

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

ALLAN BOTINHON ORLANDO

**MECANISMO PELO QUAL PROSTAGLANDINA E₂ ORIUNDA DA
EFEROCITOSE INIBE A EXPRESSÃO DO IL-1R E A DIFERENCIAÇÃO DE
TH17**

Araraquara, SP

2018

ALLAN BOTINHON ORLANDO

**MECANISMO PELO QUAL PROSTAGLANDINA E₂ ORIUNDA DA
EFEROCITOSE INIBE A EXPRESSÃO DO IL-1R E A DIFERENCIAÇÃO DE
TH17**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Ivo de Medeiros

Coorientadora: Dr^ª. Naiara Naiana Dejana

Araraquara, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

O171m

Orlando, Allan Botinhon

Mecanismo pelo qual prostaglandina E₂ oriunda da Eferocitose inibe a expressão do IL-1R e a diferenciação de Th17 / Allan Botinhon Orlando. – Araraquara, 2018.

114 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Imunologia.

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros.

Coorientadora: Naiara Naiana Dejani.

1. Eferocitose. 2. Prostaglandina E₂. 3. Th17. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient.
II. Dejani, Naiara Naiana, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

ALLAN BOTINHON ORLANDO

MECANISMO PELO QUAL PGE2 ORIUNDA DA EFEROCITOSE INIBE A EXPRESSÃO DO IL-1R
E A DIFERENCIAÇÃO DE TH17

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 24 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA


ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
(orientadora)


CLESLEI FERNANDO ZANELLI

FABIANI GAI FRANTZ
(participante por vídeo-conferência)

Agradecimentos

À família:

Meus pais pelo apoio em todos os momentos e de todas as formas, sempre me dando a certeza de que estavam ao meu lado;

Minha irmã, pelo apoio e carinho.

Aos amigos:

Meus colegas de laboratório, por toda a ajuda com o meu trabalho e pelos momentos de descontração.

À co-orientadora:

Naiara, por ter me ajudado e ensinado desde iniciação científica, até hoje. Um exemplo de como persistir e gostar de ciência.

À professora:

Alexandra, pela paciência, insistência, cobrança e carinho, todos no momento correto;

À FCFAr/UNESP pelo apoio institucional;

E por fim à FAPESP (2011/17611-7, 2016/10964-5) pelo apoio financeiro

Resumo

A resolução de reações inflamatórias é caracterizada pela fagocitose de células mortas, processo denominado eferocitose. Como consequência deste processo, há a produção dos mediadores anti-inflamatórios, fator de transformação de crescimento (TGF- β), prostaglandina E₂ (PGE₂) e a interleucina-10 (IL-10). No entanto, atualmente sabe-se que a fagocitose de células apoptóticas infectadas direciona a produção de mediadores inflamatórios interleucina-6 (IL-6), interleucina-23 (IL-23) e TGF- β . Resultados obtidos recentemente por nosso grupo demonstram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas (iAC) com *Escherichia coli* por células dendríticas promove, além da produção de TGF- β , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6, a síntese de altos níveis de PGE₂. Além disso, observamos que a PGE₂, via receptor de prostaglandina E₂ 4 (EP4), inibe a diferenciação de linfócitos Th17 por meio da modulação da expressão do receptor de IL-1 (IL-1R) em linfócitos Th. Desta forma, o objetivo deste trabalho é elucidar o mecanismo pelo qual PGE₂, oriunda da eferocitose de células apoptóticas infectadas, inibe a expressão de IL-1R e a diferenciação de linfócitos Th17. Os resultados obtidos demonstram que PGE₂, via receptor EP4, induz a ativação de adenilato ciclase/PKA/EPAC, e que esta via de sinalização promove além da inibição de IL-1R, a inibição de um importante fator de transcrição envolvido na diferenciação de linfócitos Th17, STAT3. Sabe-se que a PGE₂ pode exercer suas funções supressoras na diferenciação de células Th17 pela ativação de SOCS, bem como promover a ativação de PI3K. No entanto, apesar da presença de PGE₂ aumentar a expressão de *socs1*, a inibição da fosforilação de STAT3 não parece ser mediada por SOCS1, tão pouco PI3K está envolvida na inibição da diferenciação de células Th17. O conjunto de resultados sugere que a inibição na diferenciação de linfócitos Th17 por PGE₂, durante a eferocitose de células infectadas, ocorre através da ativação do eixo EP4/adenilato ciclase/PKA/EPAC, que resulta na inibição direta ou indireta da fosforilação de STAT3.

Palavras-chave: Eferocitose, Prostaglandina E2, Th17.

Abstract

The expression of inflammatory reactions is characterized by phagocytosis of dead cells, a process called efferocytosis. As a consequence of this process, there is the production of anti-inflammatory mediators, transforming growth factor (TGF- β), prostaglandin E2 (PGE₂) and an interleukin-10 (IL-10). However, it is now known that phagocytosis of infected apoptotic cells is one of the responsible for the production of interleukin-6 (IL-6), interleukin-23 (IL-23) and TGF- β lung mediators. The results obtained by our group demonstrate that the phagocytosis of infected apoptotic cells (iCA) with *Escherichia coli* by dendritic cells promotes, in addition to the production of TGF- β , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6, high levels of PGE₂. In addition, PGE₂, via the prostaglandin E2 receptor (EP4), inhibits differentiation of Th17 lymphocytes by modulating IL-1 receptor (IL-1R) expression in Th lymphocytes. Thus, the objective of this work is to elucidate the mechanism by which PGE₂, derived from the efferocytosis of infected apoptotic cells, inhibits the expression of IL-1R and differentiation of Th17 lymphocytes. The results obtained demonstrate that PGE₂, via the EP4 receptor, induces the activation of adenylate cyclase / PKA / EPAC, and that this signaling pathway promotes in addition to the inhibition of IL-1R, the inhibition of an important transcription factor involved in the differentiation of Th17 lymphocytes, the STAT3. PGE₂ is known to exert its suppressor functions in the differentiation of Th17 cells by the activation of SOCS, as well as to promote the activation of PI3K. However, despite the presence of PGE₂ enhancing *socs1* expression, inhibition of STAT3 phosphorylation does not appear to be mediated by SOCS1, so little PI3K is involved in inhibiting Th17 cell differentiation. The set of results suggests that the inhibition in differentiation of Th17 lymphocytes by PGE₂ during the efferocytosis of infected cells occurs through the activation of the EP4 / adenylate cyclase / PKA / EPAC axis, which results in the direct or indirect inhibition of STAT3 phosphorylation.

