

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia**

JÚLIA MIRANDA RIBEIRO BAZZANO

**Influência da prostaglandina E₂ na plasticidade de linfócitos
Th17/Th1 no contexto da encefalomielite autoimune experimental**

Araraquara, SP

2019

JÚLIA MIRANDA RIBEIRO BAZZANO

Influência da prostaglandina E₂ na plasticidade de linfócitos Th₁₇/Th₁ no contexto da encefalomielite autoimune experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração em Imunologia.

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

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias

Araraquara, SP

2019

B364i

Bazzano, Júlia Miranda Ribeiro.

Influência da prostaglandina E2 na plasticidade de linfócitos Th17/Th1 no contexto da encefalomielite autoimune experimental / Júlia Miranda Ribeiro Bazzano. – Araraquara, 2019.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação Em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração em Imunologia.

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros.

Coorientador: Alessandro dos Santos Farias.

1. PGE2. 2. Plasticidade. 3. Th17/Th1. 4. EAE. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient. II. Farias, Alessandro dos Santos, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

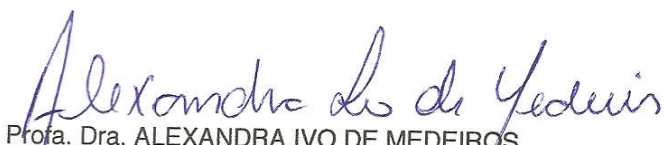
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência da prostaglandina E2 na plasticidade de linfócitos Th17/Th1 no contexto da encefalomielite autoimune experimental

AUTORA: JÚLIA MIRANDA RIBEIRO BAZZANO

ORIENTADORA: ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

COORIENTADOR: ALESSANDRO DOS SANTOS FARIAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Imunologia pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. ANA PAULA MOREIRA SEREZANI

Depto. de Medicina / Vanderbilt University Medical Center

Prof. Dr. ALEXANDRE SALGADO BASSO

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

Araraquara, 16 de maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho: Processo 130977/2017-9, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: IC Processo FAPESP nº 2014/04961-8 e Processo FAPESP nº 2016/01978-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A prostaglandina E₂ (PGE₂) é um mediador lipídico que participa tanto na diferenciação como na expansão de linfócitos T *helper* (Th) Th1 e Th17. Esse prostanoide vem sendo descrito como um importante mediador envolvido no agravamento da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). A EAE é uma doença mediada por células Th1/Th17 autorreativas, responsáveis pela intensa resposta inflamatória contra antígenos do sistema nervoso central (SNC). Alguns estudos descrevem que a inibição da síntese desse prostanoide, ou o bloqueio de seus receptores EP, reduzem os níveis de IL-17A e IFN- γ e atenuam drasticamente o desenvolvimento da doença. A coexistência de linfócitos Th1 e Th17 na EAE, assim como a presença de células Th17 produtoras de IFN- γ (Th1-like) no SNC sugerem uma possível plasticidade destas subpopulações de linfócitos. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura se a presença de PGE₂, presente no SNC, estaria envolvida na plasticidade de linfócitos Th17 em Th1 nessa autoimunidade. Portanto, a *hipótese desse estudo é que as células Th17 migrariam para o SNC e desencadeariam o recrutamento de células inflamatórias e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença. A presença de PGE₂, associado a esse microambiente inflamatório, favoreceria a plasticidade das células Th17 para um padrão Th1, resultando na diferenciação de células T CD4⁺ patogênicas (IL17⁺IFN γ ⁺) e células Th1-like*. Os resultados obtidos demonstram que as células Th17, quando cultivadas em condições polarizantes para Th1, foram hábeis em se converterem em linfócitos Th1-like, porém, a presença de PGE₂ aumenta a porcentagem de células T CD4⁺IFN- γ ⁺, via EP4 e, possivelmente, pela via de adenilato ciclase/PKA. Além disso, o tratamento com indometacina, em animais *III7^{re}/mTmG* imunizados com MOG, durante a fase aguda da doença, resultou na diminuição de células Th17 produtoras de IFN- γ no SNC de camundongos que desenvolveram a EAE, sem causar a alteração no *score* clínico da doença e no infiltrado celular.

Palavras-chave: PGE₂. Plasticidade. Th17/Th1. EAE.

ABSTRACT

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is a lipid mediator which participates in both differentiation and expansion of T helper (Th) Th1 and Th17. This prostanoid has been described as an important mediator involved in the worsening of EAE, an experimental model for Multiple Sclerosis in humans. EAE is a disease mediated for autoreactive Th1/Th17 cells, responsible for an intense inflammatory response against central nervous system (CNS) antigens. Some studies have described that inhibition of PGE₂ synthesis or blockage of its receptors decrease IL-17A and IFN- γ levels and attenuate drastically the disease development. The coexistence of Th17 and Th1 lymphocytes together with IFN- γ -producing Th17 cells (Th1-like) at CNS suggests a possible plasticity between these subtypes of lymphocytes in EAE. However, until now, there are no reports in the literature if the presence of PGE₂ in the CNS could be involved in Th17 to Th1 plasticity during EAE. Therefore, *the hypothesis of this study is that Th17 cells could migrate to the central nervous system and trigger the recruitment of inflammatory cells and the appearance of EAE first clinical symptoms. The presence of PGE₂, associated with the inflammatory microenvironment, could induce Th17 plasticity to Th1 lymphocytes, resulting in the differentiation of pathogenic T CD4⁺ (IL17⁺IFN γ ⁺) and Th1-like cells, responsible for tissue damage.* Recent data from our research group showed that Th17 cells, when cultured in Th1 polarizing condition, were capable to differentiate into Th1-like lymphocytes, however, in the presence of PGE₂, T CD4⁺IFN- γ ⁺ cells percentage is increased, through EP4 signaling, possible through cyclase adenylate/PKA activation pathway. Furthermore, the treatment of *Il17^{cre}/mTmG* mice immunized with MOG with indomethacin, during the acute phase of the disease, impairs IFN- γ producing Th17 cells inside the CNS of mice which developed EAE, however, no change in the clinical score of the disease and cellular infiltrate was observed.

Keywords: PGE₂. Plasticity. Th17/Th1. EAE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenciação de Linfócitos T CD4 ⁺ <i>naive</i> .	13
Figura 2 – Modificações epigenéticas modulam a plasticidade entre linfócitos Th17 e Th1.	15
Figura 3 – Prostaglandina E ₂ : síntese e vias de sinalização.	16
Figura 4 – Hipótese do Estudo	21
Figura 5 – Diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺ <i>naive</i> em linfócitos Th17.	27
Figura 6 – A presença de PGE ₂ na CP-Th1 resulta em um aumento na eficiência na conversão de células Th17 em Th1- <i>like</i>	28
Figura 7 - Expressão de receptores EP2 e EP4 na superfície de linfócitos Th1- <i>like</i> .	30
Figura 8 - Efeito de antagonistas de receptores EP2 e EP4, na plasticidade de células Th17 em Th1- <i>like</i> , em presença de IL-2 e IL-12.	32
Figura 9 - Efeito da inibição de PKA e Epac na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1 em presença de CP-Th1.	34
Figura 10 – Teste de inibidores de PKA na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1- <i>like</i> .	35
Figura 11 – Uso de ativadores de AC, PKA e Epac para determinação da via de sinalização	37
Figura 12 - Esquema representativo do funcionamento do animal <i>Il17cre/mTmG</i> .	38
Figura 13 - Expressão de GFP por linfócitos Th1-mTmG e Th17-mTmG.	39
Figura 14 – PGE ₂ age sinergicamente com IL-2 e IL-12 aumentando a produção de IFN- γ por células ex-Th17.	40
Figura 15 - Esquema de imunização e tratamento dos animais para indução da EAE.	41
Figura 16 – Tratamento com indometacina não alterou o <i>score</i> clínico dos animais.	42
Figura 17 – Indução ativa de EAE em animais <i>Il17a^{cre}/mTmG</i> : Delineamento Experimental.	43
Figura 18 - Linfócitos Th17-GFP ⁺ presentes dos linfonodos drenantes e no SNC de animais que desenvolveram EAE.	44
Figura 19 - PGE ₂ auxilia na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1 <i>in vivo</i> .	45
Figura 20 – Conclusão do Estudo	50
Figura 2 - Purificação de linfócitos T CD4 ⁺ CCR6 ⁺ .	58
Figura 3 - Plasticidade de linfócitos T CD4 ⁺ CCR6 ⁺ e T CD4 ⁺ CCR6 ⁻ .	59
Figura 3 - Expressão de receptores de quimiocinas durante a plasticidade de células Th17/Th1 na presença ou ausência de PGE ₂ .	63

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

AA Ácido araquidônico

AACOCF3 *arachidonyl trifluoromethyl ketone*

AC adenilato ciclase

Akt *protein kinase B*

AMPc adenosina monofosfato cíclica

ATP adenosina trifosfato

CCL quimiocina ligante (C-C *motif*)

CCR receptor de quimiocinas C-C

CD *cluster of differentiation*

CFA *complete adjuvante of freund*

COX ciclooxigenase

cPLA2 *calcium-dependent phospholipase A2*

CP-Th1 condição polarizante para linfócitos Th1

CP-Th1 condição polarizante para linfócitos Th17

CREB *cAMP response element binding protein*

CXCR receptor de quimiocinas C-X-C

EAE encefalomielite autoimune experimental

EM esclerose múltipla

EP receptor de prostaglandina E

Epac *exchange protein directly activated by cAMP*

FOXP3 *forkhead box P3*

FVS *fixable viability dye*

GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPCR receptor associado à proteína G

HIF1 α hypoxia-inducible factor 1-alpha

iAC inibidor de adenilato ciclase

iEpac inibidor de *exchange protein directly activated by cAMP*

IFN- γ interferon gama

IL interleucina

iPKA inibidor de fosfoquinase A

IRF *interferon-regulatory factor*
JAK *janus kinase*
MHC *major histocompatibility complex*
MOG *myelin oligodendrocyte glycoprotein*
mPGES-1 *microsomal PGE synthase 1*
Mtb *Mycobacterium tuberculosis* H37
mTmG *membrane-targeted tdTomato/membrane-targeted EGFP*
Myd88 *myeloid differentiation primary response 88*
NF- κ B (*nuclear factor kappa B*)
PBS *tampão fosfato-salino*
PG *prostaglandina*
PI3K *Phosphoinositide 3-kinases*
PKA *protein kinase A*
PLC *phospholipase c*
RAG *recombination-activating genes*
RNA *ribonucleic acid*
Rorc *RAR Related Orphan Receptor C*
ROR α *RAR-related orphan receptor alpha*
ROR γ t *RAR-related orphan receptor gamma*
RUNX1 *Runt-related transcription factor 1*
SFB *soro fetal bovino*
SNC *sistema nervoso central*
SOCS *suppressor of cytokine signaling*
SPF *specific pathogen free*
STAT *signal transducer and activator of transcription*
TCR *receptor de célula T*
TGF- β *transforming growth factor beta*
Th *célula T helper*
Tr-1 *linfócito T regulador - 1*
Treg *célula T reguladora*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Plasticidade das subpopulações de Linfócitos T CD4 ⁺	13
1.2. Prostaglandina E ₂ : Receptores e Vias de Sinalização e modulação da resposta imune adaptativa.....	15
1.3. Encefalomielite Autoimune Experimental	18
1.4. Prostaglandina E ₂ e EAE	19
1.5. Hipótese	20
2. OBJETIVOS.....	22
Geral	22
Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Reagentes	22
3.3. Obtenção de células T CD4 ⁺ <i>naive</i>	23
3.4. Diferenciação de linfócitos Th17.....	23
3.5. Ensaio de Plasticidade de linfócitos Th17 para Th1.....	24
3.6. Indução ativa de EAE em camundongos <i>Il17^{cre}/mTmG</i>	24
3.7. Isolamento de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ do SNC	25
3.8. Fenotipagem dos linfócitos por citometria de fluxo	25
3.9. PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR).....	25
3.10. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS:.....	26
4.1. Diferenciação de linfócitos Th17.....	26
4.2. A presença de PGE ₂ aumenta a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1, via receptor EP4.	27
4.2.1 Efeito de PGE ₂ na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1	27
4.2.2 Interação de PGE ₂ aos receptores EP durante a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1	29
4.2.3. Vias de sinalização envolvidas na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-like via receptor EP4.....	32
4.3. Purificação de células T CD4 ⁺ IL-17A ⁺ utilizando animais <i>Il17^{cre}/mTmG</i> .	38
4.4. Envolvimento de PGE ₂ no desenvolvimento de EAE	40
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	49

REFERÊNCIAS	51
-------------------	----

APÊNDICE A – USO DE CCR6 COMO MARCADOR FENOTÍPICO PARA ISOLAMENTO DE LINFOCITOS TH17	56
--	----

APÊNDICE B – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES EP, FATORES DE TRANSCRIÇÃO E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS, EM ENSAIO DE PLASTICIDADE DE LINFÓCITOS TH17 PARA TH1.	60
---	----

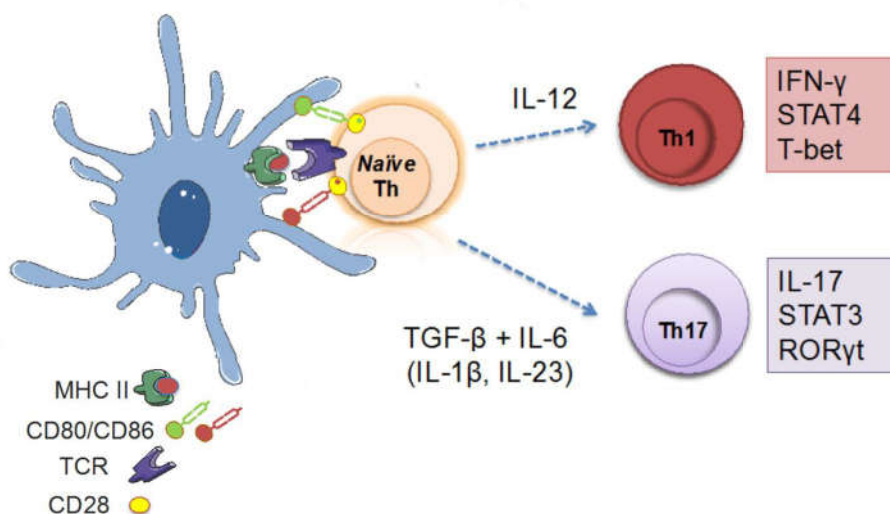
1. INTRODUÇÃO

1.1. Plasticidade das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺

As células T CD4⁺ *naïve* diferenciam-se em diferentes subtipos celulares de acordo com o padrão de resposta induzido pelo patógeno ou a doença autoimune que o hospedeiro é acometido. Essa diferenciação celular é induzida por mediadores solúveis presentes no microambiente, geradas principalmente por células dendríticas que, ao migrarem para um órgão linfóide proximal, interagem com as células T CD4⁺ *naïve* (Tartar *et al.*, 2010).

Os linfócitos Th1 diferenciam-se na presença de um microambiente contendo IL-12 e IFN- γ resultando na ativação de fatores de transcrição como STAT (*Signal transducer and activator of transcription*)1, STAT4 e T-bet, que, por sua vez, translocam-se para o núcleo e interagem em regiões promotoras resultando na transcrição do gene que codifica o IFN- γ (Wei *et al.*, 2009) (Fig. 1).

Figura 1 – Diferenciação de Linfócitos T CD4⁺ *naïve*.



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

Fig. 1. A diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naïve*, ocorre devido à apresentação de antígenos por células dendríticas. O peptídeo antigênico será reconhecido através da interação do TCR - MHC-II, que em conjunto com a coestimulação por moléculas CD80/CD86, promovem a ativação linfocitária. As células dendríticas ainda, produzem citocinas específicas que irão direcionar a diferenciação de Th *naïve* para os subtipos Th1, Th2, Treg ou Th17 (Stockinger e Omenetti, 2017).

Por sua vez, os linfócitos Th17 se diferenciam e expandem na presença de IL-1 β , IL-6, TGF- β (*transforming growth factor beta*) e IL-23, resultando na ativação de STAT3 e ROR γ t (*RAR-related orphan receptor gamma*), fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes que codificam a síntese de IL-17A, IL-17F e IL-22 (Weaver *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Porém, já foram mapeados diferentes fenótipos de linfócitos Th17, tanto humanos

quanto camundongos, com funções efectoras heterogêneas (Wong *et al.*, 2016), essas alterações são relacionadas com a ativação celular por diferentes citocinas presentes no microambiente (Bystrom *et al.*, 2018) (Fig. 1).

A sinalização via TGF- β está relacionada com o comprometimento das células Th17 com a linhagem, a presença de IL-6 leva a um perfil celular regulador (linfócitos Tr-1 ou Treg17), produtor de IL-10, encontrado na mucosa intestinal (Stockinger e Omenetti, 2017; Bystrom *et al.*, 2018) e também em modelos animais de diabetes tipo I (Bellemore *et al.*, 2015).

Por outro lado, a interação de TGF- β , na presença de IL-1 β e IL-23, está relacionada a um perfil de células Th17 patogênicas. A sinalização via IL-1 β sinergicamente a ativação do receptor de células T (TCR) ativa NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) e IRF4 (*interferon regulatory factor 4*) capazes de produzir IFN- γ (Ciofani *et al.*, 2012), enquanto que o eixo IL-23/IL-23R induz a fosforilação de STAT3 e STAT4 (Lee *et al.*, 2017). A presença dessas células Th17 patogênicas está muitas vezes associada a quadros de autoimunidades, como por exemplo a encefalomielite autoimune experimental (EAE), onde a STAT3/STAT4 fosforiladas formam um heterodímero responsável pela encefalitogenicidade dos linfócitos Th17 (Lee *et al.*, 2017).

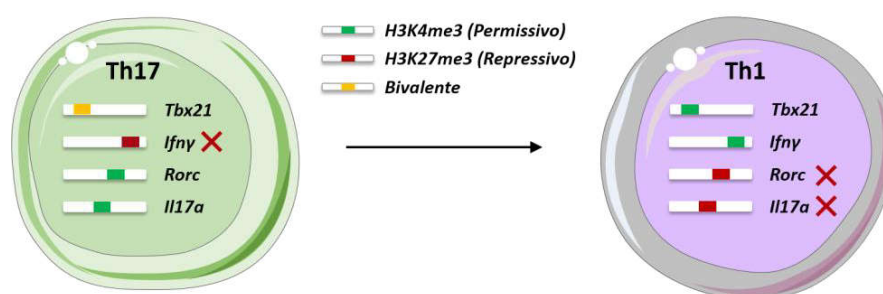
A capacidade de linfócitos T CD4⁺ produzirem citocinas características de mais de um subtipo linfocitário simultaneamente foi demonstrada, tanto *ex vivo* como *in vitro*, por diversos grupos, ao observar a modulação do perfil linfocitário em resposta a infecções subsequentes por diferentes patógenos (Panzer *et al.*, 2012; Coomes *et al.*, 2015), porém se intensificou em 2010, com a proposta de um modelo plástico de linfócitos T CD4⁺, substituindo dessa forma o modelo monolítico proposto na década de 80 (O'shea e Paul, 2010; Agaloti *et al.*, 2018).

Atualmente são propostos dois modelos para elucidar a plasticidade dos linfócitos Th17. Um deles é baseado na interação de mediadores químicos, como citocinas, com linfócitos T CD4⁺, que agiriam para regular fatores de transcrições específicos de cada subtipo linfocitário. E o segundo modelo, que ditaria uma predeterminação da célula Th17 em nível celular, devido a modificações epigenéticas nessas células. As teorias, no entanto, não são mutuamente excludentes (Agaloti *et al.*, 2018).

Em relação aos mecanismos epigenéticos que controlam a plasticidade de linfócitos Th17, sabe-se que há um padrão de alterações de histonas definido para o subtipo Th17, que se refere a um estado de metilação do promotor dos genes *Rorc* e *Il17a* permissivo à transcrição. Por outro lado, para a região promotora de *Ifng*, o estado de metilação é repressivo (Wei *et al.*, 2009). No entanto, a região promotora para *Tbx21*, gene responsável

pela codificação de T-bet, está em um estado bivalente, permitindo que linfócitos Th17, se expostos a IL-12, alterem seu padrão de metilação da cromatina e tornando-se permissivo à transcrição desse gene (Muranski e Restifo, 2013). Dessa forma, os genes *Il17a* e *Rorc* são silenciados e os genes que codificam STAT4 e T-bet serão expressos, resultando na produção de IFN- γ . Estas células Th1 derivadas de células Th17 são conhecidas como “Th1-like” ou linfócitos “ex-Th17 produtores de IFN- γ ” (Wei *et al.*, 2009; Muranski e Restifo, 2013) (Fig. 2).

