryt* por *Western Blot*. β-actina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados são representativos de dois

experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por teste *t* de Student (A). **P* < 0,05.

Além disso, avaliamos se STING pode reduzir o potencial patogênico de células T_H17 terminalmente diferenciadas. Para isso, expusemos células T_H17 totalmente diferenciadas (100% de células T Rorγt⁺) à IL-23 em um segundo *round* de cultura. Sabe-se que a IL-23, além de manter o fenótipo T_H17, promove a patogenicidade dessas células (MCGEACHY et al., 2009). Observamos que a ativação de STING causou diminuição dos níveis de mRNA de *I17a* e *I123r*, que conferem funções inflamatórias a estas células. Por outro lado, a expressão gênica dos marcadores de perfil não-patogênico *I110* e *Cd5l* foi aumentada (**Figura 19A**). Nesse cenário, buscamos avaliar ainda o impacto da inibição de STING em células T_H17 totalmente diferenciadas expostas à IL-23 na presença do agonista de STING. De modo interessante, observamos que o bloqueio de STING com C-176 reverteu o efeito de sua ativação em reduzir a capacidade de produção de IL-17A em células terminalmente diferenciadas expostas à IL-23. Por outro lado, os níveis de Rorγt permaneceram inalterados (**Figura 19B**). Logo, esses dados sugerem que a ativação de STING reduz a atividade transcricional de Rorγt, mas não sua expressão e diferenciação de células T_H17.

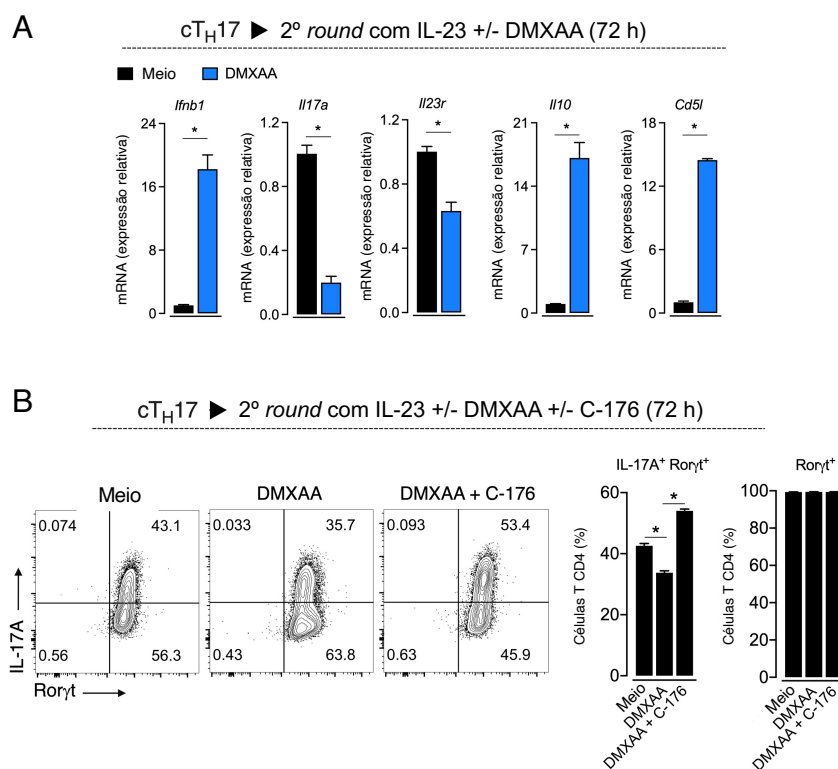


Figura 19. A ativação de STING regula negativamente o programa inflamatório de células T_H17 terminalmente diferenciadas expostas à IL-23. A) Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) por 72 h, seguida de reestimulação *in vitro* com IL-23 na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 48 h. Células foram coletadas para avaliação da expressão de *Ifnb1*, *Il17a*, *Il23r*, *Il10* e *Cd5l* por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (meio). B) Células cT_H17 foram cultivadas e reestimuladas como descrito em A na presença ou ausência de C-176 por 48 h. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por teste *t* de Student (A) ou ANOVA de uma via (B), seguida pelo pós-teste de Tukey. **P* < 0,05.

Sabe-se que a ativação de STING culmina classicamente na expressão de IFN β , após a fosforilação de IRF3 por TBK1 (LI; WILSON; KISS-TOTH, 2017). Existe na literatura evidência de que IRF3 é capaz de interagir e regular negativamente a função de Ror γ t em células T CD8⁺ (YSEBRANT DE LENDONCK et al., 2013). Logo, nos perguntamos se a ativação de IRF3 seria o mecanismo pelo qual STING regula a atividade de Ror γ t sobre a expressão de *Il17a*.

Por meio de experimentos de imunoprecipitação, confirmamos que IRF3 e Ror γ t formam um complexo em células T_H17, mas que a ativação de STING não alterou a magnitude dessa associação (**Figura 20A**). Ao avaliar o status de ativação de IRF3, por meio da identificação da fosforilação do resíduo S396, observamos que após a ativação de STING os níveis de fosfo-IRF3 estavam aumentados e restritos ao núcleo das células T_H17, que coincidiu com a alta expressão de Ror γ t neste compartimento celular (**Figura 20B**). Além disso, a presença de fosfo-IRF3 nuclear depende da sinalização de STING, já que células STING KO não recrutaram IRF3 para o núcleo diante a ativação da via (**Figura 20C**). Esses achados sugerem que o eixo IRF3-Ror γ t ocorre em células T_H17, e possivelmente regula funções transcricionais nestas células.

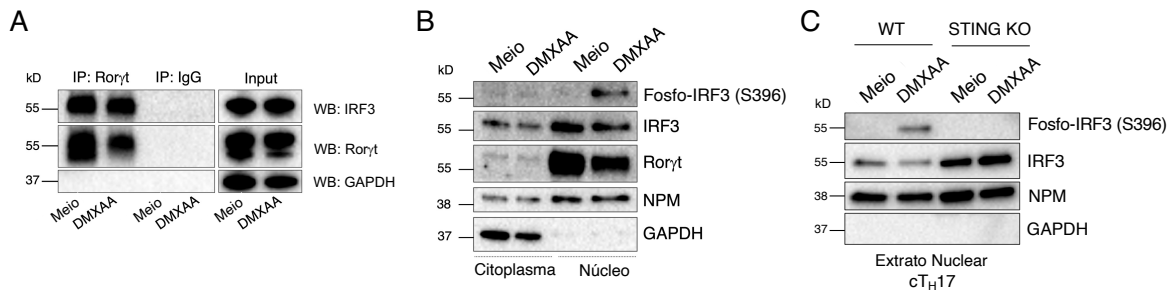


Figura 20. IRF3 interage com Roryt em células TH17. A) Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cTH17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. Estas células foram lisadas e submetidas a imunoprecipitação usando anti-Roryt ou controle IgG, seguido de *Western Blot* usando anti-IRF3. GAPDH foi utilizado com controle endógeno de expressão proteica B) Células cTH17 cultivadas na ausência (meio) ou presença de DMXAA foram submetidas a separação de frações citoplasmática e nuclear para análise de fosfo-IRF3, IRF3 e Roryt por *Western Blot*. C) Fração nuclear de células cTH17 WT e STING KO foi obtida para análise de fosfo-IRF3, IRF3 e Roryt por *Western Blot*. GAPDH e nucleofosmina (NPM) foram utilizados como controle endógeno citoplasmático e nuclear, respectivamente. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

A ligação de Roryt na região não codificadora conservada (*conserved noncoding sequence 2*; CNS2) é necessária para remodelamento da cromatina e transcrição de *Il17a* em células TH17 (WANG et al., 2012). Com o objetivo de avaliar se a ativação de STING afeta a função transcrricional de Roryt, realizamos o ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e analisamos o recrutamento de Roryt para a região CNS2 do gene *Il17a*. Notavelmente, o tratamento com agonista de STING reduziu a capacidade de Roryt de se ligar à região CNS2 de *Il17a* em células TH17 (**Figura 21A**), possivelmente via ativação de IRF3, o qual interage com Roryt.

Para reforçar os achados descritos acima, geramos camundongos *Il17a-Cre TdTom⁺*, cujas células emitem fluorescência da proteína TdTomato apenas a partir do momento em que há indução do programa de transcrição de *Il17a*. Assim, esse sistema reflete o *status* da atividade transcrricional sobre *Il17a*. Nesse sentido, observamos que os agonistas de STING reduziram a frequência de células TH17 IL-17A-TdTom⁺ *in vitro* em comparação com o controle, mais uma vez indicando que a sinalização *downstream* da ativação de STING reduz a transcrição de *Il17a* (**Figura 21B**). Por *cell sorting*, isolamos células IL-17A-TdTom⁺ a partir de culturas TH17 e vimos que a ativação de STING reduziu os níveis de mRNA de *Il23r* enquanto a expressão de *Il10* foi substancialmente aumentada. Como esperado, estas células

apresentaram maior expressão de *lfnb1* em relação ao controle, indicando ativação de STING (**Figura 21C**). Isso demonstra que após a ativação de STING, células que ativaram o programa T_H17 em algum momento de seu desenvolvimento passam por uma reprogramação direcionada a um fenótipo menos patogênico, o que corrobora com a ideia de que STING funciona como um “interruptor” do estado funcional destas células.

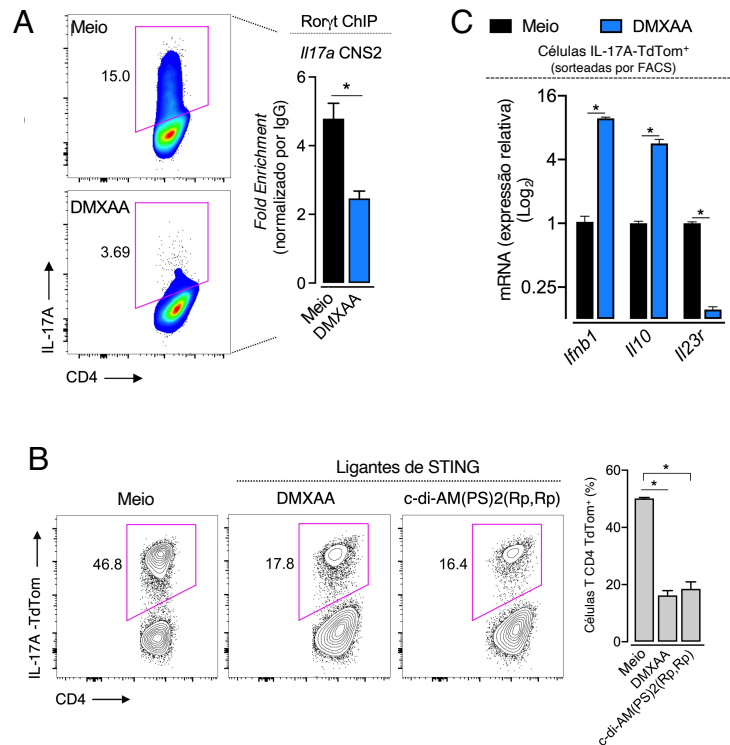


Figura 21. A ativação de STING limita a expressão de IL-17A por reduzir a atividade transcricional de Rorγt. A) Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGFβ) na ausência (meio) ou presença de DMXAA por 72 h. Células foram coletadas e submetidas ao ensaio de ChIP para Rorγt seguido de análise por RT-qPCR da região CNS2 do gene *I17a* em células cT_H17. *Fold enrichment* normalizado pelo controle IgG. B) Análise de citometria de fluxo de células cT_H17 IL-17A-TdTom⁺ cultivadas na ausência (meio) ou presença de DMXAA ou c-di-AM(PS)2(Rp,Rp) (15 μM) por 72 h. C) Expressão de *lfnb1*, *Il10* e *Il23r* em células IL-17A-TdTom⁺ cT_H17 tratadas com DMXAA por RT-qPCR. Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *Gapdh*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (meio). Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de *P* foram determinados por teste *t* de Student (A); ou ANOVA de uma (B) ou duas (C) vias, seguida pelo pós-teste de Tukey (B). **P* < 0,05.

Portanto, esses dados confirmam que a ativação de STING, além de mediar a produção de IL-10 via AhR, reduz o comprometimento destas células com o fenótipo T_H17 por limitar a atividade transcricional de Rorγt.

5.5. Impacto da ativação de STING no metabolismo oxidativo de células T_H17

Nos últimos anos, várias evidências indicam a importância do metabolismo celular na regulação da diferenciação e função de células T_H17 (PAPADOPOULOU; XANTHOU, 2022). Várias vias e processos metabólicos como glicólise, oxidação de ácidos graxos (*fatty acid oxidation*; FAO) e fosforilação oxidativa compõem assinaturas metabólicas que desempenham papéis diferenciais de acordo com o estado funcional e tipo celular (JUNG; ZENG; HORNG, 2019). Logo, buscamos avaliar se a ativação de STING altera o estado bioenergético de células T_H17. Por meio de um analisador de fluxo extracelular, vimos que células T_H17 cultivadas na presença de agonistas de STING promoveram maiores taxas, basal e máxima, de consumo de oxigênio (*Oxygen consumption rate*; OCR), incluindo aumento da síntese de ATP (**Figura 22**). Esses dados inferem que a ativação de STING acompanha aumento do metabolismo mitocondrial de células T_H17, entretanto, se esse fenômeno é consequência direta ou indireta da ativação de STING ainda deve ser avaliado.