Keywords: Efferocytosis, Prostaglandin E2, Th17.

Lista de Figuras

Fig 1. Mecanismo proposto sobre a ação da PGE ₂ durante diferenciação de linfócitos Th na presença de citocinas provenientes da eferocitose de células apoptóticas infectadas.	21
Fig 2. PGE ₂ presente em CM inibe a diferenciação de linfócitos T CD4 naive em Th17	28
Fig 3. PGE ₂ inibe a diferenciação de linfócitos via EP4	30
Fig 4. Ativação de PKA inibe a diferenciação de linfócitos	32
Fig 5. PGE ₂ inibe a expressão de IL-1R em linfócitos T CD4+ "naive"	34
Fig 6. Ativação de adenilato ciclase e PKA inibe a expressão de IL-1R	35
Fig 7. Inibição de STAT3p via EP4/PKA	37
Fig 8. Aumento na expressão de socs1 em células tratadas com CM	39
Fig 9. Padronização do silenciamento gênico de socs1	40
Fig 10. Tratamento de linfócitos com iKir SOCS1 - qPCR	41
Fig 11. Tratamento de linfócitos com iKir SOCS1:	43
Fig 12. Sinalização de PI3K é essencial para a diferenciação de linfócitos Th17	44
Fig 13. Ativação de PI3K via TCR.	45
Fig 14. PGE ₂ derivada da eferocitose de células apoptóticas infectadas inibe STAT3p e a diferenciação de Th17 via receptor EP4.....	46

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AC	<i>Apoptotic Cell</i>
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
BATF	<i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i>
COX	Ciclooxigenase
cPLA2	<i>Cytosolic phospholipases A2</i>
DC	Célula Dendrítica
CM	Meio Condicionado
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
EP Receptor	Receptor de Prostaglandina E
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
GPCR	Receptor Associado à Proteína G
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HIF1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
iAC	<i>infected apoptotic cell</i>
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Interleucina-1
IRF	<i>Interferon-Regulatory Factor</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
Myd88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PG	Prostaglandina
PKA	Fosfocinase A
PS	Fosfatidilserina

RORα	<i>RAR-related orphan receptor alpha</i>
RORγt	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Célula T <i>helper</i>
Treg	Célula T reguladora
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

Sumário

Capítulo 1	12
Introdução	13
Apoptose e eferocitose	13
Biologia de Linfócitos Th17	14
Efeito da eferocitose na diferenciação de linfócitos Th17	16
Prostaglandina E2 (PGE ₂) e vias de sinalização mediados pelos receptores EP	16
Envolvimento da PGE ₂ na diferenciação de linfócitos T helper	18
Suppressor of cytokine signaling (SOCS)	19
Objetivos Específicos	22
Materiais e Métodos	22
Animais	22
Diferenciação de DC a partir de precursores de Medula Óssea	22
Geração das células apoptóticas infectadas	23
Geração de Meio de cultura condicionado (CM) e Meio de cultura condicionado Indo (CM/Indo)	23
Obtenção de células T naive	23
Ensaio de diferenciação de células T na presença do CM ou CM/Indo	24
Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares por citometria de fluxo	24
Real Time PCR quantitativo (qPCR)	25
Phosflow por citometria de fluxo	25
Inibição da expressão do mRNA de socs1 e socs3 – Silenciamento gênico	26
Inibição de SOCS1 por meio de iKir SOCS1	26
Análise estatística	26
Resultados e discussão	27
Produção de Meio Condicionado oriundo da fagocitose de células apoptóticas infectadas	27
PGE ₂ inibe a diferenciação de linfócitos Th17 via ativação de adenilato ciclase e PKA	29
Altos níveis de PGE ₂ no CM inibe a expressão de IL-1R durante a diferenciação de células Th17	32
O eixo adenilato ciclase/PKA inibe a expressão de IL-1R	34
Sinalização de PGE ₂ via EP4/Adenilato Ciclase/PKA inibe a ativação de STAT3	35
PGE ₂ induz a expressão de SOCS1, mas não de SOCS3	38
Padronização da técnica de silenciamento utilizando a técnica de “small interference” - siRNA	39

Silenciamento funcional de SOCS1 - peptídeo inibidor de SOCS1 “Kinase inhibitory region” (iKir SOCS1).....	40
PI3K não participa da inibição de Th17 pela ação de PGE ₂	43
Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas	47
Capítulo 2	51
Intestinal host defense outcome is dictated by PGE ₂ production during efferocytosis of infected cells	52
Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions	82

Capítulo 1

Introdução

Apoptose e eferocitose

A morte celular por apoptose é caracterizada por uma sequência de alterações moleculares, como ativação de caspases e modificações em proteínas da membrana celular, bem como por alterações morfológicas, que incluem: fragmentação nuclear, condensação da cromatina e consequente diminuição do volume celular ¹.

