

JÚLIA MIRANDA RIBEIRO BAZZANO

**O PAPEL DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NA PLASTICIDADE DE CÉLULAS**

**Th17/Th1**

Araraquara

2016

JÚLIA MIRANDA RIBEIRO BAZZANO

**O PAPEL DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> NA PLASTICIDADE DE CÉLULAS**

**Th17/Th1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara

2016

*Dedico este trabalho aos meus pais por todo carinho e por sempre estarem ao meu lado, suportando minhas decisões.*

## **AGRADECIMENTOS**

Àos meus pais, pelo carinho, apoio e por estarem sempre presentes em minha vida.

À professora Alexandra Ivo de Medeiros, por me acolher em seu grupo de pesquisas, por toda orientação e dedicação não apenas a esse trabalho, mas também ao meu crescimento como aluna e pesquisadora.

Aos meus amigos do laboratório, Naiara Dejani e Victória Niño, pelos ensinamentos diários, ideias e discussões que contribuíram para o crescimento do projeto. Ana Carolina Salina, Amanda Correa, Allan Oralndo, Letícia Penteado, Ana Codo, Bruna Aguiar e Flávio Monteiro, pelo auxílio em experimentos e discussões de resultados. À Valéria Mallavolta, técnica do laboratório, pelo apoio com a rotina do laboratório e biotério. Ainda, agradeço, não somente pelo apoio na rotina de trabalho, mas pela amizade, companheirismo, conversas e momentos de risada, os quais foram essenciais em momentos de dificuldade.

À República ÉterNaMente, por terem sido minha família em Araraquara, e me ensinado o que é ter irmãs, sem vocês teria sido impossível esses seis anos de faculdade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio institucional.

À FAPESP (2011/17611-7, 2014/04961-8, 2016/01978-2) pelo apoio financeiro.

E por fim, as professoras de ciências do Colégio Progresso Campineiro, Janine Bandeira e Maria Aparecida Donangelo e professores do Curso de Bioquímica da Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado”, que me despertaram o interesse pela área da Biologia/Saúde, e proporcionaram as bases para minha graduação.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferenciação de Linfócitos TCD4 naive .....	10
Figura 2 – Modificações epigenéticas modulam a plasticidade entre linfócitos Th17 e Th1 ..	12
Figura 3 - Síntese de PGE2 e vias de sinalização.....	14
Figura 4 – Hipótese do trabalho .....	17
Figura 5 - Delineamento experimental referente ao “Experimento I”.....	20
Figura 6- Delineamento experimental referente ao “Experimento II” .....	22
Figura 7 - Confirmação da diferenciação de linfócitos Th17 após 3 e 6 dias .....	23
Figura 8 - Plasticidade dos linfócitos Th17, em condição polarizante para Th1, na presença ou ausência de PGE <sub>2</sub> , durante 18 dias de cultura. ....	25
Figura 9 - Confirmação da diferenciação de linfócitos Th17 após 4 dias de cultura .....	27
Figura 10- Plasticidade dos linfócitos Th17 purificados, em condição polarizante para Th1 na presença ou ausência de PGE <sub>2</sub> , durante 19 dias de cultura .....	28
Figura 11- Produção de IL-17A em diferentes condições experimentais .....	29
Figura 12 - Razão entre a produção de IFN- $\gamma$ e IL-17A.....	30

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>AA</b>	Ácido Araruidnico
<b>AC</b>	Adenilato Ciclase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>cAMP</b>	Adenosina Monofosfato Cíclica
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EP Receptor</b>	Receptor de Prostanide E
<b>EPAC</b>	<i>Exchange Protein directly activated by cAMP</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IFN-<math>\gamma</math>R1</b>	Receptor de IFN- $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-12R<math>\beta</math>2</b>	Receptor de IL-12
<b>MHC</b>	Complexo de Histocompatibilidade
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PKA</b>	Proteína Quinase A
<b>PLC</b>	Fosfolipase-C
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>STAT</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<b>TCR</b>	Receptor de Células T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>Th</b>	Célula T <i>helper</i>
<b>Treg</b>	Célula T reguladora

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. Diferenciação de Linfócitos T .....	9
1.2. Plasticidade de Linfócitos T .....	11
1.3. Prostaglandina E <sub>2</sub> : Receptores e Vias de Sinalização .....	12
1.4. PGE <sub>2</sub> : Influência na Resposta Imune Adaptativa e na Plasticidade de Linfócitos T .....	15
1.5. Hipótese .....	17
2. OBJETIVO .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Animais .....	17
3.2. Obtenção de células T <i>naive</i> .....	18
3.3. Ensaio de diferenciação de células T .....	18
3.3.1. Experimento I .....	18
3.3.2. Experimento II .....	18
3.4. Ensaio de Plasticidade .....	21
3.5. <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA) .....	21
4. RESULTADOS .....	23
4.1. Ensaio de Plasticidade – Experimento I .....	23
4.2. Ensaio de Plasticidade – Experimento II .....	26
4.2.1. Cinética da produção de IL-17A e IFN- $\gamma$ durante ensaio de plasticidade de linfócitos Th17/Th1 .....	29
4.2.2. Razão entre a produção de IFN- $\gamma$ e IL-17A durante o ensaio de plasticidade, para as diversas condições experimentais .....	30
5. DISCUSSÃO .....	31
6. CONCLUSÃO .....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## Resumo

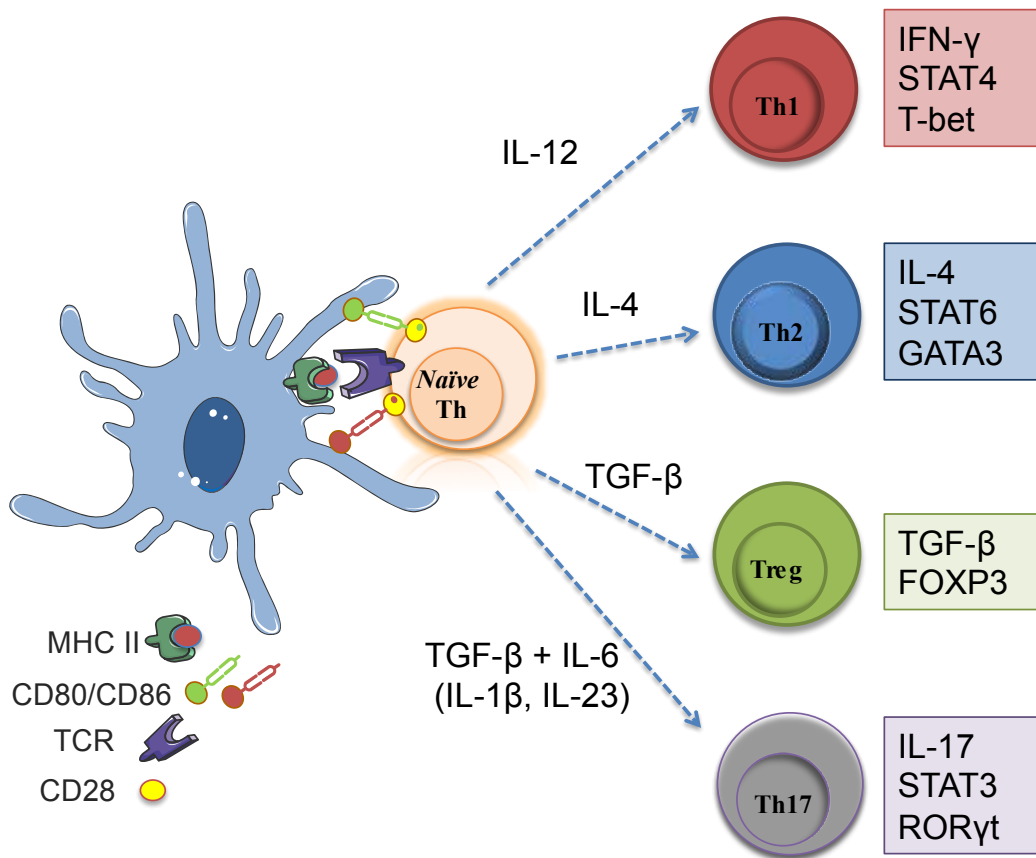
A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um dos principais mediadores envolvidos na diferenciação e/ou expansão de linfócitos T *helper* (Th) Th1 e Th17 em modelos de autoimunidade e doenças inflamatórias crônicas, como em encefalomielite autoimune experimental (EAE) e modelos experimentais de colite. A coexistência de linfócitos Th1 e Th17, assim como a presença de células Th17 produtoras de IFN- $\gamma$  sugerem a possível plasticidade destas subpopulações de linfócitos em modelos de desordens inflamatórias. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura se a presença de PGE<sub>2</sub> poderia favorecer a plasticidade de linfócitos Th17 em Th1. Linfócitos T *naive* foram diferenciados à células Th17 por 6 dias. Quando estas células foram expostas em condições polarizantes para diferenciação de linfócitos Th1 por 18 dias, na presença e ausência de PGE<sub>2</sub> foi observado um aumento na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, sendo esse mais pronunciado na presença de PGE<sub>2</sub>. Visando otimizar o protocolo experimental, as células T *naive* foram diferenciadas em linfócitos Th17 durante 4 dias, e então submetidas a purificação por coluna de separação magnética. Porém, devido a problemas metodológicos, houve inibição da proliferação e aumento de morte celular, de forma que o experimento não foi conclusivo. Resultados de quantificação de IL-17A e IFN- $\gamma$ , nas diferentes condições experimentais, confirmaram a maior plasticidade no 18º dia de cultura na presença de PGE<sub>2</sub>. Os resultados aqui apresentados sugerem pela primeira vez que na presença de um microambiente favorável a linfócitos Th1, a PGE<sub>2</sub> favorece a plasticidade de células Th17 para Th1. Entretanto, os próximos passos deste estudo visam compreender a via de sinalização esse mediador lipídico age em termos de plasticidade e, também, elucidar o papel da PGE<sub>2</sub> nessa mudança de subtipo celular dentro de um quadro inflamatório e em certas condições de doenças inflamatórias crônicas.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Diferenciação de Linfócitos T

As células T CD4<sup>+</sup> *naive* diferenciam-se em diversos subtipos celulares, dentre eles Th1, Th2, Th17 e T regulador (Treg) de acordo com o padrão de resposta induzido pelo patógeno ao qual o hospedeiro é acometido (Tartar *et al.*, 2010). Essa diferenciação é induzida por citocinas presentes no microambiente, gerado principalmente por células dendríticas infectadas que ao migrarem para um órgão linfóide proximal interagem com células TCD4<sup>+</sup> *naive*. Estes linfócitos, na presença de um microambiente de citocinas associada a interação TCR com MHC-II e moléculas co-estimuladoras, CD80/CD86 com CD28, resultam na ativação de fatores de transcrição que promovem a síntese e a secreção de mediadores solúveis específicos à cada subtipo celular garantindo uma maior eficiência da resposta imune (Murphy e Stockinger, 2010).