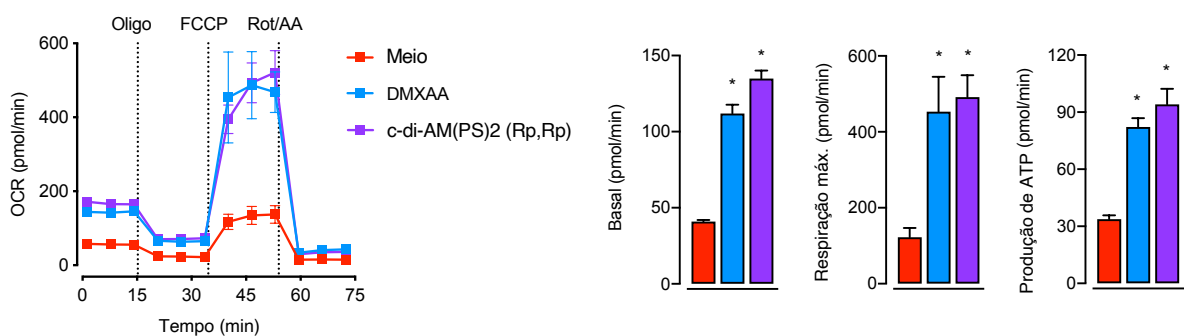


Figura 22. STING promove aumento nas taxas de fosforilação oxidativa em células T_H17. Células T CD4 naive foram cultivadas em condições polarizantes para cT_H17 (IL-6+TGF β) na ausência (meio) ou presença de DMXAA ou c-di-AM(PS)2(Rp, Rp) por 72 h. Em seguida, análise de fluxo extracelular foi realizada para mensurar a taxa de consumo de oxigênio (OCR). Dados são representativos de quatro experimentos independentes. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de *P* foram determinados por ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey (B). **P* < 0,05.

5.6. Os efeitos da ativação de STING são recapitulados em células TH17 humanas

Como abordagem translacional, investigamos os efeitos da ativação de STING em células TH17 humanas obtidas *in vitro*. Para isso, padronizamos a diferenciação de células TH17 a partir de células T CD4 naive oriundas de PBMC de doadores saudáveis. Para ativação de STING, utilizamos o agonista c-di-AMP(PS)2(Rp, Rp) (também conhecido como MIW815 ou ADU-S100), que é um ligante natural de STING modificado quimicamente para garantir estabilidade superior aos demais CDNs e que possui uma estrutura similar a de CDNs endógenos em humanos, mas que também funciona para ativação de STING murino (CORRALES et al., 2015).

Inicialmente, induzimos a diferenciação de células TH17 humanas na presença do ligante de STING e avaliamos o *status* de ativação da cascata de sinalização de STING. Assim como nossos dados com células murinas, vimos que a ativação de STING em células TH17 humanas também induziu a fosforilação de STING (resíduo S366 em humanos) (**Figura 23A**), bem como a do fator de transcrição *downstream* dessa via, IRF3 (S396) (**Figura 23B**). Esses dados sugerem que STING também induz a formação do sinalossoma em células TH17 humanas.

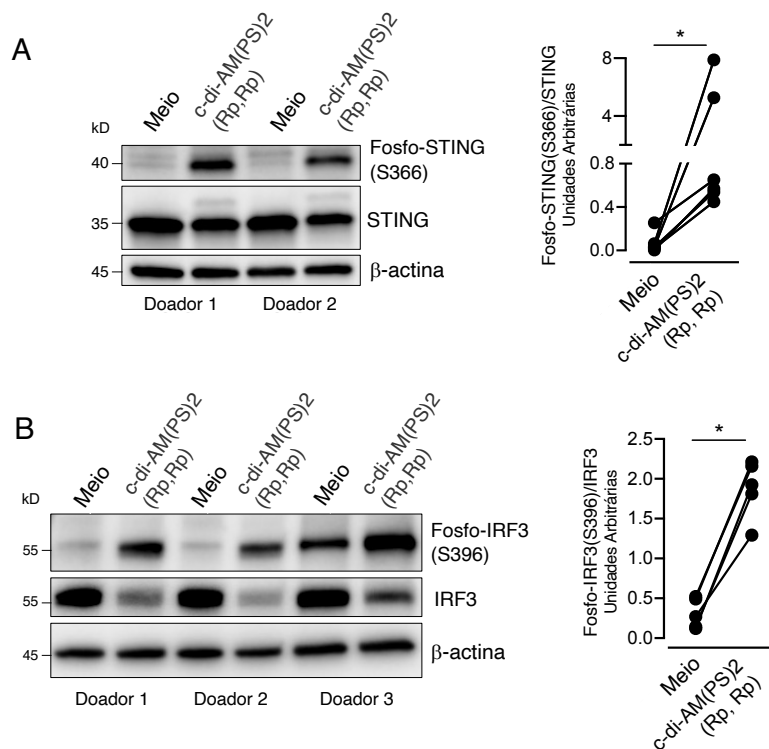


Figura 23. A cascata de sinalização de STING é funcional em células TH17 humanas. Células T CD4 naive foram isoladas a partir de PBMC de doadores saudáveis e foram cultivadas em condições

polarizantes para T_H17 humana (IL-6+IL-21+IL-23+IL-1β+TGFβ) na ausência (meio) ou presença de c-di-AMP(PS)2(Rp, Rp) (10 μM) e coletadas após 5 d. Células foram lisadas, seguido de análise da expressão proteica de A) Fosfo-STING e STING (n = 6 doadores) e B) Fosfo-IRF3 e IRF3 (n = 5 doadores) por *Western Blot*. β-actina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes; os experimentos foram agrupados no gráfico. Os resultados estão expressos como Média ± E.P.M. Valores de P foram determinados por teste t de Student (pareado). *P < 0,05.

De modo interessante, observamos que a adição de c-di-AMP(PS)2 (Rp, Rp) sobre as culturas de células T_H17 levou a redução na expressão de IL-17A, o que reproduz nossos achados em células murinas (**Figura 24A**). Vimos ainda que após a ativação de STING, a produção de IL-17A foi comprometida provavelmente devido a redução da atividade transcricional de Rorγt, mas não por afetar a diferenciação destas células, já que a expressão de Rorγt permanece comparável entre os dois grupos (**Figura 24B**). Logo, a atividade imunoreguladora de STING em células T_H17 ocorre tanto em camundongos como em humanos.

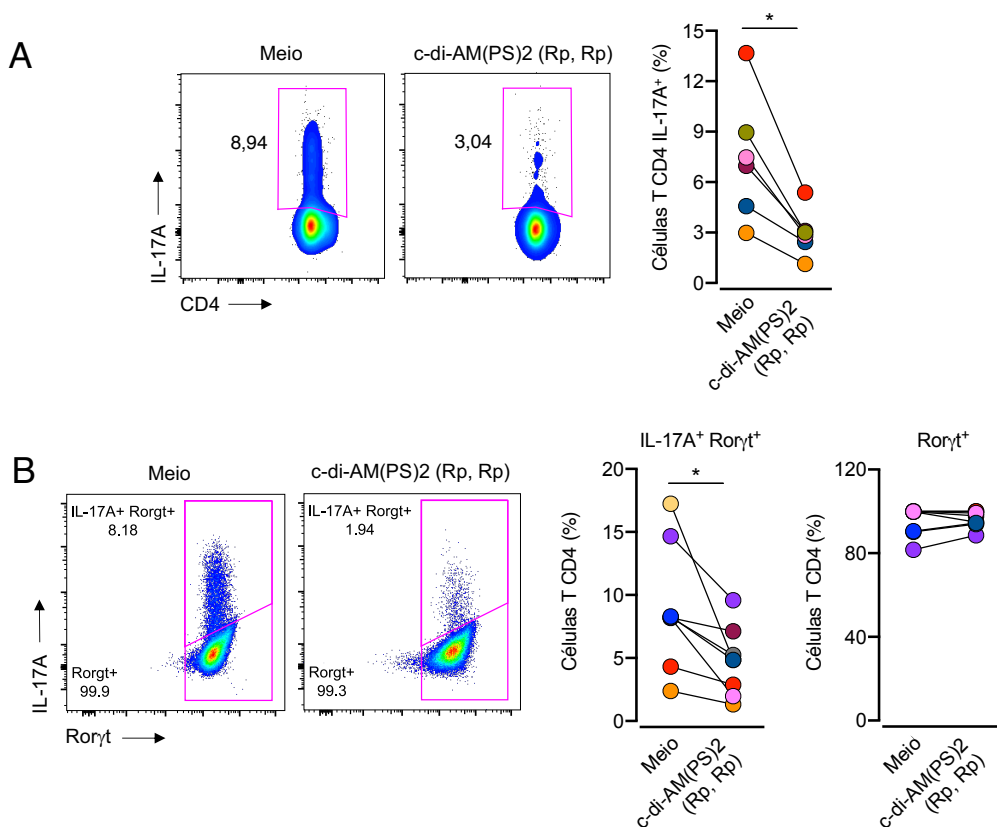


Figura 24. A ativação de STING em células T_H17 humanas reduz a produção de IL-17A sem alterar a expressão de Rorγt. Células T CD4 naive foram isoladas a partir de PBMC de doadores saudáveis e foram cultivadas em condições polarizantes para T_H17 humana (IL-6+IL-21+IL-23+IL-1β+TGFβ) na

ausência (meio) ou presença de c-di-AMP(PS)₂(Rp, Rp) e coletadas após 5 d. A) Expressão intracelular de IL-17A ($n = 6$ doadores) e B) IL-17A e Ror γ t ($n = 8$ doadores) foi analisada por citometria de fluxo. Dados são representativos de três experimentos independentes; os experimentos foram agrupados no gráfico. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de P foram determinados por teste t de Student (pareado). * $P < 0,05$.

Além dos achados acima, analisamos a expressão gênica de marcadores associados ao perfil patogênico de células T_H17. Em corroboração à maior expressão de fosfo-STING e fosfo-IRF3 (**Figura 23**), vimos que os níveis de mRNA de *IFNB1* também aumentaram em células T_H17 expostas ao ligante de STING, o que reflete ativação da via (**Figura 25**). Acompanhado a este achado, vimos que os transcritos de *IL17A* e *IL23R* foram substancialmente reduzidos com a ativação de STING. Embora a expressão de *IL10* tenha se demonstrado variável, observamos uma tendência direcionada ao aumento dos níveis de mRNA de *IL10* após a ativação de STING (**Figura 25**). Esses achados juntamente aos anteriores, confirmam que STING também reduz a patogenicidade de células T_H17 humanas, conferindo potencial importância clínica a este fenômeno.

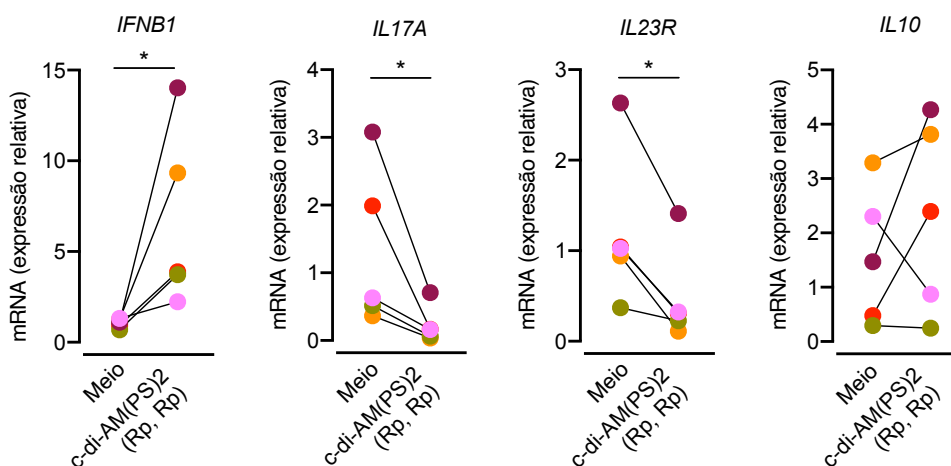


Figura 25. A ativação de STING reduz a expressão de *IL17A* e *IL23R* em células T_H17 humanas. Células T CD4 naive foram isoladas a partir de PBMC de doadores saudáveis e foram cultivadas em condições polarizantes para T_H17 humana (IL-6+IL-21+IL-23+IL-1 β +TGF β) na ausência (meio) ou presença de c-di-AMP(PS)₂(Rp, Rp) e coletadas após 5 d para avaliação de expressão gênica de *IFNB1*, *IL17A*, *IL23R* e *IL10* por RT-qPCR ($n = 5$ doadores). Para análises de expressão gênica, os valores do CT foram normalizados por *GAPDH*; *Fold change* calculado em relação ao grupo controle (meio). Dados são representativos de dois experimentos independentes; os experimentos foram agrupados no gráfico. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de P foram determinados por teste t de Student (pareado). * $P < 0,05$.