Uma das principais alterações celulares no início do processo de apoptose ocorre mediante a exposição de fosfolípidos na porção externa da membrana. A fosfatidiletanolamina, a fosfatidilcolina e a fosfatidilserina são os principais fosfolípidos envolvidos nesse processo, sendo a fosfatidilserina (PS) a principal molécula envolvida no reconhecimento das células apoptóticas por fagócitos como macrófagos e células dendríticas ².

Após o reconhecimento das células apoptóticas pelos fagócitos, ocorre então a fagocitose dessas células, e esse processo é denominado eferocitose, palavra oriunda do latim “*efferre*” que significa “levar corpos ao túmulo”. Este processo tem se mostrado cada vez mais essencial para a manutenção da homeostase e prevenção de patologias ^{3,4}.

Para que ocorra a eferocitose, é necessário que ocorra uma sequência de eventos, que envolvem tanto o reconhecimento, quanto o englobamento das células apoptóticas pelos fagócitos ⁵. Para isso, inicialmente os corpos apoptóticos liberam os chamados sinais *find-me*, como por exemplo ATP, UTP, lisofosfatidilcolina e algumas quimiocinas, os quais exercem a quimioatração dos fagócitos até as células apoptóticas. Uma vez atraídos, os fagócitos reconhecem o corpo apoptótico por meio dos sinais *eat-me*, moléculas expostas na membrana da célula, que permitem a sua identificação como apoptótica. Essas moléculas podem ser PS, bem como sua forma oxidada e ICAM-3. Por

fim, a célula fagocitada é então degradada, e ocorre a liberação de mediadores de perfil principalmente anti-inflamatórios pelo fagócito ⁶.

Biologia de Linfócitos Th17

Os linfócitos T *helper* 17 (Th17) possuem uma atuação importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra microrganismos, em especial fungos e bactérias, porém também é uma das principais células envolvidas na patogenia de algumas doenças autoimunes ^{7,8}. A diferenciação de células Th17 em camundongos ocorre a partir de linfócitos T CD4 *naive* ativados por células dendríticas produtoras principalmente de TGF- β e IL-6 ⁹.

Os linfócitos Th *naive* expressam o receptor funcional de IL-6, ou seja, a subunidade α do receptor de IL-6 (IL-6R), assim como a subunidade sinalizadora, gp130. A interação da IL-6 ao complexo gp130 e IL-6R promove a dimerização do mesmo e a ativação de *janus kinase 1/2* (JAK1/2) resultando na fosforilação de resíduos de tirosinas. A fosforilação destes resíduos permite a interação com STAT1 e/ou STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription*) favorecendo a fosforilação, a dimerização dessas proteínas que translocam-se para o núcleo e exercem sua função de fatores de transcrição ¹⁰. Além disso, a interação de TGF- β ao seu respectivo receptor induz o aumento da expressão de IL-6R α o que auxilia no processo de ativação e diferenciação de células Th17. A ativação de STAT3, por IL-6R, juntamente com TGF- β , promove a indução dos fatores de transcrição *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR γ t), *RAR-related orphan receptor alpha* (ROR α) e *Runt-related transcription factor 1* (RUNX1), que resulta na diferenciação de células Th17 ^{11,12}. ROR γ t é considerado o fator de transcrição imprescindível na diferenciação de Th17, entretanto, apesar da importância de ROR γ t na expressão de IL-17, a deficiência deste fator de transcrição, parece não impedir totalmente a síntese de IL-17, sugerindo que outros fatores de transcrição poderiam auxiliar diretamente no aumento tanto da expressão de ROR γ t, como de IL-17 ¹³⁻¹⁶. Nesse contexto, outros fatores de transcrição como IRF4, *Basic leucine zipper*

transcription factor, *ATF-like* (BATF), STAT3 e *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF1 α) têm sido descritos durante o processo de ativação, auxiliando na estabilização e na fase final de diferenciação de células Th17^{17,18}.

Ainda, a sinalização via IL-6 e TGF- β promove o aumento da expressão dos receptores para IL-21 e IL-23⁹. A citocina IL-21 é produzida pela própria célula Th17 e age autocrinamente potencializando a diferenciação em Th17, enquanto que a citocina IL-23, produzida principalmente por células dendríticas, está associada com a manutenção e a expansão desse fenótipo.^{11,16,19} Adicionalmente, a ativação de STAT3, via sinalização de IL-6, parece ser a principal via de sinalização envolvida no aumento da expressão de IL-1R. Entretanto, embora IL-23 e IL-21 isoladamente não tenham demonstrado efeito na expressão do IL-1R, na presença de IL-6, a sinalização destas vias potencializam a expressão desse receptor. IL-1 β , em associação com IL-6, induz a expressão de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células Th17, como o ROR γ t e IRF4, estando estes diretamente envolvidos na expressão de IL-17. A importância do IL-1 β na diferenciação de linfócitos Th17 foi demonstrada utilizando linfócitos Th *naive* obtidos de animais deficientes do receptor de IL-1 β , cuja a deficiência desse receptor inibiu a diferenciação de Th17. Ainda, a citocina IL-1 β tem sido descrita como um importante mediador envolvido na diferenciação de células Th17 patogênicas, ou seja, produtoras de IL-17 e Interferon gama (IFN- γ)²⁰. Além disso, o envolvimento de IL-1 β na diferenciação de Th17 também tem sido demonstrado em modelos de doenças autoimunes. Ou seja, a ausência de receptor (animais *Il1r1*-/-) impossibilitou o desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Além disso, a sinalização via IL-1R mostrou-se essencial na indução da expressão de IRF4 e ROR γ t, visto que linfócitos isolados de animais *Il1r1*-/- não expressam estes fatores de transcrição^{21,22}.