**Figura 1 - Diferenciação de Linfócitos TCD4 naíve**



Fonte: Figura retirada da Tese de Doutorado (Dejani, 2016).

A imagem foi criada usando *Servier Medical Art Powerpoint Image Bank*, disponível em <http://www.servier.com/powerpoint-image-bank>.

**Fig. 1. Diferenciação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> naíve em subtipos de Linfócitos Th.** As DCs apresentam antígenos via moléculas de MHC II, os linfócitos Th naíve respondem como células promotoras e ativadoras. Mas células dendríticas também expressam moléculas específicas que irão direcionar a diferenciação de Th *naíve* para os subtipos Th1, Th2, Treg ou Th17 (Murphy e Stockinger, 2016).

Os linfócitos Th1 estão envolvidos, principalmente, na defesa contra patógenos intracelulares obrigatórios, como vírus e algumas bactérias e fungos. Uma vez que células de imunidade inata reconhecem tais patógenos, geram um microambiente repleto de interleucina-

12 (IL-12) e interferon-γ (IFN-γ) que ativam o sinal de transdução e ativação de transcrição 1

(Stat1), o fator de transcrição de Ets-1 e o fator de transcrição de transcrição, que caracteriza

secreção de IFN-γ, que por meio de mecanismo de feedback positivo, favorecendo a diferenciação celular (Weaver *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2009).

compreensão do papel de cada um destes subtipos celulares no desenvolvimento e agravamento de diversas doenças inflamatórias crônicas e infecciosas. Ainda,

Por outro lado, os linfócitos Th17 são encontrados primordialmente em infecções por bactérias extracelulares, fungos, assim como doenças auto-imunes. A via de sinalização desse subtipo celular é iniciada pela presença de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e fator de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ) no microambiente os quais ativam Stat3 e receptor órfão relacionado ao ácido retinóico  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t), fator de transcrição responsável por promover a síntese de IL-17A e IL-22, perfil de citocinas relacionado as células Th17 (Wei *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

## 1.2. Plasticidade de Linfócitos T

A diferenciação de linfócitos T *helper* (Th) ocorre pela ativação de fatores de transcrição característicos de cada subtipo celular de acordo com o microambiente ao qual a célula está inserida (Nakayamada *et al.*, 2012). Algumas células, uma vez diferenciadas, mantêm seu fenótipo durante diversos ciclos de divisão celular (estado final de diferenciação), porém outras, quando expostas a um microambiente distinto, podem alterar seu fenótipo, o que confere aos linfócitos T uma plasticidade (Nakayamada *et al.*, 2012; Geginat *et al.*, 2014).

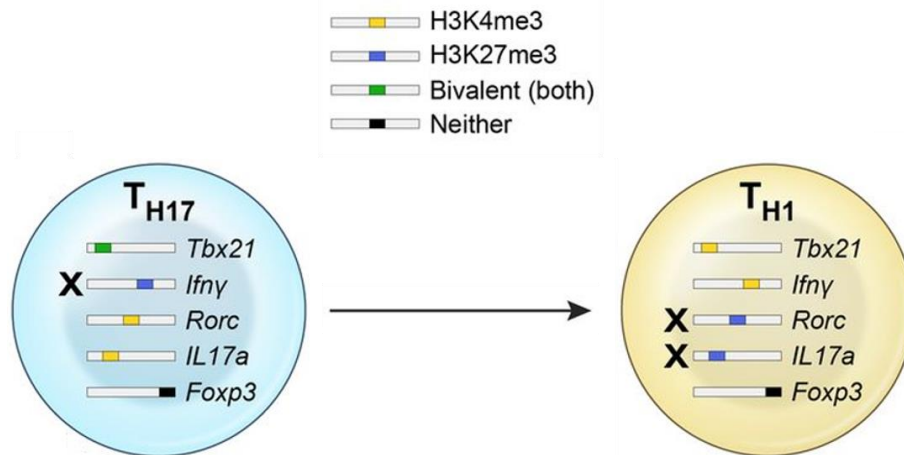
Essa plasticidade dos linfócitos T deve-se a modificações pós-transducionais específicas das histonas (metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação), que uma vez desencadeadas tornam a cromatina permissível a ligação de outros fatores de transcrição, alterando o perfil fenotípico de tais células (Nakayamada *et al.*, 2012; Allan e Nutt, 2014).

Células Th1, Th2 e Th17 apresentam diferentes modificações epigenéticas relacionadas a ativação de fatores de transcrição e produção de citocinas efetoras características de cada subtipo celular, de forma rápida e eficiente (Allan e Nutt, 2014).

O perfil de metilação dos subtipos linfocitários demonstra que para células Th17 o estado de metilação do promotor dos genes *Rorc* e *Il17a* é permissivo (H3K4me3), para o promotor de *ifng* o estado de metilação é repressivo (H3K27me3), porém o promotor *tbx21*, gene que codifica T-bet, está em um estado de metilação bivalente, permitindo que linfócitos Th17, se

expostos a um microambiente favorável à polarização de linfócitos Th1, entre em estado permissivo, para esse gene, e então, silencie o *Il17a* e *Rorc* e ative, via STAT4 e T-bet, a produção de IFN- $\gamma$  (Wei *et al.*, 2009; Muranski e Restifo, 2013)

**Figura 2 – Modificações epigenéticas modulam a plasticidade entre linfócitos Th17 e Th1**



**Figura 2.** A trimetilação da histona  $^3\text{H}$  na lisina 4 (H3K4me3) no promotor de um gene é um marcador permissivo para transcrição, enquanto que a trimetilação da histona  $^3\text{H}$  na lisina 27 (H3K27me3) é um marcador repressivo. Células Th17 são permissíveis (H3K4me3) a transcrição de *Rorc* e *Il17a* e bivalente para *Tbx21*, caracterizando instabilidade do subtipo linfocitário e plasticidade para Th1, que possui apenas marcadores permissíveis para *tbx21* e *ifn $\gamma$*  e marcadores repressivos para *Rorc* e *Il17A* (Muranski e Restifo, 2013).

Essas células, Th17 produtoras de IFN- $\gamma$  vem sendo chamadas de Th1 “não clássicas” e são frequentemente encontradas em modelos de autoimunidade, mostrando serem mais patogênicas do que as Th1 clássicas (Lee *et al.*, 2009; Nakayamada *et al.*, 2012).

### 1.3. Prostaglandina E<sub>2</sub>: Receptores e Vias de Sinalização

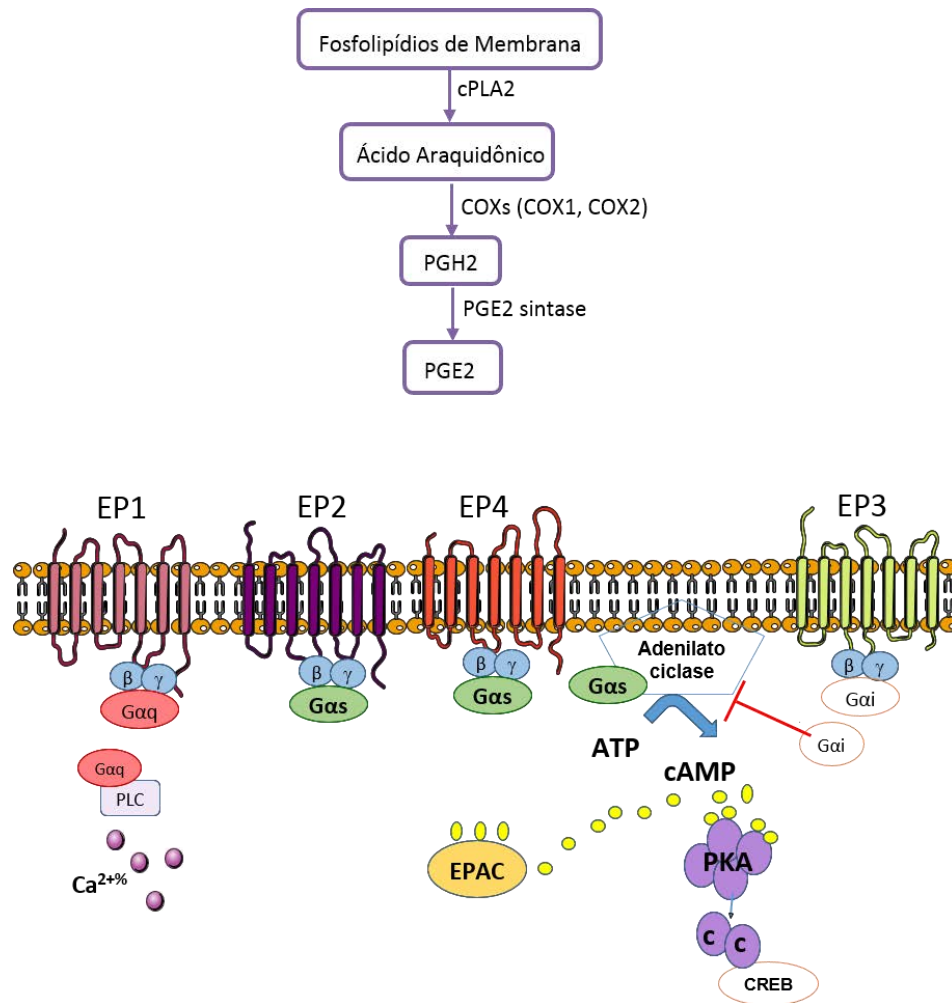
As prostaglandinas (PG) são mediadores lipídicos solúveis sintetizados a partir da biossíntese do ácido araquidônico (Boniface *et al.*), oriundo da hidrólise de fosfolípidos de membranas pelas fosfolipases (cPLA<sub>2</sub>). O ácido araquidônico liberado sofre a ação das enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), formando, em um primeiro

momento, PGG<sub>2</sub> que posteriormente sofre conversão à PGH<sub>2</sub> (Hirata e Narumiya, 2012; Sreeramkumar *et al.*, 2012). A enzima COX-1 é uma enzima constitutiva, sendo responsável pela produção de níveis basais das prostaglandinas, já COX-2 é uma enzima induzida que potencializa a produção de PG durante a inflamação (Smith *et al.*, 2000).