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



Fonte: Figura elaborada utilizando imagens disponíveis no site Smart-Servier Medical Art. Disponíveis em: <https://smart.servier.com/>

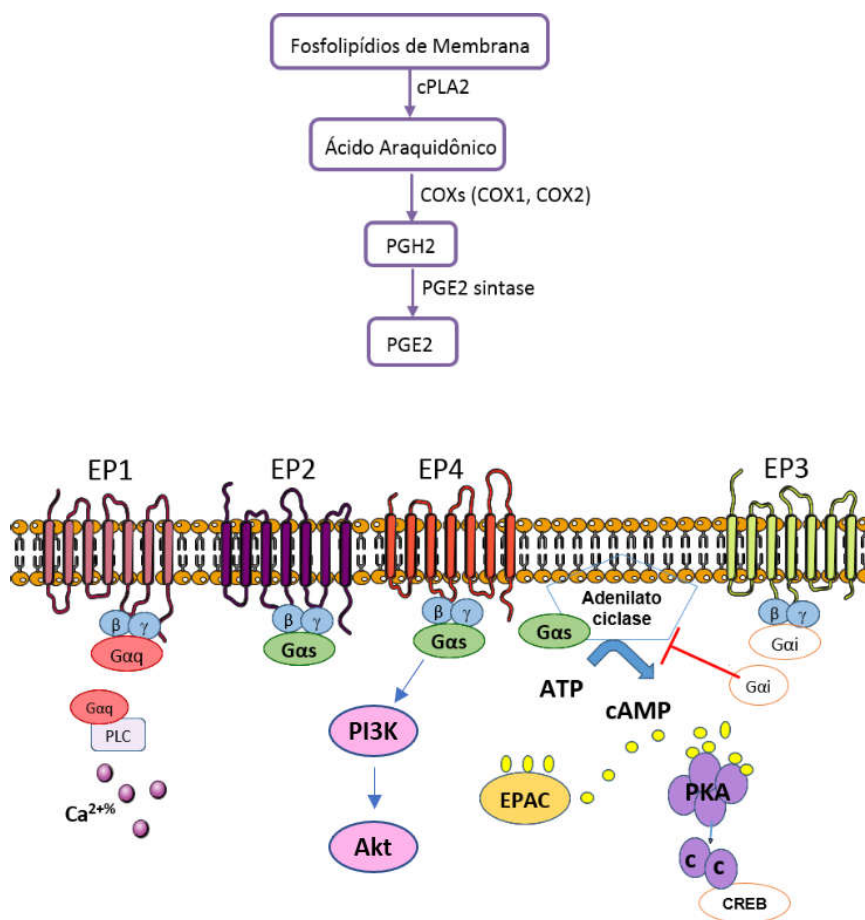
Fig. 2. A trimetilação da histona ^3H na lisina 4 (H3K4me3) no promotor de um gene é um marcador permissivo para transcrição, enquanto a trimetilação da histona ^3H na lisina 27 (H3K27me3) é um marcador repressivo. Células Th17 são permissíveis (H3K4me3) a transcrição de *Rorc* e *Il17a* e bivalente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

1.2. Prostaglandina E₂: Receptores e Vias de Sinalização e modulação da resposta imune adaptativa.

As prostaglandinas (PG) são mediadores lipídicos solúveis sintetizados a partir da biossíntese do ácido araquidônico (AA), oriundo da hidrólise de fosfolípidos de membranas pela cPLA2 (*calcium-dependent phospholipase A2*) (Kalyvas e David, 2004). O AA liberado sofre a ação das enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), formando, em um primeiro momento, PGG₂ que posteriormente sofre conversão à PGH₂ (Hirata e Narumiya, 2012). A enzima COX-1 é uma enzima constitutiva, sendo responsável pela produção de níveis basais das PG, no entanto a COX-2 é uma enzima induzida mediante a ativação celular que potencializa a produção de PG durante a inflamação (Smith *et al.*, 2000) (Figura 3).

A PGH_2 é metabolizada a quatro diferentes tipos de prostaglandinas, PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 e PGI_2 , de acordo com a enzima, PG sintase, expressa na célula em que a biossíntese está ocorrendo (Hirata e Narumiya, 2012). O prostanóide mais abundante nas células de mamíferos é a PGE_2 , cuja biossíntese ocorre pela ação de PG sintase E_2 (Hirata e Narumiya, 2012; Sreeramkumar *et al.*, 2012), essa PG é então secretada através de um transportador de membrana e atua tanto de forma autócrina quanto parácrina (Schuster, 1998) (Fig. 3).

Figura 3 – Prostaglandina E_2 : síntese e vias de sinalização.



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

Fig. 3. A PGE_2 é sintetizada a partir da degradação de fosfolípidos de membrana nuclear pela cPLC_2 , à AA. Esse, é então, convertido à PGH_2 , pelas enzimas COX-1 e COX-2, a qual originará PGE_2 , com auxílio de PG sintase E_2 . A PGE_2 pode interagir com receptores EP1, EP2, EP3 e EP4. EP1, promove aumento de Ca^{2+} intracelular por meio de PLC, via proteína $\text{G}\alpha_q$. EP3, através de $\text{G}\alpha_i$, inibe AC, e, portanto, cAMP. Já EP2 e EP4, acopladas a $\text{G}\alpha_s$, aumentam os níveis de cAMP, via AC, ativando a via de EPAC e PKA. EP4, ainda, pode ativar Akt via fosforilação de PI3K (Sugimoto e Narumiya, 2007).

A PGE_2 exerce sua função através de 4 subtipos de receptores celulares associados a proteína G: EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses podem variar quanto a distribuição nos tecidos,

expressão e transdução de sinais, conforme o tipo de proteína G acoplada (Sugimoto e Narumiya, 2007). O EP1, encontrado majoritariamente em rins, muscular gástrica e tecido adrenal, é acoplado a proteínas Gαq/p, que promove o aumento de Ca²⁺ intracelular através da ativação de fosfolipase-C (PLC) (Sugimoto e Narumiya, 2007). EP3 apresenta múltiplas variantes geradas pelo processamento alternativo do RNA, sendo que, em camundongos, as Isoformas existentes são α, β e γ. EP3α e EP3β são acopladas a proteína Gai e, quando ativadas, promovem diminuição dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), por inibição de adenilato ciclase (AC). Já a isoforma EP3γ potencializa a produção de AC e cAMP, via Rho GTPase (BREYER et al, 200; SUGIMOTO e NARUMIYA, 2008; SREERAMKUMAR; FRESNO e CUESTA, 2012) (Fig. 3).

Os receptores EP2 e EP4, por sua vez, são acoplados a proteína Gas e induzem a ativação de AC, enzima que converte adenosina trifosfato (ATP) (Locasale e Cantley, 2011) em cAMP. Esse mensageiro secundário é responsável por ativar duas vias: a da *protein kinase A* (PKA) e a da *exchange protein directly activated by cAMP* (Epac) (Gerlo et al., 2011). A interação de AMPc com 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 (BO, 2006; BRECKLER, 2001). No entanto, a ativação de PKA resulta na fosforilação de diferentes proteínas citoplasmáticas, dentre elas, fatores de transcrição, como, por exemplo, CREB (*cAMP response element binding protein*) (Yao et al., 2013) (GERLO, 2001). 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). Além disso, alguns estudos demonstram que EP4 também pode sinalizar via ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt., estimulando motilidade e proliferação celular (George et al., 2007; Xu et al., 2018) (Fig. 3).

Diversos estudos já comprovaram que a PGE₂ possui um importante papel na resposta imune adaptativa, atuando na diferenciação, proliferação e expansão de linfócitos Th1 e Th17. Experimentos in vitro utilizando células T CD4⁺ naive demonstraram que, na presença de altas concentrações de anti-CD3/CD28, agonistas de EP2 e EP4 induzem aumento na diferenciação de linfócitos Th1, sendo que, in vivo, EP4 mostrou-se importante para a expressão de IL-12Rβ2 e IFN-γR1 (Yao et al., 2013).

Com relação aos linfócitos Th17, a PGE₂ em concentrações de 10 μM promove a expressão de receptores de IL-23 e IL-1β e inibe a produção de IFN-γ, resultando no aumento da proliferação de células Th17 via EP2/EP4-cAMP (Boniface et al., 2009). Além desse

mecanismo, a presença de PGE₂ exógena promove o aumento da produção de IL-23 por células dendríticas, favorecendo a diferenciação de linfócitos Th17 (Yao *et al.*, 2009; Schirmer *et al.*, 2010).

Estudos recentes ainda demonstram que IL-23 induz tanto a fosforilação de STAT3, assim como a expressão de COX-2 e a produção de PGE₂, que age autocrinamente via EP2/EP4-cAMP/PKA/CREB, levando essas células a adquirir um perfil patogênico produtor de IL-17A⁺IFN- γ ⁺ em modelo de psoríase (Lee *et al.*, 2019).

O conjunto destes resultados demonstra que PGE₂ possui um papel chave na modulação de linfócitos Th1 e Th17, sendo que seu efeito irá depender do estado de ativação do linfócito T CD4⁺, do microambiente no qual ocorre a interação desse mediador lipídico com os linfócitos, composto não apenas pelas citocinas presentes, mas também pela concentração de PGE₂ disponível, e o tipo de receptor EP ao qual o prostanoide interage.

1.3. Encefalomielite Autoimune Experimental

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma doença caracterizada por intenso infiltrado de T CD4⁺ autorreativas à antígenos do sistema nervoso central (SNC) e outras células mononucleares promovendo a desmielinização axonal que reflete na paralisia dos membros posteriores dos animais (Miller e Karpus, 2007; Itani *et al.*, 2017). A EAE é utilizada como modelo experimental para estudos de Esclerose Múltipla (EM) em humanos, uma vez que os há predomínio do infiltrado de linfócitos Th1/Th17, neutrófilos e macrófagos que destroem a camada de mielina do eixo axonal formando as lesões no SNC e levando a sintomas clínicos semelhantes (Mccarthy *et al.*, 2012).

Além da imunização ativa, a EAE pode ser induzida passivamente, pela transferência adotiva de células T CD4⁺ oriundas de camundongos transgênico, contendo TCR específicos para *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG), em camundongos deficientes do gene que codifica as proteínas RAG1 ou RAG2. Os estudos sugerem que os subtipos linfocitários Th1 e Th17 são hábeis em estabelecer a EAE (Mccarthy *et al.*, 2012), o predomínio de linfócitos Th1 parecem estar envolvidos no influxo preferencial de macrófagos ao SNC, enquanto que presença de células Th17 favorece um intenso recrutamento de neutrófilos (Kroenke *et al.*, 2008).

Ainda não há um consenso na literatura de como as células Th1 e Th17 interagem durante o desenvolvimento da EAE. Sabe-se que camundongos deficientes do receptor de IL-23 são menos suscetíveis ao desenvolvimento da EAE, visto o envolvimento desta citocina na

maturação, expansão e patogenicidade de células Th17 (Langrish *et al.*, 2005), assim como na plasticidade de células Th17 para Th1 (Lee *et al.*, 2009; Reboldi *et al.*, 2009).

Ambos subtipos celulares, Th1/Th17, participam na patogênese da EAE, porém em diferentes fases da doença. Estudos sugerem que os linfócitos Th1 expressam elevados níveis de CCR5 e CXCR3, enquanto linfócitos Th17 expressam preferencialmente CCR6. A expressão de CCR6 permite a migração dos linfócitos Th17 para SNC devido à expressão CCL20 por células epiteliais presentes no plexo coroide dos ventrículos cerebrais. Essa migração diferenciada dos subtipos de linfócitos T CD4⁺ para o SNC foi comprovada utilizando células Th17 oriundas de camundongos CCR6^{-/-} em um modelo de EAE. Ou seja, esses animais, mesmo após a indução da EAE, mostraram-se resistentes ao desenvolvimento da doença, porém a transferência adotiva de células Th17/CCR6^{+/+}, restaurou a susceptibilidade ao desenvolvimento da patologia, confirmando a importância dos linfócitos Th17 no desencadeamento da doença (Yamazaki *et al.*, 2008; Reboldi *et al.*, 2009).

Somado a esses achados, sabe-se que em modelos de EAE, induzidos por transferência adotiva de células Th17, há um intenso infiltrado no SNC tanto de células T CD4⁺IL17⁺IFN⁺, como de TCD4⁺IFN⁺. A coexistência dessas subpopulações sugere uma possível plasticidade das células Th17 em modelos de EAE in vivo, podendo ambos os subtipos celulares, Th1 e Th17, agirem de forma conjunta para o desenvolvimento da doença (Domingues *et al.*, 2010; El-Behi *et al.*, 2010). Sabe-se que as citocinas apresentam um papel chave durante a plasticidade de células Th1-like. Em modelos de EAE, por exemplo, a presença de IL-12 exógena é capaz de induzir a regulação negativa da produção de IL-17 em células duplo positivas T CD4⁺IL-17⁺ IFN γ ⁺ (Abromson-Leeman *et al.*, 2009). Apesar de bem caracterizada a importância do microambiente para a plasticidade das células Th17 para Th1, não está bem estabelecido o papel das citocinas, assim como a de mediadores lipídicos, no processo de indução de plasticidade de células Th17 para Th1-like.

1.4. Prostaglandina E₂ e EAE

Em estudos clínicos, a PGE₂ vem sendo descrita como um mediador químico envolvido no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, como por exemplo, colite (Dejani *et al.*, 2018), artrite reumatoide (Mccoy *et al.*, 2002) e a EM (Bolton *et al.*, 1984). Pacientes que desenvolvem a EM apresentam níveis elevados de PGE₂, assim como outros metabólitos do AA, em amostras de líquido cérebro-espinhal (Bolton *et al.*, 1984). Com base nestes achados, estudos foram realizados para identificar o envolvimento de PGE₂ no desenvolvimento de EM, utilizando a EAE como modelo experimental. O

tratamento de animais com *arachidonyl trifluoromethyl ketone* (AACOCF₃, inibidor seletivo de cPLA₂), concomitante a indução de EAE, resultou no desenvolvimento de um *score* clínico da doença menos agressivo (Kalyvas e David, 2004). O mesmo efeito foi observado em animais com EAE tratados com indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal inibidor não seletivo da COX (Miyamoto *et al.*, 2006).

Além disso, a deficiência de *microsomal PGE synthase 1* (mPGES-1), enzima responsável pela produção de PGE₂ durante a inflamação, em animais com EAE resultou na melhora dos sinais clínicos associados a doença. Essa melhora foi correlacionada à inibição dos níveis de IL-17A e IFN- γ produzidas por células T CD4⁺ isoladas dos linfonodos dos animais mPGES-1 *knockout*. Estes dados demonstram que a presença de PGE₂ resulta na piora dos sintomas clínicos da EAE, e ainda, sugere que esse mediador lipídico poderia agir via receptores EP1, EP2 ou EP4, uma vez que nesse estudo, também foi identificado que a expressão desses receptores EP no SNC aumenta conforme à progressão da doença (Kihara *et al.*, 2009).

Ainda, com relação a importância dos receptores EP na patologia, sabe-se que a administração de antagonistas de EP4 na fase inicial da doença (entre 1º e 7º dia) atenuou o desenvolvimento da EAE in vivo (Yao *et al.*, 2009; Esaki *et al.*, 2010). Outros experimentos demonstraram que a administração de antagonista de EP4, em animais deficientes na expressão de EP2, impediu o desenvolvimento da EAE (Esaki *et al.*, 2010).

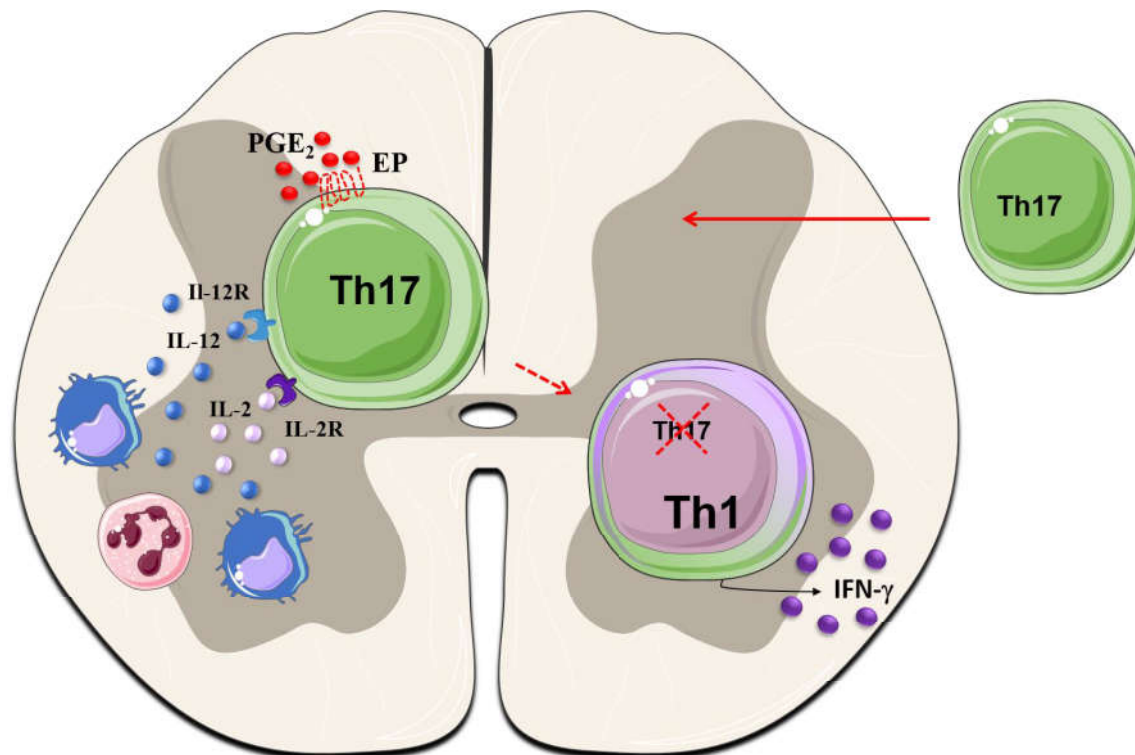
Recentes achados obtidos por nosso grupo demonstram que a PGE₂, em condições polarizantes para Th1, é capaz de modular positivamente a plasticidade de células Th17 para Th1 (IC Processo FAPESP nº 2014/04961-8 e 2016/01978-2).

Sabendo que as células Th1 e Th17 encontram-se em alta frequência no SNC, e a inibição de PGE₂ resulta em melhora significativa do quadro deletério da EAE, *este estudo visou determinar o envolvimento de PGE₂ e o mecanismo pelo qual este prostanoide influencia a plasticidade das células Th17 para Th1 no contexto de EAE.*

1.5. Hipótese

A hipótese inicial desse estudo foi que células Th17 migrariam para o SNC e desencadeariam o recrutamento de células inflamatórias que levariam ao desenvolvimento dos primeiros sinais clínicos da doença. A presença de PGE₂, associado ao microambiente inflamatório constituído principalmente por IL-2 e IL-12, favoreceria a plasticidade das células Th17 para Th1 resultando na diferenciação de células T CD4⁺ patogênicas (IL17⁺IFN γ ⁺) e células Th1-*like*, resultando no dano tecidual e agravamento da doença.

Figura 4 – Hipótese do Estudo



Fonte: Figura elaborada utilizando imagens disponíveis no site Smart-Servier Medical Art.
Disponíveis em: <https://smart.servier.com/>

Fig. 4. Os linfócitos Th17 migram para o SNC, onde encontram um microambiente inflamatório, IL-2 e IL-12, que associado a presença de PGE₂ levaria a plasticidade desses linfócitos a Th17 a um perfil Th1-like (BAZZANO, J.M.R. **Hipótese do Estudo**. 2019. Ilustração).

2. OBJETIVOS

Geral

O objetivo desse estudo foi determinar o papel da PGE₂ e o mecanismo pelo qual este prostanoide participa na plasticidade de células Th17 para Th1, no contexto da EAE.