Efeito da eferocitose na diferenciação de linfócitos Th17

O *clearance* de células apoptóticas pode ocorrer tanto na ausência de infecção, em uma situação de homeostase, ou durante um processo infeccioso em que há um grande acúmulo de células apoptóticas infectadas, ou seja, possuem no seu interior *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP). Sabe-se que a eferocitose de células infectadas com *E. coli* induz a produção de IL-23, TGF- β e IL-6 por células dendríticas. O papel desses mediadores solúveis na diferenciação de células Th17 foi comprovado através da estimulação de células T “naive”, com anti-CD3 e anti-CD28, na presença do meio condicionado oriundo de células dendríticas (DC) incubadas com células apoptóticas infectadas²³. A importância da presença do PAMP no interior dessas células apoptóticas foi confirmada utilizando meio de cultura oriundo de DC deficientes em *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) e *Myeloid Differentiation Primary Response 88* (MyD88). Nessas condições o meio de cultura condicionado, oriundo de DC deficientes em TRIF e MyD88, impediu a diferenciação de células Th17 e promoveu a diferenciação de células Treg²³. Apesar da vasta literatura sobre os mediadores envolvidos na diferenciação de células Th17, esse foi o primeiro estudo que propôs um modelo fisiológico de diferenciação de células Th17, no qual a fagocitose de células apoptóticas infectadas por bactéria, como fonte de citocinas anti-inflamatória (TGF- β) e pró-inflamatória (IL-6), atua gerando condições ideais para a diferenciação de células Th17.

Prostaglandina E2 (PGE₂) e vias de sinalização mediados pelos receptores EP

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos oriundos do metabolismo do ácido araquidônico liberado de fosfolípidos de membranas pelas fosfolipases (cPLA2)²⁴. O ácido araquidônico liberado pode ser metabolizado pela cicloxigenase 1 (COX-1) e cicloxigenase 2 (COX-2), associadas às membranas nuclear e do retículo endoplasmático, com sua porção de ligação ao substrato orientada para o citoplasma e geram o metabólito

intermediário, denominado PGH₂. Enquanto a COX-1 é uma enzima constitutiva, a enzima COX-2 é induzida em situações inflamatórias e atua potencializando a produção de prostaglandinas²⁵. As sintases responsáveis pela metabolização da PGH₂ determinam o destino da mesma, podendo ocorrer a formação de PGI₂, PGF₂, PGD₂, PGE₂ ou tromboxanos A₂. Esses prostanóides são liberados pela célula através de um transportador de membrana e, devido sua curta meia vida, logo exercem sua função efetora de forma autócrina e parácrina²⁶.

A PGE₂ é uma das mais abundantes PGs produzidas pelas células de nossos tecidos e exerce sua função através de 4 subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses subtipos são receptores associados à proteína G (GPCR) e variam quanto a propriedades de ligação à PGE₂, distribuição tecidual, expressão e tipo de proteína G²⁷. Dentre esses, EP1, EP2 e EP4 são expressos em altos níveis em células Th *naive* em camundongos, enquanto EP3 apresenta uma baixa ou inexistente expressão nesses linfócitos^{28,29}. Boniface e Bak-Jensen descreveram que a ativação de linfócitos Th *naive* humanos CD4⁺CD45RO⁻ aumenta a expressão dos receptores EP2 e EP4.

EP1 é um receptor acoplado a proteína G α q/p e promove o aumento de Ca²⁺ intracelular, EP2 e EP4 estão acoplados a subunidade α estimuladora da proteína G (G α s) e promovem o aumento da concentração intracelular de adenosina mono fosfato cíclica (cAMP)^{30,31}. Os níveis intracelulares de cAMP são regulados pela atividade de dois tipos de enzimas: a adenilato ciclase (AC) e as fosfodiesterases (PDE). O aumento intracelular de cAMP, um importante segundo mensageiro, leva a ativação de duas proteínas efetoras: a proteína quinase A (PKA) e a proteína de troca diretamente ativada por cAMP (EPAC)^{32,33}.

A PKA é um tetrâmero constituído de duas subunidades reguladoras e de duas subunidades catalíticas. A ligação do cAMP à subunidade reguladora de PKA promove uma mudança conformacional que leva à dissociação das subunidades catalíticas, que se difundem para dentro do núcleo e promovem a fosforilação de seus substratos. A

fosforilação de substratos nucleares e citoplasmáticos mediada por PKA é importante para múltiplas funções celulares, incluindo metabolismo, diferenciação, transmissão sináptica, atividade de canais iônicos, crescimento e desenvolvimento celular.

A EPAC contém um domínio de ligação ao cAMP semelhante à subunidade reguladora de PKA, além de um domínio de fator de troca (GEF). A EPAC se liga ao cAMP, ativando uma proteína da superfamília Ras, chamada Rap1, que tem sido relacionada no controle da adesão celular e formação de junções celulares. Assim, o aumento nos níveis intracelulares de cAMP pode resultar na ativação tanto de PKA quanto de EPAC, o que depende da concentração e localização dessas duas enzimas dentro da célula ³².

Sabe-se que a sinalização de PGE₂ através do receptor EP4, é capaz de ativar além da via que envolve adenilato ciclase/PKA/EPAC, a via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) ³⁴. A PI3K exerce um papel importante, contribuindo com a diferenciação de linfócitos Th17, como foi demonstrado em linfócitos T que expressavam uma PI3K inativa, foram incapazes de se diferenciar em Th17 ³⁵.