Sabe-se que células T_H17 também são capazes de transdiferenciar em células T reguladoras (T_{reg}) $Foxp3^+$ sob diferentes circunstâncias, envolvendo vias de sinalização, metabólicas e modificações epigenéticas (DOWNS-CANNER et al., 2017; OBERMAJER et al., 2014). Nesse contexto, ao avaliarmos a expressão de $Foxp3^+$ em culturas T_H17 humanas expostas ao ligante de STING, notamos que concomitante à redução de células IL-17A, houve um aumento da população de células $Foxp3^+$, indicando conversão em células T_{reg} (**Figura 26**). Em conjunto, nossos resultados apontam para STING como um regulador negativo de respostas inflamatórias mediada por células T_H17 .

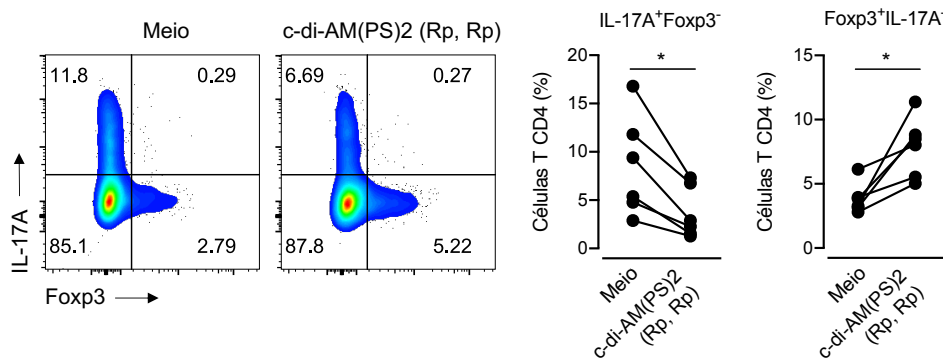


Figura 26. STING induz conversão de células T_H17 humanas em células T_{reg} ($Foxp3^+$). Células T CD4 naive foram isoladas a partir de PBMC de doadores saudáveis e foram cultivadas em condições polarizantes para T_H17 humana (IL-6+IL-21+IL-23+IL-1 β +TGF β) na ausência (meio) ou presença de c-di-AMP(PS)2(Rp, Rp) e coletadas após 5 d. Expressão intracelular de IL-17A e Foxp3 ($n = 6$ doadores) foi analisada por citometria de fluxo. Dados são representativos de dois experimentos independentes; os experimentos foram agrupados no gráfico. Os resultados estão expressos como Média \pm E.P.M. Valores de P foram determinados por teste t de Student (pareado). * $P < 0,05$.

6. Discussão

Células T_H17 compreendem uma subpopulação de linfócitos T CD4 descrita por ter um papel protetor em resposta a infecções fúngicas e outros patógenos, mas também conhecida por mediar o processo inflamatório em doenças autoimunes. Nos últimos anos diversos trabalhos têm evidenciado que fatores extrínsecos e intrínsecos, como vias de sinalização, componentes do metabolismo celular e modificações epigenéticas regulam o programa transcricional destas células, conferindo a estas, heterogeneidade de suas funções e alto grau de plasticidade para transdiferenciar entre perfis menos e mais inflamatório (STADHOUDERS; LUBBERTS; HENDRIKS, 2018). No presente estudo, demonstramos que STING, um membro chave da maquinaria de reconhecimento de DNA citoplasmático, atua como um regulador negativo do estado patogênico de células T_H17 . Isso traz novas perspectivas sobre funções não-canônicas de alvos previamente considerados cruciais para respostas imunes inata, em células da imunidade adaptativa.

Embora sensores da imunidade inata sejam pouco explorados em células T, estudos recentes têm provado o envolvimento dessas moléculas nas respostas imunes induzida por estas células. Nesse sentido, NLRP12, membro dos receptores NLR, foi recentemente descrito por atenuar respostas mediadas por células T_H17 via inibição da ativação de STAT3. Neste aspecto, foi demonstrado que animais *Nlrp12^{-/-}* desenvolvem uma forma exacerbada de artrite experimental, caracterizada por intensa resposta T_H17 (PRADO et al., 2020). Adicionalmente, tem sido demonstrado que outro membro dessa família de receptores, o NLRP1, limita a diferenciação e função de células T_H17 nos estágios iniciais do diabetes tipo I (COSTA et al., 2021). Outro grupo reportou que o sensor inato AIM2, geralmente associado a montagem e ativação de inflamassoma no compartimento mielóide, possui um papel intrínseco e independente de inflamassoma em induzir a oxidação de lipídios em células T_{reg} , favorecendo a estabilidade e função supressora dessas células (CHOU et al., 2021). Esses achados revelam que moléculas originalmente inerentes a respostas inatas podem apresentar versatilidade funcional de acordo com o tipo celular.

IL-6 e $TGF\beta$ são indutores essenciais para geração de células T_H17 convencionais, as quais são ineficazes em promover inflamação (BETTELLI et al., 2006; MCGEACHY et al., 2007). Por outro lado, embora IL-23 não estimule a diferenciação de células T_H17 , essa citocina tem um papel fundamental para indução de um programa inflamatório em células T_H17 , denominadas patogênicas (LANGRISH et al., 2005; MCGEACHY et al., 2009). Nossos resultados demonstram que células

T_H17 expressam STING (*Tmem173*), e que sua ativação, inesperadamente, levou a redução na expressão de IL-17A e aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por estas células. Em corroboração, vimos que a expressão de *Il23r*, que codifica IL-23R e é fundamental para aquisição de funções inflamatórias, tem sua expressão reduzida após a ativação de STING. Desta forma, assumimos que STING controla o programa patogênico T_H17. De fato, a deficiência de STING *per se*, causou um aumento na produção de IL-17A por estas células, sugerindo que STING está sendo ativado durante a ativação/diferenciação *in vitro*. Especulamos que ácidos nucleicos liberados por células que eventualmente morrem ao longo do processo de ativação são potenciais ligantes endógenos para ativação de STING em nossas condições experimentais. Nesse aspecto, Imanishi e colegas (2014) demonstraram que ácidos nucleicos podem induzir diretamente a diferenciação de células T_H2 e amplificação de processos alérgicos (IMANISHI et al., 2014). Além disso, sabe-se que o eventual estresse celular induz a liberação de DNA mitocondrial, o qual foi previamente demonstrado ativar a via de sinalização de STING (WEST et al., 2015). Esses tópicos são de nosso interesse e necessitam de futuras investigações.

Um dos mecanismos observados nesse estudo é a habilidade de STING induzir a produção de IL-10 por células T_H17. IL-10 desempenha seus efeitos supressores em células da imunidade inata e adaptativa para limitar a inflamação e manter a homeostase tecidual, e sua expressão envolve circuitos regulatórios que dependem do contexto em que a célula se encontra (ZHANG; KUCHROO, 2019). Vários fatores de transcrição estão associados a expressão de IL-10, incluindo Blimp-1 e AhR. Nossos dados demonstram que Blimp-1 é dispensável para a produção de IL-10 induzida por STING em células T_H17, mas por outro lado, mostramos que AhR é majoritariamente responsável pela expressão de IL-10 induzida pela ativação de STING nestas células.

Blimp-1 é crucial para produção de IL-10 em células T_H1 após estimulação com IL-12 e IL-27 em contexto de infecção por *Toxoplasma gondii* (NEUMANN et al., 2014). Adicionalmente, Heinemann e colaboradores (2014) demonstraram que células comprometidas ao perfil T_H17 quando expostas à IL-27, passam a produzir IL-10 de maneira dependente de Blimp-1 (HEINEMANN et al., 2014). Esses estudos revelam que IL-27 é importante indutora da expressão de Blimp-1, a qual é perdida na presença de TGFβ. Por outro lado, a presença de TGFβ promove a expressão de AhR, que está associado a geração de células T_R1 IL-10⁺ (APETOH et al., 2010;

VELDHOEN et al., 2008). Os fatos descritos dão suporte a ideia de que células T_H17 , devido sua plasticidade, são capazes de alterar seu perfil transcricional de acordo com o microambiente, por exemplo, podendo adquirir diferentes mecanismos para expressão de IL-10.

Os trabalhos de Neumann et al., (2014) e Heinemann et al. (2014), juntamente aos nossos achados, provam que AhR é expresso quase que exclusivamente por células T_H17 , enquanto que células T_H1 expressam altos níveis de Blimp-1. Curiosamente, demonstramos que a ativação de STING não medeia a produção de IL-10 em células T_H1 , o que soma ao fato de que Blimp-1 não é um efetor *downstream* da ativação de STING necessário para produção de IL-10. Curiosamente, mostramos que a alta expressão de STING está associada aos maiores níveis de AhR em células cT_H17 . Nesse cenário, AhR se mostrou essencial para a expressão de IL-10 induzida por STING em células T_H17 , uma vez que a inibição ou deficiência de AhR reverteu quase que completamente a produção de IL-10. Contudo, não podemos descartar mecanismos adicionais nesse processo. Por exemplo, STING também pode ativar NF- κ B, que é amplamente descrito por induzir a expressão de citocinas inflamatórias, mas que também foi demonstrado mediar a produção de IL-10 em macrófagos (SARAIVA et al., 2005). Se a ativação de STING pode regular a expressão de IL-10 via indução de NF- κ B em células T_H17 ainda é desconhecido.

Tem sido demonstrado que AhR pode promover a diferenciação de células T_{reg} e T_H17 de acordo com o ligante, indicando que AhR pode mediar funções reguladoras dependendo do contexto (QUINTANA et al., 2008). De fato, AhR tem sido amplamente associado a produção de IL-10 em determinados tipos celulares, incluído células T_{R1} - exT_H17 , além de ser considerado um marcador de células T_H17 não-patogênicas (APETOH et al., 2010; GAGLIANI et al., 2015; LEE et al., 2012). Nossos experimentos evidenciam claramente que a via de AhR é induzida diante a ativação de STING, observada pelo aumento na expressão de *Cyp1a1* e redução da expressão proteica de AhR em tempos tardios das culturas *in vitro*, que provavelmente ocorre devido a degradação proteossômica subsequente à sua ativação (DAVARINOS; POLLENZ, 1999).

Uma das limitações desse estudo é que não conseguimos desvendar o mecanismo pelo qual STING induz a ativação de AhR. Embora uma possível interação física entre STING-AhR não possa ser excluída, acreditamos que pelo fato de AhR ser um fator de transcrição ativado por ligante, é plausível hipotetizarmos que STING

pode ativar AhR, indiretamente, por induzir a produção de agonistas endógenos. Nesse cenário, sabe-se que vias do metabolismo do triptofano, tanto a via das quinureninas como a via da serotonina, são descritas por gerarem metabólitos que agem como agonistas de AhR e que são pouco exploradas quanto aos seus papéis intrínsecos em células T (GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ; QUINTANA, 2018). De fato, esse tópico é atualmente alvo de nossas investigações.

Em corroboração com os nossos achados, foi recentemente demonstrado que células B reguladoras (B_{reg}) produzem IL-10 e IL-35 de modo dependente da ativação de STING como mecanismo de reduzir as funções efetoras inflamatórias de células NK no microambiente tumoral (LI et al., 2022). Embora em contextos distintos, esse achado juntamente aos nossos resultados e de outros grupos (AHN et al., 2017; CANESSO et al., 2018), confirmam que STING é capaz de induzir respostas imunorreguladoras. De fato, é sabido que células B respondem a diversos estímulos produzindo IL-10, cuja produção está associada a uma maior taxa de metabolismo mitocondrial oxidativo (OXPHOS) (CATALÁN et al., 2021; ZHU et al., 2022).

A dependência metabólica diferencial entre os estados funcionais de células T_H17 ainda é um tópico pouco explorado. Omenetti e colaboradores demonstraram que células T_H17 homeostáticas induzidas pela microbiota comensal, apresentam um perfil quiescente, dependendo essencialmente de OXPHOS para suas demandas metabólicas, enquanto células T_H17 inflamatórias induzidas pelo patógeno *Citrobacter rodentium* apresentam atividade metabólica intensa, incluindo altas taxas de glicólise (OMENETTI et al., 2019). Ao comparar dados de scRNA-seq de células cT_H17 e células pT_H17 , Wagner e colegas (2021) observaram que células com perfil menos patogênico apresentam uma maior expressão de componentes da FAO, que está diretamente associada a OXPHOS (WAGNER et al., 2021). Neste cenário, observamos que a ativação de STING em células T_H17 induz a aquisição de um perfil não-patogênico acompanhado de um aumento substancial no consumo de oxigênio, que é um reflexo de maiores taxas de OXPHOS. De maneira geral, FAO e OXPHOS são processos que têm sido associados a funções imunossupressoras, como àquelas mediadas por células T_{reg} (HOWIE et al., 2017; MICHALEK et al., 2011). Entretanto, a atribuição de vias metabólicas ao fenótipo e funções de células T é algo complexo e que devem ser consideradas como processos dinâmicos que ocorrem de acordo com o contexto (BRAUN, 2021). Logo, ainda não está claro se a reprogramação metabólica direcionada à OXPHOS observada após a ativação de STING é causa ou

consequência da perda do potencial patogênico de células T_H17 e merece investigações adicionais.