A PGH<sub>2</sub> é metabolizada a quatro diferentes tipos de prostaglandinas, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, de acordo com a enzima presente na célula onde a biossíntese está ocorrendo (Hirata e Narumiya, 2012). O prostanóide mais comum em humanos é a PGE<sub>2</sub>, cuja biossíntese, ocorre pela ação de PG sintase E<sub>2</sub> (Hirata e Narumiya, 2012; Sreeramkumar *et al.*, 2012). As PGs são então liberadas através de um transportador de membrana e atuam de forma autócrina e parácrina (Schuster, 1998).

A PGE<sub>2</sub> exerce sua função através de 4 subtipos de receptores celulares associados a proteína G (GPCR): EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses podem variar de acordo com as propriedades de ligação à PGE<sub>2</sub>, distribuição nos tecidos, expressão e transdução de sinais, conforme o tipo de proteína G acoplada (Sugimoto e Narumiya, 2007; Hirata e Narumiya, 2012; Sreeramkumar *et al.*, 2012).

**Figura 3 - Síntese de PGE<sub>2</sub> e vias de sinalização.**



**Fonte:** Figura adaptada da Tese de Doutorado (Dejani, 2016).

**Figura 3.** A PGE<sub>2</sub>, é sintetizada a partir da degradação de fosfolipídeos de membrana nuclear pela cPLC<sub>2</sub>, à AA. Esse, é então, convertido à PGH<sub>2</sub>, pelas enzimas COX-1 e COX-2, a qual originará PGE<sub>2</sub>, com auxílio de PG sintase E<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub>, pode interagir com receptores EP1, EP2, EP3 e EP4. EP1, promove aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular por meio de PLC, via proteína Gαq. EP3, através de Gαi, inibe AC, e, portanto, cAMP. Já EP2 e EP4, acopladas a Gαs, aumentam os níveis de cAMP, via AC, ativando a via de EPAC e PKA (Sugimoto e Narumiya, 2007).

O receptor 1 de prostaglandina E<sub>2</sub> (EP1), encontrado majoritariamente em rins, mucosa muscular gástrica e tecido adrenal, é acoplado a proteínas Gαq, que promove o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular através da ativação de fosfolipase-C (PLC) (Sugimoto e Narumiya, 2007).

EP3, diferente dos outros receptores, apresenta múltiplas variantes geradas pelo processamento alternativo do RNA (*splicing* alternativo). EP3α e EP3β são acopladas a proteína Gαi e dessa forma, quando ativadas promovem diminuição dos níveis de adenosina

mono fosfato cíclica (AMPc), por inibição de adenilato ciclase (Boniface *et al.*). Já a isoforma EP3 $\gamma$  potencializa a produção de AC e cAMP, via Rho GTPase (Breyer *et al.*, 2001; Sugimoto e Narumiya, 2007; Sreeramkumar *et al.*, 2012).

Os receptores EP2 e EP4, por sua vez, são acoplados a proteína G $\alpha$ s e induzem a ativação de AC, enzima que converte adenosina trifosfato (ATP) em cAMP. Esse mensageiro secundário é responsável por ativar duas vias: a da proteína quinase A (PKA) e a da proteína de troca diretamente ativada por AMPc (EPAC) (Gerlo *et al.*, 2011). A interação de AMPc e EPAC resulta na ativação de Rap1, uma proteína da superfamília Ras, que tem sido relacionada no controle da adesão celular e formação de junções celulares (Bos, 2006);(Breckler *et al.*, 2011). No entanto, a interação de cAMP com a subunidade regulatória de PKA resulta na fosforilação de diferentes proteínas citoplasmáticas, dentre elas, fatores de transcrição, como por exemplo, a proteína de ligação ao elemento de resposta à cAMP (CREB) (Gerlo *et al.*, 2011). A ativação de CREB leva a transcrição de genes relacionados a modulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (Hirata e Narumiya, 2012; Sreeramkumar *et al.*, 2012).

#### **1.4. PGE<sub>2</sub>: Influência na Resposta Imune Adaptativa e na Plasticidade de Linfócitos T**

Diversos estudos já comprovaram que a PGE<sub>2</sub> possui um importante papel na resposta imune adaptativa, atuando na modulação da diferenciação e proliferação das células T. No caso de células Th1 e Th17, a PGE<sub>2</sub> pode agir de forma antagônica

Estudos demonstraram que a PGE<sub>2</sub> pode induzir o aumento da proliferação e diferenciação de células Th1 e Th17. Em concentrações nanomolares promovem a expressão de receptores de IL-23 e IL-1 $\beta$  e inibiu a produção de IFN- $\gamma$ , resultando no aumento da proliferação de células Th17 via EP2/EP4-cAMP, e também no aumento de células Th17 de memória. Além desse mecanismo, a PGE<sub>2</sub> adicionada a uma cultura de células dendríticas

promove o aumento da produção de IL-23 por essas células, favorecendo a diferenciação de linfócitos Th17 (Boniface *et al.*, 2009).

Por outro lado, células T *naive* incubadas com agonistas de EP2 e EP4 na presença de altas concentrações de anti-CD3/CD28, resultou na diferenciação de linfócitos Th1, sendo que EP4 foi responsável pela expressão de IL-12R $\beta$ 2 e IFN- $\gamma$ R1 (Yao, Chengcan *et al.*, 2013).

Além disso, outros trabalhos demonstram o envolvimento de PGE<sub>2</sub> em doenças autoimunes (Nistala *et al.*, 2010; Annunziato *et al.*, 2013). Em modelos experimentais de colite, assim como em paciente com doença inflamatória intestinal crônica, PGE<sub>2</sub> foi detectada em níveis elevados no intestino. No entanto, os benefícios do tratamento com inibidores seletivos de COX são ainda bastante controversos. Por exemplo, em modelo experimental de colite induzido por trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ou dextran sulphate sodium (DSS), os inibidores seletivos de COX exerceram uma diminuição significativa dos danos no cólon por promover a redução de células Th1 e Th17 no local do dano, e sistemicamente houve o remodelamento do perfil gênico da mucosa colônica, supressão da inflamação e redução da polarização, expansão e manutenção de células Th17 (Monk *et al.*, 2014).

Atualmente, já se tem descrito que além da presença de linfócitos Th1 e Th17, os linfócitos Th1 “não clássicos”, ou seja, células produtoras de IFN- $\gamma$  derivadas de linfócitos Th17, estão associados a quadros inflamatórios crônicos e de autoimunidade, como na Doença de Crohn e na artrite autoimune, consideradas células ainda mais patogênicas que as Th1 e Th17 (Lee *et al.*, 2009; Nakayamada *et al.*, 2012; Cosmi *et al.*, 2014).

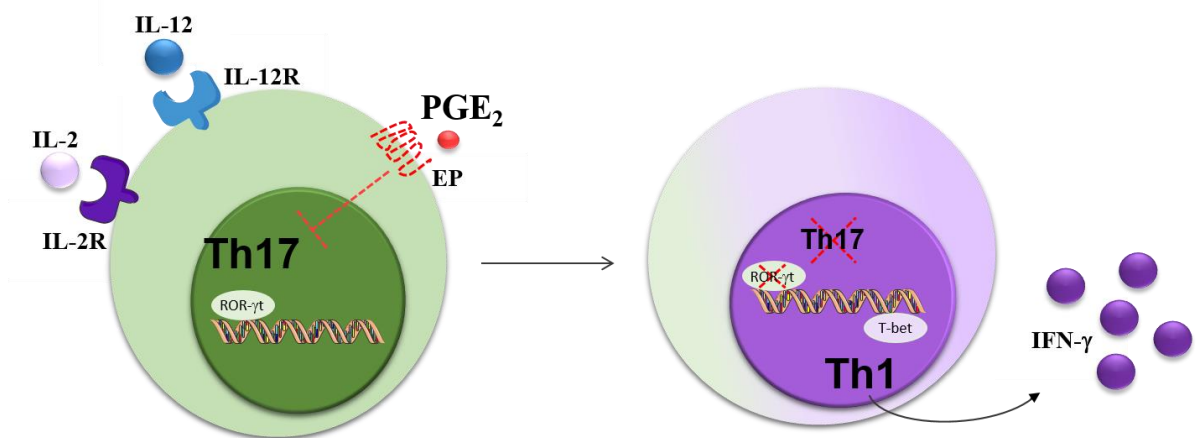
Dessa forma, tendo em vista não apenas a capacidade plástica de linfócitos T *helper*, mas também a capacidade da PGE<sub>2</sub> de modular a diferenciação e proliferação de células Th1 e Th17, positiva ou negativamente dependendo da concentração e do microambiente ao qual está inserida, o objetivo desse estudo foi avaliar a plasticidade de linfócitos Th17 para

linfócitos Th1, em um microambiente contendo PGE<sub>2</sub>, determinando o papel desse mediador lipídico nesse processo, visto sua importância na diferenciação dos linfócitos T.

### 1.5. Hipótese

*A hipótese desse trabalho é que a PGE<sub>2</sub>, em um microambiente polarizante para células Th1, aumenta a plasticidade de linfócitos Th17 para linfócitos Th1.*

**Figura 4 – Hipótese do trabalho**



**Figura 4.** A presença de PGE<sub>2</sub>, em um microambiente favorável a polarização de células Th1, promoveria o aumento da plasticidade de células Th17 já diferenciadas em células Th1.

## 2. OBJETIVO

Avaliar o papel da PGE<sub>2</sub> na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 10 semanas de idade, foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP, Campinas, São Paulo. Os animais foram mantidos em mini-isoladores com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados e livre acesso à água e ração, previamente autoclavadas. Todos

os procedimentos foram julgados pelo Comitê de Ética da Instituição (Parecer n.º, CEUA/FCF/CAr n. 15/2016 – ANEXO I).