Envolvimento da PGE₂ na diferenciação de linfócitos T helper

A participação de PGE₂ em células da imunidade adaptativa vem sendo desvendada nos últimos anos e, diferente dos efeitos supressores previamente descritos na ativação de células T *naive*, recentes trabalhos demonstram uma importante função imunoestimuladora desse prostanóide no desenvolvimento de células Th17 e Th1 em vários modelos de infecção e autoimunidade ^{24,25}. O papel supressor da PGE₂, via EP2, foi demonstrado pela inibição da capacidade proliferativa de linfócitos T usando um modelo de reação linfocitária mista. Esse efeito supressor da PGE₂, assim como de um agonista de EP2 (8-CPT-cAMP), em células T periféricas parece ser mediado por PKA-Csk, que atua antagonizando a sinalização de TCR e impedindo a ativação da quinase da família Src (Lck) ³⁶.

Ainda em uma visão imunossupressora, trabalhos destacam o papel da PGE₂ na diferenciação de células Treg. A PGE₂ pode promover a diferenciação de células Treg pelo aumento da expressão do fator de transcrição FOXP3, aumentando a função supressora dessas células³⁷. Contradizendo esses efeitos, outros estudos demonstram que os efeitos supressores da PGE₂ em células T podem ser revertidos pela forte interação mediada por TCR e o complexo CD3. A ativação de linfócitos na presença de altas concentrações de anticorpos anti-CD28/anti-CD3, na presença de PGE₂, resulta no aumento da porcentagem de linfócitos Th1. Curiosamente, essa sinalização facilitadora da PGE₂ ocorre via EP2 e EP4, porém é mediada pela ativação de PI3K³⁴.

No âmbito das células Th17, a participação de PGE₂ na diferenciação deste subtipo celular parece ser dependente dos receptores EP2 e EP4 e foi comprovada em diferentes modelos experimentais²⁹. Em modelo murino de encefalomielite autoimune experimental (EAE) foi demonstrado que a PGE₂ atua via receptores EP2 e EP4, e sinaliza via cAMP-PKA, agindo sinergicamente com IL-23 na expansão de células Th17. Além disso, a adição exógena da PGE₂ pode aumentar a produção de IL-23 por DCs colaborando indiretamente na expansão de Th17. Por outro lado, foi demonstrado que a PGE₂ inibe a diferenciação de células Th17 e a resposta imune antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*⁷.

Suppressor of cytokine signaling (SOCS)

A interação da citocina ao seu receptor resulta na ativação de JAK quinases que fosforilam resíduos de tirosinas, criando locais de ancoragem para as STATs, seguido da ativação e dimerização dessas STATs permitindo a translocação para o núcleo e a interação as suas respectivas regiões promotoras³⁸. A duração e a intensidade desses sinais são regulados pela ação de proteínas com funções supressoras que interferem na sinalização JAK/STAT, denominadas SOCS, *Suppressor of cytokine signaling*³⁹. Estas, constituem uma família de proteínas composta de sete membros (SOCS1-SOCS7). A princípio, acreditava-se que cada representante dessas proteínas exercia uma função

inibitória intracelular específica para as diferentes STATs. Por exemplo, a SOCS3 inibe a STAT3 impedindo desta forma a translocação deste fator de transcrição para o núcleo e a expressão de genes específicos ⁴⁰. No entanto, foi comprovado que a ação inibidora de algumas SOCS pode ocorrer em diferentes STATs. Por exemplo, SOCS1 que inicialmente era descrita pela inibição da ativação de STAT1, também possui ações inibitórias em STAT3 ⁴¹, como foi demonstrado em camundongos, que após o tratamento com inibidor de SOCS1, apresentaram maior ativação de STAT3 em células peritoneais ⁴².

Uma vez que SOCS3 apresenta esse efeito supressor sobre STAT3, essa proteína também exerce um efeito supressor na diferenciação de linfócitos Th17. Sabe-se que as células tronco mesenquimais são capazes de induzir a expressão de SOCS3 em linfócitos T^{naive}, via IFN- γ , e isso inibiu a diferenciação em linfócitos Th17, por meio da inibição de STAT3 ⁴¹.

Tem sido demonstrado que a PGE₂, juntamente com IL-6 ou IL-10, é capaz de diminuir a atividade de STAT3 em macrófagos, e isto se deve ao aumento na expressão de SOCS3 ⁴³. Recentes dados obtidos por nosso grupo demonstram que a eferocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promove a liberação de TGF- β , IL-6, assim como a síntese de IL-1 β e PGE₂. A presença deste prostanóide inibe a expressão do IL-1R e a diferenciação de Th17 ⁴⁴, no entanto os mecanismos e as vias de sinalização pelos quais essa inibição ocorre ainda não foram investigados. Desta forma, talvez o aumento de SOCS3 poderia ser um dos mecanismos pelos quais a PGE₂ inibiria a diferenciação de linfócitos Th17 no contexto da eferocitose.

Estudos demonstram que, em alguns tipos celulares, SOCS3 é regulada positivamente pela ação da PGE₂ ⁴⁵, no entanto nada se sabe quanto ao efeito deste prostanóide, tão pouco o envolvimento de SOCS3, durante o processo de inibição da diferenciação para Th17 no contexto da eferocitose. Considerando que STAT3 é um importante fator de transcrição envolvido na expressão do IL-1R e na diferenciação de

células Th17 e a PGE₂ é capaz de aumentar a expressão de SOCS3, a hipótese deste estudo é que PGE₂, oriunda da fagocitose de células apoptóticas infectadas, induziria a expressão de SOCS3 levando a modulação negativa da expressão do IL-1R e da diferenciação de linfócitos Th17.