A sinalização clássica de STING culmina na fosforilação e subsequente migração de IRF3 para o núcleo das células, onde promove a expressão de IFNs do tipo I (TANAKA; CHEN, 2012). Sabe-se que IFN β age diretamente em células T_H17, através de seu receptor IFNAR, limitando a função inflamatória destas células (RAMGOLAM et al., 2009; ZHANG et al., 2011a). No presente estudo, vimos que o sinalossoma formado após a ativação de STING é funcional em células T_H17 e culmina na expressão de *Irfb1*, contudo, notamos que a sinalização de receptores IFNAR é dispensável para a redução dos níveis de IL-17A induzida por STING.

De modo interessante, De Lendonck e colaboradores (2013) demonstraram que IRF3 pode conter a expressão de IL-17A em células T CD8⁺ por interagir diretamente com Ror γ t e limitar seu recrutamento para a região CNS2 do gene *I17a* (YSEBRANT DE LENDONCK et al., 2013). De fato, a ligação de Ror γ t a esta região *enhancer* é crucial para dar início a transcrição de *I17a* (WANG et al., 2012). Nossos resultados de imunoprecipitação confirmaram que em células T_H17, IRF3 forma um complexo com Ror γ t e que a ativação de STING não tem impacto nessa interação física. Sabe-se que a fosforilação de IRF3 é essencial para sua atividade transcricional no núcleo, onde forma complexos com os coativadores CBP/p300 para promover a transcrição de genes alvos (CHEN et al., 2008). Nesse sentido, observamos que após ativação de STING, a forma ativa/fosforilada de IRF3 estava quase que exclusivamente presente na fração nuclear de células T_H17, que curiosamente coincide com os altos níveis de expressão de Ror γ t no mesmo compartimento celular. Em corroboração, a deficiência de STING aboliu a localização de fosfo-IRF3 nuclear, indicando a importância de STING nesse processo.

Vale ressaltar que observamos níveis basais de IRF3 inativo no núcleo de células T_H17 células. De fato, IRF3 está presente no citoplasma na sua forma monomérica em um estado inibitório, porém, devido a presença constitutiva de sinais de localização e exportação nuclear, IRF3 mesmo inativo consegue transitar entre ambos compartimentos. Contudo, apenas a forma ativa desempenha atividade transcricional (KUMAR et al., 2000; ZHU et al., 2015). Nossos experimentos com ensaio de CHIP confirmaram que a ativação de STING em células T_H17 limita a ligação de Ror γ t à região CNS2 do gene *I17a*, cujo achado é corroborado por estudo prévio

(YSEBRANT DE LENDONCK et al., 2013). Levando os fatos anteriores em consideração, é possível que somente a forma ativa de IRF3 nuclear seja necessária para inibir a atividade transcricional de Ror γ t sobre a região CNS2 do gene *Il17a* após a ativação de STING. Nossos achados também demonstram que a ativação de STING acompanha redução na expressão de *Il23r*, um outro alvo de Ror γ t essencial para o programa patogênico de células T_H17 (CIOFANI et al., 2012; GHORESCHI et al., 2010; XIAO et al., 2014). Entretanto, se a ativação de STING reduz a expressão de *Il23r* por limitar diretamente a ligação de Ror γ t à região promotora de *Il23r* ou por um mecanismo indireto ainda não foi explorado.

O papel intrínseco de STING na biologia de células T é pouco descrito. Evidências demonstram que a sinalização de STING pode induzir efeitos anti-proliferativo e pro-apoptótico em células T submetidas apenas a ativação do TCR *in vitro* (CERBONI et al., 2017; GULEN et al., 2017; LARKIN et al., 2017). Contudo, além do sinal de ativação via TCR, sabe-se que o *milieu* de citocinas tem implicações importantes sobre a sobrevivência, diferenciação e funções das células T. Nesse contexto, a citocina IL-6 que é crucial para geração e função de células T_H17, foi descrita por promover sobrevivência e prevenir morte de células T sem interferir no processo de ativação (ADKINS et al., 1996; AYROLDI et al., 1998). Logo, isso sugere que o efeito pro-apoptótico induzido por STING pode ser contrabalanceado por sinais de sobrevivência induzidos por citocinas em células T de acordo com o contexto em que estão inseridas, especialmente em doenças inflamatórias crônicas. De fato, a contribuição de STING para processos celulares intrínsecos, como morte celular, proliferação, diferenciação, produção de citocinas e metabolismo, parece mudar de acordo com o tipo de célula imune, o que requer estudos adicionais.

Nos últimos anos, STING tem ganhado atenção devido a diversidade de funções biológicas que pode exercer (LI; WILSON; KISS-TOTH, 2017). Atualmente, sabe-se que além de se ligar ao STING endógeno, os CDNs produzidos por células viáveis podem ser transferidos e transportados para ativação de STING em células adjacentes. Ablasser e colegas (2013) foram os primeiros a demonstrar que junções comunicantes, que são canais intercelulares formados por proteínas conexinas, medeiam a transferência de cGAMP para células vizinhas como forma de amplificar a atividade antiviral (ABLASSER et al., 2013b). Além disso, estudo mais recente tem mostrado que células tumorais são capazes de produzir e exportar continuamente

moléculas de cGAMP para o meio extracelular, as quais atuam como sinal de perigo para células imunes do microambiente (CAROZZA et al., 2020).

Recentemente, alguns estudos revelaram que CDNs podem ainda ser importados por células vizinhas ou distantes através de transportadores, como o LRRC8, SLC19A1 e SLC46A2, os quais possuem especificidade diferentes de acordo com a espécie e tipo celular, incluindo células imunes (CORDOVA et al., 2021; LAHEY et al., 2020; LUTEIJN et al., 2019; RITCHIE et al., 2019; ZHOU et al., 2020). Nesse cenário, Concepcion e colegas (2022) demonstraram que o transportador LRRC8C é altamente expresso por células T, nas quais medeia a importação de cGAMP e ativação de STING (CONCEPCION et al., 2022). De modo interessante, a deficiência de LRRC8C em células T promoveu maior eficiência de resposta antiviral mediada por células T contra influenza A, além de causar exacerbação da neuroinflamação autoimune no modelo de EAE. Curiosamente, nestes experimentos os autores demonstraram que células T deficientes de LRRC8C infiltrantes do CNS de animais com EAE apresentavam maior habilidade em produzir IL-17A. Esses dados vão ao encontro da ideia de que o dano tecidual e o processo inflamatório acompanham a liberação e produção de ligantes de STING, os quais podem ser importados por células imunes adjacentes. Uma das limitações do presente estudo é a falta de experimentação *in vivo* para avaliar a função intrínseca de STING em células T_H17 em um contexto de doença. Entretanto, o estudo mencionado anteriormente juntamente aos nossos achados *in vitro*, evidenciam que a ativação de STING em células T (especificamente células T_H17) promove reprogramação para um perfil menos patogênico, com menor potencial em produzir mediadores inflamatórios. Isso foi ainda corroborado por Zhao e colaboradores (2019), os quais mostraram que a deficiência de STING *per se* induziu aumento no infiltrado de células T_H17 no pâncreas, exacerbação da inflamação e indução de fibrose em modelo de pancreatite crônica em camundongos (ZHAO et al., 2019). De modo interessante, o tratamento com anti-IL17A em animais STING KO foi suficiente para reverter os parâmetros clínicos da doença. Isso evidencia o papel da IL-17A no desenvolvimento da pancreatite crônica e que a ativação de STING pode ser uma potencial estratégia terapêutica para a inflamação mediada por células T_H17.

Em uma abordagem translacional, investigamos se a ativação de STING regula o potencial patogênico em células T_H17 humanas. Para isso utilizamos c-di-AM(PS)₂(Rp, Rp), também conhecido como ADU-S100 e MIW815, um análogo de

CDNs naturais resistente a degradação por fosfodiesterases e que, em relação aos CDNs não modificados, possui maior afinidade de ligação e potência para ativar STING tanto de camundongos como de humanos (CORRALES et al., 2015). Nossos resultados demonstraram que a ativação de STING inibe a capacidade de produção de IL-17A em células T_H17 humanas sem alterar a expressão de Ror γ t, além de reduzir os níveis de mRNA de *IL23R*. Isso recapitula os efeitos observados em células murinas. Os efeitos da ativação de STING sobre a expressão de *IL10* em células T_H17 humanas se demonstraram inconclusivos, possivelmente devido a diferenças na dinâmica de diferenciação *in vitro* entre células murinas e humanas. Por exemplo, é provável que o *timepoint* ideal pra avaliação da expressão de *IL10* em células T_H17 humanas seja outro, além disso, é possível também que as condições utilizadas para geração de células T_H17 humanas *in vitro* não sejam ideais para expressão de IL-10. Por outro lado, vimos que c-di-AM(PS)₂(Rp, Rp) promoveu a conversão de células IL-17A⁺ em células T_{reg} Foxp3⁺, sugerindo que STING medeia amplos efeitos imunossupressores em células T_H17, não somente pela conversão em células T produtoras de IL-10, mas também em células T_{reg}. Futuros experimentos poderão auxiliar na descoberta de mecanismos que regulam essa transdiferenciação.

Ensaio pré-clínicos com injeções intratumorais de ADU-S100 demonstraram importante atividade antitumoral por aumentar a ativação de células dendríticas que induzem respostas de células T CD8⁺ antígeno-específicas (CORRALES et al., 2015; SIVICK et al., 2018). A obtenção de resultados promissores levou ADU-S100 a avançar para estudos clínicos. Em estudo de fase I (NCT02675439) com pacientes com tumores sólidos e linfomas avançados/metastáticos, a monoterapia com ADU-S100 foi bem tolerada e não induziu toxicidade, entretanto, demonstrou uma eficácia limitada (MERIC-BERNSTAM et al., 2022). Além disso, um outro ensaio clínico de fase II (NCT03937141) revelou que a combinação de ADU-S100 com o anti-PD1 pembrolizumab (Keytruda) no tratamento de carcinoma de cabeça e pescoço de células escamosas (recorrente ou metastático), também foi bem tolerado, mas não promoveu atividade antitumoral substancial (ZANDBERG et al., 2020), (fonte: www.clinicaltrials.gov). Estes dados evidenciam desafios atrelados ao desenvolvimento e uso clínico de agonistas de STING, cujos efeitos divergentes podem estar associados a heterogeneidade de expressão e papel dicotômico de STING de acordo com o tipo celular. Isso reforça a necessidade de avaliação cautelosa dos efeitos diferenciais da ativação de STING sobre cada população de

células imunes. Nesse aspecto, embora não haja estudos clínicos com agonistas de STING em doenças inflamatórias, tem sido demonstrado que o tratamento sistêmico com CDNs promove respostas terapêuticas em animais com EAE (JOHNSON et al., 2021; LEMOS et al., 2014). Logo, os efeitos da ativação de STING podem ocorrer de forma dependente do estágio e contexto da doença (ex. doenças autoimunes, infecções, tumores e doenças inflamatórias crônicas) e devem ser levados em consideração ao determinar o potencial terapêutico dos agonistas de STING.

Estudos recentes, juntamente aos nossos resultados, sugerem que STING pode desempenhar funções distintas de acordo com o tipo de célula imune. Demonstramos nesse estudo que esta proteína da maquinaria de reconhecimento de DNA citoplasmático funciona como um repressor do programa patogênico de células T_H17, e vimos que há pelo menos dois mecanismos distintos envolvidos nesse processo: a produção de IL-10 via ativação de AhR e inibição da atividade de Ror γ t sobre a transcrição de *I17a*. Investigações futuras utilizando animais *knockout* condicionais e modelos de doenças mediada por células T_H17 são importantes para determinar a extensão e relevância desses achados, além de desvendar mecanismos paralelos envolvidos. Ainda, vimos que a atividade de STING também está inversamente ligada ao perfil inflamatório de células T_H17 humanas, o que abre perspectivas em determinar a associação clínica de STING em pacientes com doenças inflamatórias caracterizadas por respostas T_H17 (ex. esclerose múltipla, artrite reumatoide e psoríase) em diferentes estágios e grau de gravidade da doença.

Portanto, este estudo acrescenta novas perspectivas quanto a versatilidade de STING em regular as respostas imunes, o qual contribuirá para investigação continuada sobre o circuito imunorregulador induzido por STING em células T_H17 e outras subpopulações. Logo, STING pode representar potencial alvo terapêutico para doenças inflamatórias crônicas.

7. Conclusão

Tendo em vista os achados descritos neste trabalho, podemos concluir que STING é capaz de induzir a reprogramação de células T_H17 para um perfil com menor potencial patogênico, sendo sua expressão inversamente associada a patogenicidade destas células. Vale ressaltar que esse fenômeno ocorre de forma independente da sinalização de IFN do tipo I.