### **3.2. Obtenção de células T *naive***

Linfócitos T *naive* foram purificados a partir de células do baço de camundongos C57BL/6 com auxílio de *beads* magnéticas CD4+CD62L+ T Cell Isolation Kit II mouse (#130-093-227 – Miltenyi Biotec®) de acordo com instruções do fabricante.

### **3.3. Ensaio de diferenciação de células T**

#### **3.3.1. Experimento I**

As células T *naive*, purificadas dos animais, foram diferenciadas na presença de meio polarizante para células Th17. Resumidamente,  $5 \times 10^5$  linfócitos T *naive*/poço foram adicionados em placas de 48 poços previamente tratadas com anti-CD3 e anti-CD28 (2 µg/mL cada), anti-IL-4, anti-IL-2 e anti-IFN- $\gamma$  (10 µg/mL cada), e um coquetel de citocinas contendo, IL-1 $\beta$  (20 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL) e TGF- $\beta$  (5ng/mL), diluídas em IMDM suplementado com soro bovino, gentamicina, L-glutamina, aminoácidos essenciais, piruvato de sódio e  $\beta$ -mercapitoetanol. As células foram mantidas nessa cultura por 3 dias, quando o meio de cultura foi trocado, ao coquetel de citocinas polarizantes para Th17 foi adicionado IL-23 (50 ng/mL) para expansão destas células até o sexto dia de cultura.

O resultado foi determinado por citômetro de fluxo FACS Canto™ (Becton& Dickinson, San Diego, CA, USA) e as células marcadas com *Th1/Th17 mouse phenotyping kit* ((#560759 – BD Pharmingen™). As células com fenótipo Th17 eram CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ . Os resultados foram analisados pelo programa FCS 4 Express Flow Cytometry.

#### **3.3.2. Experimento II**

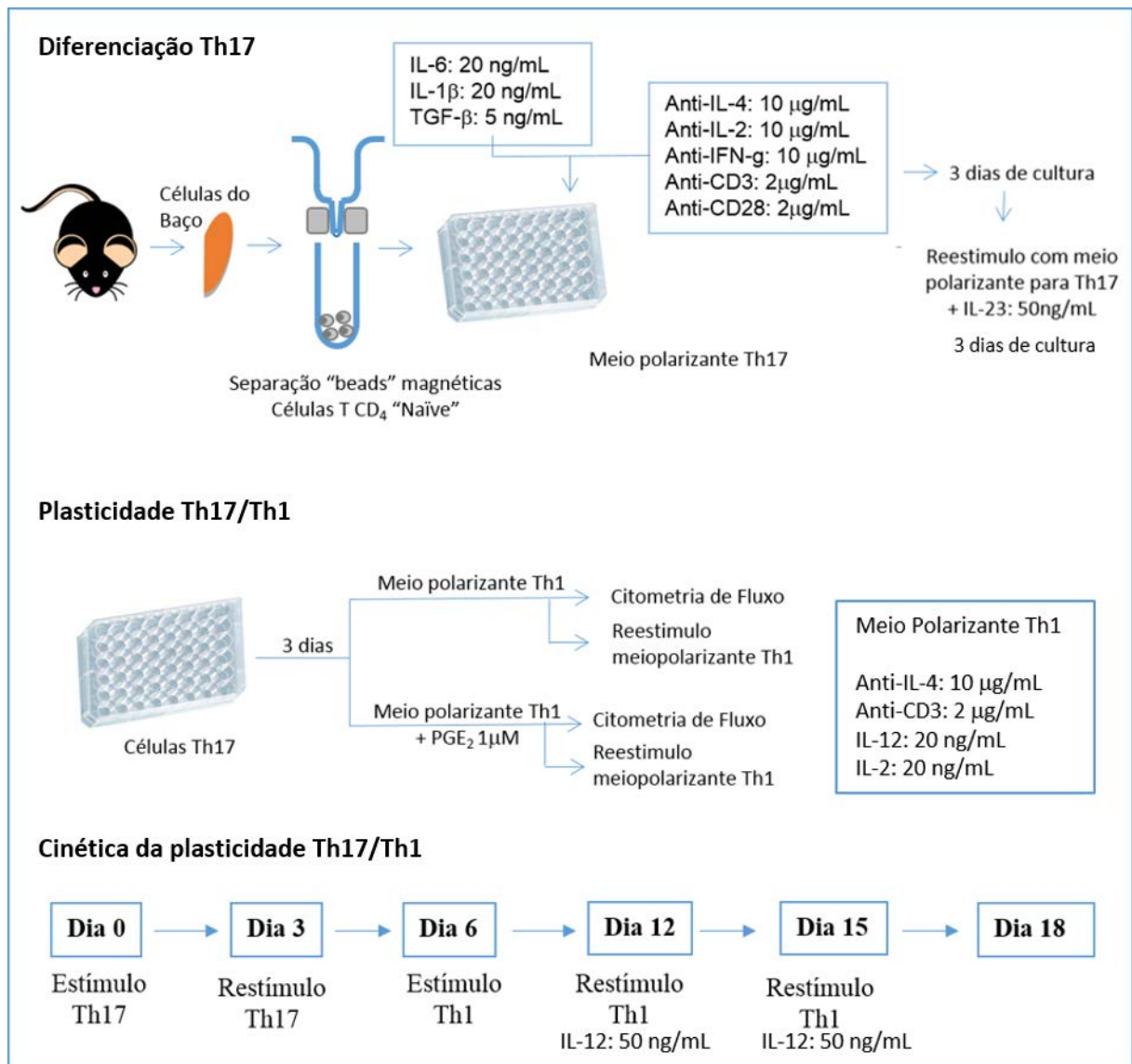
As células T *naive*, purificadas dos animais, foram diferenciadas na presença de meio polarizante para células Th17. Resumidamente,  $5 \times 10^5$  linfócitos T *naive*/poço foram

adicionados em placas de 48 poços previamente tratadas com anti-CD3 e anti-CD28 (2 µg/mL cada), anti-IL-4, anti-IL-2 e anti-IFN-γ (10 µg/mL cada), e um coquetel de citocinas contendo, IL-1β (20 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL) e TGF-β (5ng/mL), diluídas em IMDM suplementado com soro bovino, gentamicina, L-glutamina, aminoácidos essenciais, piruvato de sódio e β-mercapitoetanol. As células foram mantidas nessa cultura por 2 dias, quando o meio de cultura foi trocado, ao coquetel de citocinas polarizantes para Th17 foi adicionado IL-23 (50 ng/mL) por mais 2 dias.

No quarto dia de cultura as células secretoras de IL-17 foram purificadas com auxílio de “beads” magnéticas (Mouse IL-17 Secretion Assay – Cell Enrichment and Detection Kit (PE) - #130-094-213 – Miltenyi Biotec®), de acordo com as instruções do fabricante.

O resultado foi determinado por citômetro de fluxo FACS Canto™ (Becton& Dickinson, San Diego, CA, USA) e as células marcadas com CD4-PE, IL-17A-AlexaFluor647 e IFN-γ-FITC. As células com fenótipo Th17 eram CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN-γ<sup>-</sup>. Os resultados foram analisados pelo programa FCS 4 Express Flow Cytometry.

**Figura 5 - Delineamento experimental referente ao “Experimento I”**



**Figura 5.** Linfócitos T *naive* purificadas através de separação por *beads* magnéticas, a partir de células do baço de camundongos C57BL/6. Tais células foram submetidas a um meio polarizante para linfócitos Th17, contendo anti-CD3/CD28, anti-IL-4, anti-IL-2 e anti-IFN- $\gamma$  e as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TGF- $\beta$  e foram deixados em cultura por 3 dias. Após esse período foi dado um reestímulo com o mesmo meio polarizante acrescido de IL-23, mantendo a cultura por mais 3 dias. Após a diferenciação, iniciou-se o ensaio de plasticidade, submetendo os linfócitos Th17 a um meio polarizante para células Th1, na presença e ausência de PGE<sub>2</sub>. A cada três dias houve reestímulo dessas células, sob as mesmas condições polarizantes para linfócitos Th1, sendo que uma fração de células era coletada para fenotipagem por citometria de fluxo. Esse procedimento foi repetido até o 18º dia de cultura.