Objetivos específicos

- Estabelecer os receptores EP e as vias de sinalização da PGE₂ envolvidas na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1, in vitro.
- Determinar o efeito da PGE₂ e os receptores EP envolvidos na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1, in vivo, no contexto da EAE.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Animais

Os camundongos C57BL/6 WT utilizados foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP, Campinas, São Paulo, com idades entre 5 a 10 semanas e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Biológicas – FCFAr/UNESP. Camundongos C57BL/6 *Il17a*^{Cre}/mTmG (mTmG) foram gerados no Departamento de Animais SPF (*specific-pathogen free*), Área de Imunologia, CGEB/UNICAMP e gentilmente cedidos pelo Professor Alessandro dos Santos Farias, do Instituto de Ciências Biológicas/UNICAMP, a idade dos animais era de 8 a 10 semanas. 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 esterilizados. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas CEUA/FCFAr nº 16/2017, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

3.2. Reagentes

Os linfócitos T CD4⁺ *naive* foram cultivados com anticorpos ativadores anti-CD3 (clone H-2Kb) e anti-CD28 (clone 37.51) e anticorpos bloqueadores anti-IL-2 (clone S4B6), anti-IL-4 (clone BVD4-1D11) e anti-IFN- γ (clone H22), todos da BD. Para diferenciação celular em linfócitos Th17 foi utilizado um coquetel de citocinas recombinantes, rIL-1 β (Peprotech), rIL-6 (Peprotech), rIL-23 (Peprotech) e hTGF- β (R&D Systems). Para o ensaio de plasticidade, após a diferenciação celular, os linfócitos Th17 foram cultivados em presença de citocinas polarizantes para Th1, IL-2 (Peprotech) e IL-12 (Peprotech), na presença ou ausência de PGE₂

(Cayman); antagonista de EP2 (PF04418948– Tocris) e/ou EP4 (ONO-AE3-208 – Cayman); inibidores de adenilato ciclase (iAC) (SQ 22536 – Tocris), inibidor de PKA (iPKA) (PKI-14-22-*amide myristoylated* ou KT 5720 ou PKA *inhibitor fragment (6-22) amide* – Tocris), inibidor de Epac (iEpac) (ESI-09 – Sigma), ativador de adenilato ciclase (aAC) (Forskolin - Cayman), ativador de PKA (aPKA) (8-bromo-cAMP - Tocris) ou ativador de Epac (aEpac) (8-CPT-me-cAMP – Tocris).

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram imunizados com uma emulsão constituída de *myelin oligodendrocyte glycoprotein* oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅; MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Proteimax) (MOG), adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) (CFA) (emulsão água em óleo adicionada de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco) (Mtb)). O isolamento dos linfócitos infiltrados no SNC foi realizado utilizando Percoll (GE Healthcare).

3.3. Obtenção de células T CD4⁺ *naive*

Os linfócitos T CD4⁺ *naive* foram purificados a partir de células do baço de camundongos WT ou mTmG com auxílio de *beads* magnéticas CD4⁺CD62L⁺ T *Cell Isolation Kit II mouse* (#130-106-643 – Miltenyi Biotec®), de acordo com instruções do fabricante.

3.4. Diferenciação de linfócitos Th17

As células T CD4⁺ *naive* purificadas a partir dos camundongos WT ou mTmG foram incubadas em placas de 48 poços na concentração de 5×10^5 linfócitos T CD4⁺ *naive* por poço e mantidos por 3 dias na presença de anticorpos ativadores, anti-CD3 (2 µg/mL) e anti-CD28 (1 µg/mL), anticorpos bloqueadores, anti-IL-4 (2,5 µg/mL), anti-IL-2 (2,5 µg/mL) e anti-IFN- γ (2,5 µg/mL), e submetidas a um coquetel de citocinas para diferenciação de células Th17, IL-1 β (20 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), IL-23 (50 ng/mL) e TGF- β (5 ng/mL), diluídos em Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10%), gentamicina (0,1%), L-glutamina (1%), aminoácidos essenciais (1%), piruvato de sódio (1%) e β -mercapitoetanol (0,1%), que constituem a condição polarizante para linfócitos Th17 (CP-Th17), com volume final de 1 mL por poço.

A diferenciação dos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo através dos marcadores CD4, IL-17A, IFN- γ e *Fixable Viability Stain* (FVS), para exclusão da análise de células não viáveis.

3.5. Ensaio de Plasticidade de linfócitos Th17 para Th1

Os linfócitos Th17-WT, Th17-mTmG, foram cultivados em placa de 48 poços na concentração de $2,5 \times 10^5$ linfócitos por poço, ativados na presença de anticorpo anti-CD3 (2 $\mu\text{g/mL}$) e submetidos a uma condição polarizante para linfócitos Th1 (CP-Th1), contendo IL-2 (20 ng/mL) e IL-12 (50 ng/mL) diluídos em IMDM suplementado como descrito previamente, com volume final de 1 mL por poço.

Quando indicado, foi acrescentado à cultura celular 1 nM de PGE_2 ; 1 μM de antagonista de EP2 (PF04418948– Tocris) e/ou 1 μM de antagonista EP4; 5 ou 10 μM de iAC, 1 ou 5 μM de iPKA e 1 ou 5 μM de iEpac; 0,5 ou 1 μM de aAC ou 0,5 ou 1 μM de aPKA ou 0,5 ou 1 μM de aEpac. Para as condições em que houveram adição de antagonistas EP2 e/ou EP4 e inibidores de AC, PKA e Epac, foi adicionada 1 nM de PGE_2 após 20 minutos de tratamento das células com os antagonistas e inibidores.

A cada 3 dias de cultura, o meio de cultura foi renovado até o 15º dia. Nos dias 9 e 15 uma fração das células foi retirada para fenotipagem por citometria de fluxo, utilizando como marcadores CD4, IL-17A e IFN- γ e FVS para exclusão da análise de células não viáveis.

3.6. Indução ativa de EAE em camundongos *Il17^{cre}/mTmG*

Camundongos *Il17^{cre}/mTmG*, de 8 a 10 semanas, foram imunizados duas vezes com emulsão contendo MOG e CFA, via subcutânea no flanco anterior do animal. A primeira imunização constituiu-se de 100 μg de MOG diluídos em 50 μL de *phosphate buffered saline* (PBS) e 400 μg de Mtb em 50 μL de CFA. Após 6 dias, o animal foi imunizado pela segunda vez com 50 μg de MOG diluída em PBS e 400 μg de Mtb em 50 μL de CFA.

Para avaliar o envolvimento de PGE_2 , os animais foram divididos em grupos experimentais:

- i) grupo controle, os animais foram somente imunizados;
- ii) grupo indometacina, após 7 dias da segunda imunização, os animais foram tratados em dias alternados com indometacina, pela via intraperitoneal (5mg/kg), até o pico da doença, que ocorreu no 13º dia.

A evolução clínica da doença foi determinada segundo uma escala de índice clínico de 0 a 5: 0, ausência de sinais da doença; 1, perda de tônus na cauda; 2, fraqueza dos membros posteriores; 3, paralisia dos membros posteriores; 4, tetraplegia; 5, animal moribundo (Farias *et al.*, 2007).

Os experimentos in vivo foram realizados no Laboratório de Neuroimunologia do Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias, pertencente a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.7. Isolamento de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ do SNC

No pico da doença, 13º dia após a segunda imunização, a medula espinhal dos animais foi retirada e os linfócitos infiltrados foram isolados por meio de gradiente de densidade de Percoll (70:30). Também foram recuperados os linfócitos presentes nos linfonodos axilar e cervical. As células T CD4⁺GFP⁺ e T CD4⁺TdTomato⁺ foram purificadas via *FACS Sorting* e armazenadas para avaliar a expressão de *Ifng* por qPCR.

3.8. Fenotipagem dos linfócitos por citometria de fluxo

Os linfócitos foram estimulados por 4 horas com 50 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma Adrich), 1 µg/mL de ionoforo de cálcio (Ionomicina; A23187) e 0,66 µL/mL de monensina (GolgiStop; BD Bioscience), diluídos em IMDM suplementado, com volume final de 300 µL por poço. As células foram marcadas com FVS 780 (BD Bioscience) para análise da viabilidade celular, fixadas (Thermo Fischer), permeabilizadas (Thermo Fischer) e incubadas com anticorpo anti-CD3-PeCy5.5 (clone 17A2) anti-CD4-PE (clone H129.19) ou Pacific Blue (clone RM4-5), anti-IL-17A-AlexaFluor647 (clone TC11-18H10) ou PeCy7 (clone eBio17B7), anti-IFN-γ-FITC (clone XMG1.2) ou APC (clone XMG1.2) ou PerCPCy5 (clone XMG1.2), anti-CCR6-FITC (clone R6H1), anti-RORγt-PE (clone B2D) e anti-Foxp3-APC (clone FJK-16s). Todos os anticorpos utilizados foram da BD Bioscience e ThermoFischer. As células foram adquiridas utilizando o RLS FortessaTM – FCFRP/USP, FACS Canto IITM – FMRP/USP e FACS Aria Fusion – FOAr/UNESP (BD Bioscience) e analisadas pelo software FCS 4 Express Flow Cytometry (De Novo Software).

3.9. PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

No experimento in vivo, o RNA do homogenato de tecido (medula espinhal e linfonodos cervical e axilar) foi isolado usando RNAspin Mini de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare) e convertidos a cDNA pelo iScript cDNA Synthesis Kit (Bioered) em T100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA). O cDNA foi pré-amplificado utilizando TaqMan PreAmp MasterMix (ThermoFisher) segundo instruções do fabricante, utilizando sequência de primers para *Gapdh* e *Ifng*. A expressão dos genes foi determinada pela amplificação de *primers* específicos e quantificados por TaqMan MasterMix (SigmaAldrich). A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método 2^{-ΔCt}. Para o experimento de qPCR foi utilizado

termociclador 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram utilizados os seguintes primers (ThermoFischer): *Gapdh* (#Mm99999915_g1) e *Ifng* (#Mm01168134_m1).

3.10. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SEM e analisados utilizando o programa estatístico Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Foram realizadas análises utilizando teste *T student* para comparações entre dois grupos experimentais ou análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni ou Tukey com múltiplas comparações para grupos experimentais maiores ou iguais a três. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS:

4.1. Diferenciação de linfócitos Th17

Para estudar a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1 foi necessário a padronização de um protocolo experimental que garantisse um alto rendimento de células produtoras de IL-17A.

Para isso, os linfócitos T CD4⁺ *naive* foram isolados a partir do baço de camundongos C57BL/6 WT e submetidos a dois diferentes protocolos de diferenciação.

Protocolo 1: As células foram cultivadas por 3 dias, na presença de meio polarizante para linfócitos Th17 (CP-Th17), composto por anti-CD3 (2 μ g/mL), anti-CD28 (1 μ g/mL), anti-IL-4, anti-IL-2 e anti-IFN- γ (2,5 μ g/mL de cada), IL-1 β (20 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL), IL-23 (50 ng/mL) e TGF- β (5 ng/mL). Com esse protocolo, $\sim$ 61% das células tornaram-se produtoras de IL-17A (Fig. 5A e 5B).

Protocolo 2: As células T CD4⁺ *naive* foram cultivadas por 2 dias em contato com um coquetel de citocinas e anticorpos semelhante ao descrito anteriormente, porém inicialmente na ausência de IL-23. Apenas a partir do 2º dia a IL-23 foi adicionada no momento da troca do meio de cultura. No 4º dia de cultura, as células foram coletadas e processadas para imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstram um modesto aumento na porcentagem para $\sim$ 71% de linfócitos T CD4⁺IL-17A⁺, quando comparado ao protocolo utilizando 3 dias de cultivo (Fig. 5A e 5B).

Os dois protocolos de diferenciação utilizados não apresentaram diferenças significativas em relação ao rendimento no número de células produtoras de IL-17A (Fig. 5C), portanto optou-se pelo primeiro protocolo utilizando a diferenciação no período de 3 dias.

Figura 5 – Diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naive* em linfócitos Th17.

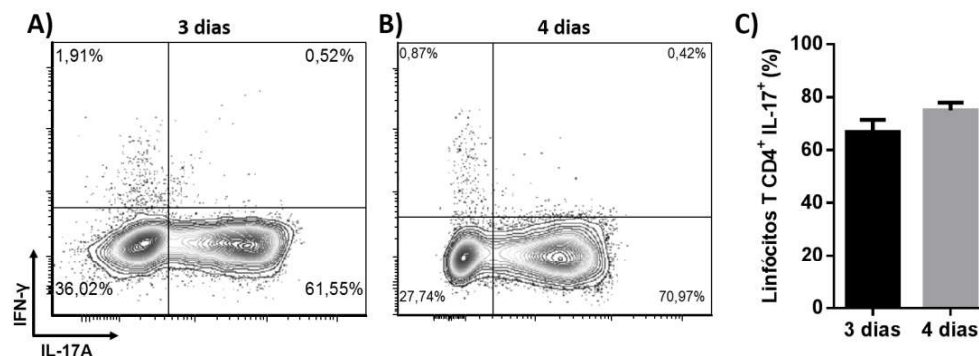


Fig. 5 – Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57Bl/6, foram ativados com anti-CD3 e anti-CD28 e diferenciados para linfócitos Th17 na presença de **(A)** IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β , anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN- γ (CP-Th17), durante 3 dias (direita) ou **(B)** IL-1 β , IL-6, TGF- β , anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN- γ , durante 2 dias, quando o meio foi renovado e acrescido de IL-23, por 2 dias adicionais. **(C)** Gráfico de barras indicando a média $\pm$ SEM da porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL17⁺ após 3 ou 4 dias de cultura. Para citometria de fluxo, as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensima, por 4h. Dados representam a média $\pm$ SEM de pelo menos três experimentos independentes. *, P < 0,05.

4.2. A presença de PGE₂ aumenta a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1, via receptor EP4.

4.2.1 Efeito de PGE₂ na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1

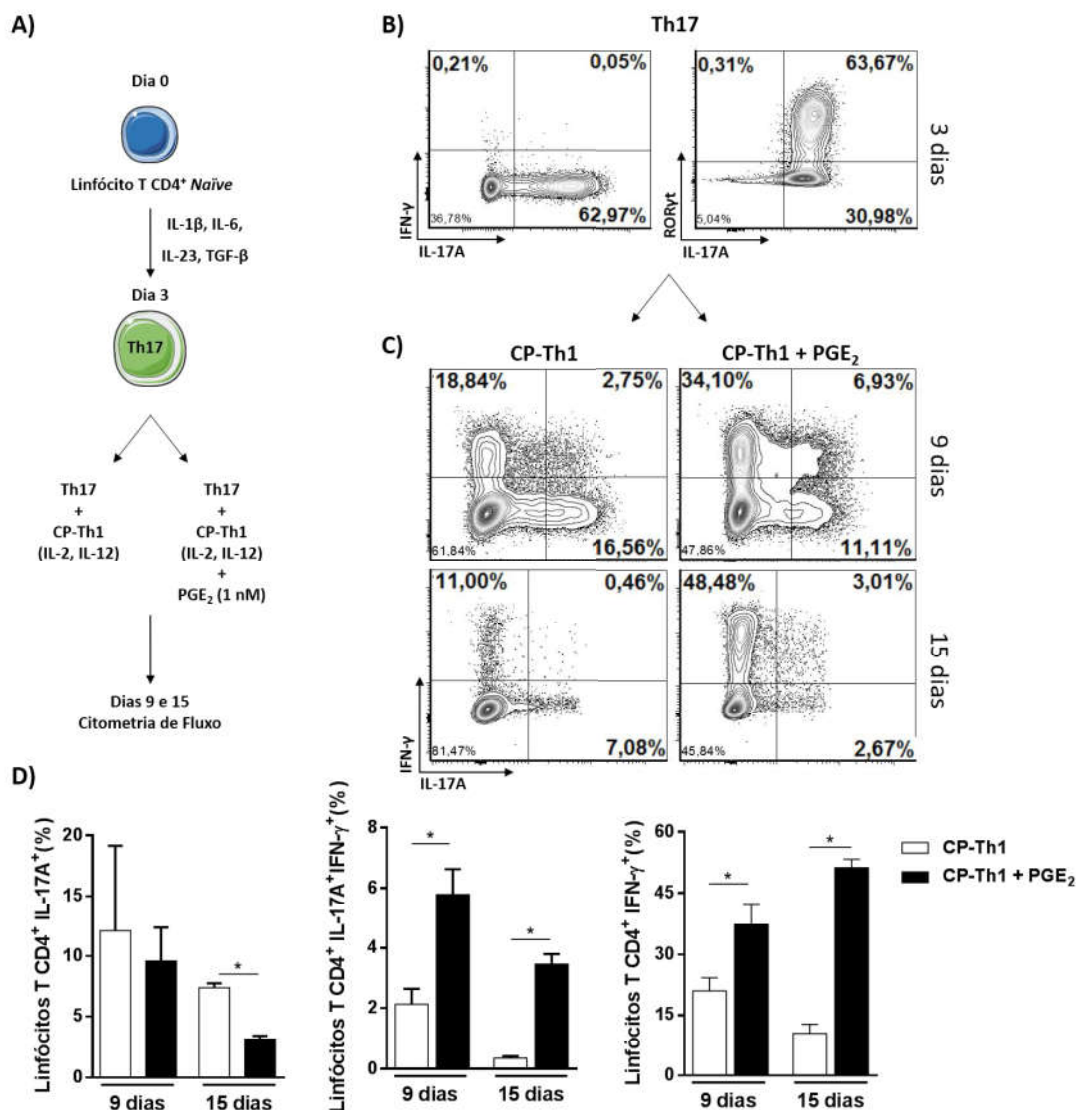
Para determinar o efeito da PGE₂ na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1, as células diferenciadas na condição polarizante para Th17 (CP-Th17) (Fig. 6B) foram cultivadas por 9 e 15 dias em condição polarizante para linfócitos Th1 (CP-Th1) na presença ou ausência de 1 nM de PGE₂, como demonstrado no esquema apresentado (Fig. 6A).

Os linfócitos Th17 cultivados por 9 dias em condições polarizantes para Th1, na presença de IL-2 e IL-12, foram capazes de sofrer a alteração do fenótipo das células Th17 para Th1-like. Ou seja, foi observado a diminuição na porcentagem de células produtoras de IL-17 (16,56%) (Fig. 6C e 6D) e o aumento na porcentagem de células produtoras de IFN- γ (18,84%) (Fig. 6C e 6D), quando comparado ao cultivo de 3 dias, indicando alteração do fenótipo Th17 para Th1-like. Esse perfil de diferenciação foi mantido após 15 dias de cultura, no qual apenas 7,08% das células foram hábeis em produzir IL-17A e 11,00%, mantiveram a produção de IFN- γ (Fig. 6C e 6D), quando comparado a 9 dias de cultura.

No entanto, a presença 1 nM de PGE₂ na cultura de células Th17 submetidas a CP-Th1 reduziu a porcentagem de células produtoras de IL-17A para 11,11% e aumentou a porcentagem de células produtoras de IFN- γ , de forma isolada (34,10%) ou concomitante com IL-17A (6,93%) (Fig. 6C e 6D), quando comparados a condição sem a presença de PGE₂.

Após 15 dias de cultura, a presença do prostanoide elevou a porcentagem de células positivas IFN- γ para 48.48% (Fig. 6C e 6D), um aumento de aproximadamente 4x comparando com as células Th17 cultivadas apenas com IL-2 e IL-12, na ausência de PGE₂, demonstrando a importância do prostanoide na conversão de linfócitos Th17 para Th1-like.

Figura 6 – A presença de PGE₂ na CP-Th1 resulta em um aumento na eficiência na conversão de células Th17 em Th1-like



Fonte: Figura elaborada utilizando imagens disponíveis no site Smart-Servier Medical Art.

Disponíveis em: <https://smart.servier.com/>

Fig. 6 – Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57Bl/6 foram ativados com anti-CD3 e anto-CD28 e diferenciados para linfócitos Th17na presença de IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β , anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN- γ (CP-Th17), durante 3 dias. As células foram cultivadas por mais 15 dias de cultura, em meio contendo anti-CD3, IL-2 e IL-12 (CP-Th1), na presença ou ausência de PGE₂. **(A)** Esquema representativo da metodologia do experimento. **(B)** Diferenciação de linfócitos Th17. **(C)** Dotplot representativo da plasticidade de linfócitos Th17 na presença de CP-Th1, após 9 e 15 dias de cultura, na presença ou ausência de PGE₂. **(D)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL17⁺, T CD4⁺IL17⁺ IFN- γ ⁺ e T CD4⁺ IFN- γ ⁺

após 9 ou 15 dias de cultura, na presença ou ausência de PGE₂. Para citometria de fluxo as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensima, por 4h e pré-selecionadas quanto à viabilidade celular. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, *, P< 0,05.