Figura 1. Hipótese do Problema

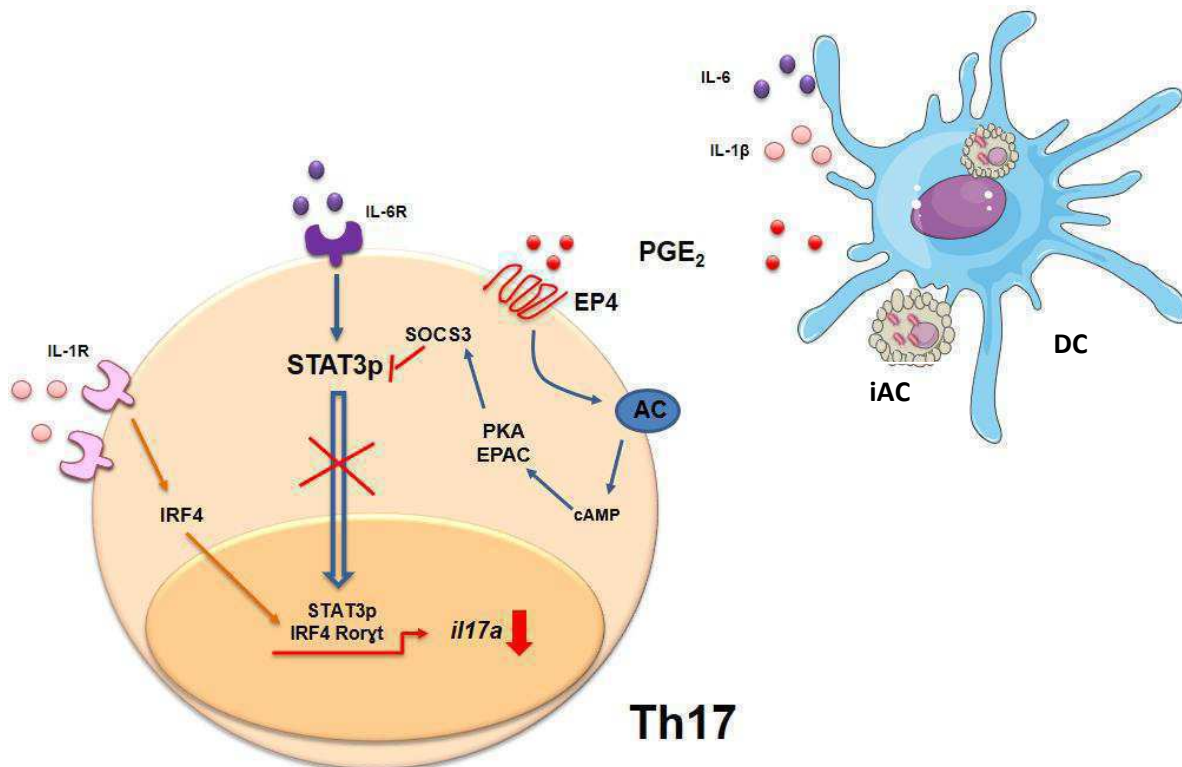


Fig 1. Mecanismo proposto sobre a ação da PGE₂ durante diferenciação de linfócitos Th na presença de citocinas provenientes da fagocitose de células apoptóticas infectadas. A PGE₂, via EP4, age aumentando cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) pela ativação de adenilato ciclase (AC) que, por sua vez, ativa PKA, induzindo SOCS3, a qual leva a inibição de STAT3, e essa cascata culmina na modulação negativa da expressão do il17a e do fator de transcrição IRF4, comprometendo a diferenciação de Th17. iAC = célula apoptótica infectada; DC= Célula dendrítica; Th17= Linfócito T helper 17.

Conclusão

Os resultados apresentados indicam que a PGE₂, oriunda da fagocitose de células apoptóticas infectadas, é capaz de inibir a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naive* em Th17, através do receptor EP4 resultando no aumento de cAMP intracelular (Fig. 14A). O aumento deste mensageiro secundário leva a ativação PKA e inibição da fosforilação de STAT3 (Fig. 14B), impedindo desta forma, a translocação desse fator de transcrição ao núcleo. Além disso, a ativação do eixo EP4/adenilato ciclase/PKA promove a inibição da expressão de IL-1R, receptor que exerce grande importância na diferenciação de linfócitos Th17, e sua inibição repercute na inibição desse subtipo linfocitário. No entanto, apesar de PGE₂ induzir a expressão de *socs1* (Fig. 14C), bem como de PI3K (Fig. 14D), não foi possível concluir se ambas estão envolvidas no mecanismo de inibição de Th17 através das estratégias farmacológicas utilizadas.

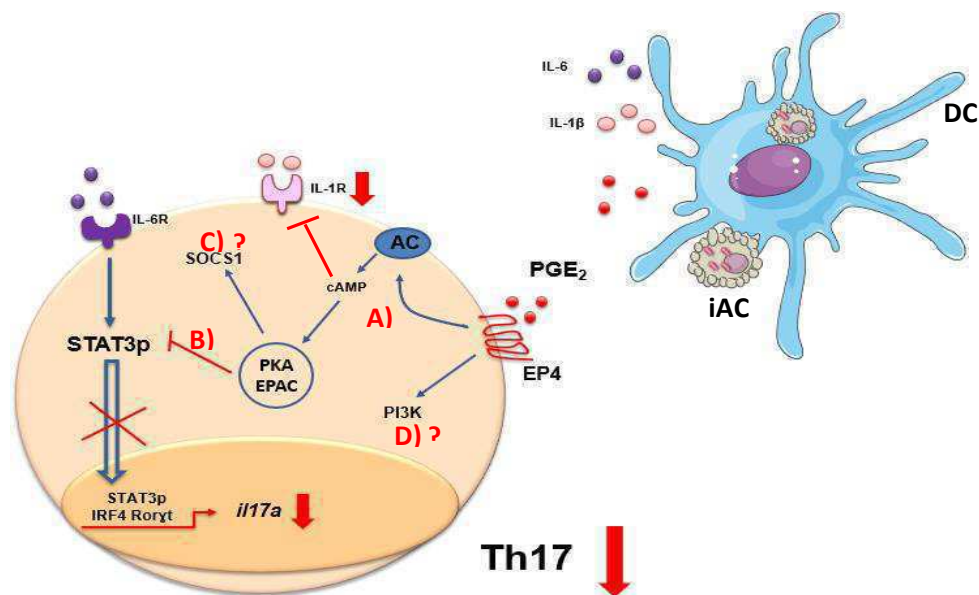


Fig 14. PGE₂ derivada da eferocitose de células apoptóticas infectadas inibe STAT3p e a diferenciação de Th17 via receptor EP4. A) PGE₂, ativa o receptor EP4, desencadeia a sinalização via adenilato ciclase/PKA/EPAC. B) PGE₂ via adenilato ciclase/PKA/EPAC inibe STAT3p. C) e D) PGE₂ induz o aumento na expressão de SOCS1 e PI3K, no entanto o envolvimento de ambas durante a inibição de linfócitos Th17 ainda requer mais estudos. iAC = célula apoptótica infectada; DC= Célula dendrítica; Th17= Linfócito T *helper* 17; AC = Adenilato Ciclase.

Referências Bibliográficas

- 1 Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C. & Kroemer, G. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Reports* **13**, 322-330, doi:10.1038/embor.2012.19 (2012).
- 2 Roos, A. *et al.* Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* **34**, 921-929, doi:10.1002/eji.200424904 (2004).
- 3 Elliott, M. R., Koster, K. M. & Murphy, P. S. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology* **198**, 1387 (2017).
- 4 Henson, P. M. Cell Removal: Efferocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **33**, 127-144, doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125315 (2017).
- 5 Martin, C. J., Peters, K. N. & Behar, S. M. Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control. *Current opinion in microbiology* **17**, 17-23, doi:10.1016/j.mib.2013.10.007 (2014).
- 6 Ravichandran, K. S. & Lorenz, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* **7**, 964-974, doi:10.1038/nri2214 (2007).
- 7 Valdez, P. A. *et al.* Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 function and interleukin-17 expression in T cells. *Immunity* **36**, 668-679, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.013 (2012).
- 8 Hoe, E. *et al.* The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiology and Immunology* **61**, 49-56, doi:10.1111/1348-0421.12471 (2017).
- 9 Waite, J. C. & Skokos, D. Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Inflammation* **2012**, doi:10.1155/2012/819467 (2012).
- 10 Calabrese, L. H. & Rose-John, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 720-727, doi:10.1038/nrrheum.2014.127 (2014).
- 11 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485-517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- 12 Asadzadeh, Z. *et al.* The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology*, doi:https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.015 (2017).
- 13 Brustle, A. *et al.* The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology* **8**, 958-966, doi:10.1038/ni1500 (2007).
- 14 Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405-409, doi:10.1038/nature08114 (2009).
- 15 Okamoto, K. *et al.* IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* **464**, 1381-1385, doi:10.1038/nature08922 (2010).
- 16 Zhang, F., Fuss, I. J., Yang, Z. & Strober, W. Transcription of RORgammat in developing Th17 cells is regulated by E-proteins. *Mucosal immunology* **7**, 521-532, doi:10.1038/mi.2013.69 (2014).
- 17 Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402-2414, doi:10.1182/blood-2012-09-378653 (2013).
- 18 Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V. & Cua, D. J. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews. Immunology* **14**, 585-600, doi:10.1038/nri3707 (2014).
- 19 Zhang, F., Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* **9**, 1297-1306, doi:10.1038/ni.1663 (2008).
- 20 Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology* **8**, 942-949, doi:10.1038/ni1496 (2007).

- 21 Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* **30**, 576-587, doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007 (2009).
- 22 Martin, B. N. *et al.* T cell-intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature immunology* **17**, 583-592, doi:10.1038/ni.3389 (2016).
- 23 Torchinsky, M. B., Garaude, J., Martin, A. P. & Blander, J. M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation. *Nature* **458**, 78-82, doi:http://www.nature.com/nature/journal/v458/n7234/supinfo/nature07781_S1.html (2009).
- 24 Burke, J. E. & Dennis, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovascular drugs and therapy/ sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **23**, 49-59, doi:10.1007/s10557-008-6132-9 (2009).
- 25 Smith, W. L., DeWitt, D. L. & Garavito, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* **69**, 145-182, doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145 (2000).
- 26 Schuster, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annual review of physiology* **60**, 221-242, doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.221 (1998).
- 27 Sugimoto, Y. & Narumiya, S. Prostaglandin E receptors. *The Journal of biological chemistry* **282**, 11613-11617, doi:10.1074/jbc.R600038200 (2007).
- 28 Nagamachi, M. *et al.* Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *The Journal of experimental medicine* **204**, 2865-2874, doi:10.1084/jem.20070773 (2007).
- 29 Boniface, K. *et al.* Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *The Journal of experimental medicine* **206**, 535-548, doi:10.1084/jem.20082293 (2009).
- 30 Hata, A. N. & Breyer, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics* **103**, 147-166, doi:10.1016/j.pharmthera.2004.06.003 (2004).
- 31 Flórez-Grau, G. *et al.* Up-regulation of EP2 and EP3 receptors in human tolerogenic dendritic cells boosts the immunosuppressive activity of PGE2. *Journal of Leukocyte Biology* **102**, 881-895, doi:10.1189/jlb.2A1216-526R (2017).
- 32 Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T. & Mei, F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **40**, 651-662 (2008).
- 33 Wehbi, V. L. & Taskén, K. Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T cells – Role of Anchored Protein Kinase A Signaling Units. *Frontiers in Immunology* **7**, 222, doi:10.3389/fimmu.2016.00222 (2016).
- 34 Yao, C. *et al.* Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nature medicine* **15**, 633-640, doi:10.1038/nm.1968 (2009).
- 35 Haylock-Jacobs, S. *et al.* PI3K δ drives the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting effector T cell apoptosis and promoting Th17 differentiation. *Journal of Autoimmunity* **36**, 278-287, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.02.006> (2011).
- 36 Vang, T. *et al.* Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *The Journal of experimental medicine* **193**, 497-507 (2001).
- 37 Baratelli, F. *et al.* Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* **175**, 1483-1490 (2005).
- 38 Jatiani, S. S., Baker, S. J., Silverman, L. R. & Reddy, E. P. Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. *Genes & cancer* **1**, 979-993, doi:10.1177/1947601910397187 (2010).

- 39 Yoshimura, A., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Hanada, T. & Yasukawa, H. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Frontiers in immunology* **3**, 20, doi:10.3389/fimmu.2012.00020 (2012).
- 40 Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H. & Yoshimura, A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 980-985, doi:10.1161/ATVBAHA.110.207464 (2011).
- 41 Liu, X. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN- γ -mediated SOCS3 activation. *Immunologic Research* **61**, 219-229, doi:10.1007/s12026-014-8612-2 (2015).
- 42 Piñeros Alvarez, A. R. *et al.* SOCS1 is a negative regulator of metabolic reprogramming during sepsis. *JCI Insight* **2**, e92530, doi:10.1172/jci.insight.92530 (2017).
- 43 Cheon, H. *et al.* Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. *J Immunol* **177**, 1092-1100 (2006).
- 44 Dejana, N. *Prostaglandin E2 via EP4/IL-1R inhibits Th17 cell differentiation during efferocytosis of infected cells* (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) thesis, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2016, (2016).
- 45 Taleb, S. *et al.* Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *The Journal of experimental medicine* **206**, 2067-2077, doi:10.1084/jem.20090545 (2009).
- 46 Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* **223**, 77-92, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-X) (1999).
- 47 Penteado, L. d. A. *et al.* Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. *Immunology* **151**, 304-313, doi:10.1111/imm.12731 (2017).
- 48 Valdez, P. A. *et al.* Prostaglandin E2 Suppresses Antifungal Immunity by Inhibiting Interferon Regulatory Factor 4 Function and Interleukin-17 Expression in T Cells. *Immunity* **36**, 668-679, doi:10.1016/j.immuni.2012.02.013 (2012).
- 49 Kofler, D. M. *et al.* Decreased RORC-dependent silencing of prostaglandin receptor EP2 induces autoimmune Th17 cells. *The Journal of Clinical Investigation* **124**, 2513-2522, doi:10.1172/JCI72973 (2014).
- 50 Aronoff, D. M., Canetti, C., Serezani, C. H., Luo, M. & Peters-Golden, M. Cutting Edge: Macrophage Inhibition by Cyclic AMP (cAMP): Differential Roles of Protein Kinase A and Exchange Protein Directly Activated by cAMP-1. *The Journal of Immunology* **174**, 595 (2005).
- 51 Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1685-1691, doi:10.1084/jem.20060285 (2006).
- 52 Zielinski, C. E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* **484**, 514, doi:10.1038/nature10957 <https://www.nature.com/articles/nature10957#supplementary-information> (2012).
- 53 Martin, B. N. *et al.* T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature immunology* **17**, 583-592, doi:10.1038/ni.3389 (2016).
- 54 Chung, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by IL-1 signaling. *Immunity* **30**, 576-587, doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007 (2009).
- 55 Hirahara, K. *et al.* Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 425-434, doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.006 (2010).

- 56 Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H. & Yoshimura, A. Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and JAK/STAT Pathways. *Regulation of T-Cell Inflammation by SOCS1 and SOCS3* **31**, 980-985, doi:10.1161/atvbaha.110.207464 (2011).
- 57 Ahmed, C. M. I., Larkin, J. & Johnson, H. M. SOCS1 Mimetics and Antagonists: A Complementary Approach to Positive and Negative Regulation of Immune Function. *Frontiers in immunology* **6**, 183, doi:10.3389/fimmu.2015.00183 (2015).
- 58 Yao, C. *et al.* Prostaglandin E2–EP4 signaling promotes immune inflammation through TH1 cell differentiation and TH17 cell expansion. *Nature Medicine* **15**, 633, doi:10.1038/nm.1968
- <https://www.nature.com/articles/nm.1968#supplementary-information> (2009).
- 59 Srivastava, N., Sudan, R. & Kerr, W. G. Role of Inositol Poly-Phosphatases and Their Targets in T Cell Biology. *Frontiers in Immunology* **4**, 288, doi:10.3389/fimmu.2013.00288 (2013).