### **3.4. Ensaio de Plasticidade**

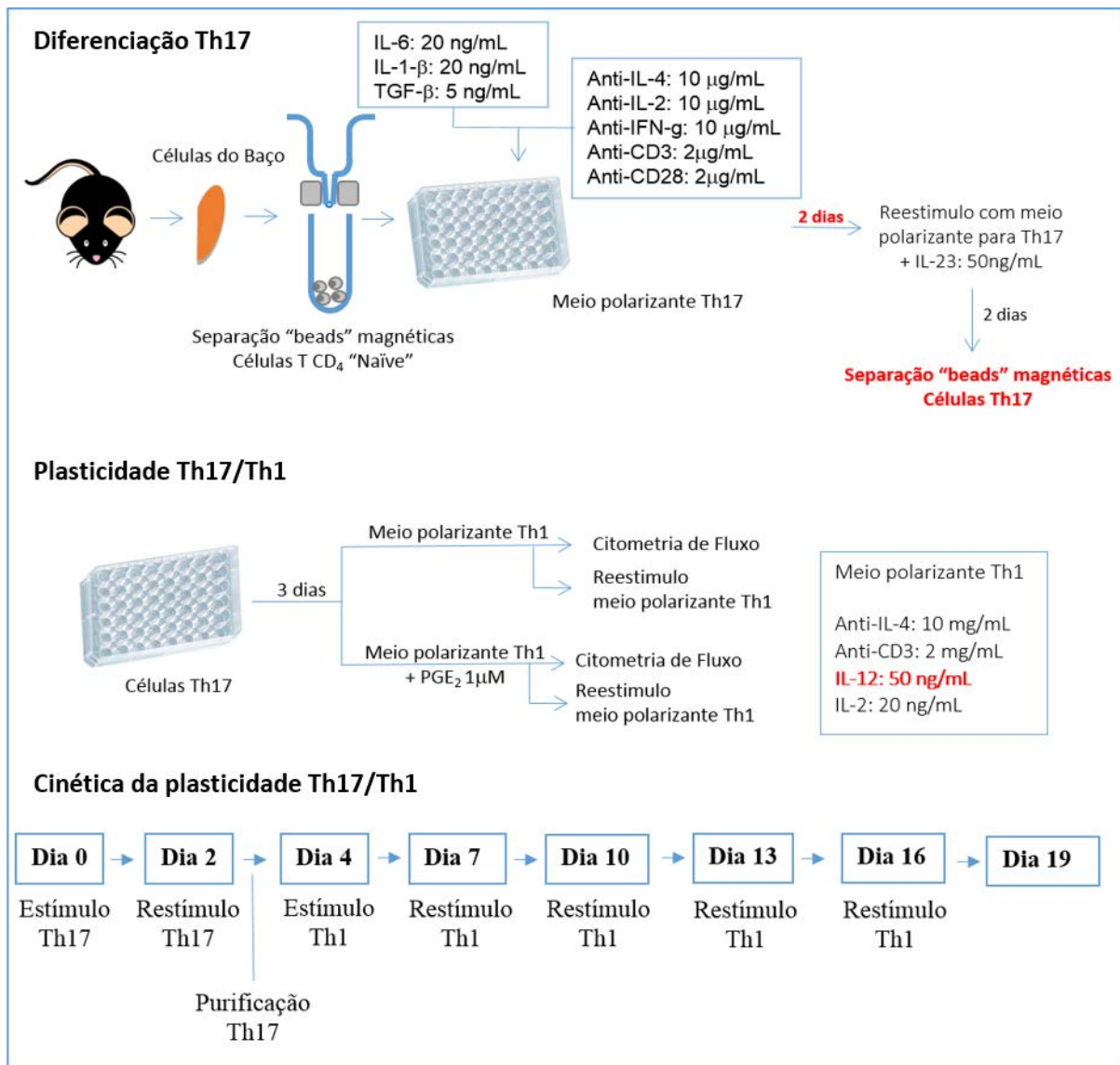
Os linfócitos Th17 foram então cultivados em meio polarizante para células Th1 na presença e ausência de PGE<sub>2</sub>, na concentração de 1 μM. Em placa de 48 poços, foi tratada com anti-CD3 e anti-CD28 (2 μg/mL cada), anti-IL-4 e anti-IFN-γ (10 μg/mL cada), e um coquetel de citocinas para diferenciação em células Th1, contendo IL-2 (20 ng/mL) e IL-12 (50 ng/mL), diluídas em IMDM suplementado com soro bovino, gentamicina, L-glutamina, aminoácidos essenciais, piruvato de sódio e β-mercapitoetanol, foi adicionado 5x10<sup>5</sup> linfócitos Th17/poço.

A cada três dias de cultura, uma fração de células era retirada para fenotipagem por citometria de fluxo (FACS Canto™- Becton & Dickinson, San Diego, CA, USA), utilizando como marcadores CD4, IL-17 e IFN-γ. As células que mantiveram fenótipo Th17 eram CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN-γ<sup>-</sup>, já as células que alteraram seu fenótipo para Th1 eram CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup>IFN-γ<sup>+</sup>. Esse procedimento foi repetido até o décimo-nono dia de cultura. Os resultados foram analisados pelo programa FCS 4 Express FlowCytometry.

### **3.5. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Além da fenotipagem por citometria de fluxo, para determinar o subtipo celular ao qual os linfócitos T foram polarizados, avaliou-se a produção das citocinas IL-17A e IFN-γ por ELISA de acordo com o protocolo dos respectivos fabricantes.

**Figura 6- Delineamento experimental referente ao “Experimento II”**



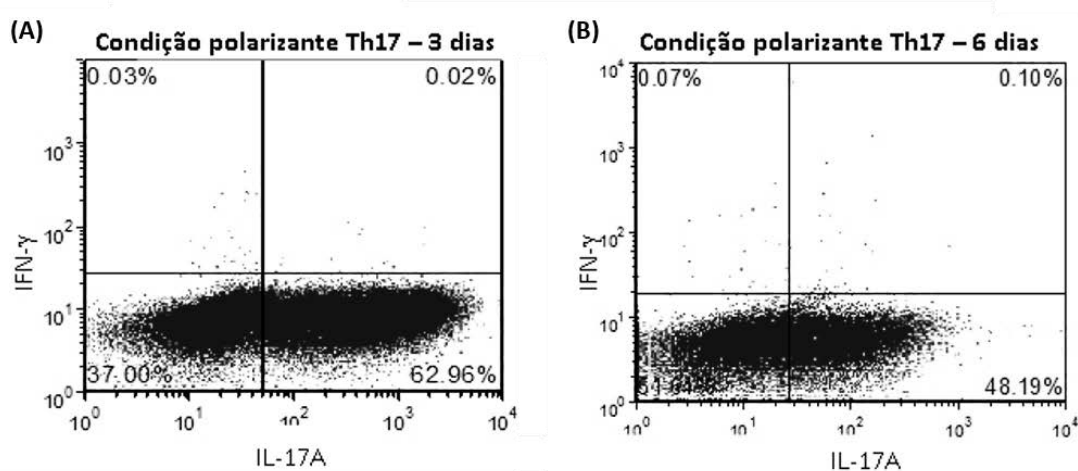
**Figura 6.** Linfócitos T *naive* purificadas através de separação por *beads* magnéticas, a partir de células do baço de camundongos C57BL/6. Tais células foram submetidas a um meio polarizante para linfócitos Th17, contendo anti-CD3/CD28, anti-IL-4, anti-IL-2 e anti-IFN-γ e as citocinas IL-1β, IL-6 e TGF-β e foram deixados em cultura por 2 dias. Após esse período foi dado um reestímulo com o mesmo meio polarizante acrescido de IL-23, mantendo a cultura por mais 2 dias. Após a diferenciação, as células secretoras de IL-17A foram purificadas por *beads* magnéticas. Iniciou-se o ensaio de plasticidade, submetendo os linfócitos Th17 a um meio polarizante para células Th1, na presença e ausência de PGE<sub>2</sub>. A cada três dias houve reestímulo dessas células, sob as mesmas condições polarizantes para linfócitos Th1, sendo que uma fração de células era coletada para fenotipagem por citometria de fluxo. Esse procedimento foi repetido até o 19º dia de cultura.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensaio de Plasticidade – Experimento I

No experimento I, após três e seis dias de diferenciação sob condições polarizantes para linfócitos Th17, as células foram analisadas por citometria de fluxo e, no terceiro dia, aproximadamente 63% mostram-se secretoras de IL-17A, caracterizando o fenótipo de células Th17 (Figura 7A). Porém após o reestímulo dessas células, no sexto dia de cultura, observou-se a diminuição da porcentagem de células produtoras de IL-17A (Figura 7B). Apesar da diminuição da porcentagem de células produtoras de IL-17A, podemos observar que metade da população celular era ainda composta por células Th17 (aproximadamente 48%), sem a presença de células produtoras de IFN- $\gamma$ .

**Figura 7 - Confirmação da diferenciação de linfócitos Th17 após 3 e 6 dias**



**Figura 7.** Células T *naive* purificadas do baço de camundongos C57BL/6, ativadas com anti-CD3/CD28 e cultivadas em meio polarizante para linfócito Th17 (IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e anti-IL-4, anti-IL-2, anti-IFN- $\gamma$ ). As células foram marcadas Th1/Th17 mouse phenotyping kit (#560759 – BD Pharmingen™). (A) *Dotplot* das células no 3º dia de diferenciação. (B) *Dotplot* das células no 6º dia de diferenciação, após reestímulo com IL-23.

Após o sexto dia de experimento, as células foram privadas dos estímulos polarizantes para Th17 e submetidas a um microambiente favorável a polarização de linfócitos Th1. Para determinar a cinética da plasticidade desses linfócitos, foram fornecidos reestímulos Th1 a

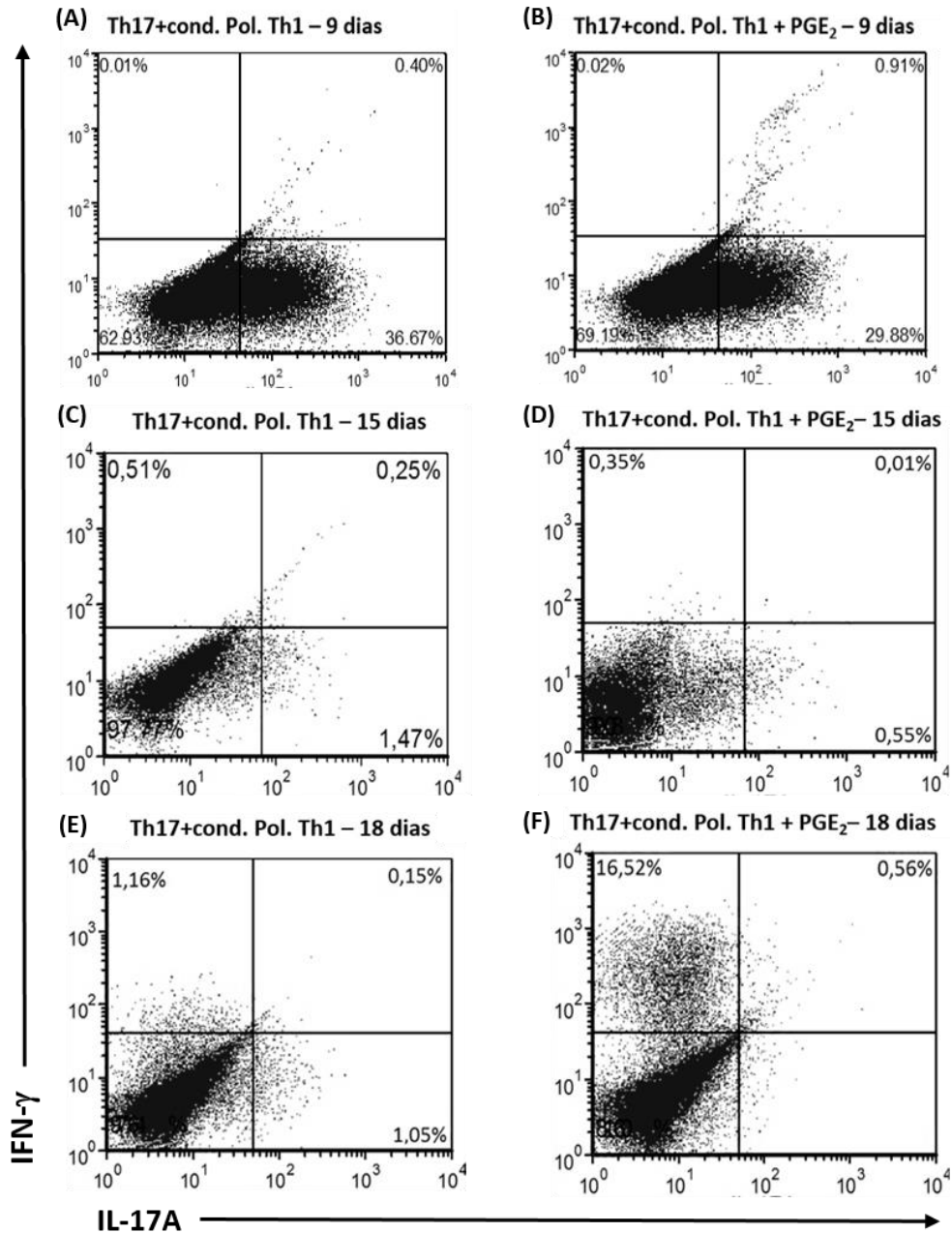
cada três dias, até o décimo oitavo dia de cultura. No décimo segundo dia de cultura, a concentração de IL-12 adicionada ao meio polarizante para linfócitos Th1 foi alterada para 50 ng/mL, devido a resultados experimentais do nosso grupo de pesquisa que padronizou a melhor condição para a diferenciação de células Th1 (dados não mostrados). Ainda, para avaliar o papel de PGE<sub>2</sub> na plasticidade de Th17/Th1, em umas das condições foi adicionado PGE<sub>2</sub> na concentração de 1 μM.

No nono dia de cultura, houve redução na porcentagem de células produtoras de IL-17A em ambas condições experimentais (Figura 8A e 8B), sendo essa mais acentuada na presença de PGE<sub>2</sub>. Ou seja, aproximadamente 30% das células eram IL-17A<sup>+</sup> na presença de PGE<sub>2</sub> (Figura 8B), enquanto na ausência de PGE<sub>2</sub>, aproximadamente 37% de linfócitos eram produtores de IL-17A (Figura 8A).

Com a continuidade da cultura, manteve-se a redução da porcentagem de células produtoras de IL-17A (1,47% na condição experimental na ausência de PGE<sub>2</sub> e 0,55% na condição experimental com adição de PGE<sub>2</sub>), sendo que as células adquiriram perfil duplo negativa TCD4<sup>+</sup>IL17A<sup>-</sup>IFN-γ<sup>-</sup> em ambas as condições experimentais (Figura 8C e 8D).

O último dia de experimento, décimo oitavo, apresentou um perfil de células distinto dos anteriores, esses linfócitos que reduziram a produção de IL-17A, quando mantidos em um microambiente polarizante para células Th1, adquiriram a capacidade de produzir IFN-γ, sendo que para as células cultivadas na presença de PGE<sub>2</sub>, essa produção foi aproximadamente 15 vezes maior do que na ausência do mediador lipídico (Figura 8E e 8F).

**Figura 8 - Plasticidade dos linfócitos Th17, em condição polarizante para Th1, na presença ou ausência de PGE<sub>2</sub>, durante 18 dias de cultura.**



**Figura 8.** Células Th17 ativadas com anti-CD3/CD28 e cultivadas em meio polarizante para linfócito Th1 (IL-2, IL-12 e anti-IL-4, anti-IFN- $\gamma$ ). As células foram marcadas Th1/Th17 mouse phenotyping kit ((#560759 – BD Pharmingen™). (A) *Dotplot* das células no 9º dia de cultura. (B) *Dotplot* das células no 9º dia de cultura, na presença de 1 $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>. (C) *Dotplot* das células no 15º dia de cultura. (D) *Dotplot* das células no 15º dia de cultura, na presença de 1 $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>. (E) *Dotplot* das células no 18º dia de cultura. (F) *Dotplot* das células no 18º dia de cultura, na presença de 1 $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>

A partir dos resultados obtidos no Experimento I, foram realizadas algumas adequações no delineamento experimental, visando à otimização dos resultados no experimento II (modificações destacadas em vermelho no delineamento experimental referente ao experimento II – Figura 6).

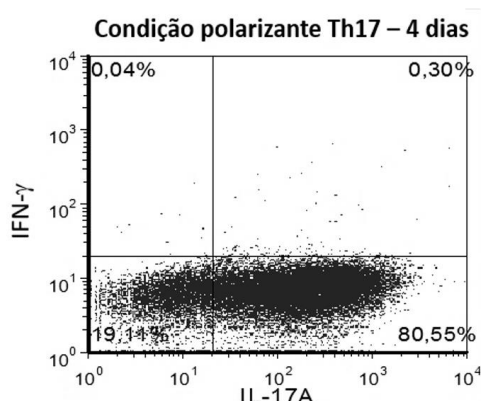
#### **4.2. Ensaio de Plasticidade – Experimento II**

As células T *naive* foram obtidas do baço de camundongos C57BL/6, com o auxílio de *beads* magnéticas, e submetidas a condição polarizante para linfócitos Th17, durante quatro dias, sendo que no segundo dia de cultura foram reestimuladas.

Após o período de diferenciação, as células sofreram um processo de separação por *beads* magnéticas, afim de obter uma cultura com maior porcentagem de células secretoras de IL-17A, para então iniciar estudo de plasticidade.

A otimização do protocolo experimental, com a redução no tempo de diferenciação na presença de condições polarizantes para Th17, resultou no aumento da porcentagem de diferenciação de células Th17, sendo encontrado 80,55% de células produtoras de IL-17A (Figura 9), ou seja, um aumento de aproximadamente 30% se comparado ao resultado do experimento I (Figura 6). Essas células Th17, foram então privadas de estímulos Th17, e inseridas à um microambiente polarizante para linfócitos Th1, na ausência e presença de PGE<sub>2</sub>, onde foram mantidas por 19 dias, sendo reestimuladas a cada 3 dias.

**Figura 9 - Confirmação da diferenciação de linfócitos Th17 após 4 dias de cultura**



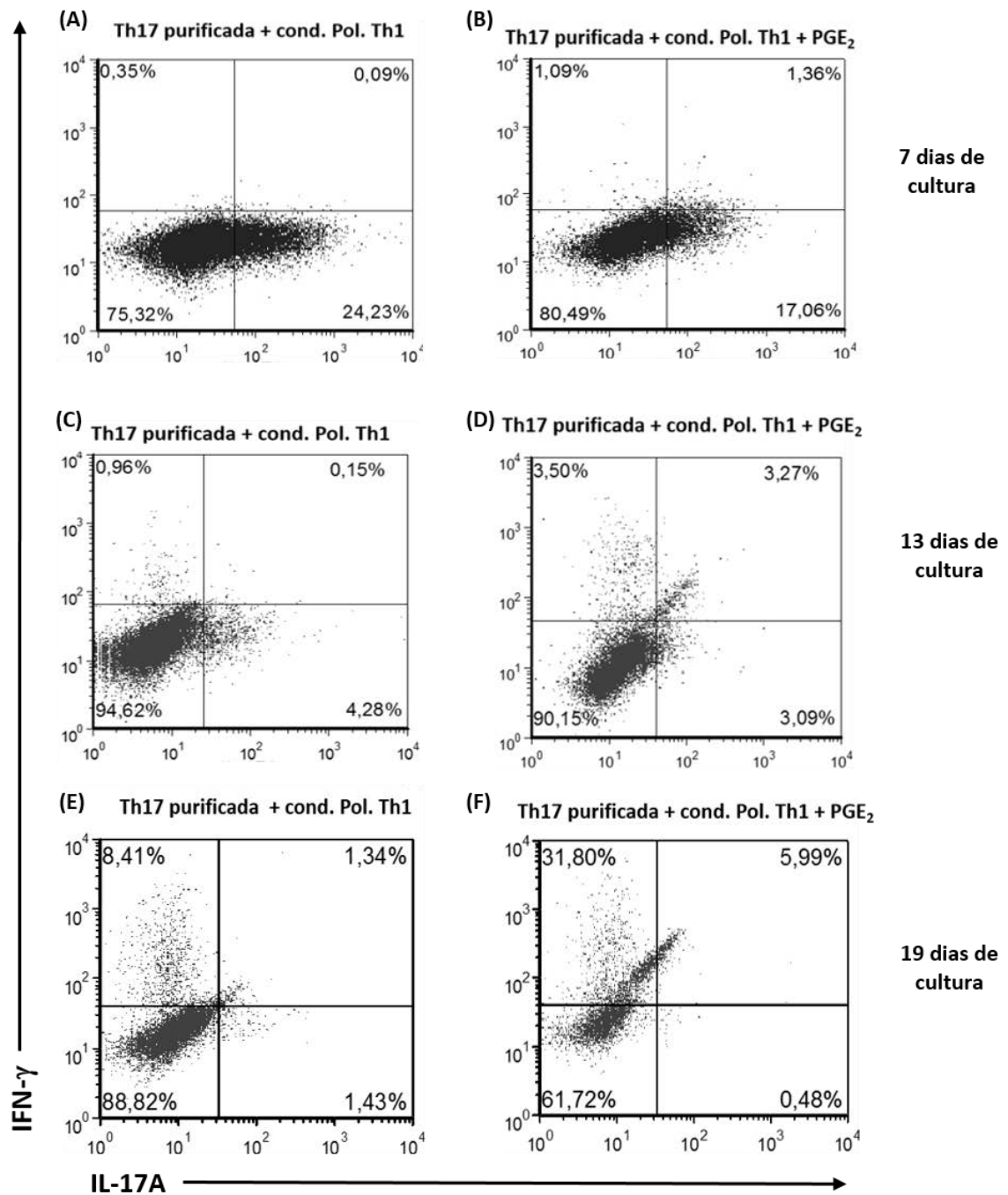
**Figura 9.** Células T *naive* purificadas do baço de camundongos C57BL/6, ativadas com anti-CD3/CD28 e cultivadas em meio polarizante para linfócito Th17 (IL-6, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e antiIL-4, anti-IL-2, anti-IFN- $\gamma$ ). As células foram marcadas com anticorpos anti-IL-17A conjugados com AlexaFluor 647 e anticorpos anti-IFN- $\gamma$  conjugados com FITC após 4 dias de cultura.

Foi observado que em apenas três dias cultivadas em microambiente polarizante para linfócitos Th1, as células de ambas as condições experimentais, sofreram redução da produção de IL-17A (Figura 10A e 10B), sendo que foi mais intensa na cultura a qual a PGE<sub>2</sub> foi adicionada (aproximadamente 17,0%).

Após o reestímulo com meio polarizante para linfócitos Th1, as células com treze dias de cultura adquiriram um perfil fenotípico duplo negativo, tanto para a condição sem PGE<sub>2</sub> (Figura 10C), sendo apenas 4,28% TCD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>, quanto para a condição com PGE<sub>2</sub>, 3,09% TCD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> (Figura 10D), mantendo-se semelhantes para ambas as condições.

Os resultados obtidos no último dia de experimento, indicam aproximadamente 32% de células produtoras de IFN- $\gamma$ , e uma porcentagem menor que 1% para produção de IL-17A na na condição em que houve a adição de PGE<sub>2</sub> (Figura 10E), e aproximadamente 8,0% de células produtoras de IFN- $\gamma$ , na condição contendo o meio polarizante para Th1, com 1,43% de IL-17A mantendo a tendência já observada durante os primeiros dias do experimento (Figura 10F).

**Figura 10- Plasticidade dos linfócitos Th17 purificados, em condição polarizante para Th1 na presença ou ausência de PGE<sub>2</sub>, durante 19 dias de cultura**



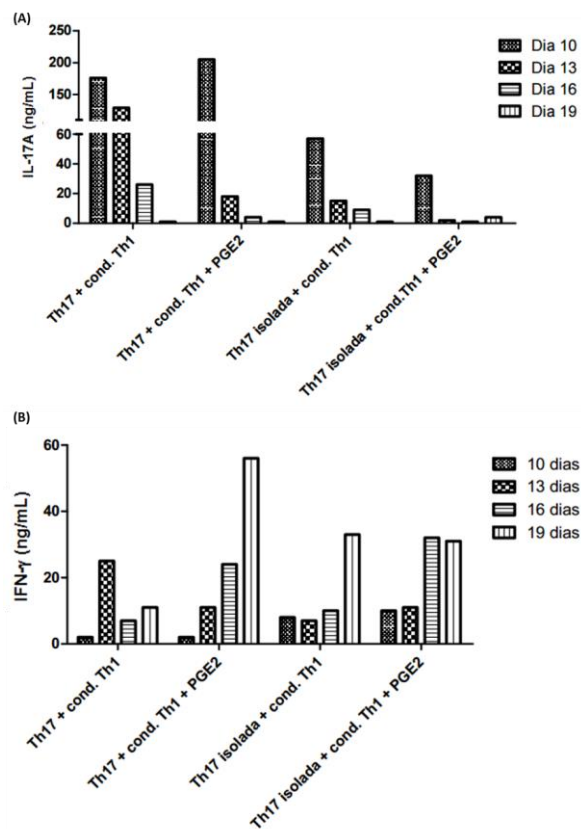
**Figura 10.** Células Th17 purificadas por *beads* magnéticas ativadas com anti-CD3/CD28 e cultivadas em meio polarizante para linfócito Th1 (IL-2, IL-12 e anti-IL-4, anti-IFN- $\gamma$ ). As células foram marcadas com anticorpos anti-IL-17A conjugados com Alexa Fluor 647 e anticorpos anti-IFN- $\gamma$  conjugados com FITC. **(A)** *Dotplot* das células no 7º dia de cultura. **(B)** *Dotplot* das células no 7º dia de cultura, na presença de 1  $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>. **(C)** *Dotplot* das células no 13º dia de cultura. **(D)** *Dotplot* das células no 13º dia de cultura na presença de 1  $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>. **(E)** *Dotplot* das células no 19º dia de cultura. **(F)** *Dotplot* das células no 19º dia de cultura na presença de 1  $\mu$ M de PGE<sub>2</sub>.

#### 4.2.1. Cinética da produção de IL-17A e IFN- $\gamma$ durante ensaio de plasticidade de linfócitos Th17/Th1

Para confirmar os resultados obtido por citometria, a cinética de produção das citocinas, IL-17A e IFN- $\gamma$ , foi avaliada nas diferentes condições experimentais a partir do sobrenadante das culturas celulares, referente ao experimento II.

Corroborando com os dados obtidos na citometria, em todas as condições experimentais avaliadas, observou-se a diminuição na produção de IL-17A no decorrer da cinética do experimento, como indicado na Figura 11.

**Figura 11- Produção de IL-17A em diferentes condições experimentais**

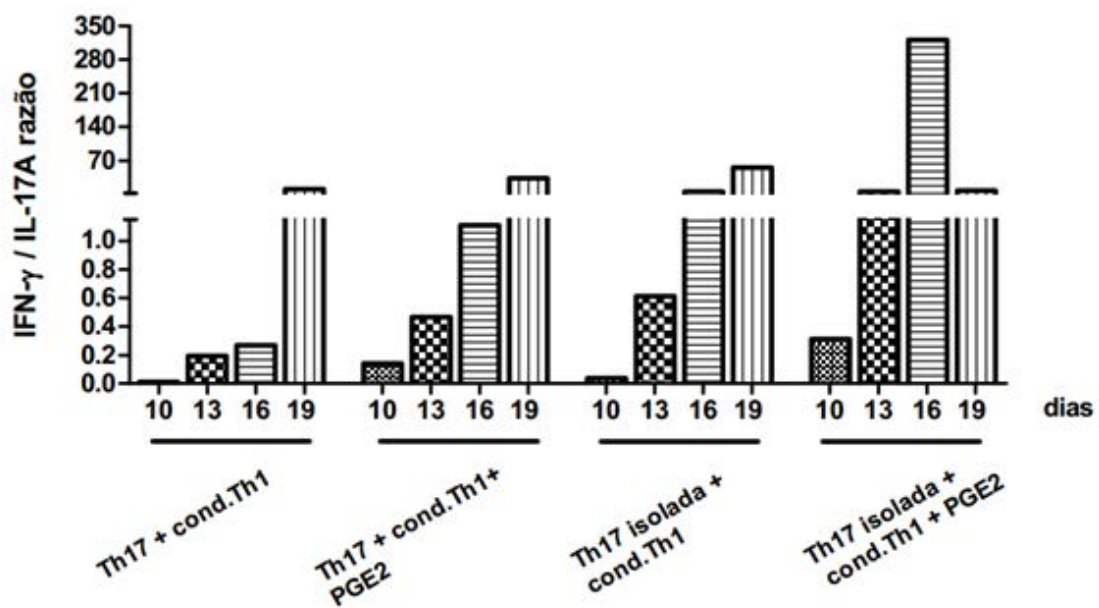


**Figura 11.** Células Th17, purificadas por “beads” magnéticas ou não purificadas, foram estimuladas com meio polarizante Th1 em diferentes dias, na presença e ausência de PGE<sub>2</sub>. (A) O sobrenadante dessas culturas foi coletado para quantificação de IL-17A. Dados obtidos de um experimento isolado (B) O sobrenadante dessas culturas foi coletado para quantificação de IFN- $\gamma$ . Dados obtidos de um experimento isolado.

#### 4.2.2. Razão entre a produção de IFN- $\gamma$ e IL-17A durante o ensaio de plasticidade, para as diversas condições experimentais

A partir dos resultados obtidos na quantificação de IFN- $\gamma$  e IL-17A, analisou-se a razão entre a produção dessas citocinas ao longo dos dias do experimento, para cada condição experimental (Figura 12). Dessa forma, foi possível observar uma tendência ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  em relação a produção de IL-17A, conforme as células eram reestimuladas. A maior razão foi observada após dezenove dias de cultura para todas as condições, exceto a que as células Th17 foram purificadas e cultivadas na presença de PGE<sub>2</sub>.

**Figura 12 - Razão entre a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17A**



**Figura 12.** Gráfico representando a razão entre a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17A pelas células nas diferentes condições experimentais.

## 5. DISCUSSÃO

Durante muitos anos acreditou-se que a diferenciação dos T CD4<sup>+</sup> *naive*, em um dos subtipos celulares - Th1, Th2, Th17 – era estável e imutável, porém estudos posteriores mostraram que esses linfócitos possuem plasticidade capaz de alterar seus fenótipos de acordo com o microambiente ao qual são submetidos (Yao, C. *et al.*, 2013)

A plasticidade dos linfócitos Th17 para Th1 se deve ao fato de que além de expressar ROR- $\gamma$ t como fator de transcrição principal, esse subtipo celular também pode expressar T-bet, sendo que o fator determinante para o fenótipo assumido por essa célula está relacionado com o microambiente ao qual está inserida (Nakayamada *et al.*, 2012).

Sabe-se, que a PGE<sub>2</sub> é um mediador lipídico que está diretamente envolvido na diferenciação de diferentes sub populações de linfócitos T. Experimentos feitos por Yao, C *et al* (2013), demonstraram que a presença de PGE<sub>2</sub> em um meio polarizante de linfócitos Th1 aumenta a diferenciação desse subtipo celular. Resultados obtidos recentemente por nosso grupo de pesquisa sugerem que esse mediador lipídico também está relacionado à diminuição da diferenciação de linfócitos Th17 (dados não mostrados), embora autores como Kalinski (Kalinski, 2012), tenham descrito o efeito contrário, o qual a PGE<sub>2</sub> aumenta a diferenciação desse subtipo celular. Outros estudos envolvendo a PGE<sub>2</sub> demonstraram que a presença do prostanóide em uma cultura de células Th17 estimula a ação de IL-23, via EP2 e EP4, aumentando a expansão desse subtipo celular (Yao *et al.*, 2009). Desta forma, uma vez que a PGE<sub>2</sub> pode influenciar na diferenciação e expansão de linfócitos Th1 e Th17 de formas antagônicas, nossa hipótese neste estudo foi avaliar se esse prostanóide poderia também participar na plasticidade dos linfócitos Th17 para Th1. Para isso, partiu-se de uma cultura de linfócitos diferenciados em Th17, os quais foram submetidos a condições polarizantes para linfócitos Th1 na presença e ausência de PGE<sub>2</sub>.

Ao final do experimento I foi possível verificar que a plasticidade de células Th17 em Th1 foi mais acentuada na cultura em que houve adição de PGE<sub>2</sub>. No entanto, como ao final de três dias de diferenciação havia um percentual de células duplo negativas, antes do início da adição do meio polarizante para Th1, questionou-se se as células positivas para IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> seriam oriundas das que foram inicialmente células Th17 e que alteraram seu fenótipo, ou das células não diferenciadas (Th0) que em condição polarizante diferenciaram-se em Th1. Para elucidar essa questão, no terceiro dia de diferenciação dos linfócitos Th17, isolou-se as células secretoras de IL-17A por meio de *beads* magnéticas, comparando os resultados obtidos a partir dessa cultura purificada com uma cultura mista. Nota-se que no decorrer da cinética, as células que foram purificadas, responderam de forma mais eficiente aos reestímulos Th1, se comparadas ao experimento I, sugerindo que o aumento da população IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ocorreu devido a mecanismos de plasticidade dos linfócitos Th17 já diferenciados, e não por diferenciação de células T *naive*, mesmo que na cultura de células Th17 (Figura 8) manteve-se 20% de células não diferenciadas (Th0). Ensaios futuros, para eliminar essa população, visa-se a realização de *sorting* para células Th17.

Ainda, de acordo com o “Experimento II”, no décimo nono dia de cultura, na condição com PGE<sub>2</sub>, houve a maior produção de IFN- $\gamma$  e a menor produção de IL-17A, 31,40% e 0,48%, respectivamente. Apesar disso, ao analisar o gráfico correspondente ao resultado (Figura 9F), vê-se que há uma separação entre as distintas populações, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e uma população que aparece em diagonal no *dotplot*, sendo que, mesmo com o uso de controles, a maior porcentagem de células que correspondem a região IFN- $\gamma$  positiva do gráfico, nas outras condições experimentais, fazem parte da região duplo negativa.

Diversas análises foram realizadas, para tentar eliminar essa população utilizando a exclusão de *dublets* ou *debris* celulares. Porém observa-se a presença desta população não apenas aparece na Figura 9F, mas também em todos os resultados provenientes de citometria

de fluxo, tanto no Experimento I quanto no Experimento II. Apesar de os *dotplot* serem derivados de células previamente selecionada para células T CD4<sup>+</sup>, acredita-se que tal população seja composta por células mortas, de forma que estudos novos estão sendo realizados com o uso de Fixable Viability Stain 780 (#565388 – BD Horizon™), capaz de marcar células mortas, por difusão através de poros na membrana e ligar-se covalentemente a aminas intracelulares, eliminando, portanto, a população em questão, produzindo resultados mais confiáveis.

Tal população, mesmo sendo constante em todos os resultados de citometria de fluxo, foi mais evidente, e mais discrepante nas Figuras 9D e F, sendo mais significativa para o resultado final do experimento na Figura 9F. Acredita-se que esse fato, deve-se ao menor número de células na cultura para as respectivas condições experimentais. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa, podem auxiliar no entendimento do fenômeno observado, mostrando que a presença de PGE<sub>2</sub> inibe a diferenciação de linfócitos Th17, a concentração de 50 nM é capaz de inibir 50% da diferenciação, concentração vinte vezes menor do que a usada nos experimentos realizados nesse trabalho.

Com isso, mediante a limitação da análise por não utilizar até então o reagente Viability Stain, não se pode considerar o resultado obtido, apenas pela Figura 9F como conclusivo. Porém, concomitantemente à fenotipagem por citometria de fluxo, ainda foi realizado a quantificação de IFN- $\gamma$  e IL-17A a partir do sobrenadante das culturas celulares. Analisando a razão entre a produção dessas duas citocinas, percebe-se que o décimo nono dia de cultura teve a maior razão entre a produção dessas duas citocinas, com exceção da cultura cujas células Th17 foram purificadas e colocadas em meio polarizante Th1 com adição de PGE<sub>2</sub>. Esse resultado pode ser explicação pelo menor número de células na cultura, e também com um possível esgotamento dessas células, que foram super estimuladas desde o início do experimento pela PGE<sub>2</sub>. A maior razão entre a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17A foi observada no

décimo sexto dia de cultura na condição de células Th17 purificadas e cultivadas na presença de PGE<sub>2</sub>

Como citado anteriormente, estudos envolvendo a plasticidade de células Th17 e Th1, mostram que a mudança fenotípica ocorre devido a existência de células duplo positivas para ROR- $\gamma$ t e T-bet. A princípio nossa expectativa era que as células Th17, ao receber estímulos Th1, migrariam para a região de duplo positivo do gráfico, e posteriormente haveria uma diminuição na produção de IL-17A e mantivessem, apenas, a produção de INF- $\gamma$ . Porém, o perfil populacional observado, mostrou que, antes de aumentar a porcentagem de células produtoras de INF- $\gamma$ , os linfócitos anteriormente produtores de IL-17A migram para a região de duplo negativo do gráfico. Para compreender de forma mais clara o comportamento dessas células, torna-se necessário estudos futuros sobre o comportamento dos fatores de transcrição envolvidos nessa plasticidade.

Corroborando com os dados de citometria, a detecção de INF- $\gamma$  e IL-17A indicam o aumento de INF- $\gamma$  no sobrenadante de células e o aumento da porcentagem de células produtoras dessa citocina, nas condições em que as células foram cultivadas com PGE<sub>2</sub>, quando comparado às células que não foram expostas ao prostanóide. Estes resultados, juntamente com os dados de citometria, reforçam a hipótese de que esse mediador lipídico auxilia na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1. Para elucidar o mecanismo pelo qual a PGE<sub>2</sub> favoreceria esta plasticidade, novos estudos relacionados aos receptores EP, suas respectivas vias de sinalização e ativação de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células Th1 serão futuramente investigados.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados sugerimos que a prostaglandina E<sub>2</sub>, na presença de condições polarizantes Th1, aumenta a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, R. S.; NUTT, S. L. Deciphering the epigenetic code of T lymphocytes. *Immunol Rev*, v. 261, n. 1, p. 50-61, Sep 2014. ISSN 1600-065X (Electronic)0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123276> >.

ANNUNZIATO, F. et al. Reasons for rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders. *Semin Immunol*, v. 25, n. 4, p. 299-304, Nov 15 2013. ISSN 1096-3618 (Electronic)1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211040> >.

BONIFACE, K. et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med*, v. 206, n. 3, p. 535-48, Mar 16 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273625> >.

BOS, J. L. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*, v. 31, n. 12, p. 680-6, Dec 2006. ISSN 0968-0004 (Print)0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084085> >.

BRECKLER, M. et al. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal*, v. 23, n. 8, p. 1257-66, Aug 2011. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402149> >.

BREYER, R. M. et al. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 41, p. 661-90, 2001. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264472> >.

COSMI, L. et al. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*, v. 85, n. 1, p. 36-42, Jan 2014. ISSN 1552-4930 (Electronic)1552-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009159> >.

DEJANI, N. N. Prostaglandina E2 via EP4/IL-1R inibe a diferenciação de células Th17 durante a eferocitose de células infectadas. 2016. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

EGINAT, J. et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol*, v. 5, p. 630, 2014. ISSN 1664-3224 (Electronic)1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566245> >.

GERLO, S. et al. Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action. *Cell Mol Life Sci*, v. 68, n. 23, p. 3823-41, Dec 2011. ISSN 1420-9071 (Electronic)1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744067> >.

HIRATA, T.; NARUMIYA, S. Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Adv Immunol*, v. 116, p. 143-74, 2012. ISSN 1557-8445 (Electronic)0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063076> >.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, v. 188, n. 1, p. 21-8, Jan 1 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187483> >.

LEE, Y. K. et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*, v. 30, n. 1, p. 92-107, Jan 16 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19119024> >.

MONK, J. M. et al. Antagonizing arachidonic acid-derived eicosanoids reduces inflammatory Th17 and Th1 cell-mediated inflammation and colitis severity. *Mediators Inflamm*, v. 2014, p. 917149, 2014. ISSN 1466-1861 (Electronic)0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136149> >.

MURANSKI, P.; RESTIFO, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, v. 121, n. 13, p. 2402-14, Mar 28 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic)0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325835> >.

MURPHY, K. M.; STOCKINGER, B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol*, v. 11, n. 8, p. 674-80, Aug 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644573> >.

NAKAYAMADA, S. et al. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*, v. 24, n. 3, p. 297-302, Jun 2012. ISSN 1879-0372 (Electronic)0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341735> >.

NISTALA, K. et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 33, p. 14751-6, Aug 17 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679229> >.

SCHUSTER, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol*, v. 60, p. 221-42, 1998. ISSN 0066-4278 (Print)0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9558462> >.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, v. 69, p. 145-82, 2000. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966456> >.

SREERAMKUMAR, V.; FRESNO, M.; CUESTA, N. Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol*, v. 90, n. 6, p. 579-86, Jul 2012. ISSN 1440-1711 (Electronic)0818-9641 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946663> >.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*, v. 282, n. 16, p. 11613-7, Apr 20 2007. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329241> >.

TARTAR, D. M. et al. FoxP3+RORgammat+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes. *J Immunol*, v. 184, n. 7, p. 3377-85, Apr 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181889> >.

WEAVER, C. T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, v. 25, p. 821-52, 2007. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201677> >.

WEI, G. et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*, v. 30, n. 1, p. 155-67, Jan 16 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144320> >.

YAO, C. et al. Prostaglandin E(2) promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nature Communications*, v. 4, p. 1685, 04/0909/03/received02/28/accepted 2013. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3644078/> >.

YAO, C. et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med*, v. 15, n. 6, p. 633-40, Jun 2009. ISSN 1546-170X (Electronic)1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465928> >.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, v. 30, n. 5, p. 646-55, May 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464987> >.

## ANEXO I

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 02/2016

Interessada: VICTORIA EUGENIA NINO CASTAÑO

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Projeto: Papel de PGE2 na diferenciação de células Th1 e Th17 durante a eferocitose de células apoptóticas infectadas com *Streptococcus pneumoniae*

### Parecer nº 15/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Papel de PGE2 na diferenciação de células Th1 e Th17 durante a eferocitose de células apoptóticas infectadas com *Streptococcus pneumoniae*", apresentado pela pós-graduanda VICTORIA EUGENIA NINO CASTAÑO, sob orientação da Professora Doutora Alexandra Ivo de Medeiros, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2017, em formulário para este fim.

Araraquara, 14 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA