

JULIA CORTINA CAMPOPIANO

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

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

Área de concentração: Imunologia

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

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

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

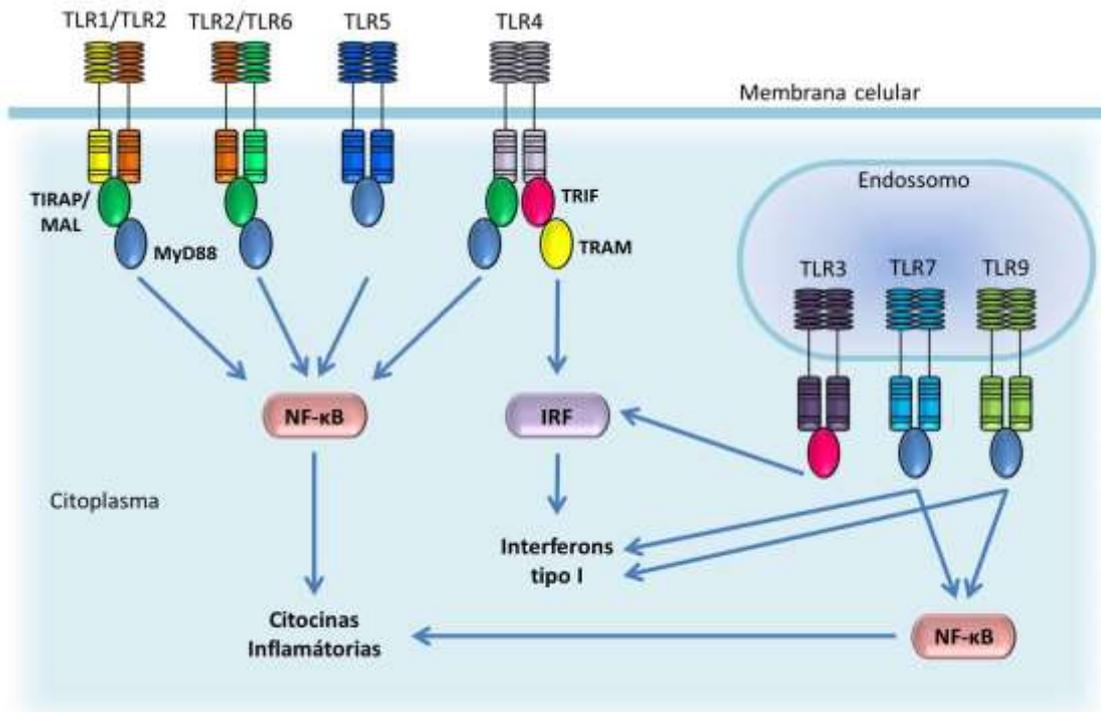


Figura 1. Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll (TLRs).

1.4 Subpopulações de linfócitos T CD4⁺

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

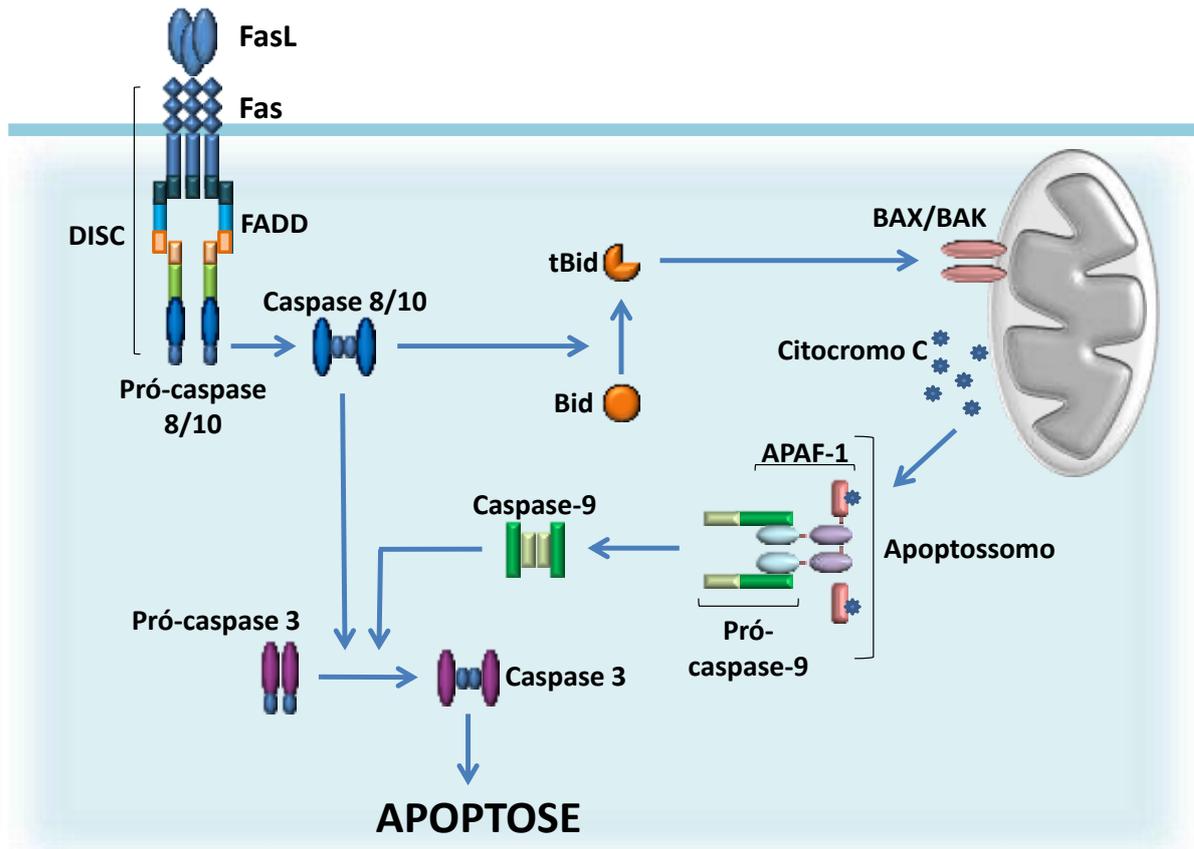


Figura 2: Via extrínseca de apoptose e sua amplificação mitocondrial.

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

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

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

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

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

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

1.6 Prostaglandina E₂

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

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

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

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

As funções biológicas da PGE₂ abrangem efeitos nos sistemas reprodutivo, gastrointestinal, cardiovascular, nervoso e imunológico. A PGE₂ geralmente atua como um importante mediador pró-inflamatório envolvido na indução de todos os sinais cardinais da inflamação: edema, calor, vermelhidão e dor. Isso é produzido como resultado de sua ação no aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo no tecido inflamado, hiperalgesia e ação nos neurônios sensoriais periféricos dentro da área afetada (122, 123). Sua influência no sistema imune é complexa, tendo ação em vários tipos celulares, como macrófagos, DCs, linfócitos B e T, causando efeitos tanto anti, quanto pró-inflamatórios.

Para se explicar a grande diversidade de efeitos que a PGE₂ desempenha, diversos fatores devem ser considerados. Dentre eles, a sua concentração no microambiente, o tecido alvo de sua ação, o estado de diferenciação da célula alvo e principalmente o receptor pelo qual ela será reconhecida. A PGE₂ se liga a quatro receptores específicos, chamados EP (EP1-4), sendo que existe heterogeneidade quanto às proteínas G acopladas a estes receptores (124, 125).

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

108. Lee MO, Kang HJ, Kim YM, Oum JH, Park J. Repression of FasL expression by retinoic acid involves a novel mechanism of inhibition of transactivation function of the nuclear factors of activated T-cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002;269(4):1162-70.
109. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(2):231-9.
110. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(3):862-77.
111. Campopiano JC. Influência da ativação de macrófagos via receptores do tipo Toll (TLRs) na produção de fatores moduladores da sobrevivência de linfócitos T [Dissertação (Mestrado em ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2010.
112. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998;12(12):1063-73.
113. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*. 2002;23(3):144-50.
114. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S423-8.
115. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(21):13926-31.
116. Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005;315(1):1-7.
117. Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammarstrom S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annual review of biochemistry*. 1978;47:997-1029.
118. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:145-82.
119. Radmark O, Samuelsson B. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and 5-lipoxygenase: potential drug targets in cancer. *Journal of internal medicine*. 2001;250(1):5-14.
120. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacological reviews*. 2007;59(3):207-24.
121. Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(3):114-7.
122. Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Japanese journal of pharmacology*. 2000;83(4):279-85.

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

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

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

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

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