Mecanicamente, a ativação de STING em células T_H17 leva a ativação de AhR por um mecanismo ainda desconhecido, cuja atividade transcricional é majoritariamente responsável por induzir a expressão de IL-10. Concomitantemente, a ativação de STING promove diminuição na produção de IL-17A e menor expressão de *Il23r* por meio de um mecanismo alternativo independente de AhR. Nesse cenário, nossos dados demonstram que após ativação de STING, o fator de transcrição IRF3 é ativado, o qual é capaz de interagir fisicamente com Ror γ t. Deste modo, a ativação de STING limita a ligação de Ror γ t à região *enhancer* CNS2 do gene *Il17a*, culminando em reduzida expressão de IL-17A. De modo interessante, a ativação de STING em células T_H17 humanas recapitula os efeitos observados em células murinas (**Figura 27**).

Nossos dados implicam que STING possui um papel intrínseco em limitar o estado patogênico de células T_H17 , sugerindo que STING pode ser um importante alvo farmacológico para doenças inflamatórias, cuja patogênese envolva respostas mediadas por células T_H17 .

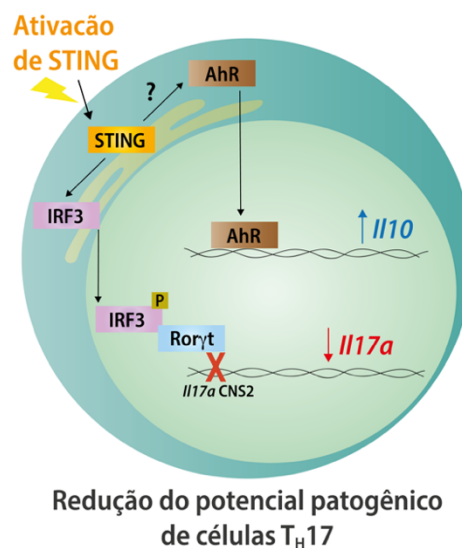


Figura 27. Representação esquemática dos mecanismos pelos quais STING regula a patogenicidade de células T_H17 . A ativação de STING induz a produção de IL-10 de modo parcialmente dependente da atividade de AhR em células T_H17 . Em paralelo, STING é capaz de reduzir a atividade transcricional de Ror γ t sobre a região CNS2 do gene *Il17a*, culminando em menor produção desta citocina.

Referências

ABBAS, Abul K.; MURPHY, Kenneth M.; SHER, Alan. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, [S. l.], v. 383, n. 6603, p. 787–793, 1996. DOI: 10.1038/383787a0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/383787a0>.

ABE, Takayuki; BARBER, Glen N. Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- κ B Activation through TBK1. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 5328–5341, 2014. DOI: 10.1128/JVI.00037-14. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00037-14>.

ABE, Takayuki; HARASHIMA, Ai; XIA, Tianli; KONNO, Hiroyasu; KONNO, Keiko; MORALES, Alejo; AHN, Jeonghyun; GUTMAN, Delia; BARBER, Glen N. STING Recognition of Cytoplasmic DNA Instigates Cellular Defense. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 5–15, 2013. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.01.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>.

ABLASSER, Andrea; GOLDECK, Marion; CAVLAR, Taner; DEIMLING, Tobias; WITTE, Gregor; RÖHL, Ingo; HOPFNER, Karl Peter; LUDWIG, Janos; HORNING, Veit. CGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. **Nature**, [S. l.], v. 498, n. 7454, p. 380–384, 2013. a. DOI: 10.1038/nature12306.

ABLASSER, Andrea; SCHMID-BURGK, Jonathan L.; HEMMERLING, Inga; HORVATH, Gabor L.; SCHMIDT, Tobias; LATZ, Eicke; HORNING, Veit. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. **Nature**, [S. l.], v. 503, n. 7477, p. 530–534, 2013. b. DOI: 10.1038/nature12640. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12640>.

ADKINS, B.; CHUN, K.; HAMILTON, K.; NASSIRI, M. Naive murine neonatal T cells undergo apoptosis in response to primary stimulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 157, n. 4, p. 1343–9, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8759713>.

AHN, Jeonghyun; SON, Sehee; OLIVEIRA, Sergio C.; BARBER, Glen N. STING-Dependent Signaling Underlies IL-10 Controlled Inflammatory Colitis. **Cell Reports**, [S. l.], v. 21, n. 13, p. 3873–3884, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.101. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.101>.

AN, Jie; DURCAN, Laura; KARR, Reynold M.; BRIGGS, Tracy A.; RICE, Gillian I.; TEAL, Thomas H.; WOODWARD, Joshua J.; ELKON, Keith B. Expression of Cyclic GMP-AMP Synthase in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 800–807, 2017. DOI: 10.1002/art.40002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40002>.

ANASTASIOU, Marina et al. Endothelial STING controls T cell transmigration in an IFN γ -dependent manner. **JCI Insight**, [S. l.], v. 6, n. 15, 2021. DOI:

10.1172/jci.insight.149346.

APETOH, Lionel et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 854–861, 2010. DOI: 10.1038/ni.1912.

AYROLDI, Emira; ZOLLO, Ornella; CANNARILE, Lorenza; D' ADAMIO, Francesca; GROHMANN, Ursula; DELFINO, Domenico V.; RICCARDI, Carlo. Interleukin-6 (IL-6) Prevents Activation-Induced Cell Death: IL-2–Independent Inhibition of Fas/fasL Expression and Cell Death. **Blood**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 4212–4219, 1998. DOI: 10.1182/blood.v92.11.4212. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V92.11.4212>.

BETTELLI, Estelle; CARRIER, Yijun; GAO, Wenda; KORN, Thomas; STROM, Terry B.; OUKKA, Mohamed; WEINER, Howard L.; KUCHROO, Vijay K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, [S. l.], v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006. DOI: 10.1038/nature04753. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04753>.

BHAUMIK, Suniti; BASU, Rajatava. Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, n. MAR, p. 1–20, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00254.

BIRMPILI, Dafni; CHARMARKE ASKAR, Imane; BIGAUT, Kévin; BAGNARD, Dominique. The Translatability of Multiple Sclerosis Animal Models for Biomarkers Discovery and Their Clinical Use. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 19, 2022. DOI: 10.3390/ijms231911532.

BLASCHITZ, Christoph; RAFFATELLU, Manuela. Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier. **Journal of Clinical Immunology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 196–203, 2010. DOI: 10.1007/s10875-010-9368-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-010-9368-7>.

BRAUN, Michel Y. The Natural History of T Cell Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 13, p. 6779, 2021. DOI: 10.3390/ijms22136779. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6779>.

BRUBAKER, Sky W.; BONHAM, Kevin S.; ZANONI, Ivan; KAGAN, Jonathan C. **Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective**. [s.l.: s.n.]. v. 33 DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>.

BURDETTE, Dara L.; MONROE, Kathryn M.; SOTELO-TROHA, Katia; IWIG, Jeff S.; ECKERT, Barbara; HYODO, Mamoru; HAYAKAWA, Yoshihiro; VANCE, Russell E. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. **Nature**, [S. l.], v. 478, n.

7370, p. 515–518, 2011. DOI: 10.1038/nature10429. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10429>.

CANESSO, M. C. C. et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. **Mucosal Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 820–834, 2018. DOI: 10.1038/mi.2017.88. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mi.2017.88>.

CAROZZA, Jacqueline A. et al. Extracellular cGAMP is a cancer-cell-produced immunotransmitter involved in radiation-induced anticancer immunity. **Nature Cancer**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 184–196, 2020. DOI: 10.1038/s43018-020-0028-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s43018-020-0028-4>.

CATALÁN, Diego; MANSILLA, Miguel Andrés; FERRIER, Ashley; SOTO, Lilian; OLEINIK, Kristine; AGUILLÓN, Juan Carlos; ARAVENA, Octavio. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, n. April, p. 1–30, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.611795.

CERBONI, Silvia et al. Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 214, n. 6, p. 1769–1785, 2017. DOI: 10.1084/jem.20161674. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/214/6/1769/42368/Intrinsic-antiproliferative-activity-of-the-innate>.

CHANG, Elmer Y.; GUO, Beichu; DOYLE, Sean E.; CHENG, Genhong. Cutting Edge: Involvement of the Type I IFN Production and Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Production. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 178, n. 11, p. 6705–6709, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.6705.

CHANG, John T.; WHERRY, E. John; GOLDRATH, Ananda W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 1104–1115, 2014. DOI: 10.1038/ni.3031. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ni.3031>.

CHEN, Kun; LIU, Juan; CAO, Xuetao. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, [S. l.], v. 83, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.03.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.008>.

CHEN, Qi; SUN, Lijun; CHEN, Zhijian J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1142–1149, 2016. DOI: 10.1038/ni.3558.

CHEN, Weijun; SRINATH, Hema; LAM, Suvana S.; SCHIFFER, Celia A.; ROYER, William E.; LIN, Kai. Contribution of Ser386 and Ser396 to Activation of Interferon Regulatory Factor 3. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 379, n. 2, p. 251–260,

2008. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.03.050.

CHOU, Wei Chun et al. AIM2 in regulatory T cells restrains autoimmune diseases. **Nature**, [S. l.], v. 591, n. 7849, p. 300–305, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03231-w.

CIOFANI, Maria et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. **Cell**, [S. l.], v. 151, n. 2, p. 289–303, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.09.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.016>.

CONCEPCION, Axel R. et al. The volume-regulated anion channel LRRC8C suppresses T cell function by regulating cyclic dinucleotide transport and STING–p53 signaling. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 287–302, 2022. DOI: 10.1038/s41590-021-01105-x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35105987>.

CORDOVA, Anthony F.; RITCHIE, Christopher; BÖHNERT, Volker; LI, Lingyin. Human SLC46A2 Is the Dominant cGAMP Importer in Extracellular cGAMP-Sensing Macrophages and Monocytes. **ACS Central Science**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 1073–1088, 2021. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00440.

CORRALES, Leticia et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. **Cell Reports**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1018–1030, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.04.031. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.031>.

COSTA, Frederico R. C. et al. NLRP1 acts as a negative regulator of Th17 cell programming in mice and humans with autoimmune diabetes. **Cell Reports**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 109176, 2021. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109176. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124721005210>.

CROW, Mary K. Type I Interferon in the Pathogenesis of Lupus. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 192, n. 12, p. 5459–5468, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1002795. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/192/12/5459/92567/Type-I-Interferon-in-the-Pathogenesis-of-Lupus>.

CROW, Yanick J.; STETSON, Daniel B. The type I interferonopathies: 10 years on. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 471–483, 2022. DOI: 10.1038/s41577-021-00633-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-021-00633-9>.

CUA, Daniel J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, [S. l.], v. 421, n. 6924, p. 744–748, 2003. DOI: 10.1038/nature01355. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01355>.

DANILCHANKA, Olga; MEKALANOS, John J. Cyclic Dinucleotides and the Innate Immune Response. **Cell**, [S. l.], v. 154, n. 5, p. 962–970, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.014>.

DAVARINOS, Nikos A.; POLLENZ, Richard S. Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosolic Proteasome following Nuclear Export. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 274, n. 40, p. 28708–28715, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28708. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.274.40.28708>.

DOBBS, Nicole; BURNAEVSKIY, Nikolay; CHEN, Didi; GONUGUNTA, Vijay K.; ALTO, Neal M.; YAN, Nan. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. **Cell Host and Microbe**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 157–168, 2015. DOI: 10.1016/j.chom.2015.07.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.001>.

DOWNS-CANNER, Stephanie; BERKEY, Sara; DELGOFFE, Greg M.; EDWARDS, Robert P.; CURIEL, Tyler; ODUNSI, Kunle; BARTLETT, David L.; OBERMAJER, Nataša. Suppressive IL-17A⁺Foxp3⁺ and ex-Th17 IL-17A^{neg}Foxp3⁺ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, p. 14649, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14649. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms14649>.

DUNPHY, Gillian et al. Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 71, n. 5, p. 745–760.e5, 2018. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.07.034. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276518306038>.

DURANT, Lydia et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. **Immunity**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 605–615, 2010. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.003>.

EL-BEHI, Mohamed; CIRIC, Bogoljub; DAI, Hong; YAN, Yaping; CULLIMORE, Melissa; SAFAVI, Farinaz; ZHANG, Guang-Xian; DITTEL, Bonnie N.; ROSTAMI, Abdolmohamad. The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 568–575, 2011. DOI: 10.1038/ni.2031. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2031>.

FERNANDEZ-SALGUERO, Pedro et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. **Science**, [S. l.], v. 268, n. 5211, p. 722–726, 1995. DOI: 10.1126/science.7732381. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.7732381>.

FITZGERALD, Katherine A.; KAGAN, Jonathan C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. **Cell**, [S. l.], v. 180, n. 6, p. 1044–1066, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.041. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>.

GAGLIANI, Nicola et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. **Nature**, [S. l.], v. 523, n. 7559, p. 221–225, 2015. DOI: 10.1038/nature14452. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature14452>.

GAUBLOMME, Jellert T. et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. **Cell**, [S. l.], v. 163, n. 6, p. 1400–1412, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.009>.

GHORESCHI, Kamran et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. **Nature**, [S. l.], v. 467, n. 7318, p. 967–971, 2010. DOI: 10.1038/nature09447. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature09447>.

GUI, Xiang; YANG, Hui; LI, Tuo; TAN, Xiaojun; SHI, Peiqing; LI, Minghao; DU, Fenghe; CHEN, Zhijian J. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. **Nature**, [S. l.], v. 567, n. 7747, p. 262–266, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1006-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1006-9>.

GULEN, Muhammet F.; KOCH, Ute; HAAG, Simone M.; SCHULER, Fabian; APETOH, Lionel; VILLUNGER, Andreas; RADTKE, Freddy; ABLASSER, Andrea. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-00573-w. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00573-w>.

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Cristina; QUINTANA, Francisco J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Immunity**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 19–33, 2018. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.12.012.

HAAG, Simone M. et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. **Nature**, [S. l.], v. 559, n. 7713, p. 269–273, 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0287-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0287-8>.

HARBOUR, Stacey N.; MAYNARD, Craig L.; ZINDL, Carlene L.; SCHOEB, Trenton R.; WEAVER, Casey T. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 112, n. 22, p. 7061–7066, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1415675112.

HEINEMANN, Christina et al. IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1. **Nature Communications**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 3770, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4770. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/ncomms4770>.

HIROTA, Keiji et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 255–263, 2011. DOI: 10.1038/ni.1993. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1993>.

HOPFNER, Karl Peter; HORNING, Veit. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 501–521, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0244-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0244-x>.

HOWIE, Duncan et al. Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. **JCI Insight**, [S. l.], v. 2, n. 3, 2017. DOI: 10.1172/jci.insight.89160.

HUANG, Yi He; LIU, Xiang Yu; DU, Xiao Xia; JIANG, Zheng Fan; SU, Xiao Dong. The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING. **Nature Structural and Molecular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 728–730, 2012. DOI: 10.1038/nsmb.2333.

HUBER, Samuel et al. Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3- and Foxp3+ Regulatory CD4+ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. **Immunity**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 554–565, 2011. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.01.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.020>.

IMANISHI, Takayuki et al. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. **Nature Communications**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 3566, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4566. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms4566>.

ISHII, Ken J. et al. A toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 40–48, 2006. DOI: 10.1038/ni1282.

ISHIKAWA, Hiroki; BARBER, Glen N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, [S. l.], v. 455, n. 7213, p. 674–678, 2008. DOI: 10.1038/nature07317.

ISHIKAWA, Hiroki; MA, Zhe; BARBER, Glen N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, [S. l.], v. 461, n. 7265, p. 788–792, 2009. DOI: 10.1038/nature08476. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08476>.

IVANOV, Ivaylo I.; MCKENZIE, Brent S.; ZHOU, Liang; TADOKORO, Carlos E.; LEPELLEY, Alice; LAFAILLE, Juan J.; CUA, Daniel J.; LITTMAN, Dan R. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-

17+ T Helper Cells. **Cell**, [S. l.], v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.035. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406011056>.

IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 36–49, 2014. DOI: 10.1038/nri3581. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3581>.

JIANG, Li; YAO, Shuyu; HUANG, Su; WRIGHT, Jeffrey; BRACIALE, Thomas J.; SUN, Jie. Type I IFN signaling facilitates the development of IL-10-producing effector CD8 + T cells during murine influenza virus infection. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 46, n. 12, p. 2778–2788, 2016. DOI: 10.1002/eji.201646548. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201646548>.

JOHNSON, Brandon M. et al. STING Agonist Mitigates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Stimulating Type I IFN-Dependent and -Independent Immune-Regulatory Pathways. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 206, n. 9, p. 2015–2028, 2021. DOI: 10.4049/jimmunol.2001317.

JØNSSON, K. L. et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 14391, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14391. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms14391>.

JUNG, Jonathan; ZENG, Hu; HORNG, Tiffany. Metabolism as a guiding force for immunity. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 85–93, 2019. DOI: 10.1038/s41556-018-0217-x.

KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 297, n. 1, p. 5–12, 2020. DOI: 10.1111/imr.12912. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12912>.

KAUL, Arvind; GORDON, Caroline; CROW, Mary K.; TOUMA, Zahi; UROWITZ, Murray B.; VAN VOLLENHOVEN, Ronald; RUIZ-IRASTORZA, Guillermo; HUGHES, Graham. Systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 2, n. June, p. 1–22, 2016. DOI: 10.1038/nrdp.2016.39. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.39>.

KUMAR, K. Prasanna; MCBRIDE, Kevin M.; WEAVER, Brian K.; DINGWALL, Colin; REICH, Nancy C. Regulated Nuclear-Cytoplasmic Localization of Interferon Regulatory Factor 3, a Subunit of Double-Stranded RNA-Activated Factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 4159–4168, 2000. DOI: 10.1128/mcb.20.11.4159-4168.2000.

KUMARI, Puja; RUSSO, Ashley J.; SHIVCHARAN, Sonia; RATHINAM, Vijay A. AIM2

in health and disease: Inflammasome and beyond. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 297, n. 1, p. 83–95, 2020. DOI: 10.1111/imr.12903. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12903>.

KUWABARA, Taku; ISHIKAWA, Fumio; KONDO, Motonari; KAKIUCHI, Terutaka. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2017, p. 3908061, 2017. DOI: 10.1155/2017/3908061. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/3908061/>.

LAHEY, Lauren J. et al. LRRC8A:C/E Heteromeric Channels Are Ubiquitous Transporters of cGAMP. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 578- 591.e5, 2020. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.10.021.

LANGRISH, Claire L.; CHEN, Yi; BLUMENSCHNEIN, Wendy M.; MATTSON, Jeanine; BASHAM, Beth; SEDGWICK, Jonathan D.; MCCLANAHAN, Terrill; KASTELEIN, Robert A.; CUA, Daniel J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005. DOI: 10.1084/jem.20041257. Disponível em: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20041257>.

LARKIN, Bridget; ILYUKHA, Vladimir; SOROKIN, Maxim; BUZDIN, Anton; VANNIER, Edouard; POLTORAK, Alexander. Cutting Edge: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 199, n. 2, p. 397–402, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601999. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/199/2/397/109585/Cutting-Edge-Activation-of-STING-in-T-Cells>.

LEE, Youjin et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 991–999, 2012. DOI: 10.1038/ni.2416. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.2416>.

LEMOIS, Henrique et al. Activation of the STING Adaptor Attenuates Experimental Autoimmune Encephalitis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 192, n. 12, p. 5571–5578, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1303258. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1303258>.

LI, Sirui et al. STING-induced regulatory B cells compromise NK function in cancer immunity. **Nature**, [S. l.], v. 610, n. 7931, p. 373–380, 2022. DOI: 10.1038/s41586-022-05254-3.

LI, Yang; WILSON, Heather L.; KISS-TOTH, Endre. Regulating STING in health and disease. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–21, 2017. DOI: 10.1186/s12950-017-0159-2.

LIU, Dong et al. STING directly activates autophagy to tune the innate immune

response. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 1735–1749, 2019. DOI: 10.1038/s41418-018-0251-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0251-z>.

LIU, Siqi et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. **Science**, [S. l.], v. 347, n. 6227, p. aaa2630–aaa2630, 2015. DOI: 10.1126/science.aaa2630. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aaa2630>.

LIU, Yin et al. Activated STING in a Vascular and Pulmonary Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 371, n. 6, p. 507–518, 2014. DOI: 10.1056/nejmoa1312625.

LUCKHEERAM, Rishi Vishal; ZHOU, Rui; VERMA, Asha Devi; XIA, Bing. CD4+T cells: Differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/925135.

LUKSCH, Hella et al. STING-associated lung disease in mice relies on T cells but not type I interferon. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 144, n. 1, p. 254–266.e8, 2019. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.01.044.

LUTEIJN, Rutger D. et al. SLC19A1 transports immunoreactive cyclic dinucleotides. **Nature**, [S. l.], v. 573, n. 7774, p. 434–438, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1553-0.

MARGOLIS, Shally R.; WILSON, Stephen C.; VANCE, Russell E. Evolutionary Origins of cGAS-STING Signaling. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 38, n. 10, p. 733–743, 2017. DOI: 10.1016/j.it.2017.03.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.03.004>.

MCGEACHY, Mandy J.; BAK-JENSEN, Kristian S.; CHEN, Yi; TATO, Cristina M.; BLUMENSCHHEIN, Wendy; MCCLANAHAN, Terrill; CUA, Daniel J. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 2007. DOI: 10.1038/ni1539. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ni1539>.

MCGEACHY, Mandy J.; CHEN, Yi; TATO, Cristina M.; LAURENCE, Arian; JOYCE-SHAIKH, Barbara; BLUMENSCHHEIN, Wendy M.; MCCLANAHAN, Terrill K.; O'SHEA, John J.; CUA, Daniel J. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 314–324, 2009. DOI: 10.1038/ni.1698. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1698>.

MCGEACHY, Mandy J.; CUA, Daniel J.; GAFFEN, Sarah L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. **Immunity**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 892–906, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>.

MCNAB, Finlay W.; EWBANK, John; HOWES, Ashleigh; MOREIRA-TEIXEIRA, Lucia; MARTIROSYAN, Anna; GHILARDI, Nico; SARAIVA, Margarida; O’GARRA, Anne. Type I IFN Induces IL-10 Production in an IL-27–Independent Manner and Blocks Responsiveness to IFN- γ for Production of IL-12 and Bacterial Killing in Mycobacterium tuberculosis –Infected Macrophages. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 193, n. 7, p. 3600–3612, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1401088. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1401088>.

MERIC-BERNSTAM, Funda et al. Phase I Dose-Escalation Trial of MIW815 (ADU-S100), an Intratumoral STING Agonist, in Patients with Advanced/Metastatic Solid Tumors or Lymphomas. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 677–688, 2022. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1963. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/28/4/677/678101/Phase-I-Dose-Escalation-Trial-of-MIW815-ADU-S100>.

MICHALEK, R. D.; GERRIETS, V. A.; JACOBS, S. R.; MACINTYRE, A. N.; MACIVER, N. J.; MASON, E. F.; SULLIVAN, S. A.; NICHOLS, A. G.; RATHMELL, J. C. Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4⁺ T Cell Subsets. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 186, n. 6, p. 3299–3303, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1003613. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1003613>.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1986.

MUKAI, Kojiro; KONNO, Hiroyasu; AKIBA, Tatsuya; UEMURA, Takefumi; WAGURI, Satoshi; KOBAYASHI, Toshihide; BARBER, Glen N.; ARAI, Hiroyuki; TAGUCHI, Tomohiko. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. **Nature Communications**, [S. l.], v. 7, n. May, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11932.

MUNN, David H.; MELLOR, Andrew L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 137–143, 2013. DOI: 10.1016/j.it.2012.10.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>.

MURIRA, Armstrong; LAMARRE, Alain. Type-I interferon responses: From friend to foe in the battle against chronic viral infection. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 7, n. DEC, p. 1–8, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00609.

NAIR, Rajan P. et al. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 128, n. 7, p. 1653–1661, 2008. DOI: 10.1038/sj.jid.5701255. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701255>.

NAZMI, Arshed; MUKHOPADHYAY, Rupanjan; DUTTA, Kallol; BASU, Anirban. STING mediates neuronal innate immune response following japanese encephalitis virus infection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 2, p. 1–10, 2012. DOI: 10.1038/srep00347.

NEUMANN, Christian et al. Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 211, n. 9, p. 1807–1819, 2014. DOI: 10.1084/jem.20131548. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/211/9/1807/41814/Role-of-Blimp1-in-programing-Th-effector-cells>.

OBERMAJER, Nataša; POPP, Felix C.; SOEDER, Yorick; HAARER, Jan; GEISSLER, Edward K.; SCHLITT, Hans J.; DAHLKE, Marc H. Conversion of Th17 into IL-17A^{neg} Regulatory T Cells: A Novel Mechanism in Prolonged Allograft Survival Promoted by Mesenchymal Stem Cell-Supported Minimized Immunosuppressive Therapy. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 193, n. 10, p. 4988–4999, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1401776. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1401776>.

OMENETTI, Sara et al. The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. **Immunity**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 77–89.e6, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.05.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.004>.

OUYANG, Songying et al. Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclic di-GMP Binding. **Immunity**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1073–1086, 2012. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.019>.

PAPADOPOULOU, Gina; XANTHOU, Georgina. Metabolic rewiring: a new master of Th17 cell plasticity and heterogeneity. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 289, n. 9, p. 2448–2466, 2022. DOI: 10.1111/febs.15853.

PARHAM, Christi et al. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R β 1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 168, n. 11, p. 5699–5708, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.168.11.5699. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/168/11/5699/34227/A-Receptor-for-the-Heterodimeric-Cytokine-IL-23-Is>.

PRADO, Douglas Silva; VERAS, Flavio P.; FERREIRA, Raphael Gomes; DAMASCENO, Luis Eduardo Alves; MELO, Paulo Henrique; ZAMBONI, Dario Simões; CUNHA, Thiago Mattar; CUNHA, Fernando Queiroz; ALVES-FILHO, José Carlos. NLRP12 controls arthritis severity by acting as a checkpoint inhibitor of Th17 cell differentiation. **FASEB Journal**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 10907–10919, 2020. DOI: 10.1096/fj.202000795R.

PRANTNER, Daniel; PERKINS, Darren J.; LAI, Wendy; WILLIAMS, Mark S.; SHARMA, Shruti; FITZGERALD, Katherine A.; VOGEL, Stefanie N. 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic Acid (DMXAA) Activates Stimulator of Interferon Gene (STING)-dependent Innate Immune Pathways and Is Regulated by Mitochondrial Membrane Potential. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 47, p. 39776–39788, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.382986. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.382986>.

QUINTANA, Francisco J.; BASSO, Alexandre S.; IGLESIAS, Antonio H.; KORN, Thomas; FAREZ, Mauricio F.; BETTELLI, Estelle; CACCAMO, Mario; OUKKA, Mohamed; WEINER, Howard L. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, [S. l.], v. 453, n. 7191, p. 65–71, 2008. DOI: 10.1038/nature06880. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature06880>.

RAMGOLAM, Vinod S.; SHA, Yonggang; JIN, Jianping; ZHANG, Xin; MARKOVIC-PLESE, Silva. IFN- β Inhibits Human Th17 Cell Differentiation. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 183, n. 8, p. 5418–5427, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0803227.

RANOVA, Diana Rose E. et al. STING Promotes Homeostasis via Regulation of Cell Proliferation and Chromosomal Stability. **Cancer Research**, [S. l.], v. 79, n. 7, p. 1465–1479, 2019. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1972. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/79/7/1465/641092/STING-Promotes-Homeostasis-via-Regulation-of-Cell>.

REHWINKEL, Jan; GACK, Michaela U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 537–551, 2020. DOI: 10.1038/s41577-020-0288-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>.

RITCHIE, Christopher; CORDOVA, Anthony F.; HESS, Gaelen T.; BASSIK, Michael C.; LI, Lingyin. SLC19A1 Is an Importer of the Immunotransmitter cGAMP. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 75, n. 2, p. 372–381.e5, 2019. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.05.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.006>.

ROOKS, Michelle G.; GARRETT, Wendy S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 341–352, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.42. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.42>.

SAITOH, T. et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 49, p. 20842–20846, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0911267106. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0911267106>.

SARAIVA, Margarida; CHRISTENSEN, Jillian R.; TSYTSYKOVA, Alla V.; GOLDFELD, Anne E.; LEY, Steven C.; KIOUSSIS, Dimitris; O’GARRA, Anne. Identification of a

Macrophage-Specific Chromatin Signature in the IL-10 Locus. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 175, n. 2, p. 1041–1046, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.2.1041.

SAUER, John-Demian et al. The N-Ethyl-N-Nitrosourea-Induced Goldenticket Mouse Mutant Reveals an Essential Function of Sting in the In Vivo Interferon Response to *Listeria monocytogenes* and Cyclic Dinucleotides. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 688–694, 2011. DOI: 10.1128/IAI.00999-10. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00999-10>.

SCHNEIDER, William M.; CHEVILLOTTE, Meike Dittmann; RICE, Charles M. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 32, p. 513–545, 2014. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.

SCHOGGINS, John W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? **Annual Review of Virology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 567–584, 2019. DOI: 10.1146/annurev-virology-092818-015756. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-092818-015756>.

SHANG, Guijun et al. Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. **Nature Structural and Molecular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 725–727, 2012. DOI: 10.1038/nsmb.2332.

SHANG, Guijun; ZHANG, Conggang; CHEN, Zhijian J.; BAI, Xiao-chen; ZHANG, Xuewu. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. **Nature**, [S. l.], v. 567, n. 7748, p. 389–393, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-0998-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-0998-5>.

SHARMA, Shruti et al. Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 112, n. 7, p. E710–E717, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1420217112. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1420217112>.

SIVICK, Kelsey E. et al. Magnitude of Therapeutic STING Activation Determines CD8+ T Cell-Mediated Anti-tumor Immunity. **Cell Reports**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 3074–3085.e5, 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.047. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.047>.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, Fernando; PARLATO, Marianna; DE OLIVEIRA, Rosane B.; GOLENBOCK, Douglas; FITZGERALD, Katherine; SHALOVA, Irina N.; BISWAS, Subhra K.; CAVAILLON, Jean Marc; ADIB-CONQUY, Minou. Interferon- γ and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor production by natural killer cells involves different signaling pathways and the adaptor stimulator of interferon genes (STING). **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 15, p. 10715–10721, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.435602. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.435602>.

STADHOUDERS, Ralph; LUBBERTS, Erik; HENDRIKS, Rudi W. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, [S. l.], v. 87, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.12.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.007>.

STANIFER, Megan L.; PERVOLARAKI, Kalliopi; BOULANT, Steeve. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1445, 2019. DOI: 10.3390/ijms20061445. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1445>.

STARK, George R.; DARNELL, James E. The JAK-STAT Pathway at Twenty. **Immunity**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 503–514, 2012. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013>.

STETSON, Daniel B.; MEDZHITOV, Ruslan. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. **Immunity**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 93–103, 2006. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.12.003.

STORCH, E.; KIRCHNER, H.; BREHM, G.; HULLER, K.; MARCUCCI, F. Production of Interferon-beta by Murine T-Cell Lines Induced by 10-Carboxymethyl-9-Acridanone. **Scandinavian Journal of Immunology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 195–199, 1986. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1986.tb01958.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.1986.tb01958.x>.

STRITESKY, Gretta L.; YEH, Norman; KAPLAN, Mark H. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 181, n. 9, p. 5948–5955, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.181.9.5948. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/181/9/5948/78909/IL-23-Promotes-Maintenance-but-Not-Commitment-to>.

SUN, Lijun; WU, Jiayi; DU, Fenghe; CHEN, Xiang; CHEN, Zhijian J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. **Science**, [S. l.], v. 339, n. 6121, p. 786–791, 2013. DOI: 10.1126/science.1232458. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1232458>.

SUN, Wenxiang et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 21, p. 8653–8658, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0900850106. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0900850106>.

TAN, Xiaojun; SUN, Lijun; CHEN, Jueqi; CHEN, Zhijian J. Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 447–478, 2018. DOI: 10.1146/annurev-micro-102215-095605. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev->

micro-102215-095605.

TANAKA, Yasuo; CHEN, Zhijian J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. **Science Signaling**, [S. l.], v. 5, n. 214, p. ra20–ra20, 2012. DOI: 10.1126/scisignal.2002521. Disponível em: <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2002521>.

UNTERHOLZNER, Leonie et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 997–1004, 2010. DOI: 10.1038/ni.1932.

VELDHOEN, Marc; HIROTA, Keiji; WESTENDORF, Astrid M.; BUER, Jan; DUMOUTIER, Laure; RENAULD, Jean-Christophe; STOCKINGER, Brigitta. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, [S. l.], v. 453, n. 7191, p. 106–109, 2008. DOI: 10.1038/nature06881. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature06881>.

WAGNER, Allon et al. Metabolic modeling of single Th17 cells reveals regulators of autoimmunity. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 16, p. 4168–4185.e21, 2021. DOI: 10.1016/j.cell.2021.05.045. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.045>.

WALKER, Melissa M.; CRUTE, Bergren W.; CAMBIER, John C.; GETAHUN, Andrew. B Cell–Intrinsic STING Signaling Triggers Cell Activation, Synergizes with B Cell Receptor Signals, and Promotes Antibody Responses. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 201, n. 9, p. 2641–2653, 2018. DOI: 10.4049/jimmunol.1701405.

WANG, Chao et al. CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. **Cell**, [S. l.], v. 163, n. 6, p. 1413–1427, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.068. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.068>.

WANG, Xiaohu et al. Transcription of Il17 and Il17f Is Controlled by Conserved Noncoding Sequence 2. **Immunity**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 23–31, 2012. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.10.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.019>.

WARNER, James D. et al. STING-associated vasculopathy develops independently of IRF3 in mice. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 214, n. 11, p. 3279–3292, 2017. DOI: 10.1084/jem.20171351.

WEST, A. Phillip et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. **Nature**, [S. l.], v. 520, n. 7548, p. 553–557, 2015. DOI: 10.1038/nature14156. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature14156>.

WU, Jiayi; CHEN, Zhijian J. Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 461–488, 2014. DOI:

10.1146/annurev-immunol-032713-120156. Disponível em:
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120156>.

WU, X.; TIAN, J.; WANG, S. Insight into non-pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–8, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01112.

XIAO, Sheng et al. Small-molecule ROR γ t antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms. **Immunity**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 477–489, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.04.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.004>.

XU, Jiangnan; YANG, Yu; QIU, Guixing; LAL, Girdhari; WU, Zhihong; LEVY, David E.; OCHANDO, Jordi C.; BROMBERG, Jonathan S.; DING, Yaozhong. c-Maf Regulates IL-10 Expression during Th17 Polarization. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 182, n. 10, p. 6226–6236, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0900123.

YAMASHIRO, Livia H. et al. Interferon-independent STING signaling promotes resistance to HSV-1 in vivo. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 3382, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-17156-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17156-x>.

YANG, Li; ANDERSON, David E.; BAECHEER-ALLAN, Clare; HASTINGS, William D.; BETTELLI, Estelle; OUKKA, Mohamed; KUCHROO, Vijay K.; HAFLER, David A. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T H17 cells. **Nature**, [S. l.], v. 454, n. 7202, p. 350–352, 2008. a. DOI: 10.1038/nature07021.

YANG, Xuexian O. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **Immunity**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 29–39, 2008. b. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.11.016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761307005754>.

YANG, Xuexian O.; PANOPOULOS, Athanasia D.; NURIEVA, Roza; CHANG, Seon Hee; WANG, Demin; WATOWICH, Stephanie S.; DONG, Chen. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 2007. DOI: 10.1074/jbc.C600321200. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.C600321200>.

YASUDA, Keiko; TAKEUCHI, Yusuke; HIROTA, Keiji. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 283–297, 2019. DOI: 10.1007/s00281-019-00733-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-019-00733-8>.

YEN, David et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 116, n. 5, p. 1310–1316, 2006. DOI: 10.1172/JCI21404. Disponível em:

<http://www.jci.org/articles/view/21404>.

YOSEF, Nir et al. Dynamic regulatory network controlling TH 17 cell differentiation. **Nature**, [S. l.], v. 496, n. 7446, p. 461–468, 2013. DOI: 10.1038/nature11981. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11981>.

YSEBRANT DE LENDONCK, Laure et al. Interferon regulatory factor 3 controls interleukin-17 expression in CD8 T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 110, n. 34, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1219221110. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1219221110>.

ZANDBERG, D. P. et al. 71P A phase II study of ADU-S100 in combination with pembrolizumab in adult patients with PD-L1+ recurrent or metastatic HNSCC: Preliminary safety, efficacy and PK/PD results. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 31, n. Imdc, p. S1446–S1447, 2020. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.10.559. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.10.559>.

ZHANG, Conggang; SHANG, Guijun; GUI, Xiang; ZHANG, Xuewu; BAI, Xiao-chen; CHEN, Zhijian J. Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. **Nature**, [S. l.], v. 567, n. 7748, p. 394–398, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1000-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1000-2>.

ZHANG, Fuping; MENG, Guangxun; STROBER, Warren. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1297–1306, 2008. DOI: 10.1038/ni.1663.

ZHANG, Huiyuan; KUCHROO, Vijay. Epigenetic and transcriptional mechanisms for the regulation of IL-10. **Seminars in Immunology**, [S. l.], v. 44, n. July, p. 101324, 2019. DOI: 10.1016/j.smim.2019.101324. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101324>.

ZHANG, Lixia; YUAN, Shunzong; CHENG, Genhong; GUO, Beichu. Type I IFN Promotes IL-10 Production from T Cells to Suppress Th17 Cells and Th17-Associated Autoimmune Inflammation. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. e28432, 2011. a. DOI: 10.1371/journal.pone.0028432. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028432>.

ZHANG, Min; ZOU, Yan; ZHOU, Xujun; ZHOU, Jinming. Inhibitory targeting cGAS-STING-TBK1 axis: Emerging strategies for autoimmune diseases therapy. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 13, n. September, p. 1–26, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.954129.

ZHANG, Xu; SHI, Heping; WU, Jiayi; ZHANG, Xuewu; SUN, Lijun; CHEN, Chuo; CHEN, Zhijian J. Cyclic GMP-AMP containing mixed Phosphodiester linkages is an

endogenous high-affinity ligand for STING. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 226–235, 2013. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.05.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.022>.

ZHANG, Yan; LUO, Xiao-yu; WU, Dong-hai; XU, Yong. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 71–87, 2015. DOI: 10.1038/aps.2014.120. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/aps.2014.120>.

ZHANG, Zhiqiang; YUAN, Bin; BAO, Musheng; LU, Ning; KIM, Taeil; LIU, Yong Jun. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 959–965, 2011. DOI: 10.1038/ni.2091.