4.2.2 Interação de PGE₂ aos receptores EP durante a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1

Para compreender o receptor de PGE₂ envolvido na ativação e indução da produção de IFN- γ por linfócitos ex-Th17, inicialmente foi avaliada a expressão de receptores EP2 e EP4 na superfície de células Th17 submetidas a IL-2 e IL-12 (CP-Th1), na presença ou ausência de PGE₂.

Como controle experimental, os linfócitos Th1 e Th17 foram diferenciados em suas respectivas condições polarizantes e, após 3 dias de cultura, a expressão de EP2 e EP4 foi avaliada. Inicialmente, identificou-se que a expressão de receptor EP2 é maior em linfócitos Th17, quando comparado ao Th1. Em contrapartida, o receptor EP4 é mais expresso na superfície de ambos os subtipos linfocitários e predominante ao receptor EP2 (Fig. 7A).

Os linfócitos diferenciados em CP-Th17 foram então submetidos ao cultivo em CP-Th1, por 9 dias, e a expressão desses receptores foi avaliada. Não foi observada diferença estatística significativa na expressão de EP2 seja na presença ou ausência de PGE₂. No entanto, a expressão de EP4 foi maior quando comparada ao receptor EP2, tanto na ausência como presença de PGE₂ (Fig. 7B).

Após 15 dias, o mesmo padrão de expressão de receptores foi mantido, de forma que a presença de PGE₂ mostrou-se capaz de modular positivamente a expressão de receptor EP4, na superfície dos linfócitos ex-Th17 expostos a CP-Th1. Ainda, para ambas as condições experimentais, a expressão do receptor EP4 foi aproximadamente 3x maior que a de EP2 (Fig. 7B).

Figura 7 - Expressão de receptores EP2 e EP4 na superfície de linfócitos Th1-like.

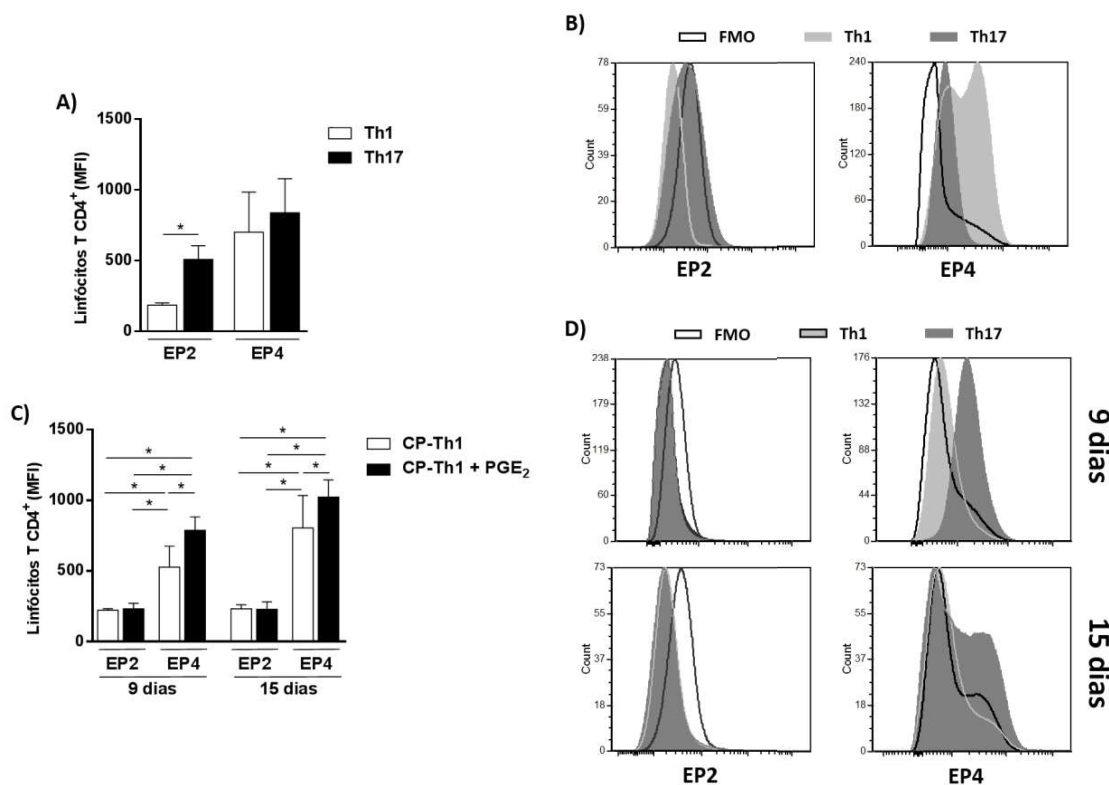


Fig. 7 – Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57Bl/6, foram ativados com anti-CD3 e anti-CD28 e diferenciados durante 3 dias na presença de IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β , anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN- γ (CP-Th17) para Th17 ou na presença de IL-2 e IL-12 (CP-Th1) para Th1. **(A)** Gráfico de barras do MFI e **(B)** histograma da expressão de receptores EP2 e EP4 na superfície de linfócitos Th1 e Th17. Os linfócitos Th17 foram cultivados por mais 15 dias em CP-Th1, na presença ou ausência de PGE₂. **(A)** Gráfico de barras do MFI e **(B)** histograma da expressão de receptores EP2 e EP4 na superfície de linfócitos T CD4⁺ após 9 ou 15 dias de cultura, na presença ou ausência de PGE₂. As células foram pré-selecionadas quanto a viabilidade celular e expressão de CD4⁺. Dados representam a média $\pm$ SEM de ao menos três experimentos independentes. *, P < 0,05.

Para confirmar a participação dos receptores EP2 e EP4 na sinalização de PGE₂ durante a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-like, os linfócitos Th17, cultivados em condição polarizante para Th1, foram incubados na presença de diferentes concentrações de antagonistas de receptores EP2 e/ou EP4, seguido da adição de 1 nM de PGE₂ exógena. As condições CP-Th1 ou CP-Th1 + 1 nM de PGE₂ foram conduzidas concomitantemente como parâmetro de comparação do desenvolvimento fenotípico dessas células.

Após 9 dias de cultura, o bloqueio do receptor EP2 pela presença do antagonista não interferiu no processo de conversão de células Th17 em células produtoras de IFN- γ mediante a adição de PGE₂ exógena, quando comparado a condição CP-Th1 + PGE₂, 43,39% e 36,09%, respectivamente (Fig. 8A e 8B).

Entretanto, o bloqueio apenas do receptor EP4, ou concomitante a adição do antagonista do receptor EP2, na presença de PGE₂ exógena, resultou em uma drástica redução na porcentagem de células produtoras de IL-17A (11,53%) e IFN- γ (19,14%), porcentagens estas semelhantes a condição que recebeu apenas CP-Th1 por 9 dias (Fig. 8A e 8B). No entanto, a presença de ambos antagonistas não resultou em um efeito sinérgico na inibição de células Th1-like, sugerindo, portanto, o envolvimento apenas do receptor EP4 nesse processo de plasticidade.

Após 15 dias de cultura, o perfil de diferenciação observado com 9 dias manteve-se, ou seja, na presença de antagonista do receptor EP2, as células ex-Th17 foram aptas a produzir elevados nível de IFN- γ (61,26%), condizente com a condição controle, CP-Th1 + PGE₂ (62,91%). Em contrapartida, o bloqueio apenas do receptor EP4 ou concomitante ao antagonista de EP2 impediu a conversão de células Th17 em células Th-like, obtendo porcentagens próximas ao controle CP-Th1. Novamente, a presença de ambos antagonistas não resultou em um efeito sinérgico, sugerindo que, em uma fase mais tardia da plasticidade, apenas o receptor EP4 esteja envolvido nesse processo.

Figura 8 - Efeito de antagonistas de receptores EP2 e EP4, na plasticidade de células Th17 em Th1-like, em presença de IL-2 e IL-12.

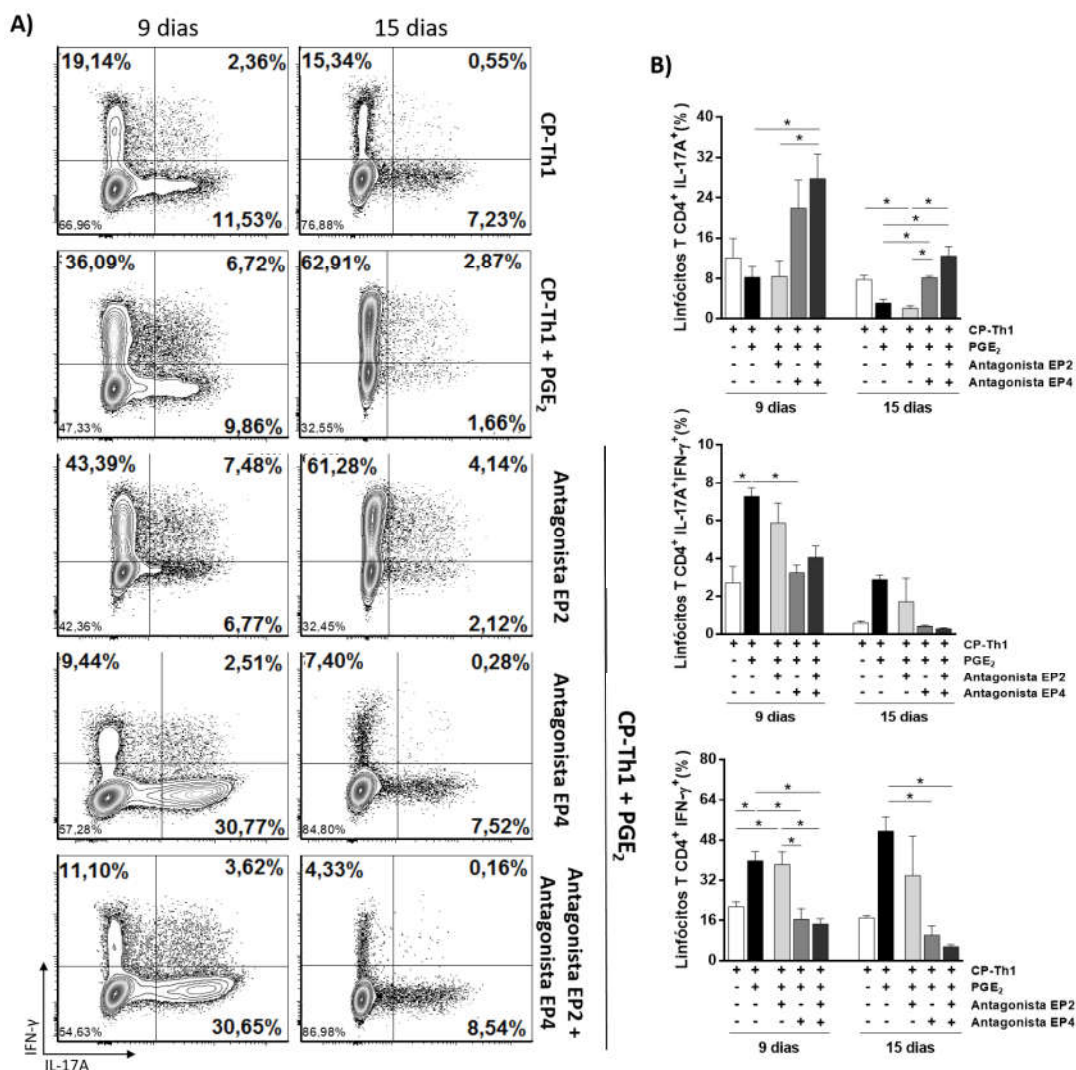


Fig. 8 – Linfócitos Th17 foram cultivados por 15 dias em meio contendo anti-CD3, IL-2 e IL-12 (CP-Th1) na presença ou ausência de 1 nM de PGE₂, 1 μ M de PF04418948 (antagonista EP2) e/ou ONO-AE3-208 (antagonista EP4). **(A)** Dotplot representativo da plasticidade de linfócitos Th17 na presença de antagonistas de receptores EP2 e/ou EP4, após 9 e 15 dias de cultura. A adição dos antagonistas foi feita 20 minutos antes da adição de 1nM de PGE₂ exógena. **(B)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL17⁺, T CD4⁺IL17⁺IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IFN- γ ⁺ após 9 ou 15 dias de cultura. Para citometria de fluxo as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensina, por 4h. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, *, P<0,05.

4.2.3. Vias de sinalização envolvidas na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-like via receptor EP4

Sabe-se que PGE₂ via EP4 sinaliza através da ativação de adenilato ciclase (AC) que resulta no aumento dos níveis intracelulares de AMPc (adenosina monofosfato cíclica),

podendo levar a ativação de *Protein kinase cAMP-dependent* (PKA) e/ou *exchange protein directly activated by cAMP* (Epac).

Com isso, na tentativa de avaliar a cascata de sinalização intracelular ativada por PGE₂ via receptores EP4, durante o processo de plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-*like*, as células diferenciadas na presença de CP-Th17 foram cultivadas em condição CP-Th1, e então incubadas na presença de diferentes concentrações de inibidores de AC, PKA e Epac, seguido da adição de 1 nM de PGE₂ exógena.

Em ambas concentrações testadas, o bloqueio de AC não interferiu na porcentagem de células positivas produtoras de IFN- γ . Ou seja, as células diferenciadas em Th17 e cultivadas na condição CP-Th1+PGE₂, na presença do iAC, ainda se mantiveram eficientes em converter-se em linfócitos Th1-*like*, em ambos os períodos avaliado, 9 e 15 dias (Fig. 9B). Essas porcentagens foram semelhantes à condição controle, em que as células foram cultivadas com CP-Th1 + PGE₂, na ausência do inibidor de AC (Fig. 9A).

Sabe-se que o aumento de cAMP, via sinalização de PGE₂-EP4, resulta na ativação de PKA e Epac. Para confirmar os resultados obtidos na condição com o inibidor de AC (iAC), as células diferenciadas em Th17 cultivadas na condição CP-Th1 + PGE₂ foram então incubadas com os inibidores de PKA e Epac. Novamente, os tratamentos com ambos os inibidores não foram hábeis em modular a porcentagem de células ex-Th17 produtoras de IFN- γ , Th1-*like*, (Fig. 9B), após 9 e 15 dias de cultura. Ou seja, a porcentagem de células produtoras de IFN- γ foi semelhante à obtida na condição controle CP-Th1 + PGE₂ (Fig. 9A).

Figura 9 - Efeito da inibição de PKA e Epac na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1 em presença de CP-Th1.

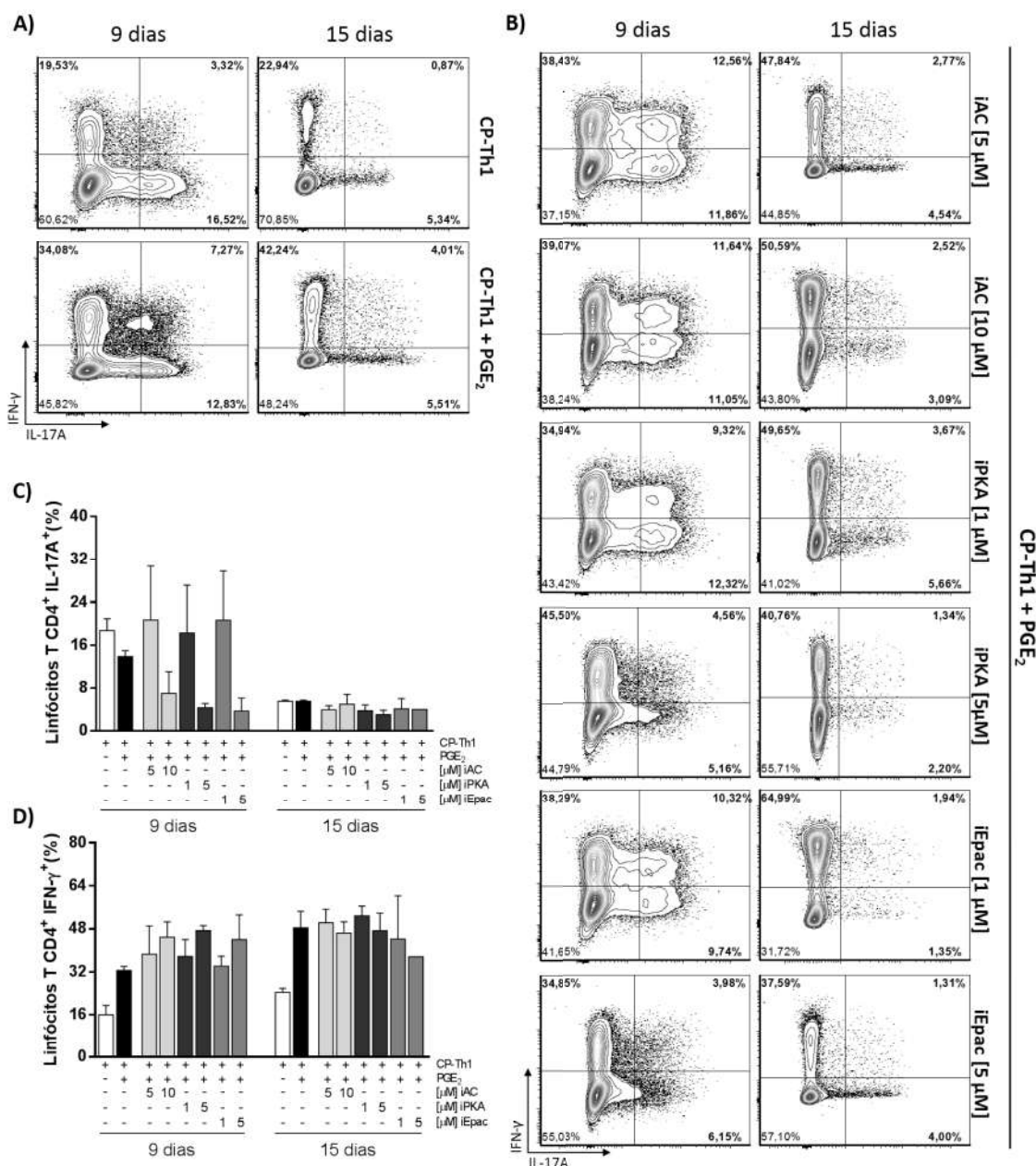


Fig. 9 – Linfócitos Th17 foram cultivados por 15 dias em meio contendo anti-CD3, IL-2 e IL-12 **(A)** na presença ou ausência de 1 nM de PGE₂ ou **(B)** na presença de 5 μ M ou 10 μ M de SQ 22536 (inibidor de AC - iAC), PKI-14-22-amide myristoylated (inibidor de PKA - iPKA) e ESI-09 (inibidor de Epac - iEpac). **(C)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de células produtoras de IL-17A e **(D)** e IFN- γ . A adição dos inibidores foi feita 20 minutos antes da adição de 1nM de PGE₂ exógena. Para citometria de fluxo, as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensima, por 4h, e pré-selecionadas quanto a viabilidade celular e expressão de CD4. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes.

A escolha dos inibidores para realização dos experimentos foi baseada em experimentos prévios do grupo de pesquisa, porém, outros inibidores de PKA também foram testados posteriormente, os resultados com esses inibidores mostram que tanto em porcentagem, quanto em intensidade média de fluorescência, a produção de IFN- γ se manteve elevada, em níveis semelhantes com o da condição estimulada com PGE₂, tanto após 9 e 15 dias de cultura (Fig. 10).

O uso do PKA *inhibitor fragment 6-22 amide*, pode indicar uma discreta tendência à redução de IFN- γ , em ambos os dias experimentais avaliados. Porém, esses experimentos devem ser repetidos para comprovar esse possível efeito inibitório.

Figura 10 – Teste de inibidores de PKA na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-like.

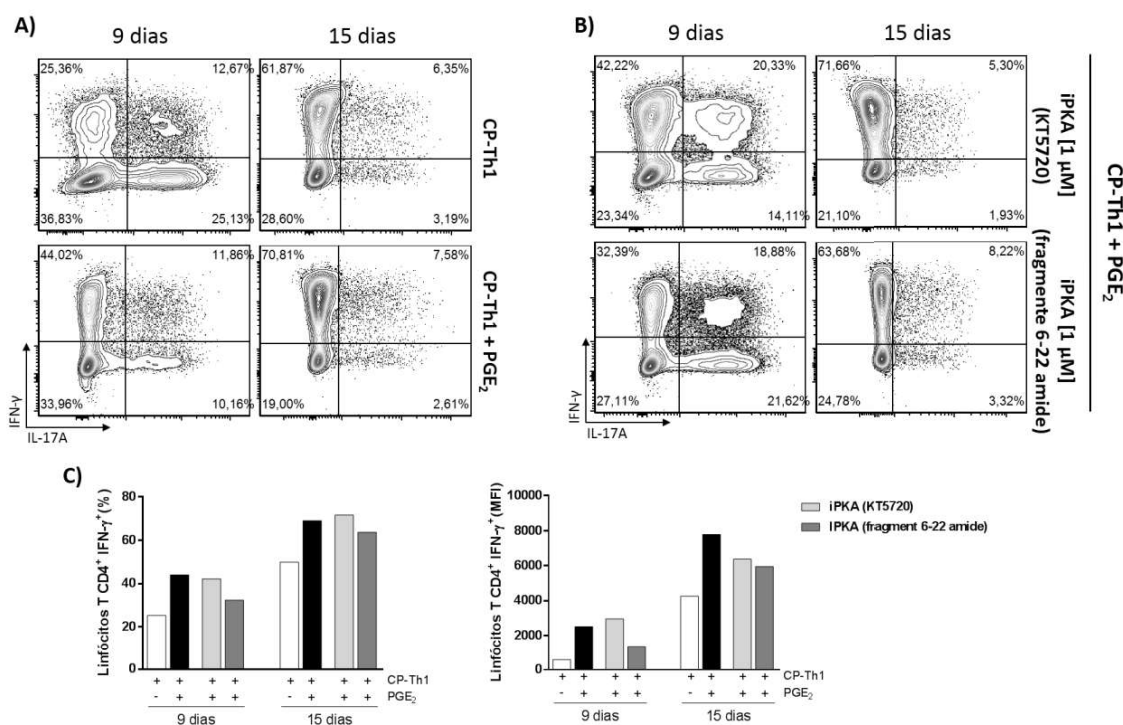


Fig. 10 – Linfócitos Th17 foram cultivados por 15 dias em meio contendo anti-CD3, IL-2 e IL-12 (CP-Th1) (A) na presença ou ausência de 1 nM de PGE₂ (B) na presença de 1 μ M de KT-5720 (inibidor de PKA - iPKA) e PKA *inhibitor fragment 6-22 amide* (inibidor de PKA - iPKA). (C) Gráfico de barras indicando a porcentagem de células produtoras de IFN- γ (esquerda) e a intensidade média de fluorescência (MFI) desta citocina (direita). A adição dos inibidores foi feita 20 minutos antes da adição de 1nM de PGE₂ exógena. Para citometria de fluxo, as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensina, por 4h, e pré-selecionadas quanto a viabilidade celular e expressão de CD4. Resultados oriundos de um único experimento realizado, sem replicatas biológicas.

Na tentativa de excluir a participação da sinalização via PGE₂/EP4/AC/PKA-Epac no aumento da plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-like, foi utilizado a estratégia de adição de ativadores das respectivas vias juntamente com IL-2 e IL-12, na ausência de PGE₂.

A presença do ativador de AC, Forskolin, na concentração de 1 uM foi capaz de induzir um modesto aumento tanto em MFI de células produtoras de IFN- γ , quando comparado a condição CP-Th1 (Fig. 11D). No entanto, esse resultado não corrobora com os obtidos nas condições CP-Th1 + aPKA ou CP-Th1 + aEpac (Fig. 11). Ou seja, não foi observado o aumento de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ na presença dos ativadores de PKA ou Epac quando comparado à condição CP-Th1. No entanto, vale ressaltar que não foi avaliado o efeito sinérgico dessas duas vias.

Esses dados sugerem que a presença de PGE₂ pode agir, ao menos parcialmente, pelas vias de AC, talvez com a participação conjunta de PKA e Epac. Porém, assim como para os resultados anteriores, a ausência de replicatas biológicas dessas condições experimentais inviabiliza a conclusão das vias de sinalização envolvidas nesse processo.

Figura 11 – Uso de ativadores de AC, PKA e Epac para determinação da via de sinalização

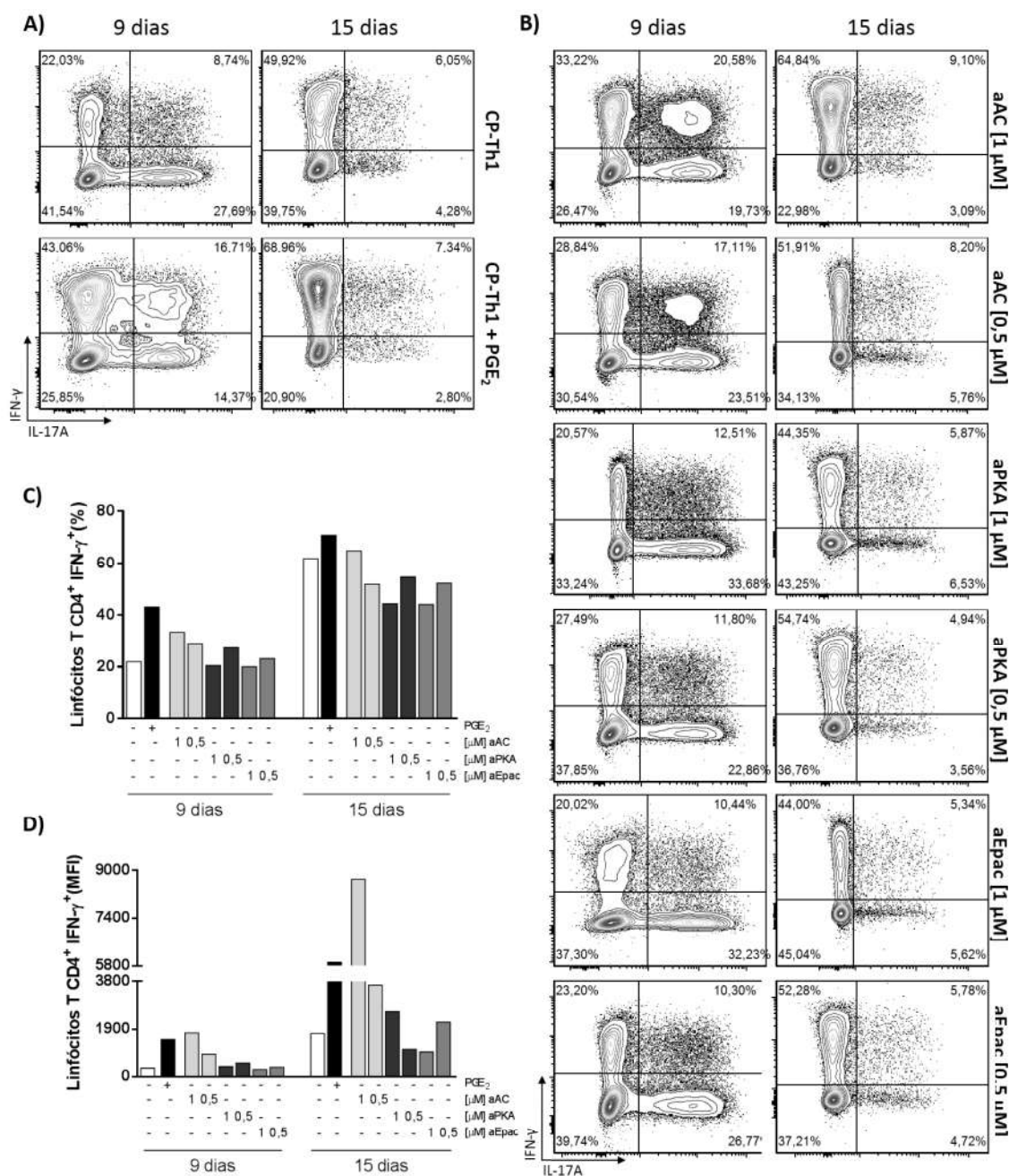


Fig. 11 – Linfócitos Th17 foram cultivados por 15 dias em meio contendo anti-CD3, IL-2 e IL-12 (CP-Th1) na presença ou ausência de **(A)** 1 nM de PGE₂ **(B)** 1 μ M ou 500 nM de Forskolin (ativador de adenilato ciclase - aAC), (ativador de PKA - aPKA) ou (ativador de Epac - aEpac). **(C)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de células produtoras de IFN- γ e **(D)** MFI desta citocina. Para citometria de fluxo as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensima, por 4h, e pré-selecionadas quanto a viabilidade celular e expressão de CD4. Resultados oriundos de um único experimento realizado, sem replicatas biológicas.

4.3. Purificação de células T CD4⁺IL-17A⁺ utilizando animais *Il17^{cre}/mTmG*

Com o objetivo de validar os resultados demonstrados previamente, foi preciso buscar estratégias para confirmar que as células Th1-*like* eram realmente *ex*-Th17. Essa preocupação deve-se ao fato que apesar do protocolo de diferenciação utilizado resultar em aproximadamente 65% de linfócitos T CD4⁺IL-17A⁺, ainda há uma fração de ~35% de células não produtoras de IL-17^a e/ou IFN- γ (Fig. 6B), que poderiam se diferenciar em linfócitos Th1, na presença de IL-2 e IL-12.

Mediante a colaboração do Prof. Alessandro Farias (UNICAMP), foi possível utilizar nesse estudo a linhagem de camundongo C57BL/6 *Il17^{cre}/mTmG*, através do cruzamento de animais *Il17^{cre}* com animais mTmG. Esses animais possuem em todas as células os sítios LoxP flanqueando o *cassette* tdTomato (mT), de forma que todas as células do animal expressam a fluorescência vermelha. Ainda, localizado posteriormente a sequência tdTomato, há o *cassette* EGFP (mG). Portanto, mediante o cruzamento com o animal com *Il17^{cre}*, as proles provenientes desse cruzamento terão o *cassette* mT deletados, de forma que essas células passarão a expressar uma fluorescência verde (Fig. 12). Ou seja, utilizando essa estratégia experimental, a transcrição do gene que codifica a IL-17 em os linfócitos T CD4 permitirá a expressão da proteína GFP (*Green Fluorescence protein*) de forma definitiva, mesmo que posteriormente a *Il17* não esteja mais ativa, permitindo o rastreamento dos linfócitos Th17.

Figura 12 - Esquema representativo do funcionamento do animal *Il17^{cre}/mTmG*.

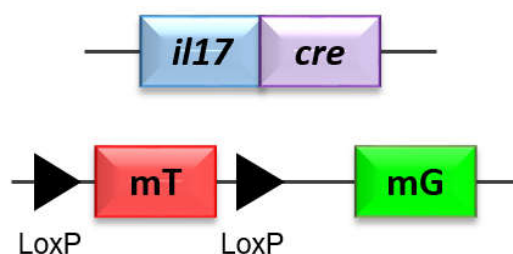


Fig. 12. Camundongos C57BL/6 *Il17^{cre}/mTmG*, possuem o *cassette* tdTomato (mT) flanqueado por sítios *LoxP*, seguido por *cassette* EGFP (mG). E ainda, inserido um gene de Cre recombinase no sítio de transcrição de *Il17a*. (Bazzano, J.M.R. **Esquema *Il17^{cre}/mTmG***. 2018. Ilustração).

Inicialmente, foi necessário validar a funcionalidade do sistema gerado, de forma que os linfócitos T CD4⁺ *naive* - mTmG foram diferenciados em CP-Th1 ou CP-Th17 e marcados intracelularmente para IL-17 e IFN- γ no 3º dia de cultura. Aproximadamente 80% dos linfócitos cultivados na presença de uma condição polarizante para Th1 produziram IFN- γ e

como esperado, essa produção não foi concomitante com a de GFP (Fig. 13A). Em contrapartida, o cultivo de T CD4⁺ *naive* – mTmG na presença da CP-Th17 resultou na produção de IL-17A por ~63% das células, sendo que dentre essas, aproximadamente 26% foram hábeis em produzir também GFP (Fig. 13B).

Figura 13 - Expressão de GFP por linfócitos Th1-mTmG e Th17-mTmG.

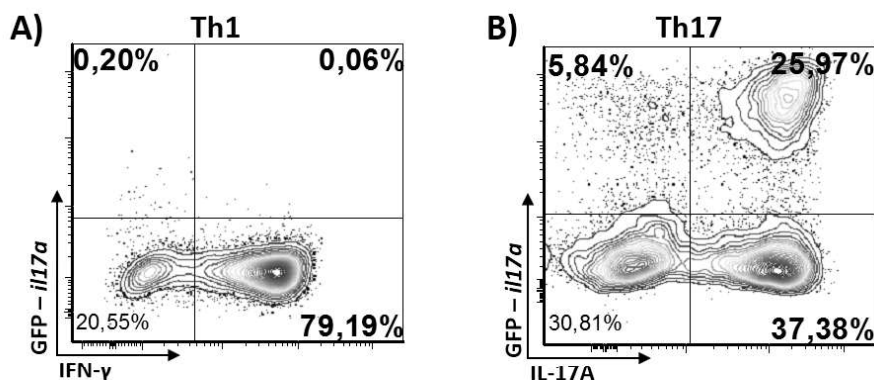


Fig. 13. Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57BL/6 *Il17^{cre}/mTmG* foram ativados com anti-CD3 e anti-CD28 e diferenciados durante 3 dias na presença de (A) IL-2 e IL-12 (CP-Th1) para Th1 ou (B) IL-1β, IL-6, IL-23, TGF-β, anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN-γ (CP-Th17) para Th17. Para citometria de fluxo, as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensina por 4h. As células foram pré-selecionadas segundo a viabilidade e presença de CD4⁺. Dot plot representativo de três experimentos realizados, em triplicata biológica.

Nosso próximo passo foi avaliar a plasticidade de linfócitos Th17-mTmG diferenciados a partir de células TCD4⁺ *naive* isoladas do baço de camundongos *Il17^{cre}/mTmG* cultivadas na presença da CP-Th17. Após 3 dias de cultivo, aproximadamente 83% das células T CD4⁺GFP⁺ mostraram-se hábeis em produzir IL-17A (Fig. 14A). Após esse período, essas células foram então cultivadas em CP-Th1, na presença ou ausência de 1nM de PGE₂. Após 9 e 15 dias de cultura, aproximadamente 33% e 38% respectivamente, das células cultivadas apenas na presença de CP-Th1 foram hábeis em produzir IFN-γ (T CD4⁺GFP⁺), ou seja, um perfil Th1-like (Fig. 14B). Porém, nas células cultivadas em CP-Th1, na presença de PGE₂, não foi observado aumento estatisticamente significativo nas porcentagens de células produtoras de IFN-γ, quando comparação a condição CP-Th1 (Fig. 14B), após 9 e 15 dias de cultivo. No entanto, ao avaliarmos a capacidade de produção de IFN-γ, pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI), as células Th17 cultivadas em CP-Th1, na presença de PGE₂, foram mais eficientes em produzir IFN-γ quando comparado a condição sem a presença de PGE₂, após 9 e 15 dias de cultivo. (Fig. 14C).

Figura 14 – PGE₂ age sinergicamente com IL-2 e IL-12 aumentando a produção de IFN- γ por células ex-Th17.

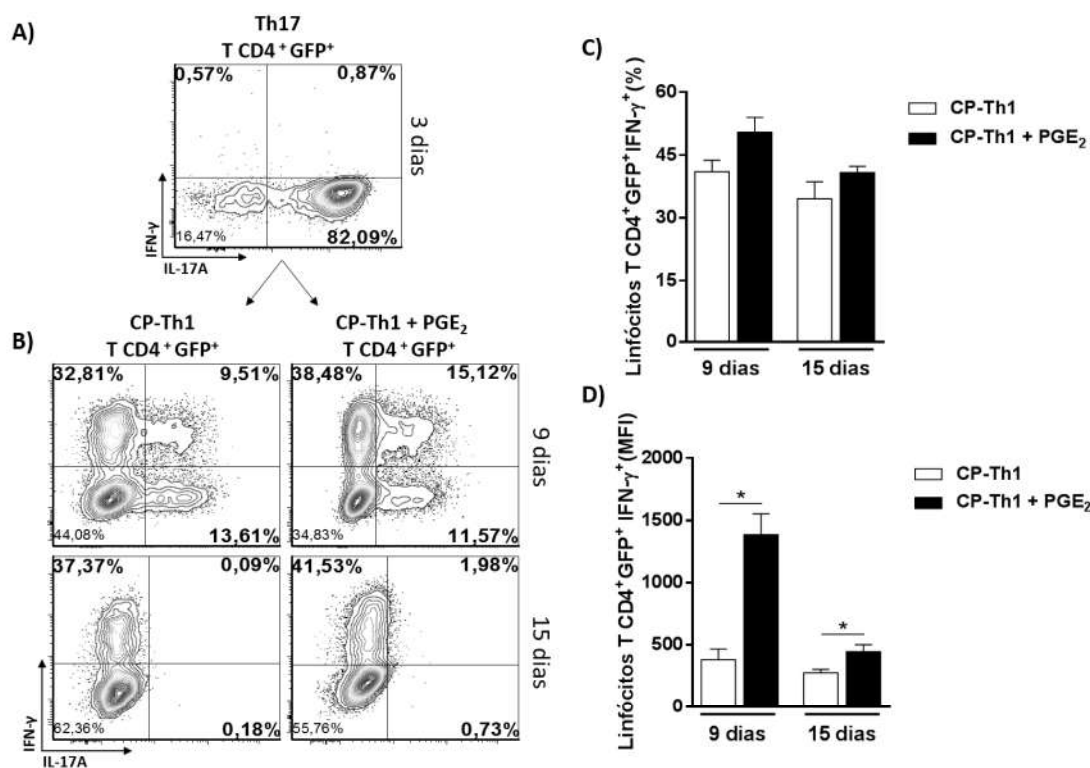


Fig. 14. Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57BL/6 *Il17^{cre}/mTmG* foram ativados com anti-CD3 e anti-CD28 e diferenciados durante 3 dias na presença de IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β , anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN- γ (CP-Th17) para Th17. As células foram cultivadas por mais 15 dias de cultura, em meio contendo anti-CD3, IL-2 e IL-12 (CP-Th1), na presença ou ausência de PGE₂. **(A)** Diferenciação de linfócitos Th17-mTmG. **(B)** Dotplot representativo da plasticidade de linfócitos Th17 na presença de CP-Th1, após 9 e 15 dias de cultura, na presença ou ausência de PGE₂. **(C)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL17⁺, T CD4⁺IL17⁺ IFN- γ ⁺ e T CD4⁺ IFN- γ ⁺ após 9 ou 15 dias de cultura, na presença ou ausência de PGE₂. Para citometria de fluxo as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensina, por 4h e pré-selecionadas segundo a viabilidade, expressão de CD4 e eGFP. Um experimento individual realizado em triplicata. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes, *, P < 0,05.

4.4. Envolvimento de PGE₂ no desenvolvimento de EAE

Não está muito bem elucidado na literatura como ocorre a patogênese da EAE, porém o que se sabe é que diversos componente celulares e químicos estão envolvidos no agravamento da doença, como por exemplo a presença de células Th17 produtoras de IFN- γ e a PGE₂, respectivamente (Kihara *et al.*, 2009; El-Behi *et al.*, 2010).

Para compreender se a presença desse mediador lipídico estaria favorecendo a conversão de células Th17 em Th1-like, in vivo, em um modelo de EAE, animais *Il17^{cre}/mTmG* foram submetidos a imunização com MOG para indução da doença. Uma semana após a última imunização, um grupo de animais foi tratado com indometacina visando a redução da produção de PGE₂, conforme apresentado no delineamento experimental apresentado na

Figura 16 – Tratamento com indometacina não alterou o *score* clínico dos animais.

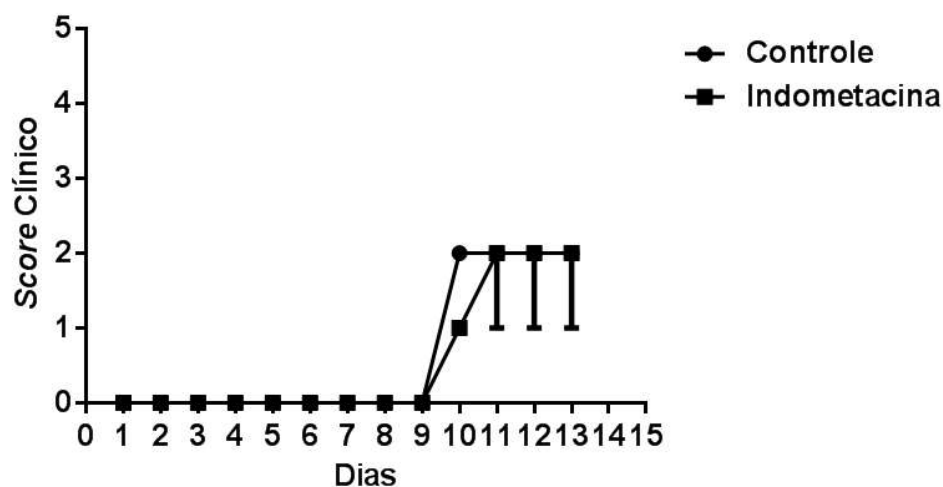
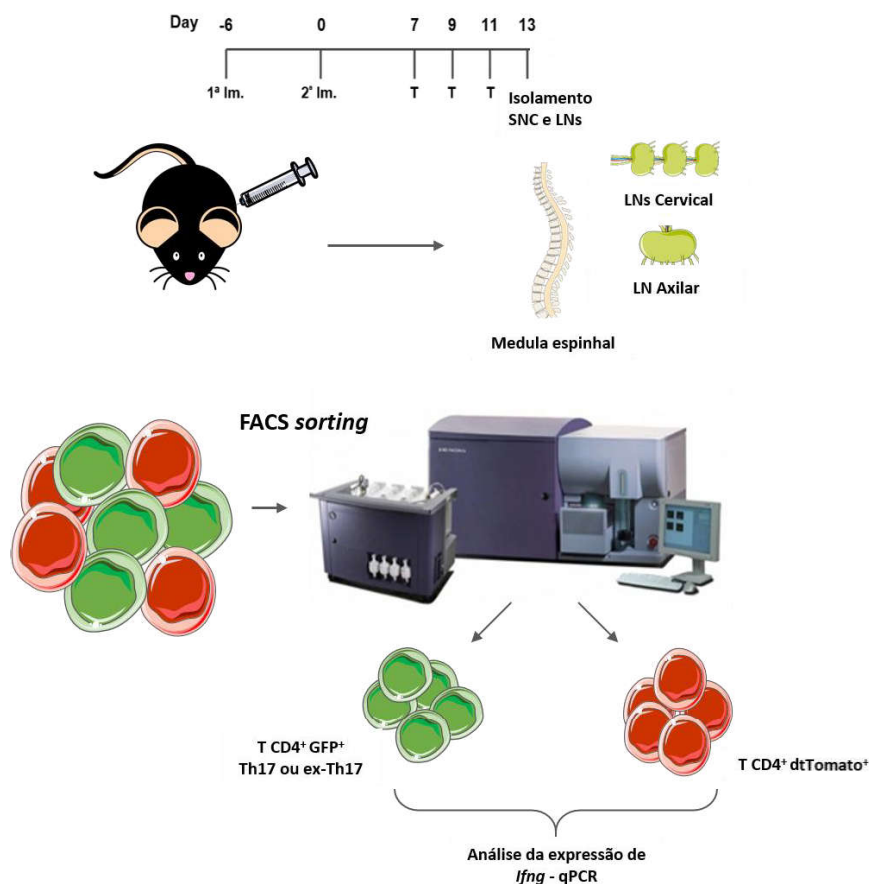


Fig. 16 – Camundongos *III7cre/mTmG* foram imunizados com duas doses contendo MOG, Mtb e adjuvante completo de Freund (dia -6 e 0). Após 7 dias da segunda imunização, alguns animais foram tratados com indometacina (100µg/mL) em dias intercalados. O *score* clínico dos animais foi avaliado depois da segunda imunização. Resultados oriundos de um único experimento realizado, grupo controle com N = 2 e grupo indometacina com N = 3.

No 13º dia, pico da doença, os linfócitos dos linfonodos axilares e cervicais, assim como do SNC foram isolados dos animais dos diferentes grupos experimentais. As células foram então marcadas com anti-CD4-Pacific Blue e anti-CD3-PeCy5.5 e purificados via *FACS Sorting* em duas frações: *i*) linfócitos T $CD3^+CD4^+GFP^+$ - que deve compor a fração de células Th17 ou ex-Th17 - população de interesse para esse estudo; *ii*) linfócitos T $CD3^+CD4^+dtTomato^+$ - demais subtipos linfocitários infiltrados (Fig. 17).

Figura 17 – Indução ativa de EAE em animais *Il17a^{cre}/mTmG*: Delineamento Experimental.



Fonte: Figura elaborada utilizando imagens disponíveis no site Smart-Servier Medical Art
Disponíveis em: <https://smart.servier.com/>

Fig. 17 – Camundongos *Il17a^{cre}/mTmG* foram imunizados com duas doses de MOG, CFA e Mtb. Após 7 dias, os animais foram tratados ou não tratados com indometacina (100 µg/kg), em dias intercalados. No 13º dia, foram retirados medula espinhal, linfonodo cervical e axilar. As células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD3 e isoladas via FACS Sorting de acordo com a presença de GFP ou dtTomato. (Bazzano, J.M.R. **Delineamento experimental in vivo**. 2018. Ilustração).

Foi observada uma baixa porcentagem de células Th17 ou ex-Th17 isoladas dos linfonodos axilar e cervical (Fig. 18A e 18B) tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com indometacina. No entanto, o tratamento dos animais com indometacina resultou em um modesto aumento do infiltrado de células Th17 ou ex-Th17 no SNC quando comparado ao influxo linfocitário observado no grupo de animais não tratados (Fig. 18C).

Figura 18 - Linfócitos Th17-GFP⁺ presentes nos linfonodos drenantes e no SNC de animais que desenvolveram EAE.

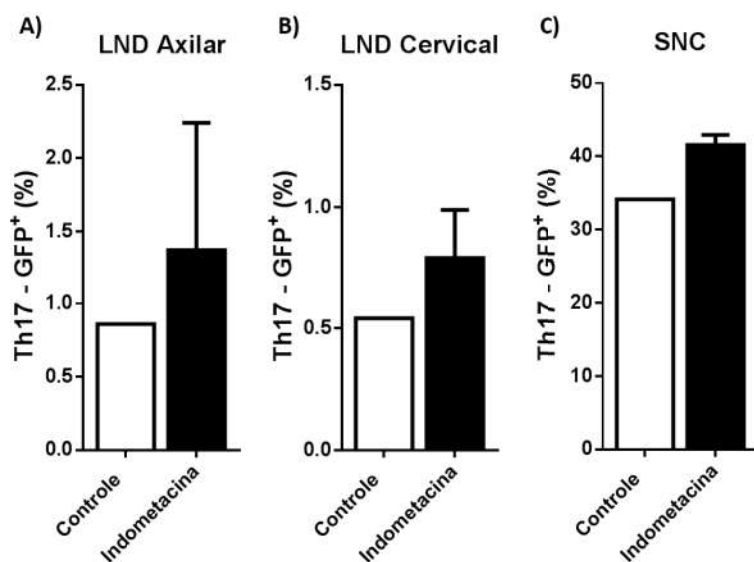


Fig. 18 - Camundongos *Il17^{cre}/mTmG* foram imunizados com MOG e tratados com indometacina ou não tratados (controle). Após 13 dias da imunização, foram isolados linfócitos dos linfonodos drenantes e do SNC. Essas células foram marcadas extracelularmente para CD3 e CD4. Os gráficos em barra representam a porcentagem de células que expressavam GFP (A) no linfonodo (LND) axilar (B) linfonodo (LND) cervical (C) Sistema Nervoso Central (SNC). Resultados oriundos de um único experimento realizado, grupo controle com N = 2 e grupo indometacina com N = 3.

Além disso, foi observado que, no linfonodo axilar, houve uma redução na expressão de *Ifn γ* tanto nas células positivas para GFP, como em células dtTomato⁺ de animais tratados com indometacina, quando comparado aos linfócitos de animais não tratados (Fig. 19A). No entanto, apesar da diminuição na expressão *Ifn γ* ser mantida no linfonodo cervical em células dtTomato, não foi observada a modulação na expressão de *Ifn γ* nas células GFP obtidas de animais tratados com indometacina, quando comparado aos linfócitos de animais não tratados (Fig. 19B).

Em relação ao infiltrado celular do SNC, a inibição de PGE₂ sistêmica, mediante ao tratamento dos animais com indometacina, reduziu em aproximadamente 2 vezes a expressão de *Ifn γ* em linfócitos Th17-GFP⁺ quando comparado aos linfócitos Th17-GFP⁺ isolados do SNC dos animais controle, no entanto, em células positivas para dtTomato, essa expressão não foi alterada (Fig. 19C).

Figura 19 - PGE₂ auxilia na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1 in vivo.

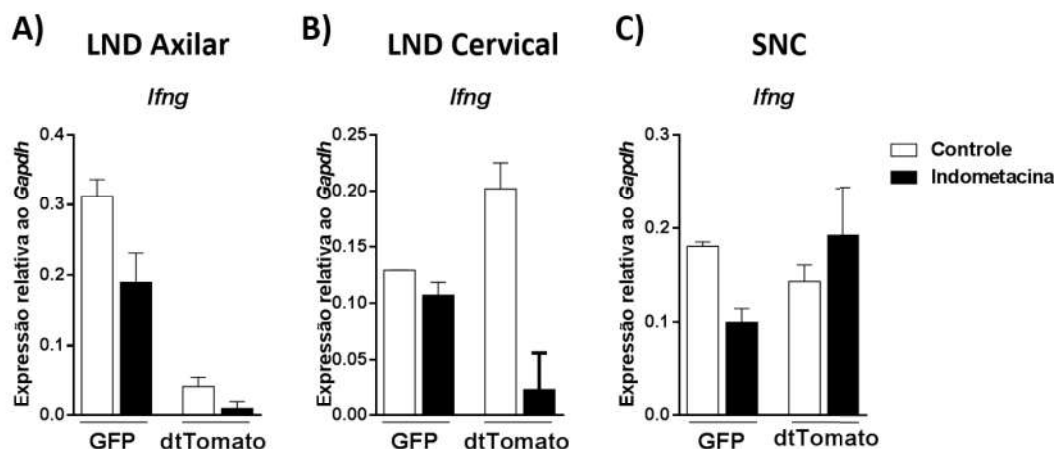


Fig. 19 - Camundongos *Il17^{cre}/mTmG* foram imunizados com MOG e tratados com indometacina (barra branca) ou não tratado (controle – barras pretas). Após 13 dias da imunização, foram isolados linfócitos dos linfonodos drenantes e do SNC. Essas células foram marcadas extracelularmente para CD3 e CD4 e isoladas via FACS *Sorting* em duas frações: T CD3⁺CD4⁺GFP⁺ e T CD3⁺CD4⁺dtTomato⁺ para análise via qPCR. Os gráficos em barra representam a expressão relativa de *Ifng* ao *Gapdh* das células GFP⁺ e dtTomato⁺ isoladas do (A) linfonodo (LND) axilar (B) do linfonodo (LND) cervical e (C) sistema nervoso central. Resultados oriundos de um único experimento realizado, grupo controle com N = 2 e grupo indometacina com N = 3.

5. DISCUSSÃO

Os linfócitos Th17 originam-se a partir da diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naïve* na presença de um microambiente contendo TGF- β e IL-6, pela ativação do fator de transcrição ROR γ t, que leva a transcrição de IL-17A e IL-17F (Lee *et al.*, 2009; Stadhouders *et al.*, 2018). Porém, diversos estudos comprovaram a instabilidade desse subtipo linfocitário, que é atribuída a fácil modulação de ROR γ t por alterações do microambiente em que o linfócito Th17 está inserido, conferindo a essa célula um perfil plástico (Boniface *et al.*, 2010; Tartar *et al.*, 2010). A manutenção de um microambiente contendo TGF- β é essencial para manutenção do fenótipo Th17, enquanto que a presença de IL-12 é capaz de conferir um perfil patogênico, produtor de IFN- γ à essas células (Lexberg *et al.*, 2008; Lexberg *et al.*, 2010). Nesse estudo, demonstramos que a PGE₂, mediador lipídico amplamente encontrado em contextos de inflamação crônica e autoimunidades, age via receptor EP4, sinergicamente com IL-2 e IL-12, para favorecer a conversão de linfócitos Th17 em linfócitos Th-1-like. O mecanismo de ação de PGE₂/EP4 precisa ser melhor investigado, mas os dados apontam um pequeno indicio da participação de adenilato ciclase/cAMP/PKA. Além disso, os dados obtidos *in vivo* sugerem que, durante o desenvolvimento de EAE, o tratamento de animais com inibidor da síntese de

PGE₂ não interfere no infiltrado de linfócitos Th17 no sistema nervoso central, porém a inibição desse prostanoide resultou na inibição da expressão de células “ex-Th17” produtoras de IFN- γ .

Outros estudos já haviam demonstrado a importância de PGE₂ na plasticidade de linfócitos Th17, mediante a ação conjunta com IL-1 β e IL-23. A presença desse microambiente em linfócitos T CD4⁺ *naive* humanos resulta no aumento da fosforilação de STAT3 e na diferenciação de um perfil de Th17 patogênica (Boniface *et al.*, 2009). Nesse estudo, foi demonstrado que linfócitos Th17 diferenciados na presença de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23, e então cultivados na presença de IL-2, IL-12 e 1 nM de PGE₂ apresentam um aumento na porcentagem de células produtoras de IFN- γ , em comparação com a condição polarizante para Th1.

Os experimentos utilizando a linhagem de camundongos C57BL/6 *Il17^{cre}/mTmG* permitiram o rastreamento de células Th17 ou “ex-Th17”, mediante a expressão da proteína GFP. Os resultados obtidos utilizando células Th17 de animais *Il17^{cre}/mTmG* foram discrepantes com aqueles obtidos com animais WT em relação a porcentagem de células Th1-*like*. Ou seja, a presença de PGE₂ em células Th17 cultivadas em CP-Th1 parece não impactar no aumento da porcentagem de células Th1-*like*. No entanto, a presença desse prostanoide resultou em um drástico aumento na quantidade de IFN- γ produzida por essas células, observado pelo aumento do MFI na condição a qual a PGE₂ foi adicionada as células ex-Th17-mTmG. Confirmando, portanto, o papel desse mediador lipídico na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-*like*.

Estudos demonstram que a PGE₂ parece agir em conjunto com IL-12 favorecendo a diferenciação de linfócitos Th1, via receptor EP2 e EP4 (Yao *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Nossos resultados corroboram com esses estudos, demonstrando que linfócitos Th1, bem como Th17, expressam ambos os receptores. Porém que se nota após 9 e 15 dias da adição de CP-Th1 é uma modulação negativa do receptor EP2 de aproximadamente 2x nas células Th1-*like*, em comparação com células Th17, de maneira independente da adição de PGE₂. Além disso, a adição do prostanoide foi capaz de modular positivamente a expressão de EP4 em linfócitos ex-Th17 produtores de IFN- γ , sugerindo um possível mecanismo de *feedback* positivo, já demonstrado para esse receptor em outros tipos celulares, como neurônios (St-Jacques e Ma, 2013; 2016). Analisando, por fim, a expressão de EP2 e EP4 na superfície dos linfócitos Th1-*like*, demonstramos que a ação de PGE₂, IL-2 e IL-12, culmina não somente na alteração do perfil de citocinas produzidos pelas células, mas também na expressão dos

receptores EP2 e EP4, que assemelha-se muito mais ao perfil Th1 clássico em comparação ao Th17.

Dados recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que, em modelo de colite infecciosa, a PGE₂ age via receptor EP4 para inibir a diferenciação de linfócitos Th17 (Dejani *et al.*, 2018), apesar do presente estudo visar linfócitos Th17 já diferenciados, também demonstramos que a via da PGE₂/EP4 é importante para inibir um perfil Th17 e convertê-los a um perfil Th1-like in vitro.

Sabe-se que o receptor EP4 é acoplado a proteína G α s e induz a ativação de AC, enzima que converte adenosina trifosfato em cAMP (Locasale e Cantley, 2011). Esse mensageiro secundário é responsável por ativar duas vias, PKA e/ou Epac (Gerlo *et al.*, 2011). Para avaliar o mecanismo de ação de PGE₂ via EP4 no contexto da plasticidade, foi utilizado como estratégia o tratamento com inibidores para AC, PKA e Epac, porém, nesse experimento não foi observado bloqueio da sinalização de PGE₂ para nenhuma das condições experimentais. No entanto o uso de ativador de AC levou a um discreto aumento na produção de IFN- γ , sugerindo que PKA e Epac, poderiam agir sinergicamente durante o processo de plasticidade dessas células, e não de forma independente. A participação de Epac, na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1, pode estar relacionada uma possível inibição do perfil Th17, uma vez que, em células endoteliais vasculares, já está bem estabelecido que Epac leva uma cascata de ativação que resulta na transcrição de SOCS-3 que, por consequência, inibe a via de sinalização de IL-6, citocina fundamental na estabilidade do perfil Th17 (Schmidt *et al.*, 2013).

Sabidamente, a sinalização de PGE₂-EP4-PKA induz aumento da expressão de IL-12R β 2 e IFN- γ R1, favorecendo a diferenciação de linfócitos Th1, porém, esse mecanismo não ocorre de maneira isolada, sendo a via de PI3K essencial para manutenção da produção de IL-2 e IFN- γ , e para supressão de efeitos inibitórios da ação de cAMP sob a sinalização do TCR (Yao *et al.*, 2013). A importância de PI3K também foi descrita na diferenciação de células Th17 patogênicas, mas de forma independente da ativação por PGE₂, e sim na sinalização de IL-1 β -IL-1 β R/mTOR (Deason *et al.*, 2018). Considerando então que a PGE₂ poderia atuar concomitantemente via PKA e PI3K, na manutenção de linfócitos Th17, na presença de IL-12, e de forma isolada na diferenciação de linfócitos Th17 patogênicos, essa seria uma via passível de investigações futuras para elucidar como a PGE₂ é capaz de auxiliar na conversão de linfócitos Th17 em Th1-like.

A PGE₂ é um mediador lipídico já previamente descrito como o prostanoide envolvido no agravamento da doença em modelos de EAE e em pacientes com EM (Kihara *et al.*, 2009),

doenças essas diretamente associadas com a presença de linfócitos Th17 patogênicos (Kebir *et al.*, 2009; Domingues *et al.*, 2010; El-Behi *et al.*, 2010). No entanto, até o momento, nada havia sido relatado quanto a participação desse prostanoide na plasticidade dessas células Th17-Th1. Na tentativa de comprovar nossos resultados de plasticidade dessas células *in vitro* e demonstrar a possível participação de PGE₂ utilizando o modelo EAE, animais *Il17^{cre}/mTmG* foram imunizados com MOG+CFA, para sensibilizar clones de linfócitos T autorreativos e viabilizar a diferenciação e migração para o SNC. Após 7 dias de cultura, acredita-se que essas células já iniciaram a migração para o SNC, iniciando, portanto, o tratamento com indometacina. Como esperado, o tratamento com indometacina não afetou o *score* clínico dos animais, uma vez que foi descrito que ambas as células, Th1 ou Th17, são capazes de causar a EAE, alterando as características da doença, devido ao tipo de células recrutadas, monócitos ou neutrófilos, respectivamente (Kroenke *et al.*, 2008). Ainda em relação ao infiltrado celular, nota-se que nos linfonodos drenantes, axilar e cervical, a presença de células Th17 ou “ex-Th17” é pequena se comparado ao SNC. Esses resultados corroboram com os dados da literatura, visto que o desenvolvimento dos sinais clínicos da doença estão associado ao infiltrado celular no SNC, no pico da EAE (Kebir *et al.*, 2009; Boniface *et al.*, 2010). Ainda olhando para a porcentagem de células produtoras de GFP, entre os grupos tratados e não tratados com indometacina, não é possível notar diferença significativa, mas apenas uma tendência de aumento de Th17 ou “ex-Th17” no SNC do grupo tratado. Essa paridade de células entre os grupos era esperada, uma vez que o tratamento foi iniciado após 7 dias da imunização, quando essas células possivelmente já tinham alcançado o SNC, visando a não alteração do processo de diferenciação e migração linfocitário, e com o objetivo de apenas modular a plasticidade.

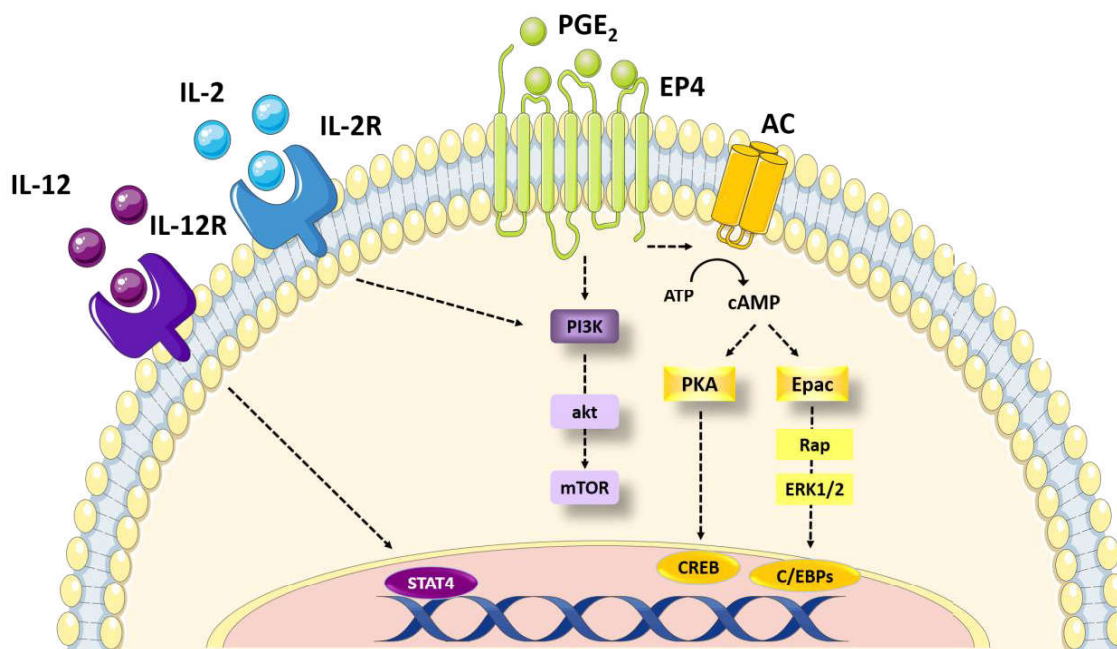
Sabe-se que altos níveis de PGE₂ são detectados no líquido cefalorraquidiano de paciente com EM (Bolton *et al.*, 1984). Além disso, em animais que desenvolvem a EAE, esse prostanoide parece estar relacionado a patogenicidade da doença (Kihara *et al.*, 2009). Corroborando com esses estudos, os resultados obtidos demonstram um novo papel de PGE₂ na plasticidade de linfócitos no modelo de indução ativa de EAE, uma vez que o tratamento com indometacina, ou seja, a redução da PGE₂ no microambiente levou a menor produção de *Ifng* por células Th17 no SNC e linfonodo axilar. Essa redução foi encontrada também nos linfonodos cervical e axilar, em células que expressavam dtTomato, ou seja, células consideradas Th1 clássicas, que nunca foram produtoras de IL-17A. No entanto, no SNC, houve praticamente o mesmo nível de expressão de IFN- γ por células Th1. Não foi possível detectar a produção de *Il17a* ou *Rorc* nessas células (dados não mostrados).

Portanto, nesse trabalho, demonstramos pela primeira vez, que sinergicamente a IL-2 e IL-12, a PGE₂ age via receptor EP4 para favorecer a conversão de um linfócito Th17 em Th1-*like*. Ainda, extrapolando os resultados *in vitro* para um modelo de EAE, sugere-se que, presença de PGE₂ parece ser capaz de induzir a plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-*like*, no SNC dos animais acometidos pela doença, possivelmente em ação sinérgica com IL-2 e IL-12 presente no microambiente.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que a PGE₂, em presença de microambiente polarizante para linfócitos Th1 (IL-2 e IL-12), induz aumento da plasticidade de células Th17 para Th1, através do receptor EP4 (Fig. 20). Tentando compreender o comportamento dessas células *in vivo*, o tratamento com indometacina não alterou o desenvolvimento da doença e a migração de linfócitos Th1 e Th17 para o sistema nervoso central dos animais, porém a presença de PGE₂ levou a maior produção de IFN- γ por células ex-Th17.

Figura 20 – Conclusão do Estudo



Fonte Figura elaborada utilizando imagens disponíveis no site Smart-Servier Medical Art
Disponíveis em: <https://smart.servier.com/>

Fig. 20. Os linfócitos Th17 migram para o SNC, onde encontram um microambiente inflamatório contendo IL-2 e IL-12, que induzem fosforilação de PI3K e STAT4, respectivamente, levando a um perfil Th1-like. Associado às citocinas, a PGE₂ age via receptor EP4, capaz de potencializar a via de sinalização de PI3k/Akt/mTOR, e ativar adenilato ciclase (AC)/cAMP/PKA-Epac. Dessa forma, a PGE₂, associada à presença de IL-2 e IL12, age auxiliando na plasticidade de linfócitos Th17 para Th1-like. (BAZZANO, J.M.R. **Conclusão do Estudo**. 2019. Ilustração).

REFERÊNCIAS

- ABROMSON-LEEMAN, S.; BRONSON, R. T.; DORF, M. E. Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFNgamma but have a spectrum of IL-17 profiles. **J Neuroimmunol**, v. 215, n. 1-2, p. 10-24, Oct 30 2009. ISSN 1872-8421 (Electronic) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19692128> >.
- AGALITI, T. et al. TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms. **J Autoimmun**, v. 87, p. 50-60, Feb 2018. ISSN 1095-9157 (Electronic) 0896-8411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371049> >.
- BELLEMORE, S. M. et al. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. **Clin Exp Immunol**, v. 182, n. 3, p. 261-9, Dec 2015. ISSN 1365-2249 (Electronic) 0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26250153> >.
- BOLTON, C.; TURNER, A. M.; TURK, J. L. Prostaglandin levels in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients in remission and relapse. **J Neuroimmunol**, v. 6, n. 3, p. 151-9, Jun 1984. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6586729> >.
- 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> >.
- BONIFACE, K. et al. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 679-87, Jul 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511558> >.
- BYSTROM, J. et al. Functional and phenotypic heterogeneity of Th17 cells in health and disease. **Eur J Clin Invest**, p. e13032, Oct 5 2018. ISSN 1365-2362 (Electronic) 0014-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30289986> >.
- CHEN, Q. et al. A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 2, p. 292-310, May 2010. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423341> >.
- CIOFANI, M. et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 289-303, Oct 12 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021777> >.
- COOMES, S. M. et al. IFNgamma and IL-12 Restrict Th2 Responses during Helminth/Plasmodium Co-Infection and Promote IFNgamma from Th2 Cells. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 7, p. e1004994, Jul 2015. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147567> >.
- DEASON, K. et al. BCAP links IL-1R to the PI3K-mTOR pathway and regulates pathogenic Th17 cell differentiation. **J Exp Med**, v. 215, n. 9, p. 2413-2428, Sep 3 2018. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30093533> >.

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.

DEJANI, N. N. et al. Intestinal host defense outcome is dictated by PGE2 production during efferocytosis of infected cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 36, p. E8469-E8478, Sep 4 2018. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30127026> >.

DOMINGUES, H. S. et al. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15531, Nov 29 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209700> >.

EL-BEHI, M.; ROSTAMI, A.; CIRIC, B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 5, n. 2, p. 189-97, Jun 2010. ISSN 1557-1904 (Electronic)
1557-1890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107924> >.

ESAKI, Y. et al. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 27, p. 12233-8, Jul 06 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566843> >.

FARIAS, A. S. et al. Nitric oxide and TNFalpha effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 1, p. 32-8, 2007. ISSN 1021-7401 (Print)
1021-7401 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700038> >.

GEORGE, R. J. et al. EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 83, n. 1-2, p. 112-20, Feb 2007. ISSN 1098-8823 (Print)
1098-8823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259077> >.

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> >.

ITANI, F. R. et al. Suppression of autoimmune demyelinating disease by preferential stimulation of CNS-specific CD8 T cells using Listeria-encoded neuroantigen. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1519, May 08 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)
2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28484224> >.

KALYVAS, A.; DAVID, S. Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. **Neuron**, v. 41, n. 3, p. 323-35, Feb 05 2004. ISSN 0896-6273 (Print)
0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766173> >.

KEBIR, H. et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 66, n. 3, p. 390-402, Sep 2009. ISSN 1531-8249 (Electronic)
0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19810097> >.

KIHARA, Y. et al. Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 51, p. 21807-12, Dec 22 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995978> >.

KROENKE, M. A. et al. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **J Exp Med**, v. 205, n. 7, p. 1535-41, Jul 07 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573909> >.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med**, v. 201, n. 2, p. 233-40, Jan 17 2005. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657292> >.

LEE, J. et al. T cell-intrinsic prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling is critical in pathogenic TH17 cell-driven inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 143, n. 2, p. 631-643, Feb 2019. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29935220> >.

LEE, P. W. et al. IL-23R-activated STAT3/STAT4 is essential for Th1/Th17-mediated CNS autoimmunity. **JCI Insight**, v. 2, n. 17, Sep 7 2017. ISSN 2379-3708 (Electronic)

2379-3708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28878115> >.

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> >.

LEXBERG, M. H. et al. IFN-gamma and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 11, p. 3017-27, Nov 2010. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21061434> >.

LEXBERG, M. H. et al. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 10, p. 2654-64, Oct 2008. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18825747> >.

LOCASALE, J. W.; CANTLEY, L. C. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. **Cell Metab**, v. 14, n. 4, p. 443-51, Oct 05 2011. ISSN 1932-7420 (Electronic)

1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982705> >.

MCCARTHY, D. P.; RICHARDS, M. H.; MILLER, S. D. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. **Methods Mol Biol**, v. 900, p. 381-401, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic)

1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933080> >.

MCCOY, J. M.; WICKS, J. R.; AUDOLY, L. P. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 110, n. 5, p. 651-8, Sep 2002. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208866> >.

MILLER, S. D.; KARPUS, W. J. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 15, p. Unit 15 1, May 2007. ISSN 1934-368X (Electronic)

1934-3671 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432984> >.

MIYAMOTO, K. et al. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. **Brain**, v. 129, n. Pt 8, p. 1984-92, Aug 2006. ISSN 1460-2156 (Electronic)
0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835249> >.

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> >.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science**, v. 327, n. 5969, p. 1098-102, Feb 26 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185720> >.

PANZER, M. et al. Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. **J Immunol**, v. 188, n. 2, p. 615-23, Jan 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156341> >.

REBOLDI, A. et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nat Immunol**, v. 10, n. 5, p. 514-23, May 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19305396> >.

SCHIRMER, C. et al. Human fibroblasts support the expansion of IL-17-producing T cells via up-regulation of IL-23 production by dendritic cells. **Blood**, v. 116, n. 10, p. 1715-25, Sep 09 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538798> >.

SCHMIDT, M.; DEKKER, F. J.; MAARSINGH, H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 2, p. 670-709, Apr 2013. ISSN 1521-0081 (Electronic)
0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447132> >.

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> >.

ST-JACQUES, B.; MA, W. Prostaglandin E2/EP4 signalling facilitates EP4 receptor externalization in primary sensory neurons in vitro and in vivo. **Pain**, v. 154, n. 2, p. 313-23, Feb 2013. ISSN 1872-6623 (Electronic)
0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265688> >.

_____. Preferred recycling pathway by internalized PGE2 EP4 receptor following agonist stimulation in cultured dorsal root ganglion neurons contributes to enhanced EP4 receptor sensitivity. **Neuroscience**, v. 326, p. 56-68, Jun 21 2016. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060485> >.

STADHOUDERS, R.; LUBBERTS, E.; HENDRIKS, R. W. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. **J Autoimmun**, v. 87, p. 1-15, Feb 2018. ISSN 1095-9157 (Electronic) 0896-8411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29275836> >.

STOCKINGER, B.; OMENETTI, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 9, p. 535-544, Sep 2017. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28555673> >.

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> >.

WONG, M. T. et al. A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 442-56, Aug 16 2016. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521270> >.

XU, S. et al. Prostaglandin E2 receptor EP4 is involved in the cell growth and invasion of prostate cancer via the cAMP/PKA/PI3K/Akt signaling pathway. **Mol Med Rep**, v. 17, n. 3, p. 4702-4712, Mar 2018. ISSN 1791-3004 (Electronic) 1791-2997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29328471> >.

YAMAZAKI, T. et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8391-401, Dec 15 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050256> >.

YAO, C. et al. Prostaglandin E(2) promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. **Nat Commun**, v. 4, p. 1685, 2013. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575689> >.

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> >.

APÊNDICE A – USO DE CCR6 COMO MARCADOR FENOTÍPICO PARA ISOLAMENTO DE LINFOCITOS TH17

Metodologia - Purificação de linfócitos Th17-CCR6⁺ e Th17-CCR6⁻.

Ao final da diferenciação dos linfócitos Th17-WT, células Th17 foram marcadas com anticorpo anti-CCR6-APC. Essas células foram então isoladas com auxílio de *beads* magnéticas anti-APC *MultiSort Kit* (#130-091-255), segundo instruções do fabricante. As frações APC⁺ e APC⁻ foram fenotipadas por citometria de fluxo.

Resultado - Isolamento de linfócitos Th17-CCR6⁺ e Th17-CCR6⁻.

Uma das abordagens propostas foi de purificação das células utilizando o marcador de superfície CCR6 em células Th17, uma vez que esse receptor de quimiocinas é sabidamente expresso majoritariamente em linfócitos Th17, dentre os subtipos de linfócitos T CD4⁺ efetores, mas pode também ser expresso em linfócitos Treg (Reboldi *et al.*, 2009).

Para tanto, as células Th17 diferenciadas foram avaliadas quanto a expressão de CCR6, Foxp3 e IL-17A, por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstram que 53,33% das células produtoras de IL-17A possuem CCR6 expresso na membrana (Fig. 1A), mas que a sua expressão em linfócitos Treg (T CD4⁺Foxp3⁺) é praticamente inexistente (Fig. 1B).

Figura 1 – Expressão de CCR6 por linfócitos Th17.

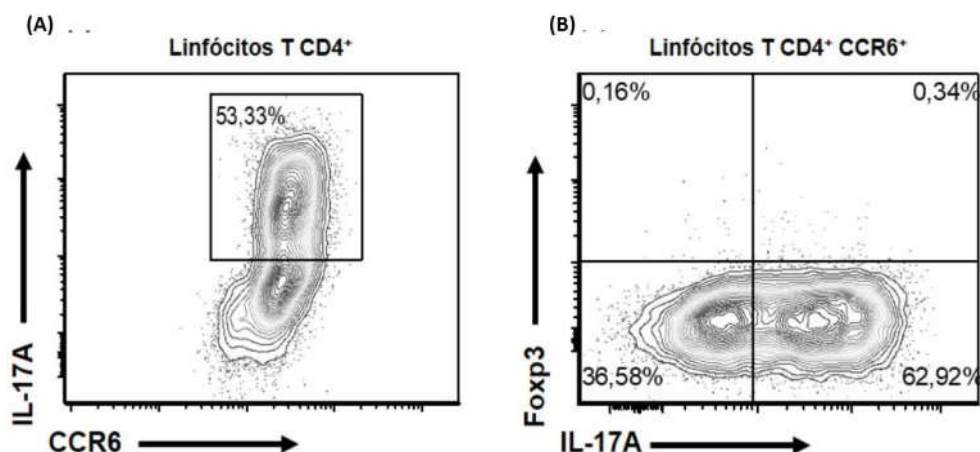


Fig. 1 - Apêndice A - Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57Bl/6, foram ativados com anti-CD3 e anti-CD28 e diferenciados na presença de IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β , anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN- γ (CP-Th17), durante 3 dias para linfócitos Th17. **(A)** Dotplot representando a expressão de IL-17A e CCR6 em células T CD4⁺. **(B)** Dotplot representando a expressão de Foxp3 e IL-17A em células T CD4⁺CCR6⁺. Para citometria de fluxo, as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensina, por 4h e pré-selecionadas quanto a viabilidade celular. O resultado oriundo de único experimento sem replicata experimental.

Sabendo que a presença de CCR6 na superfície dos linfócitos T CD4⁺ foi exclusiva das produtoras de IL-17A (Fig. 1), utilizou-se esse receptor de quimiocina como marcador de membrana para identificação de células Th17, permitindo dessa forma a purificação de células T CD4⁺CCR6⁺.

Antes da purificação, a frequência de células T CD4⁺CCR6⁺ foi de 56,51% e, dentre esses, 79,20% dos linfócitos produziam IL-17A (Fig. 2A). Após o isolamento, foram analisadas a fração de células não selecionadas na purificação (seleção negativa) e a fração de células de interesse (seleção positiva).

Utilizando o protocolo de acordo com as recomendações do fabricante, os resultados obtidos utilizando a população de células oriundas da seleção negativa não mostrou-se eficiente. Foi observado que aproximadamente 44% de células TCD4⁺ eram CCR6⁺ e dentre estas ~60% de células mostraram-se produtoras de IL-17A, ou seja, houve uma perda de células CCR6⁺. Porém, com relação às células obtidas pelo processo de seleção positiva, 97% das células retidas foram positivas para o receptor CCR6 e dessas, aproximadamente 79%, mostraram-se positivas para IL-17. No entanto, apesar do enriquecimento dessa população celular, não houve aumento significativo na porcentagem de células produtoras de IL-17A (Fig. 2B). Mediante aos resultados obtidos, decidimos optar por outras estratégias de purificação de células T CD4⁺IL-17⁺ para confirmar nossa hipótese.

Figura 221 - Purificação de linfócitos T CD4⁺CCR6⁺.

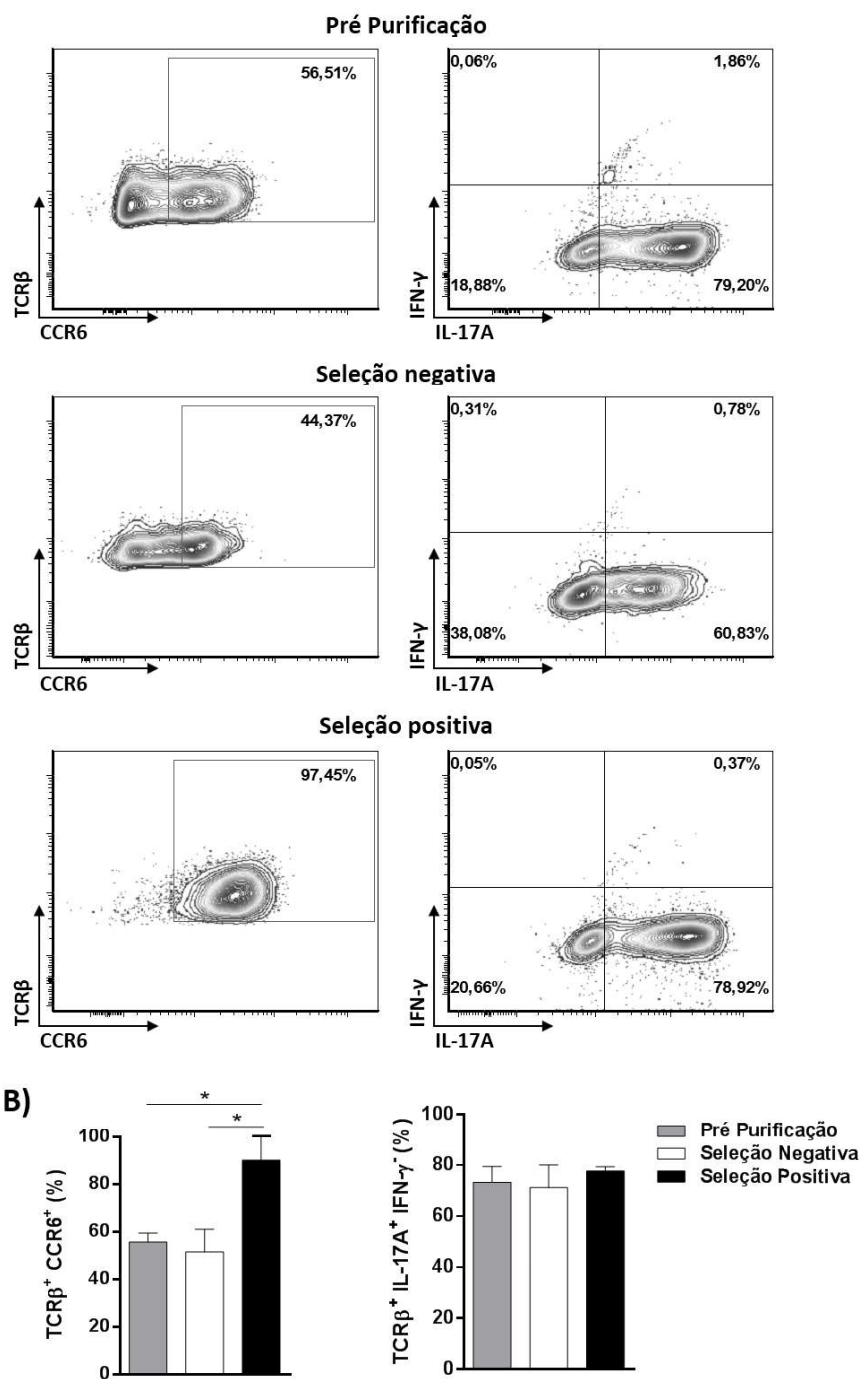


Fig. 2 – Apêndice A - Linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ isolados do baço de camundongos C57Bl/6, foram ativados com anti-CD3 e anti-CD28 e diferenciados na presença de IL-1β, IL-6, IL-23, TGF-β, anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN-γ. No 3º dia os linfócitos Th17 foram submetidos a isolamento com *beads* magnéticas pela expressão de CCR6. A fração de células não selecionadas (seleção negativa) e as células selecionadas (seleção positiva) pela coluna de separação magnéticas foram analisadas por citometria de fluxo. **(A)** *Dotplot* representativo da purificação de linfócitos T CD4⁺CCR6⁺ e a porcentagem de células produtoras de IL-17A e/ou IFN-γ de cada fração. **(B)** Gráfico de barras indicando a porcentagem de linfócitos T CD4⁺CCR6⁺ e T CD4⁺IL17⁺ IFN-γ. Para citometria de fluxo as células foram previamente estimuladas com PMA, Ionomicina e Monensina, por 4h e pré-

selecionadas quanto a viabilidade celular. Dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes. *, $P < 0,05$.

As células T $CD4^+CCR6^+$ obtidas previamente foram incubadas em CP-Th1 na presença ou ausência de 1 nM de PGE_2 , para avaliar a capacidade plástica de cada uma das frações isoladas. Após 9 e 15 dias de cultura, foi determinada a porcentagem de células capazes de produzir IL-17 e/ou IFN- γ .

A presença de PGE_2 , após 9 dias de cultura com CP-Th1, não levou a alteração da produção de IL-17A ou de IFN- γ pelas células, em contrapartida aumentou em 10% a presença de células T $CD4^+IL-17A^+IFN-\gamma^+$ (Fig. 3).

Ao continuar com a cultura, por mais 6 dias, observou-se a redução de células produtoras de IL-17A e IFN- γ , simples ou duplo positivas, tanto para a condição CP-Th1 ou CP-Th1 $^-$ - PGE_2 , cujas porcentagens se mantiveram semelhantes entre si (Fig. 3).

Figura 3.22 - Plasticidade de linfócitos T $CD4^+CCR6^+$ e T $CD4^+CCR6^-$.

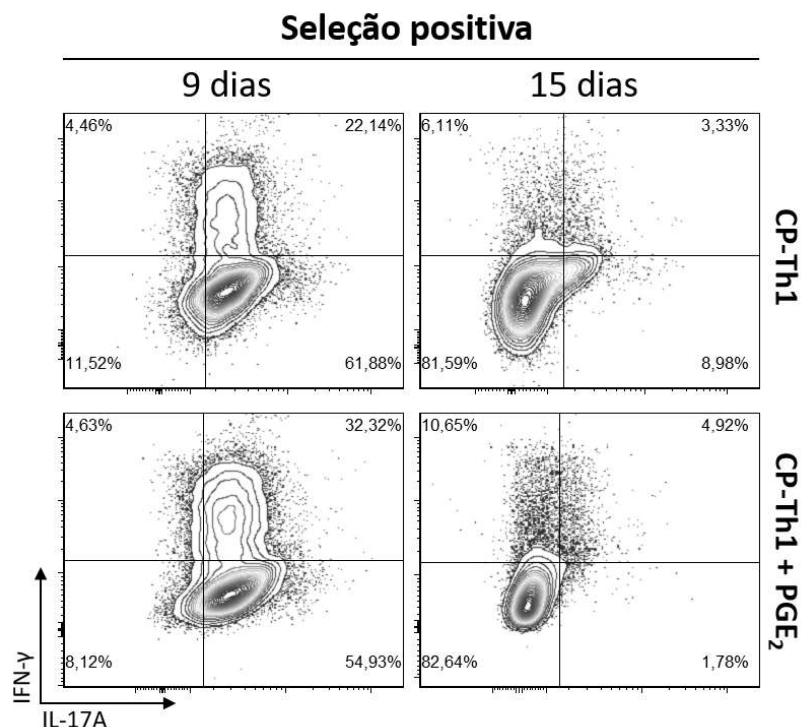


Fig. 3. Apêndice A - Linfócitos Th17 foram isolados pela expressão de CCR6 e cultivados por 15 dias com IL-2 e IL-12, na presença ou ausência de PGE_2 . No 9º e 15º dia de cultura as células foram estimuladas com PMA, Ionomicina e Monoensima por 4h, para avaliar a produção de citocinas intracelular. As células foram pré-selecionadas pela viabilidade celular. Um experimento em simplicata.

APÊNDICE B – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES EP, FATORES DE TRANSCRIÇÃO E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS, EM ENSAIO DE PLASTICIDADE DE LINFÓCITOS TH17 PARA TH1.

Metodologia - PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

O RNA dos linfócitos T CD4⁺ de cultura foram isolados usando RNAspin Mini de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare) e convertidos em cDNA usando iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) em T100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA). A expressão dos genes foi determinada pela amplificação de *primers* específicos e quantificados por SybrGreen (Life). A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta C_t}$. Para o experimento de qPCR foi utilizado termociclador ABI Prim 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências dos *primers* utilizado estão listadas a baixo:

Tabela 1 – Lista de *primers* utilizados no trabalho.

<i>Gapdh</i>	F- AACTTTGGCATTGTGGAAGG	R-ACACATTGGGGGTAGGAACA
<i>Ccr2</i>	F- AGAGAGCTGCAGCAAAAAGG	R- GATGAACCACACTGCCACAC
<i>Ccr6</i>	F- TTGTCCTCACCTACCGTTC	R- GGAAAGAGGCAGTTGCAAAG
<i>Ep1</i>	F- CTCCTTGCGGCATTAGTGTG	R- TGCGGTCTTTCGGAATCGT
<i>Ep2</i>	F- CGTTATCCTCAACCTCATTCGC	R- TCCGTCTCCTCTGCCATCG
<i>Ep3</i>	F- TTGCTGGCTCTGGTGGTGAC	R- GCTGGACTGCGAGACGGC
<i>Ep4</i>	F- TGACCCAAGCAGACACCACCT	R- TCCCACTAACCTCATCCACCAA
<i>Rorc</i>	F- GGTGATAACCCCGTAGTGGA	R- CTGCAAAGAAGACCCACACC
<i>Tbx21</i>	F- ATCCTGTAATGGCTTGTGGG	R- TCAACCAGCACCAGACAGAG

Resultados - PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Para compreender a modulação da expressão de receptores EP na membrana de linfócitos Th17 durante a sua conversão em células Th1-like, foi isolado o RNA de células durante o experimento de plasticidade com animais mTmG/*Il17cre*.

Em relação a linfócitos Th1 e Th17, após 3 dias de diferenciação, para ambos os subtipos celulares houve maior expressão de EP2 e EP4 em detrimento de EP1 e EP3 (Fig. 1A). Após 9 dias de cultura, o cultivo de células Th17 em CP-Th1 resultou no aumento da expressão de EP2 e EP4, com a predominância de EP2 quando comparado a 3 dias de cultura. No entanto, na presença de PGE₂, a expressão tanto de EP2 como de EP4 foi semelhante (Fig. 1B). Após 15 dias de cultura, foi observado o mesmo perfil de expressão de EP2 e EP4, comparado ao 9º dia de cultura. Ou seja, a presença de ambos receptores fora foi similar, dentro da mesma condição experimental (Fig. 1C).

Figura 1 – Expressão de Receptores EP durante a plasticidade de células Th17/Th1 na presença ou ausência de PGE₂.

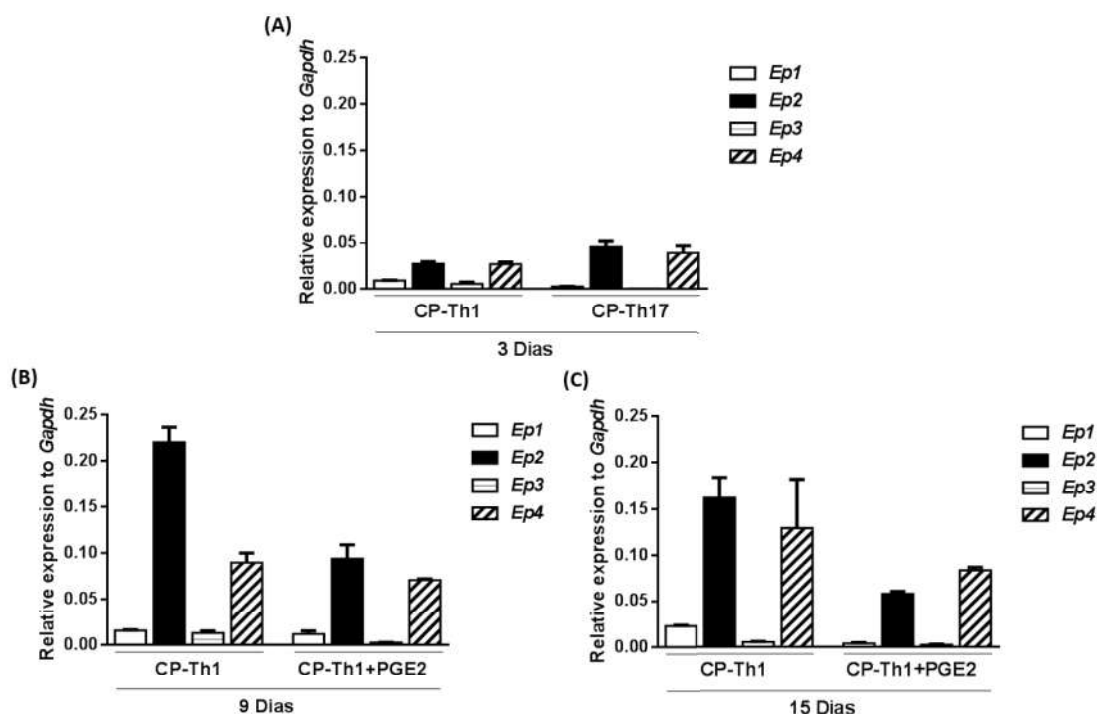


Fig. 1. Apêndice B - Linfócitos T CD4⁺ *naïve* foram isolados do baço de animais *Il17^{cre}/mTmG* e diferenciados em CP-Th17. Após 3 dias, as células foram desafiadas com CP-Th1 na presença ou ausência de 1 nM de PGE₂ até o 15º dia de cultura. A expressão de receptores EPs foi avaliada **(A)** em células Th1 e Th17 após 3 dias de diferenciação, **(B)** em células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 ou CP-Th1+PGE₂ após 9 dias e **(C)** em células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 ou CP-Th1+PGE₂ após 15 dias. Um experimento em duplicata.

Foi também avaliado a expressão de fatores de transcrição em células Th17 durante o processo de plasticidade para Th1. Como modelo de comparação, o primeiro experimento foi confirmar a expressão de *Rorγt* em células Th17 e *Tbx21* em células Th1 (Fig. 2A). Após a 9 dias de cultivo, notou-se que as células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 tiveram a

manutenção da expressão de *Rorgt*, porém um aumento de *Tbx21* quando comparado ao dia 3 de cultura (Fig. 2B). A presença de PGE₂ por sua vez resultou em uma maior expressão de *Tbx21* comparado a condição que recebeu apenas CP-Th1 (Fig. 2B).

Ao final de 15 dias de cultura, foi observado um modesto aumento na expressão de *Tbx21* na condição CP-Th1 e a presença de PGE₂ resultou em um aumento de ao menos 3 vezes na expressão de *Rorgt* quando comparado a condição que apenas recebeu a CP-Th1 (Fig. 2C).

Figura 2 - Expressão de Fatores de Transcrição durante a plasticidade de células Th17/Th1 na presença ou ausência de PGE₂.

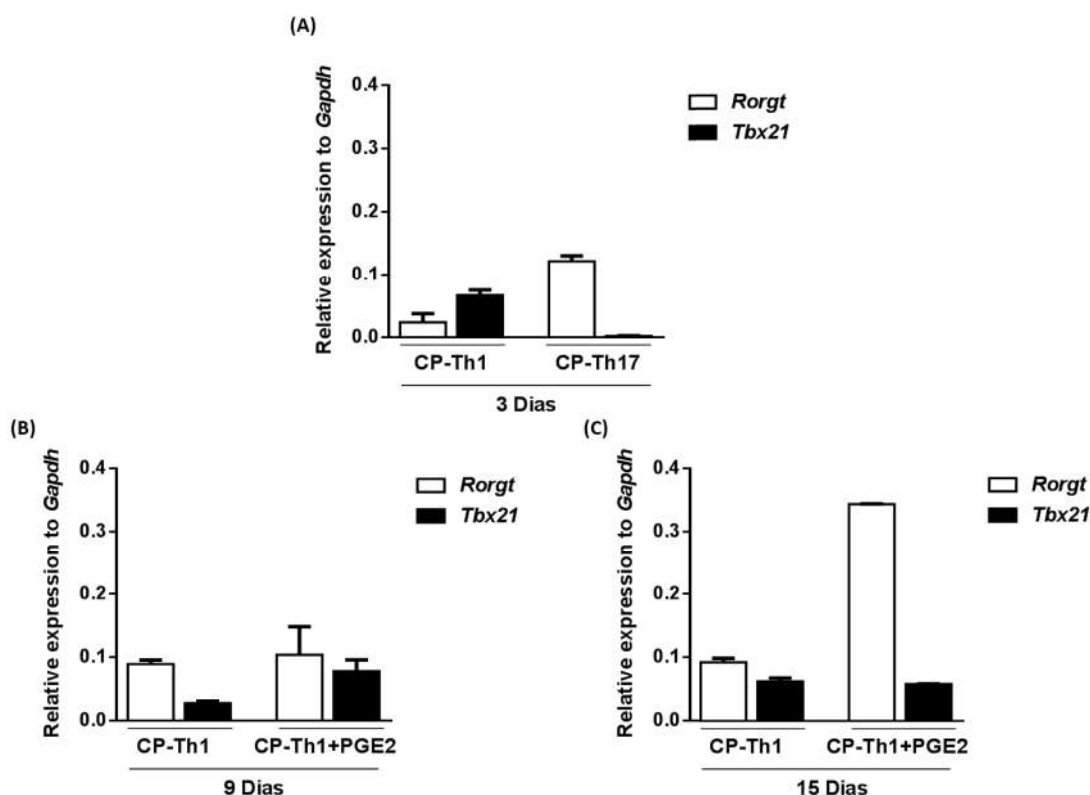


Fig. 2 - Linfócitos T CD4⁺ naive foram isolados do baço de animais *Il17^{cre}/mTmG* e diferenciados em CP-Th17. Após 3 dias, as células foram cultivadas com CP-Th1 na presença ou ausência de 1 nM de PGE2 até o 15º dia de cultura. A expressão de *Rorgt* e *Tbx21* foi avaliada (A) em células Th1 e Th17 após 3 dias de diferenciação, (B) em células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 ou MPTH1+PGE2 após 9 dias e (C) em células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 ou CP-Th1+PGE2 após 15 dias. Um experimento em duplicata.

No experimento *in vivo*, será importante entender a dinâmica de migração dos linfócitos Th17, Th1 e Th1-like. Sendo assim, avaliou-se a expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR6 nas células Th17 durante o processo de plasticidade, os quais são os receptores mais envolvidos com a migração desses subtipos linfocitários em EAE.

Comprovando dados da literatura, após a diferenciação, a expressão de *Ccr6* é exclusiva de linfócitos Th17, enquanto *Ccr2* pode aparecer em linfócitos Th1 e Th17 em quantidades similares (Fig. 3A). Com isso, o cultivo de células Th17 na presença de CP-Th1 ou CP-Th1+PGE₂ resultou em uma drástica redução na expressão de *Ccr6* após 9 e 15 dias de cultura, quando comparado ao 3º dia de cultura celular (Fig. 3.2.3B e 3.2.3C). Por outro lado, foi observado um aumento na expressão de *Ccr2* após 9 e 15 dias de cultura (Fig. 3B) quando comparado ao 3º dia de cultura celular (Figura 3C). A presença de PGE₂ não mudou a expressão de *Ccr6* ou *Ccr2* em linfócitos Th17 cultivados em CP-Th1, quando comparada a condição que não recebeu PGE₂ (Fig 3.2.3.).

Figura 3.23 - Expressão de receptores de quimiocinas durante a plasticidade de células Th17/Th1 na presença ou ausência de PGE₂.

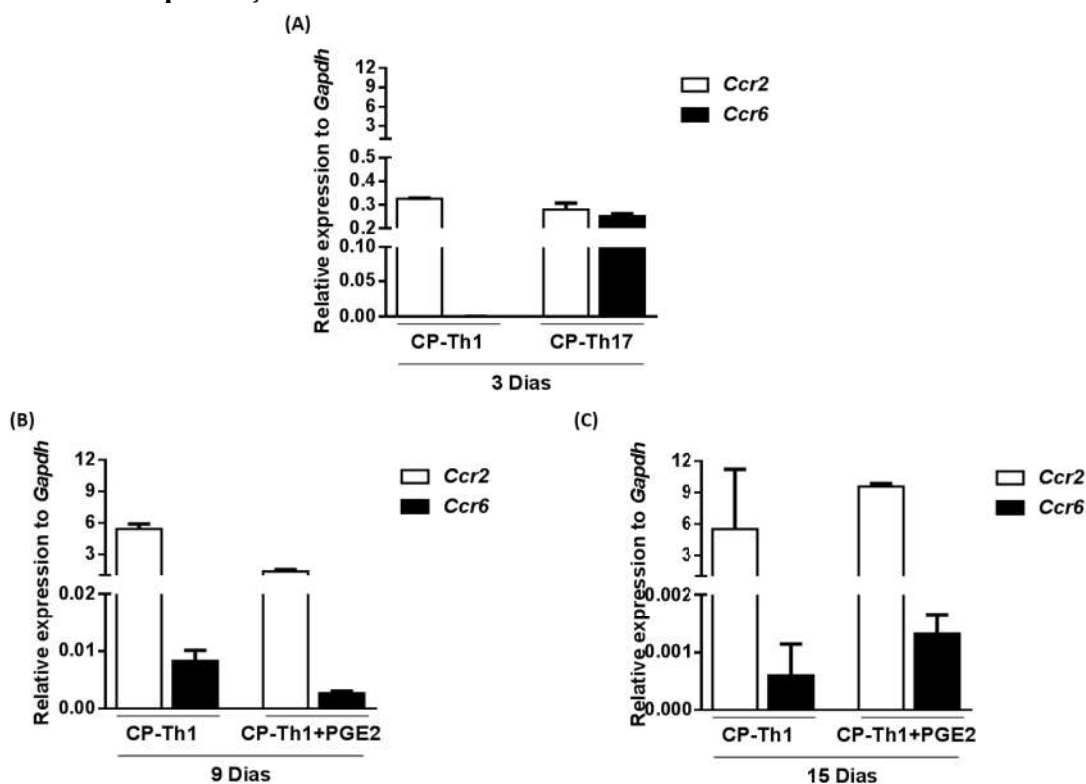


Fig. 3. Apêndice B - Linfócitos T CD4⁺ *naive* foram isolados do baço de animais *Il17^{cre}/mTmG* e diferenciados em CP-Th17. Após 3 dias, as células foram desafiadas com CP-Th1 na presença ou ausência de 1 nM de PGE₂ até o 15º dia de cultura. A expressão de *Ccr6* e *Ccr2* foi avaliada (A) em células Th1 e Th17 após 3 dias de diferenciação, (B) em células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 ou MPTTh1+PGE₂ após 9 dias e (C) em células Th17 cultivadas na presença de CP-Th1 ou MPTTh1+PGE₂ após 15 dias. Um experimento em duplicata.