ZHAO, Qinglan; MANOHAR, Murli; WEI, Yi; PANDOL, Stephen J.; HABTEZION, Aida. STING signalling protects against chronic pancreatitis by modulating Th17 response. **Gut**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 1827–1837, 2019. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-317098.

ZHONG, Bo et al. The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. **Immunity**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 538–550, 2008. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.003>.

ZHOU, Chun et al. Transfer of cGAMP into Bystander Cells via LRRC8 Volume-Regulated Anion Channels Augments STING-Mediated Interferon Responses and Anti-viral Immunity. **Immunity**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 767–781.e6, 2020. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.016.

ZHU, Mingzhu; FANG, Ting; LI, Shun; MENG, Kun; GUO, Deyin. Bipartite Nuclear Localization Signal Controls Nuclear Import and DNA-Binding Activity of IFN Regulatory Factor 3. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 195, n. 1, p. 289–297, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1500232. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/195/1/289/104497/Bipartite-Nuclear-Localization-Signal-Controls>.

ZHU, Yinhong et al. Oxidative phosphorylation regulates interleukin-10 production in regulatory B cells via the extracellular signal-related kinase pathway. **Immunology**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1111/imm.13554.

Anexos

Anexo 1 – Prêmios recebidos durante o Doutorado

2021. Concessão pela FAPESP de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (nº processo 21/08800-2). Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University, Mainz, Alemanha. Supervisor: Prof. Dr. Tim Sparwasser. Período: Dez/2021 – Nov/2022.

2019. Thereza Kipnis Award (1º lugar), apresentação oral. Prêmio concedido pela Sociedade Brasileira de Imunologia durante o XLIV Congresso da SBI - IMMUNOTHERAPY 2019, Florianópolis, SC.

Anexo 2 – Artigos científicos publicados durante o Doutorado

Veras FP, Publio GA, Melo BM, Prado DS, Norbiato T, Cecilio NT, Hiroki C, **Damasceno LEA**, Jung R, Toller-Kawahisa JE, Martins TV, Assunção SF, Lima D, Alves MG, Vieira GV, Tavares LA, Alves-Rezende ALR, Karbach SH, Nakaya HI, Cunha TM, Souza CS, Cunha FQ, Sales KU, Waisman A, Alves-Filho JC. Pyruvate kinase M2 mediates IL-17 signaling in keratinocytes driving psoriatic skin inflammation. Cell Rep. 2022 Dec 27;41(13):111897.

Damasceno LEA, Cebinelli GCM, Fernandes MF, Nascimento DC, Públio GA, Vinolo MAR, Oliveira SC, Sparwasser T, Cunha TM, Cunha FQ, Alves-Filho JC. STING is an intrinsic checkpoint inhibitor that restrains the T_H17 cell pathogenic program. Cell Rep. 2022 May 24;39(8):110838.

Silva CMS, Wanderley CWS, Veras FP, Gonçalves AV, Lima MHF, Toller-Kawahisa JE, Gomes GF, Nascimento DC, Monteiro VVS, Paiva IM, Almeida CJLR, Caetité DB, Silva JC, Lopes MIF, Bonjorno LP, Giannini MC, Amaral NB, Benatti MN, Santana RC, **Damasceno LEA**, Silva BMS, Schneider AH, Castro IMS, Silva JCS, Vasconcelos AP, Gonçalves TT, Batah SS, Rodrigues TS, Costa VF, Pontelli MC, Martins RB, Martins TV, Espósito DLA, Cebinelli GCM, da Fonseca BAL, Leiria LOS, Cunha LD, Arruda E, Nakaia HI, Fabro AT, Oliveira RDR, Zamboni DS, Louzada-Junior P, Cunha TM, Alves-Filho JCF, Cunha FQ. Gasdermin-D activation by SARS-CoV-2 triggers NET and mediate COVID-19 immunopathology. Crit Care. 2022 Jul 7;26(1):206.

Franchin M, Luiz Rosalen P, da Silva Prado D, César Paraluppi M, Leal Silva R, **Damasceno LEA**, Morelo DFC, Napimoga MH, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Cunha TM. Cinnamoyloxy-mammeisin, a coumarin from propolis of stingless bees, attenuates Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation via STAT3 inhibition. Eur J Pharmacol. 2022 Aug 15;929:175127.

Santos JD, Oliveira-Neto JT, Barros PR, **Damasceno LEA**, Lautherbach N, Assis AP, Silva CAA, Sorgi CA, Faccioli LH, Kettelhut IC, Salgado HC, Carneiro FS, Alves-Filho JC, Tostes RC. Th17 cell-linked mechanisms mediate vascular dysfunction induced by testosterone in a mouse model of gender-affirming hormone therapy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2022 Aug 1;323(2):H322-H335.

Silva CMS, Wanderley CWS, Veras FP, Sonogo F, Nascimento DC, Gonçalves AV, Martins TV, Cólón DF, Borges VF, Brauer VS, **Damasceno LEA**, Silva KP, Toller-Kawahisa JE, Batah SS, Souza ALJ, Monteiro VS, Oliveira AER, Donate PB, Zoppi D, Borges MC, Almeida F, Nakaya HI, Fabro AT, Cunha TM, Alves-Filho JC, Zamboni DS, Cunha FQ. Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation. Blood. 2021 Dec 23;138(25):2702-2713.

Prado DS, **Damasceno LEA**, Sonogo AB, Rosa MH, Martins TV, Fonseca MDM, Cunha TM, Cunha FQ, Alves-Filho JC. Pitavastatin ameliorates autoimmune neuroinflammation by regulating the Treg/Th17 cell balance through inhibition of mevalonate metabolism. Int Immunopharmacol. 2021 Feb;91:107278.

Damasceno LEA, Prado DS, Veras FP, Fonseca MM, Toller-Kawahisa JE, Rosa MH, Públio GA, Martins TV, Ramalho FS, Waisman A, Cunha FQ, Cunha TM, Alves-Filho

JC. PKM2 promotes Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation by fine-tuning STAT3 activation. J Exp Med. 2020 Oct 5;217(10):e20190613.

Prado DS, Veras FP, Ferreira RG, **Damasceno LEA**, Melo PH, Zamboni DS, Cunha TM, Cunha FQ, Alves-Filho JC. NLRP12 controls arthritis severity by acting as a checkpoint inhibitor of Th17 cell differentiation. FASEB J. 2020 Aug;34(8):10907-10919.

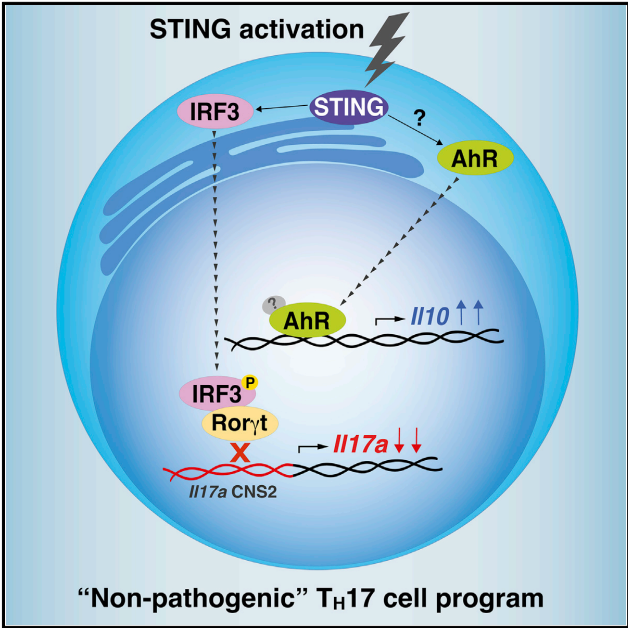
Guimarães RM, Davoli-Ferreira M, Fonseca MM, **Damasceno LEA**, Santa-Cecilia FV, Kusuda R, Menezes GB, Cunha FQ, Alves-Filho JC, Cunha TM. Frontline Science: Blood-circulating leukocytes fail to infiltrate the spinal cord parenchyma after spared nerve injury. J Leukoc Biol. 2019 Sep;106(3):541-551.

Anexo 3 – Artigo publicado relacionado à Tese

Cell Reports

STING is an intrinsic checkpoint inhibitor that restrains the T_H17 cell pathogenic program

Graphical abstract



“Non-pathogenic” T_H17 cell program

Report

Authors

Luis Eduardo Alves Damasceno, Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli, Mariane Font Fernandes, ..., Thiago Mattar Cunha, Fernando Queiroz Cunha, José Carlos Alves-Filho

Correspondence


jcafilho@usp.br

In brief


T_H17 cells display a spectrum of pathogenic states depending on environmental and intrinsic cues. Damasceno et al. demonstrate that STING activation induces a non-pathogenic T_H17 profile. Mechanistically, STING impairs Rorγt-mediated *IL17a* transcription, thereby reducing IL-17A production. Besides that, STING activation promotes IL-10 expression through AhR signaling pathway.

Highlights

- The expression of STING is inversely associated with T_H17 cell pathogenic state
- AhR signaling is involved in the STING-driven IL-10 expression in T_H17 cells
- STING activation impairs Rorγt binding to *IL17a* CNS2 enhancer region



Damasceno et al., 2022, Cell Reports 39, 110838
May 24, 2022 © 2022 The Authors.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110838>



Anexo 4 – Repercução do trabalho na Mídia

Agência FAPESP
NOTÍCIAS AGENDA VÍDEOS ASSINE

Pesquisa identifica proteína intracelular que pode bloquear inflamação nas doenças autoimunes

17 de janeiro de 2023

Luciana Constantino | Agência FAPESP – Pesquisa [publicada](#) na revista *Cell Reports* identificou uma proteína que pode atuar como um sensor de dano tecidual e bloquear a resposta inflamatória desencadeada por um subtipo de linfócito envolvido no desenvolvimento de diferentes doenças autoimunes. A descoberta abre espaço para novos estudos em busca de tratamentos para enfermidades como psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla, nas quais o próprio sistema imunológico ataca células saudáveis.

O trabalho revela o papel da proteína STING (acrônimo em inglês para *STimulator of INterferon Genes*) em linfócitos, particularmente em células T auxiliares do tipo 17 (Th17, na sigla em inglês).

Os cientistas, liderados por um grupo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), demonstraram que a ativação de STING em linfócitos *in vitro* reduz a capacidade dessa célula de causar inflamação e, em contrapartida, ela passa a fabricar uma citocina, a interleucina-10, que tem funções anti-inflamatórias.

A descoberta, liderada por pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pode levar a novos tratamentos para essas enfermidades (imagem: Wikimedia Commons)

ASSISTA AGORA
AO VIVO

Cientistas identificam proteína que pode bloquear inflamação nas doenças autoimunes

Descoberta abre espaço para novos estudos em busca de tratamentos para enfermidades como psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla

FOLHA DE S.PAULO
★ ★ ★




saúde responde ciência equilíbrio cotidiano

Pesquisa identifica proteína intracelular que pode bloquear inflamação em doença autoimune

Estudo pode levar a novos tratamentos para doenças como psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla



Anexo 5 – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
		
<h2>CERTIFICADO</h2>		
<p>Certificamos que o Protocolo intitulado “<i>Importância da via de sinalização de STING na regulação da patogenicidade de células Th17 e sua implicação na autoimunidade</i>”, registrado com o número 095/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao <i>filo Chordata</i>, <i>subfilo Vertebrata</i> (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 29 de julho de 2019.</p>		
<p>Este Protocolo prevê a utilização de 84 camundongos C57Bl 6 machos pesando 22g oriundos do Serviço de Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 78 camundongos Sting fl/fl, 12 camundongos IL-10 KO, 12 camundongos IFNAR KO, 24 camundongos 129 SVEV, 168 camundongos Rag 1 KO, 24 camundongos MAVS KO, todos machos, pesando 22g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 84 camundongos STING KO*, 78 camundongos CD4-Cre Sting fl/fl, 66 camundongos Foxp3 – Cre Sting fl/fl, 66 camundongos Rorc – Cre Sting fl/fl e 78 camundongos Sting fl/fl, todos machos pesando 22g oriundos do Biotério da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/07/2019 a 31/07/2025.</p>		
<hr/> <small>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br</small> <hr/>		



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement



We certify that the Protocol n° 095/2019, entitled “*The role of the STING signaling pathway in the regulation of Th17 cell pathogenicity and its implication for autoimmunity*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/29/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 84 male C57Bl 6 mice weighing 22g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; 12 male IL-10 KO mice, 12 male IFNAR KO mice, 24 male 129 SVEV mice, 168 male Rag 1 KO mice, 24 male MAVS KO mice, all of them weighing 22g from the Breeding Center of Special Mice of Ribeirão Preto Medical School; 84 male STING KO mice, 78 male CD4 – Cre Sting fl/fl mice, 66 male Foxp 3 – Cre Sting fl/fl mice, 66 male Rorc-Cre Sting fl/fl mice and 78 male Sting fl/fl mice, all of them weighing 22g from the Laboratory of Experimental Surgery, of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/31/2025.

Ribeirão Preto, 29 de julho de 2019


Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP