

AMANDA CORREIA SARAIVA

**PRODUÇÃO DE PGE₂ POR CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIANTE FAGOCITOSE
DE CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS**

Araraquara

2013

AMANDA CORREIA SARAIVA

**PRODUÇÃO DE PGE₂ POR CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIANTE FAGOCITOSE
DE CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS**

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

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

Araraquara

2013

*Dedico este trabalho a meus pais e meu
irmão pelo esforço em me manter aqui e pelo
apoio do início ao fim.*

AGRADECIMENTOS

À família:

Meus pais por todos os esforços e compreensão;

Meu irmão pelo apoio e credibilidade;

Stanley, Iza, Catarina, Iolanda e Patrícia por participarem tão lindamente deste processo.

Aos amigos:

Nathália, pela companhia, pelo carinho e pelos ouvidos;

Helen, pela paciência;

Hermano, pelo tempo;

Alice, por tudo;

Ana Paula, Cínthia, Taciana, Paulo e Larissa pelas risadas, comidas, e festas;

Renata, pela leveza;

Naiara, Felipe, Fernanda, Vitória, Ana, Gustavo, Aline, Thaís, Taís, Valéria e Flávio, por tornarem as experiências do laboratório uma marcante experiência de vida.

Aos professores:

Alexandra, pela amizade, pelos grandes ensinamentos profissionais e de vida e, claro, pela enorme paciência;

Taís Bauab, por não me deixar desistir;

Márcia da Silva (in memorian), por estar atenta aos detalhes que são importante para cada um;

Marcos Corrêa, pelo enorme coração;

À FCFAr/UNESP, FAPESP, CNPq e PROPE pelo apoio financeiro e intitucional.

E por fim, à minha psicóloga Cristina.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
Células Dendríticas na Resposta Imune	12
Reconhecimento de Células Apoptóticas	12
Efeito da Eferocitose na Modulação da Resposta Imune	14
PGE ₂ na Modulação da Resposta Imune	16
PGE ₂ e Imunidade Adaptativa.....	18
Hipótese do Projeto	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
Animais.....	22
Diferenciação de CDs a partir de precursores de Medula Óssea (BMDC)	22
Análise da expressão de receptores de superfície por citometria de fluxo	23
Geração das células apoptóticas com PAMP (AC+PAMP)	24
Ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas (AC+PAMP) por células dendríticas - Geração de meio Condicionado.	26
Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	27
Análise estatística	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
Geração de Células Dendríticas a partir de Precursores da Medula Óssea	29
Geração de Células apoptóticas infectadas utilizando irradiação UV	33
Quantificação de PGE ₂ a partir do meio condicionado – Protocolos 1 e 2	35
Avaliação de Citocinas do Meio Condicionado	39
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeito da fagocitose de células apoptóticas.

Figura 2. Atuação da PGE₂ via esceptores EP.

Figura 3. PGE₂ atua na diferenciação de linfócitos T.

Figura 4. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea.

Figura 5. Fenótipo de maturação de células dentríticas oriundas de precursores da medula óssea.

Figura 6. Avaliação do perfil de morte celular no exsudado peritoneal.

Figura 7. Avaliação do perfil de morte celular do exsudado peritoneal irradiado com UV.

Figura 8. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promoveu a liberação de altos níveis de PGE₂ – Protocolo 1.

Figura 9. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promoveu a liberação de altos níveis de PGE₂ – Protocolo 2.

Figura 10. Produção de IL-1 β e IL-6 por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas com diferentes cargas bacterianas.

Figura 11. Produção de TGF- β por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

8-CPT-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
AC+PAMP_{high}	Célula Apoptótica Infectada com alta carga bacteriana
AC+PAMP_{low}	Célula Apoptótica Infectada com baixa carga bacteriana
AMP_c	Adenosina Monofosfato Cíclica
BMDC	Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea
CD	Célula Dendrítica
COX	Cicloxygenase
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
DAMP	Padrão Molecular Associado a Dano
EP	Receptor EP
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GM-CSF	Fator Estimulador de Crescimento de Monócitos e Granulócitos
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteína G
IFN-α	Interferon alfa
IL	Interleucina
iTreg	Célula T reguladora induzida
LTC4	Leucotrieno C4
MC-CD	Meio Condicionado
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NO	Óxido Nítrico
nTreg	Célula T reguladora natural
PAF	Fator de Ativação Plaquetária

PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PC	Fosfatidilcolina
PG	Prostaglandina
PI	Iodeto de Propídeo
PKA	Fofocinase A
PLA2	Fosfolipase A2
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
PS	Fosfatidilserina
SFB	Soro Fetal Bovino
TCR	Receptor de Célula T
TGF-β	Fator de Crescimento e Transformação beta
Th	Célula T helper
Tim	Mucina Imunoglobulina de Célula T
TLR	Receptor Semelhante a Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Célula T reguladora
TxA2	Tramboxano A2
UFC	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

A fagocitose de células apoptóticas é um processo dinâmico e de fundamental importância para homeostase dos tecidos após uma injúria. A fagocitose de células apoptóticas promove a síntese de mediadores anti-inflamatórios como PGE_2 , $\text{TGF-}\beta$ e IL-10, podendo resultar na supressão da resposta imune do hospedeiro contra agentes infecciosos. Entretanto, um elegante estudo utilizando células apoptóticas infectadas demonstrou que a fagocitose destas células promove a geração não apenas de citocinas anti-inflamatórias como $\text{TGF-}\beta$ mas também de IL-6 e IL-23, promovendo um efeito imunoestimulador, a diferenciação de células Th17. A atuação da PGE_2 na imunidade adaptativa vem sendo investigada quanto à diferenciação e ativação de linfócitos Th1, Treg e Th17.

Os resultados aqui apresentados demonstram que o protocolo de diferenciação de células dendríticas utilizado foi capaz de gerar em torno de 85% de CD imaturas evidenciado pela expressão de um perfil fenotípico $\text{CD11c}^+\text{CD11b}^+\text{MHCII}^{\text{low}}\text{CD80}^{\text{low}}\text{CD86}^{\text{low}}$.

Quanto à produção de PGE_2 , a fagocitose de AC+PAMP por células dendríticas foi capaz de induzir níveis elevados deste mediador lipídico nas diferentes proporções de células apoptóticas utilizadas. Os níveis de PGE_2 encontrados no sobrenadante de cultura foi proporção dependente evidenciando uma relação direta entre fagocitose de AC+PAMP e a produção de PGE_2 .

A fim de mimetizar a cinética da carga bacteriana durante uma infecção, ou seja, inicialmente uma menor carga bacteriana que tende a aumentar conforme ocorre a colonização, os animais foram inoculados com alta (high - 10^6 UFC de *E. coli*) e baixa (low - 10^5 UFC de *E. coli*) cargas bacterianas, gerando desta forma o que chamamos de AC+PAMP^{high} e AC+PAMP^{low}, respectivamente. Os resultados aqui apresentados demonstram que diante de uma alta carga bacteriana há uma maior produção dos mediadores

investigados, PGE₂, IL-1 β , TGF- β e IL-6, quando comparada com a produção diante de baixa carga bacteriana.

O pré-tratamento das CD com indometacina foi capaz de inibir a produção de PGE₂ em níveis acima de 85% comprovando que esta ferramenta será uma boa estratégia a ser utilizada nos subseqüentes ensaios de diferenciação de células Th17 a partir do MC-CD para verificar a influência da PGE₂ neste processo.

Nossos resultados demonstram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas leva à produção de PGE₂ assim como citocinas diretamente envolvidas na diferenciação de células Th17.

INTRODUÇÃO

Células Dendríticas na Resposta Imune

Células Dendríticas (CD) são células profissionais na apresentação de antígenos e uma das mais hábeis em apresentar antígenos e induzir a ativação e diferenciação de células T “naive” nas subpopulações de linfócitos, Th1, Th2, Th17 e Treg. Em situações homeostáticas, CD imaturas estão presentes nos tecidos e, juntamente com os macrófagos, representam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos. Durante um processo infeccioso, as CD imaturas fagocitam o patógeno e adquirem um fenótipo maduro, o que favorece a migração destas células para órgãos linfoides proximais, criando, desta forma, uma ponte entre as respostas inata e adaptativa do sistema imune(1).

A mudança de perfil das CD, de imaturo a maduro, ocorre a partir da fagocitose ou interação com patógenos via receptores de reconhecimento padrão (PRRs) resultando não apenas em mudança morfológica, mas também na expressão de receptores de quimiocinas, moléculas de MHC-II e co-estimuladoras (CD-80 e CD-86) que permitem a ativação das células T “naive” no linfonodo. Durante o processo de maturação, estas células dendríticas passam também a expressar receptores de quimiocinas, como CCR-7, que permitem o recrutamento destas células para região paracortical do linfonodo proximal. O recrutamento destas CD para esse região rica em células T é controlada por quimiocinas como CCL19 e CCL21, produzidas pelas células estromais da região rica em células T do linfonodo(2, 3).

Reconhecimento de Células Apoptóticas

A apoptose é um tipo de morte celular programada que faz parte do processo fisiológico de desenvolvimento, remodelamento e renovação tecidual homeostática nos diversos órgãos. Morfologicamente, a morte celular por apoptose está associada com redução do volume celular, retração de pseudópode, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e manutenção da integridade da membrana plasmática(4). Diferente do observado na morte

celular por necrose, a permeabilidade celular é mantida durante a apoptose, evitando-se a liberação de componentes intracelulares tóxicos denominados DAMPs (*Damage-associated molecular pattern*). Os corpos celulares resultantes desse processo, denominados corpos apoptóticos, são subsequentemente removidos por fagócitos profissionais, como macrófagos ou células dendríticas imaturas, porém, células adjacentes também podem participar do processo, como por exemplo, células epiteliais(5).

O reconhecimento e o englobamento de corpos apoptóticos fazem parte de um processo complexo e dinâmico denominado *programmed cell clearance*(6). A deficiência na remoção das células apoptóticas por fagócitos resulta na perda da integridade destas células, resultando na liberação de DAMPs e interação à PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) na superfície de fagócitos e promove a liberação de substâncias pró-inflamatórias.

O processo de fagocitose de células apoptóticas por fagócitos, denominado eferocitose, envolve a interação de um grande número de receptores e opsoninas com seus respectivos ligantes celulares expostos durante os vários estágios da apoptose. Estudos recentes demonstram que a detecção, reconhecimento e ingestão de células apoptóticas envolvem pelo menos três mecanismos: moléculas *eat-me* expressas por células apoptóticas, receptores endocíticos expressos em fagócitos, e moléculas solúveis que atuam interligando células apoptóticas e fagócitos. O sistema imune possui PRRs capazes de reconhecer o próprio modificado, ou seja, células que se encontram em processo de morte celular(6). Um fator comum a todas as membranas eucarióticas é a distribuição assimétrica de diferentes espécies de fosfolipídios na dupla camada lipídica. O processo apoptótico, por sua vez, encontra nessa assimetria uma importante maneira de sinalização para seu reconhecimento por fagócitos. Sendo assim, um dos primeiros eventos no processo apoptótico é a perda dessa assimetria e conseqüente exposição de fosfolipídios que normalmente encontram-se presentes na parte interna da membrana plasmática, como a fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina

(PE) e fosfatidilcolina (PC)(7). Dentre esses, a externalização de PS é a mais descrita como um importante sinal *eat-me* presente na superfície celular e facilita, portanto, a limpeza de células apoptóticas. Além disso, reações de oxidação que levam ao acúmulo de formas oxidadas de PS podem estimular a difusão transmembrana de PS e formas oxidadas de PS (PS-OX) durante o processo de apoptose(6).

Moléculas que se ligam a PS exposta e secundariamente se ligam aos receptores em fagócitos estão entre as mais conhecidas. Entre essas, a glicoproteína MFG-E8, secretada por um subtipo de macrófagos ativados, se liga à PS e secundariamente a integrinas $\alpha\beta3$ expressas na superfície de macrófagos, resultando no processo de fagocitose das células apoptóticas. Da mesma maneira, as opsoninas Gas6 e a proteína S, se ligam à PS e, secundariamente, ao receptor da tirosina kinase Mer(8).

Recentemente, duas proteínas transmembranas, Tim1 e Tim4, e dois receptores, o receptor estabilina-2(9) e o receptor BAI1(10), foram também descritos como receptores de PS. Formas oxidadas dos fosfolipídios expostos no momento da apoptose também são reconhecidas por receptores específicos de fagócitos e contribuem para exclusão de células em processo de apoptose. Um estudo recente demonstrou que o reconhecimento de células apoptóticas pelo receptor *scavenger* CD36 ocorre via moléculas de PS oxidadas (PS-OX) e, em menor escala, moléculas de PC oxidadas (PC-OX), mas não se liga à PS não oxidada(11).

Efeito da Eferocitose na Modulação da Resposta Imune

A ingestão de células apoptóticas, ou mesmo sua ligação a macrófagos, promove a liberação de moléculas anti-inflamatórias, entre elas TGF- β , IL-10 , óxido nítrico, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de ativação plaquetária (PAF), enquanto inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, KC, IL-8 e leucotrieno C₄(12-14). Esses efeitos anti-inflamatórios foram observados tanto em macrófagos ativados como não ativados

e a falta de mediadores pró-inflamatórios parece estar associada com a ação autócrina e parácrina de TGF- β , PGE₂ e PAF(13, 15).

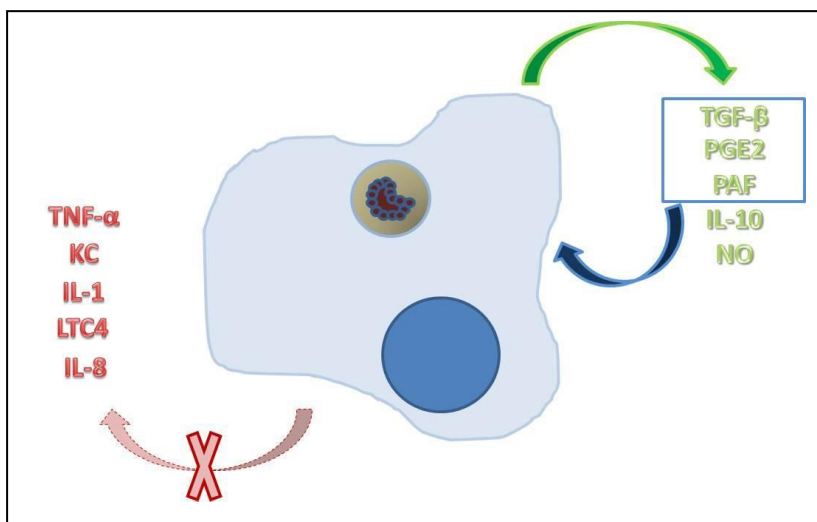


Figura 1: Efeito da fagocitose de células apoptóticas. A fagocitose de células apoptóticas leva à liberação de mediadores anti-inflamatórios como TGF- β , PGE₂, PAF, IL-10 e NO ao passo que inibe a liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , KC, IL-1, IL-8 e LTC-4.

Em um modelo de doença de Chagas, a administração de células apoptóticas aumentou a parasitemia, sendo este efeito bloqueado pela utilização de inibidor de COX ¹⁶. De maneira semelhante, Medeiros *et al.* (2009) demonstraram que a administração de células apoptóticas 16 horas antes da administração intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae* promoveu um aumento da bacteremia com observação de disseminação hematogênica. A utilização de animais nocautes para o receptor EP2 reverteu a situação, controlando a bacteremia de modo semelhante ao controle (animal apenas infectado)(14). Ambos os estudos demonstram a atuação da prostaglandina como mediadora imunossupressora no contexto da fagocitose. Entretanto, a fagocitose de células apoptóticas infectadas, ou seja, contendo

PAMP associado, promove a produção de mediadores como IL-23, TGF- β e IL-6 por células dendríticas. A incubação de células T “naive” com meio condicionado, proveniente de cultura de CD e células apoptóticas infectadas, na presença de anti-CD3 e anti-CD28 promove a diferenciação de células Th17 funcionais. Por outro lado, a incubação de células T “naive” na presença de meio condicionado obtido de células apoptóticas sem PAMP resulta na diferenciação em células T reguladoras (Tregs)(16). Quando as CD eram deficientes em TRIF e Myd88 também se observou a diferenciação em células Tregs, demonstrando que a presença ou ausência de ligante de TLR dentro de células apoptóticas dita se a CD instruirá a diferenciação para células Th17 ou Tregs(17).

Desta forma, a fagocitose de células apoptóticas infectadas promove um estímulo fisiológico com produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β) e pró-inflamatórias (IL-6) e cria condições ideais para a geração de células Th17. Curiosamente, apesar de muitos estudos sobre células Th17, esse mecanismo foi o primeiro a propor um modelo fisiológico de diferenciação das mesmas(18). Esse foi comprovado *in vivo* pelo modelo de infecção por *Citrobacter rodentium*, conhecido por induzir resposta Th17, no qual o bloqueio do fenômeno da apoptose anulou a resposta por esse subtipo celular(17).

PGE₂ na Modulação da Resposta Imune

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos formados pela maioria das células do nosso corpo e atuam de forma autócrina e parácrina. Elas têm origem do ácido araquidônico liberado de membranas pelas fosfolipases (PLA2), principalmente a fosfolipase citosólica tipo 4 (cPLA2)(19). O ácido araquidônico liberado é rapidamente metabolizado pela ciclooxygenase 1 (COX-1) e ciclooxygenase 2 (COX-2) para formar uma prostaglandina intermediária denominada PGH2.

Enquanto a COX-1 é uma enzima constitutiva, responsável pelos níveis basais da produção de prostaglandinas, a COX-2 é induzida em momentos de inflamação e atua

potencializando a produção de PGs(20). No entanto, a visão simplificada de que COX-1 exerce funções homeostáticas e COX-2 exerce funções patofisiológicas é errônea na maioria dos casos(21). As enzimas COX estão inseridas nas membranas nuclear e do retículo endoplasmático, com sua porção de ligação ao substrato orientada para o citoplasma(20). As enzimas responsáveis pela metabolização da PGH₂ traçam o destino da mesma, podendo ocorrer a formação de PGI₂, PGF₂, PGD₂, PGE₂ ou tromboxanas A₂ (TxA₂). O produto final da metabolização de PGH₂ depende do tipo celular em questão e as prostaglandinas produzidas são liberadas pela célula predominantemente através de um transportador de prostaglandina e, devido sua curta meia vida, logo exercem sua função de forma autócrina e parácrina(22).

Particularmente, a PGE₂ é amplamente produzida pelas células do corpo humano, com as mais versáteis funções. Ela exerce sua função através de 4 subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses subtipos são receptores associados à proteína G (GPCRs) e variam em sua estrutura molecular, propriedades de ligação à PGE₂, distribuição tecidual, expressão e transdução de sinais(23).

Entre esses, EP2 e EP4 são expressos em altos níveis em monócitos e células T “naive” em humanos, enquanto EP1 e EP3 são pouco expressos ou inexistentes. No mesmo trabalho, Boniface *et al.* (2009) demonstraram que a ativação de células T humanas promoveu o aumento de duas a três vezes da expressão dos receptores EP2 e EP4(24). Por outro lado, em ensaios murinos, além da alta expressão de EP2 e EP4, o receptor EP1 também está presente em células T “naive”(25). Enquanto EP1 é um receptor acoplado a proteínas Gq/p, ambos EP2 e EP4 estão acoplados à subunidade α estimuladora da proteína G (G α_s), e a ligação de PGE₂ a estes promove, respectivamente, o aumento de Ca²⁺ intracelular e o aumento da concentração intracelular de adenosina mono fosfato cíclica (AMPC), importante segundo mensageiro que atua regulando diversas funções celulares(26, 27).

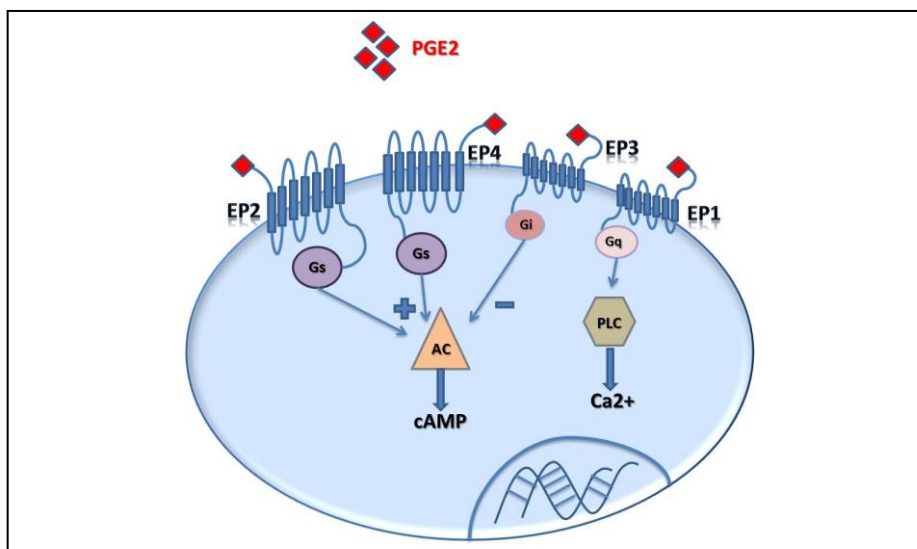


Figura 2: Atuação da PGE₂ via receptores EP. A prostaglandina E₂ atua via 4 receptores ligados a proteína G: EP1, EP2, EP3 e EP4. EP1, acoplado a proteínas Gq/p, EP2 e EP4, acoplados à subunidade α estimuladora (G α s), e a ligação de PGE₂ leva, respectivamente, ao aumento de Ca²⁺ intracelular e ao aumento da concentração intracelular de adenosina mono fosfato cíclica (AMPc).

PGE₂ e Imunidade Adaptativa

A atuação da PGE₂ na imunidade adaptativa vem sendo desvendada nos últimos anos e, diferente da função imunossupressora descrita previamente(28, 29), recentes trabalhos demonstram uma importante função imunoativadora deste mediador lipídico(30).

O papel supressor da PGE₂ via EP2 foi demonstrado previamente pela inibição da capacidade proliferativa de células T usando um modelo de reação linfocitária mista(31). Esse efeito supressor de PGE₂ e 8-CPT-cAMP em células T periféricas é mediado por PKA-Csk, que atua antagonizando a sinalização de TCR, competindo pela ativação da kinase da família Src (Lck), ou seja, enquanto o TCR estimula a ativação desta kinase, a PGE₂ estimula a inativação(32, 33). Ainda em uma visão imunossupressora, recentes trabalhos destacam o papel de PGE₂ na diferenciação de células Treg. Baratelli *et al.* (2005) demonstraram que a

PGE_2 aumenta a expressão do fator de transcrição FOXP3 em células Treg naturais (nTreg) e promove a expressão deste em células T “naive”, sendo capaz de promover a diferenciação destas em células Treg induzidas (iTreg)(28).

Contradizendo esses efeitos supressores diretos ou indiretos por PGE_2 em células T, um recente trabalho da literatura reportou que estimulações fortes de TCR superam o efeito supressivo da PGE_2 e, nessas condições, mais a combinação de citocinas que promovem a diferenciação de células Th1, a PGE_2 aumentou a porcentagem de células perfil Th1 produtoras de $\text{IFN-}\gamma$ de maneira concentração dependente. Entretanto, altas doses de PGE_2 não atuaram na promoção da diferenciação da subpopulação Th1. Curiosamente, essa sinalização facilitadora da PGE_2 , apesar de ocorrer via EP2 e EP4, foi promovida pela ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)(30). Outro estudo demonstrou que o receptor EP1 é um facilitador da diferenciação de células Th1 e que essas, com relação aos receptores EPs, expressam predominantemente o receptor EP1(25).

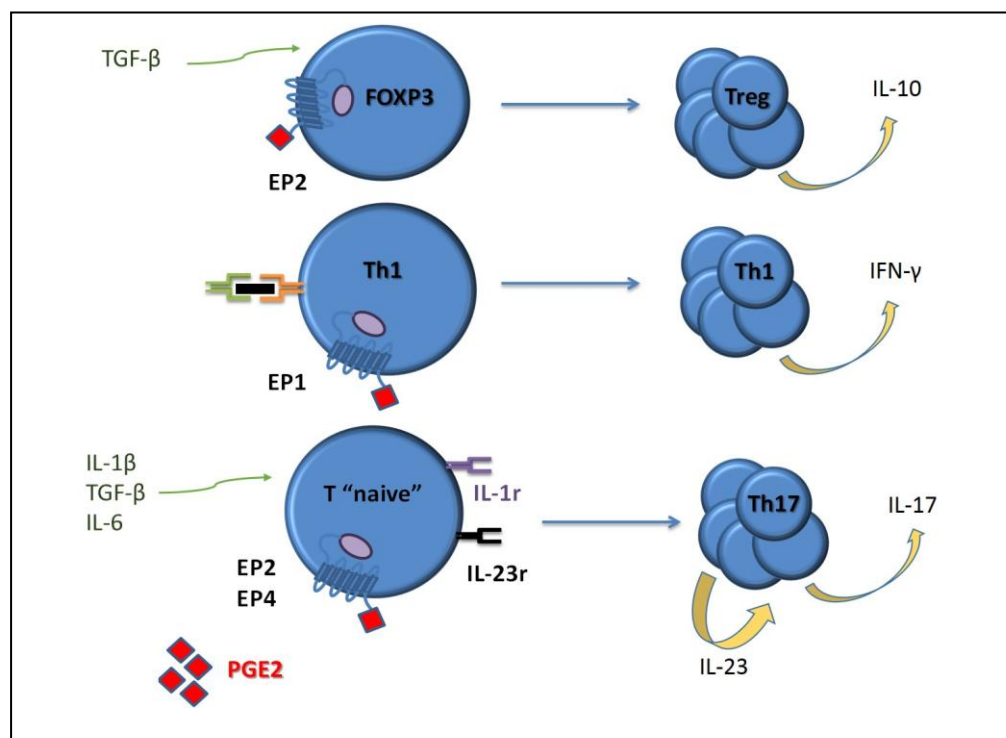


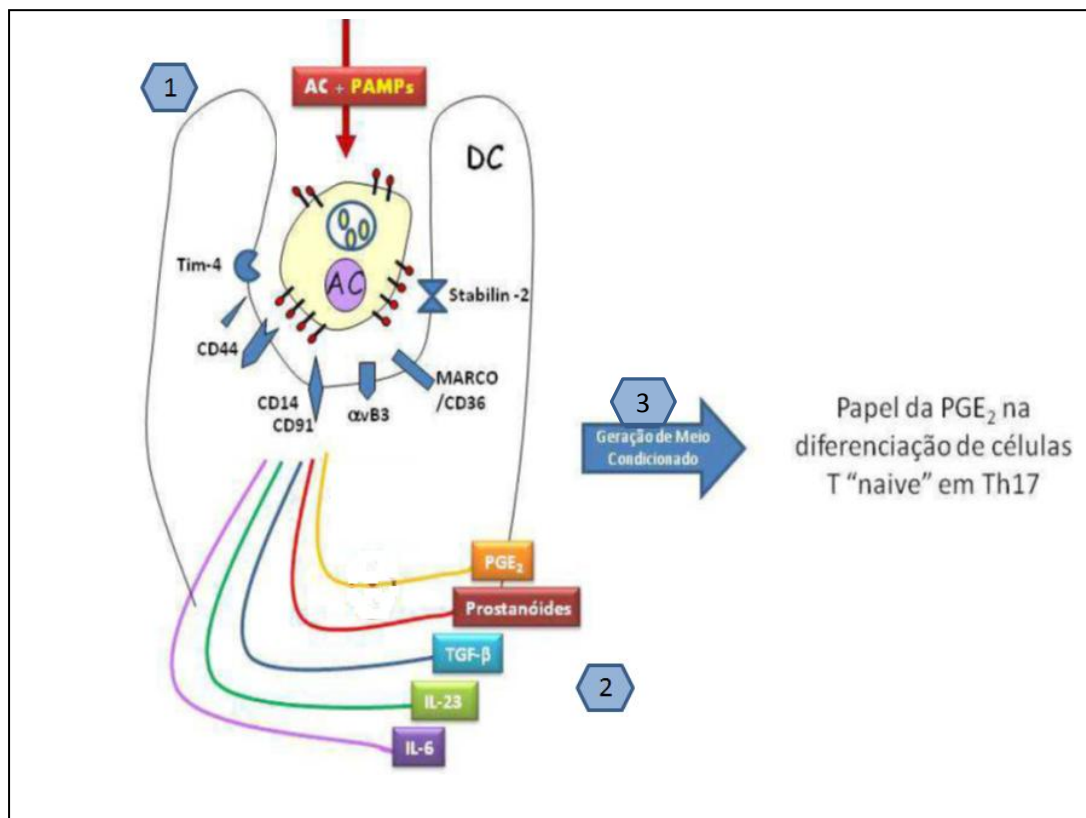
Figura 3: PGE₂ atua na diferenciação de linfócitos T. PGE₂, via EP2, aumenta expressão do fator de transcrição FOXP3 levando a maior diferenciação de células Treg. Via EP1, o mediador facilita a diferenciação e aumenta a proliferação de células Th1. Atuando pelos receptores EP2 e EP4 a prostaglandina E₂ aumenta expressão de receptores para IL-1 e IL-23 em células T “naive” facilitando a diferenciação em células Th17.

No âmbito das células Th17, Boniface *et al.* (2009) demonstraram que PGE₂ atua via receptores EP2 e EP4 através da via de sinalização AMPc – PKA para auxiliar na diferenciação de células T “naive” humanas em células Th17. A prostaglandina aumenta a expressão dos receptores para a interleucina1 (IL-1R) e interleucina 23 (IL-23R) em células T em diferenciação e, em combinação com citocinas que promovem a diferenciação da subpopulação Th17, aumentou a fosforilação de STAT3 e induziu uma mudança qualitativa e quantitativa na função e fenótipo de Th17 para um padrão mais inflamatório/patogênico(21). Em murinos, a PGE₂ atua via receptores EP2 e EP4, e sinaliza via AMPc - PKA facilitando a expansão de células Th17 em conjunto com a IL-23. Além disso, a PGE₂ pode levar a aumento na migração CDs através da regulação positiva da expressão de receptores para quimiocinas, aumento nas expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (MHC-II, CD40, CD86) combinado ao aumento da produção de IL-23, colaborando indiretamente na expansão de Th17(30, 34, 35) Outro importante trabalho da literatura demonstra que a PGE₂ tem um importante papel no recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular através do aumento da síntese de IL-17 e inibição do eixo IL12/IFN- γ (35). Portanto, a PGE₂ tem demonstrado grande atuação na modulação da imunidade adaptativa, atuando, de maneira controversa, tanto como mediadora imunossupressora como imunoativadora.

A atuação da PGE_2 na imunidade adaptativa vem sendo investigada quanto à diferenciação e ativação de linfócitos Th1, Treg e Th17. Até o momento, nada se sabe da participação deste mediador lipídico no contexto da fagocitose de células apoptóticas infectadas e o mecanismo pelo qual a PGE_2 pode colaborar sinergicamente com $\text{TGF-}\beta$, IL-6 e IL-23 no processo de diferenciação de células Th17.

Hipótese do Projeto

A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas leva a produção de PGE_2 e citocinas resultando na diferenciação de células Th17.



OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho visa investigar se a fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promove além da produção de TGF- β e IL-6, a síntese de PGE₂.

Para tanto, utilizaremos as seguintes estratégias:

- 1) Geração de células apoptóticas;
- 2) Determinação da proporção de células apoptóticas nos ensaios de fagocitose por células dendríticas;
- 3) Quantificação de PGE₂ e citocinas em meio condicionado oriundo da co-cultura de células dendríticas na presença de células apoptóticas.

MATERIAL E MÉTODOS

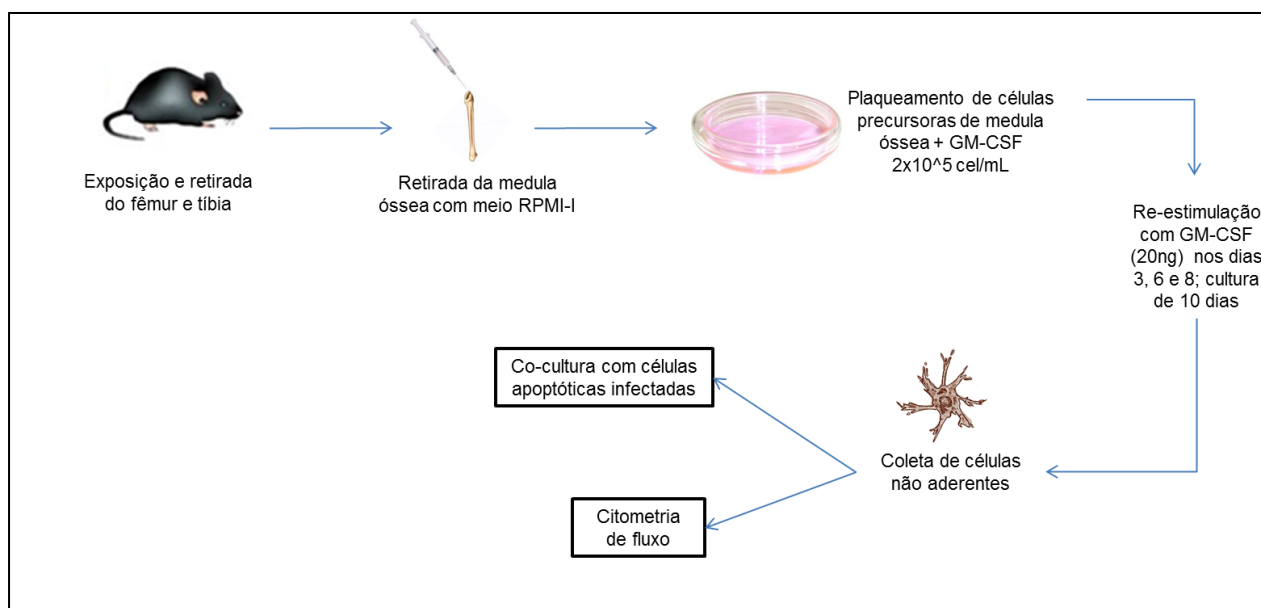
Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 14 semanas de idade, foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP. 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. Todos os procedimentos foram julgados pelo Comitê de Ética da Instituição.

Diferenciação de CDs a partir de precursores de Medula Óssea (BMDC)

As CDs foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea do fêmur e tíbia dos animais C57BL/6 segundo protocolos preconizados por Lutz *et al.* (1999). As células precursoras foram plaqueadas em placa de petri na concentração de 2×10^5 células/mL em volume final de 10 mL de meio RPMI (Sigma) completo, contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 10 μ g/mL de gentamicina (Gibco), adicionado de 20 ng/mL de GM-CSF (e-Bioscience). As células permaneceram em diferenciação por 10 dias em estufa de CO₂ a 37°C.

No dia 3, foram adicionados à placa 10 mL de meio RPMI-C fresco complementado de 20ng/mL de GM-CSF. Nos dias 6 e 8, 10 mL de meio foram removidos da placa e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm, 25°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” celular ressuspensionado em 10 mL de RPMI-C fresco complementado de 20ng/mL de GM-CSF. Enfim, no dia 10, as células não aderentes, que é o perfil de células dendríticas, foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 1500rpm e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com meio RPMI-C livre de SFB. Após lavagem, as células foram, então, ressuspensionadas em 2mL de meio RPMI-C livre de SFB, contadas pelo método de exclusão por trypan e ajustadas para a concentração adequada para o ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas.



Análise da expressão de receptores de superfície por citometria de fluxo

Para a análise de marcadores específicos de CDs foi analisada a expressão de CD11c, MHC-II, CD80 e CD86, após o período de diferenciação de 10 dias. As CDs foram coletadas, contadas e distribuídas em tubos FACS (BD PharMingen, San Diego, USA), na concentração de $0,5-1 \times 10^6$ células, por tubo, para realização da análise fenotípica das mesmas. Para o bloqueio das ligações inespecíficas, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com

anticorpo anti-CD16/CD32 (FcBlock™ – BD PharMingen), na concentração de 0,5 mg/5x10⁵ células. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos monoclonais de interesse: CD11c, CD80, CD86, MHCII, na concentração de 0,2 – 0,5mg de anticorpo/5x10⁵ células, seguido de nova incubação de 30 minutos a 4°C. Após esse período de incubação, foram adicionados 2mL de PBS (solução salina tamponada de fosfatos) pH 7,2 contendo 2% SFB e as células serão centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em 500 mL de PBS 2% SFB. Trinta mil eventos por tubo foram adquiridos em citômetro FACSCanto™ (Becton& Dickinson, San Diego, CA, USA) e analisados pelo programa FACSDiva™. Todos os anticorpos são da BD PharMingen (BD PharMingen, San Diego, USA) e foram usados seguindo-se as instruções do fabricante. Os anticorpos são marcados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) e PE (ficoeritrina).

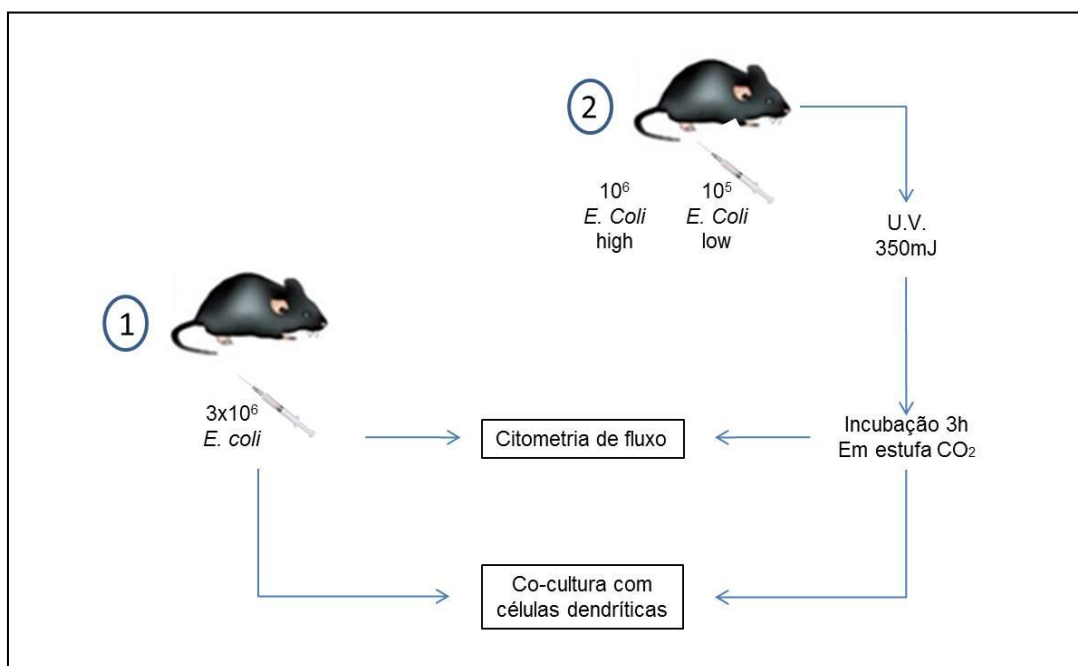
Geração das células apoptóticas com PAMP (AC+PAMP)

Como fonte de células apoptóticas com PAMP foram utilizados neutrófilos contendo *Escherichia coli* como descrito por Torchinsky *et al.* (2009). As bactérias foram plaqueadas em meio sólido LB ágar 2% e mantidas em estufa a 37 °C. No dia seguinte, as bactérias foram ressuspensas em 10 mL de meio LB líquido estéril e mantidas “overnight” a 37°C. Após o período de incubação, 100 µL dessa suspensão foi transferido para 10 mL de meio LB líquido estéril e o crescimento bacteriano foi acompanhado em absorvância de 600 nm (Epoch, Biotek) até que a densidade óptica (DO) atingisse aproximadamente 0,5. Após atingir a DO esperada, 2mL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo falcon de 50 mL e centrifugados por 10min, 3000 rpm a 4 °C. As bactérias foram lavadas duas vezes com PBS estéril gelado. Após a lavagem, as bactérias foram ressuspensas e diluídas em tioglicolato na quantidade necessária para cada experimento. As diluições foram realizadas de acordo com a curva de crescimento bacteriano padronizado no laboratório. No fim, 1mL de

tioglicolato+bac, na concentração de 10^6 ou 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC), foi inoculado via intraperitoneal nos animais. Após 13h foi realizado o lavado peritoneal, utilizando-se 5mL de PBS gelado, a fim de recuperar-se as células apoptóticas infectadas. A carga bacteriana inoculada por animal foi certificada através da contagem de UFC em diluições seriadas da suspensão de Tioglicolato+*E. coli*. A porcentagem de células apoptóticas e necróticas foi avaliada por citometria de fluxo com os marcadores de morte celular Anexina e PI.

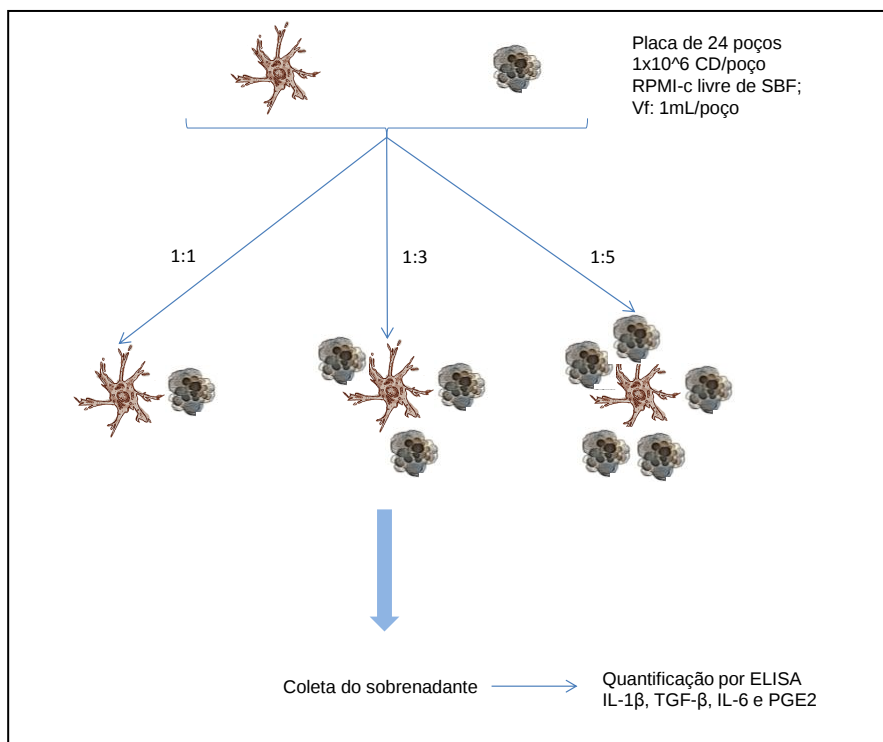
Em um segundo momento, adicionamos um passo ao protocolo, no qual irradiamos com luz ultravioleta (UV) as células derivadas do lavado peritoneal com a energia de 350mJ (CrossLinker, Vilber Lourmat) e colocamo-as por 4 horas em estufa a 37 °C. A irradiação foi realizada em placas de 24 poços, com volume final de 500μL/poço e 3×10^6 células/poço. No fim, as células estavam prontas para a adição das CDs.

A fim de confirmarmos se as células derivadas do lavado peritoneal estavam realmente infectadas, os animais foram inoculados i.p. com 10^5 *E. coli* vivas (DH5α) conjugadas com FITC e ressuspensas em 1mL de Tioglicolado e após 13h o lavado peritoneal foi coletado. Aproximadamente 1×10^6 neutrófilos foram avaliados quanto à presença da *E.coli* na presença de Azul de Trypan (250μg/mL), o qual funciona como um *quencher* para as bactérias que estejam presas a membrana da célula e não internas.



Ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas (AC+PAMP) por células dendríticas - Geração de meio Condicionado.

As células dendríticas imaturas diferenciadas de medula óssea foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 céls/poço em meio RPMI-C livre de SFB. As células apoptóticas infectadas (Neutrófilos apoptóticos+*E.coli*) foram colocadas em cultura com as CDs na proporção de 1:1, 3:1 e 5:1 (AC+PAMP:CD) na presença ou ausência de Indometacina ($10 \mu\text{M}$). Após 18h de incubação a 37°C , o sobrenadante foi coletado, centrifugado para remoção de células e utilizado para a quantificação de PGE_2 e outras citocinas.



Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O sobrenadante resultante do ensaio de fagocitose de células apoptóticas infectadas (AC+PAMP) por células dendríticas foi avaliado quanto à presença de PGE₂ (PGE₂ EIA Kit, Cayman Chemicals –514010) e das citocinas IL-1 β , IL-6 e TGF- β (BD-Biosciences).

A quantificação de PGE₂ foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, os controles, padrões e amostras foram pipetados na placa e esta foi incubada “overnight” a 4°C. Após o período de incubação a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem, e 200 μ L do reagente de revelação (Ellman’s reagent) foram adicionados a todos os poços. Para revelação da cor, a placa foi mantida sob agitação orbital por 60 a 90 minutos, até desenvolvimento de coloração. Após este período, a placa foi lida em espectrofotômetro em absorvância de 412nm (Epoch, Biotec). A concentração das amostras foi calculada de acordo com a curva gerada pelas concentrações conhecidas do padrão e os resultados foram expressos em pg/mL. Para as citocinas, as quantificações foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Basicamente, placas de 96 poços (Corning, NY, USA) foram recobertas com 100 μ L/poço de solução contendo anticorpos purificados de captura, diluídos

em tampão apropriado. As placas foram incubadas a 4°C, durante uma noite. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com solução PBS-Tween 20 (0,05%) e as placas foram incubadas com 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS contendo 10% SFB) durante uma hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes e adicionou-se o padrão e 100 µL/poço das amostras (sobrenadante). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas por 5 vezes e incubadas com 100 µL/poço do “working detector” (anticorpo biotilado mais av-HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas, desta vez por 7 vezes, e foram adicionados 100 µL/poço da solução do substrato. Desta vez, as placas foram incubadas sob proteção da luz durante 30 minutos. Após o tempo determinado a reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço da solução de parada (H₂SO₄ 2N). A absorvância foi lida a 450nm em um leitor de microplaca (Epoch, Biotek) e as concentrações das citocinas foram calculadas pela curva padrão gerada em cada ensaio com concentrações conhecidas das citocinas em questão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± SD e, então, analisados utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para as comparações entre dois grupos experimentais foram utilizados o teste de Student's *t* e para as comparações entre três ou mais grupos experimentais foi aplicada a análise de variância ANOVA seguido de teste de comparação múltipla Dunnett ou Tukey. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$. Todos os experimentos foram realizados ao menos três vezes em diferentes períodos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Geração de Células Dendríticas a partir de Precursores da Medula Óssea

O foco de estudo do nosso grupo de pesquisa é voltado ao entendimento da resposta imune contra microorganismos nas infecções pulmonares. No entanto, devido ao baixo rendimento do isolamento de células dendríticas do pulmão para realização dos experimentos, optamos em utilizar como fonte de células dendríticas a diferenciação *in vitro*, utilizando GM-CSF recombinante, a partir de células obtidas de medula óssea.

O procedimento de diferenciação de CD partiu de 2×10^6 células precursoras de medula óssea e, ao final de 10 dias de cultura, alcançamos um rendimento médio de $\sim 2 \times 10^7$ células semi-aderentes. Para validar a diferenciação em células dendríticas a partir de células totais de medula óssea, o perfil fenotípico desta cultura celular foi analisado por citometria de fluxo utilizando como marcadores CD11c (marcador específico para células dendríticas) e CD11b, CD80, CD86, MHC-II (marcadores relacionados a maturação celular). As células dendríticas foram selecionadas por tamanho (*FSC – Forward Scatter*) e granularidade (*SSC – Side Scatter*) (Figura 4A) e a porcentagem de células CD11c positivas determinadas (Figura 4B). Após 10 dias de cultura, 80-90% das células foram positivas para CD 11c (Figuras 4B e 5A).

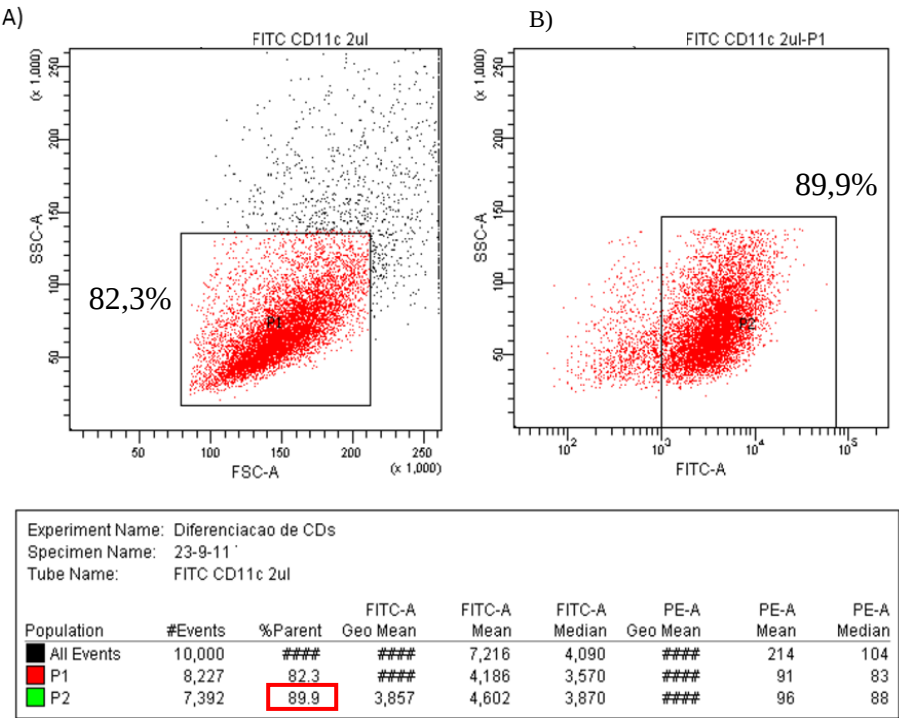


Figura 4. Caracterização fenotípica das células dendríticas diferenciadas a partir de precursores da medula óssea. 2×10^5 células precursoras da medula óssea foram incubadas em meio RPMI completo suplementado com GM-CSF recombinante, e cultivadas a 37° C durante dez dias. O fenótipo das células dendríticas foi determinado utilizando anticorpos anti-CD11c (FITC). (A) Dotplot representativos da porcentagem de células CD11c, gate contendo a população característica em tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) de células CD11c. (B) Dotplot representativo da população positiva para marcação CD11c dentro da população característica.

Sabe-se que as células dendríticas, quando no tecido, apresentam um perfil fenotípico denominado imaturo, ou seja, são células com eficiente capacidade fagocítica. A ativação destas células pela fagocitose de microorganismos e o microambiente inflamatórios promovem a maturação destas células alterando o perfil de moléculas de superfície, bem como sua morfologia. Estas células passam a expressar, por exemplo, diferentes receptores para quimiocinas, como CCR7, que permitem seu recrutamento para o linfonodo. Além disso, durante o processo de maturação, células dendríticas aumentam a expressão de moléculas de MHC-II, CD80 e CD86 favorecendo desta forma a ativação de linfócitos T “naive” nos órgãos linfóides secundários. A análise dos marcadores fenotípicos, relacionados à maturação celular, demonstra que ao final de 10 dias de cultura, a grande porcentagem das células apresentavam um perfil imaturo, ou seja, células dendríticas com fenótipo $CD11c^{+}CD11b^{+}MHC-II^{low}CD80^{low}CD86^{low}$ (Figura 5B). A importância da padronização de um protocolo de diferenciação de CD, a partir de células de medula óssea, foi imprescindível para obtenção de CD com fenótipo imaturo para dar continuidade aos subsequentes ensaios para obtenção do meio condicionado. Portanto, o fenótipo imaturo destas células dendríticas, ao final do período da diferenciação, assegura que durante o ensaio de fagocitose as células serão hábeis em fagocitar as células apoptóticas durante a co-cultura.

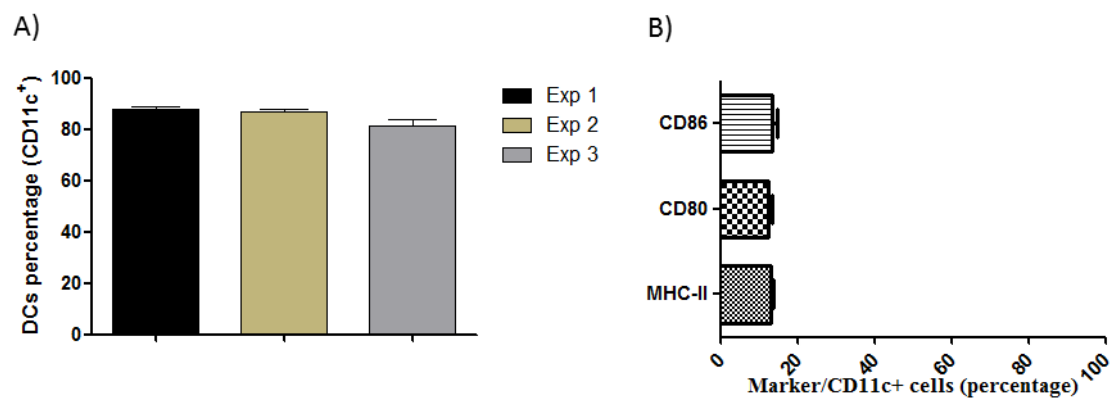


Figura 5. Fenótipo de maturação de células dendríticas oriundas de precursores da medula óssea. 2×10^5 células precursoras da medula óssea foram incubadas em RPMI completo suplementado com a citocina recombinante GM-CSF (20ng), e cultivadas a 37° C durante dez dias. As células foram incubadas com anticorpos anti-CD11c/FITC, anti-MHC-II, CD80 e CD86 conjugados com PE. (A) Porcentagem de células CD11c positivas em experimentos independentes e (B) porcentagem dos marcadores MHC-II, CD80 e CD86 em células CD11c positivas (Resultado representativo de 3 experimentos independentes).

Geração de Células apoptóticas infectadas utilizando irradiação UV

Como apresentado em nossos resultados preliminares, a geração de células apoptóticas infectadas a partir da injeção intraperitoneal contendo *Escherichia coli* em uma suspensão de tioglicolato promove o recrutamento de neutrófilos com um fenótipo de 28% de células apoptóticas precoces (Anexina+/PI-) e apenas 4% de células apoptóticas tardias (Anexina+/PI+) (Figura 6).

Apesar do pequena porcentagem de células necróticas, a fim de otimizar a porcentagem de células apoptóticas precoces obtidas do exsudado peritoneal, a suspensão celular foi submetida à irradiação UV (350mJ) como descrito previamente no protocolo utilizado por Torchinsky *et al.* (2009). Os resultados obtidos demonstram que a irradiação das células obtidas do exsudato resultou no aumento de aproximadamente 2,24 vezes no rendimento de células apoptóticas precoces, ou seja, esse protocolo de tratamento resultou em 62,7% de células apoptóticas precoces (Figura 7). A partir de então, todos os experimentos subsequentes foram realizados utilizando como fonte de células apoptóticas o exsudato peritoneal submetido a irradiação UV (350mJ).

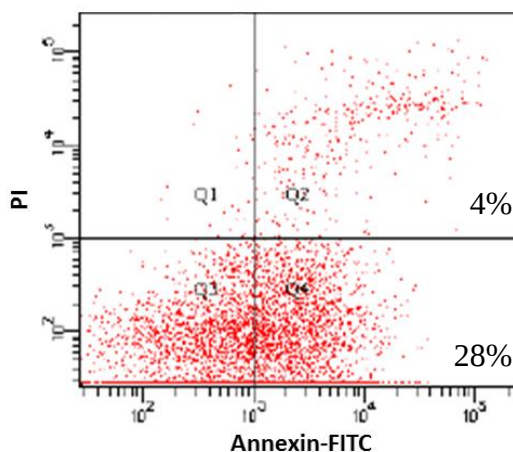


Figura 6. Avaliação do perfil de morte celular no exsudado peritoneal. Os animais foram inoculados i.p. com 1mL de tioglicolato contendo 10^5 *E. coli* vivas (DH5 α). As células foram coletadas e incubadas com Anexina V/PI para determinação da porcentagem de células apoptóticas e necróticas. Dado representativo de n=5 animais.

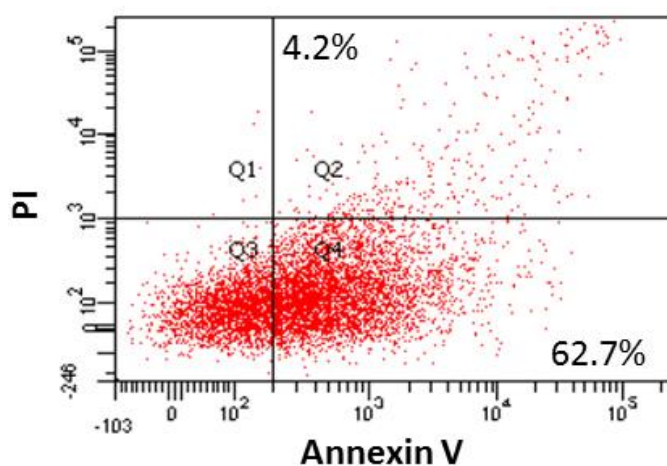


Figura 7. Avaliação do perfil de morte celular do exsudado peritoneal irradiado com UV. Os animais foram inoculados i.p. com 1 mL de tioglicolato contendo 10^5 ou 10^6 *E. coli* vivas (DH5 α). As células foram coletadas, irradiadas com UV (350mJ) e marcadas com Anexina V/PI para determinação da porcentagem de células apoptóticas e necróticas. Dado representativo de n=5 animais.

Quantificação de PGE₂ a partir do meio condicionado – Protocolos 1 e 2

Após a padronização dos diferentes protocolos de obtenção de células apoptóticas (Protocolos 1 e 2), nosso próximo passo foi avaliar se a otimização do protocolo 2, ou seja, o aumento da porcentagem de células apoptóticas refletiria no aumento da produção de PGE₂ por CD no meio condicionado. Células apoptóticas infectadas obtidas a partir do protocolo 1 foram capazes de induzir a produção de altos níveis de PGE₂ por células dendríticas. A produção deste mediador ocorreu de maneira concentração dependente, ou seja, quanto maior a proporção de células apoptóticas infectadas maior a concentração de PGE₂ produzida por células dendríticas. As proporções de 1:3 e 1:5 (CD:AC+PAMP) promoveram um aumento significativo da produção de PGE₂ por células dendríticas quando comparadas com o controle, apenas CD não estimuladas (Figura 8A).

O tratamento das CD com indometacina reduziu em ~82% a produção da PGE₂ em todas as proporções de células apoptóticas utilizadas quando comparada com células não tratadas incubadas com AC+PAMP (Figura 8C).

É importante que se tenha boa eficiência na inibição da produção de PGE₂ para que possamos investigar a influência deste mediador no meio condicionado a ser utilizado para posterior diferenciação de células Th17.

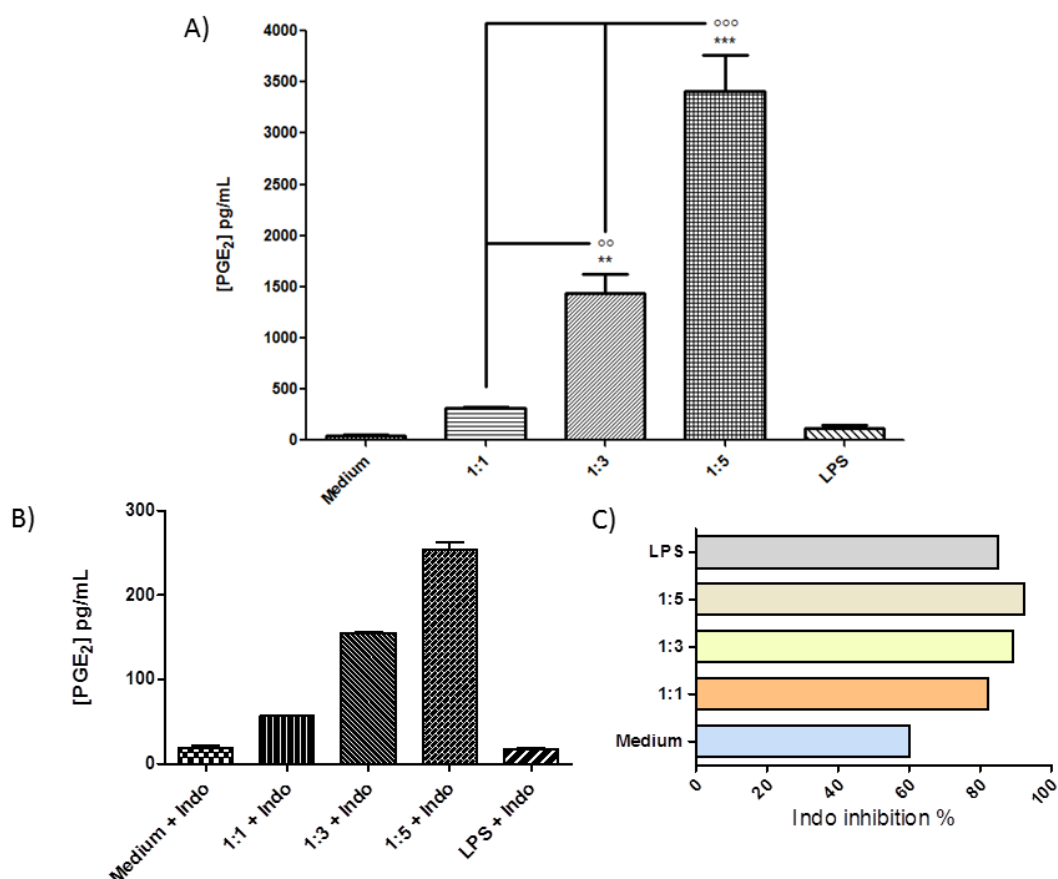


Figura 8. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promoveu a liberação de altos níveis de PGE₂ – Protocolo 1. As células dendríticas foram incubadas com diferentes proporções de células apoptóticas infectadas na presença ou ausência do inibidor de COX não seletivo (indometacina 10 μ M) por 18 horas a 37°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de PGE₂ foi analisada por Elisa. (A) A produção de PGE₂ sem tratamento e (B) com tratamento com Indometacina. Os valores representam um experimento representativo de três realizados. (C) Gráfico da porcentagem de inibição da produção de PGE₂ promovido pelo tratamento com indometacina. Sendo, **p<0,01, ***p<0,001 quando comparado ao grupo controle e oop<0,01, ooop<0.001 quando comparado entre os grupos indicados pelas linhas.

Como descrito previamente, o Protocolo 2 induziu um aumento na porcentagem de células apoptóticas, portanto nosso próximo passo foi avaliar se a otimização deste protocolo poderia refletir no aumento da produção de PGE_2 , o principal mediador de interesse em nosso estudo. A co-cultura de CD com AC infectadas irradiadas com UV resultou no aumento dos níveis de PGE_2 em $\sim 2,24$ vezes quando comparado com células não estimuladas (Figura 9). Como PGE_2 é o mediador solúvel de principal interesse em nosso projeto e o aumento na porcentagem de células apoptóticas foi capaz de induzir o aumento deste mediador lipídico por CD, optamos por utilizar o Protocolo 2 nos subsequentes experimentos para geração do meio condicionado a ser utilizado na diferenciação de linfócitos T “Naive”.

Além de determinar o quanto a otimização da porcentagem de células apoptóticas poderia refletir no aumento de produção de PGE_2 por CD, nós também tivemos interesse em avaliar o quanto a carga bacteriana no interior de células apoptóticas poderia influenciar na produção de mediadores solúveis durante a eferocitose por CD. Portanto, na tentativa de tentar mimetizar o curso da infecção, ou seja, inicialmente uma menor carga bacteriana que tende a aumentar conforme ocorre a colonização e proliferação destes microorganismos, nós geramos células apoptóticas a partir da inoculação de animais com uma alta carga bacteriana (AC+PAMP_{high} - 10^6 UFC de *E. coli*) e baixa carga bacteriana (AC+PAMP_{low} - 10^5 UFC de *E. coli*).

Nossos resultados mostram que a incubação de CD com células apoptóticas contendo diferentes inóculos de bactérias (AC+PAMP_{high} ou AC+PAMP_{low}) resulta na produção diferenciada de PGE_2 . Ou seja, CD incubadas com AC+PAMP_{high} irradiadas com UV (protocolo 2) são capazes de induzir a produção de ao menos 3x mais PGE_2 quando comparado com CD incubadas com AC+PAMP_{low} (Figura 9). Fazendo uma correlação com o que ocorre *in vivo*, o maior carga bacteriana resultaria em uma ativação exacerbada de células residentes e intensa resposta inflamatória e, conseqüentemente, a produção de mediadores

inflamatórios tende a aumentar visando um maior recrutamento celular, assim como uma maior atividade efetora, na tentativa de resolução da infecção.

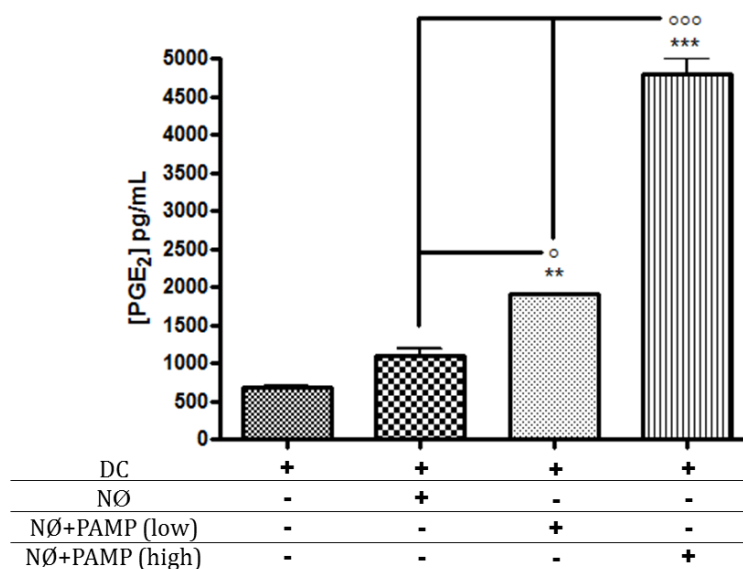


Figura 9. A fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas promoveu a liberação de altos níveis de PGE₂ – Protocolo 2. As células dendríticas foram incubadas com células apoptóticas infectadas com baixa ou alta carga bacteriana, na proporção de 1CD:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de PGE₂ foi analisada por Elisa. Sendo, **p<0,01, *** p<0,001 quando comparado ao grupo controle (grupo DC) e op<0,05, ooop<0.001 quando comparado entre os grupos indicados pelas linhas.

Avaliação de Citocinas do Meio Condicionado

Durante o processo infeccioso, os fagócitos infectados são ativados resultando na mudança do microambiente pela síntese de várias citocinas que são imprescindíveis durante o processo de ativação e diferenciação dos subtipos de células T. Dentre as citocinas envolvidas na diferenciação de células Th17, sabe-se que IL-6, TGF- β e em alguns casos IL-1 β são imprescindíveis neste processo. Portanto, além da detecção de PGE₂, nosso próximo passo foi avaliar se as citocinas envolvidas na diferenciação de Th17 (IL-6, IL-1 β e TGF- β) também estão presentes no meio condicionado produzido a partir da fagocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas.

A quantificação destes mediadores solúveis foi determinada em meio condicionado oriundo da co-cultura de CD e AC+PAMP irradiadas (Protocolo 2). Assim como na quantificação de PGE₂, foram mantidas as duas condições de células apoptóticas a partir da inoculação de diferentes UFC de *E. coli*, AC+PAMP_{high} (10⁶ UFC de *E.coli*) ou AC+PAMP_{low} (10⁵ UFC de *E.coli*).

A co-cultura de CD+AC+PAMP foi capaz de induzir a síntese das principais citocinas envolvidas no processo de diferenciação em células Th17 (IL-6, IL-1 β e TGF- β) sendo que a condição AC+PAMP_{high} mostrou-se mais eficiente na ativação de CD. Como podemos observar nas figuras 7A e B, a condição de cultivo de AC+PAMP_{high} foi capaz de induzir uma alta produção dos mediadores IL-1 β e IL-6. Entretanto, a condição AC+PAMP_{low} não foi capaz de induzir a síntese de citocinas em níveis considerados estatisticamente significativos quanto à produção destes mediadores quando comparadas com os controles (apenas células dendríticas – CD – e apenas neutrófilos apoptóticos – NØ).

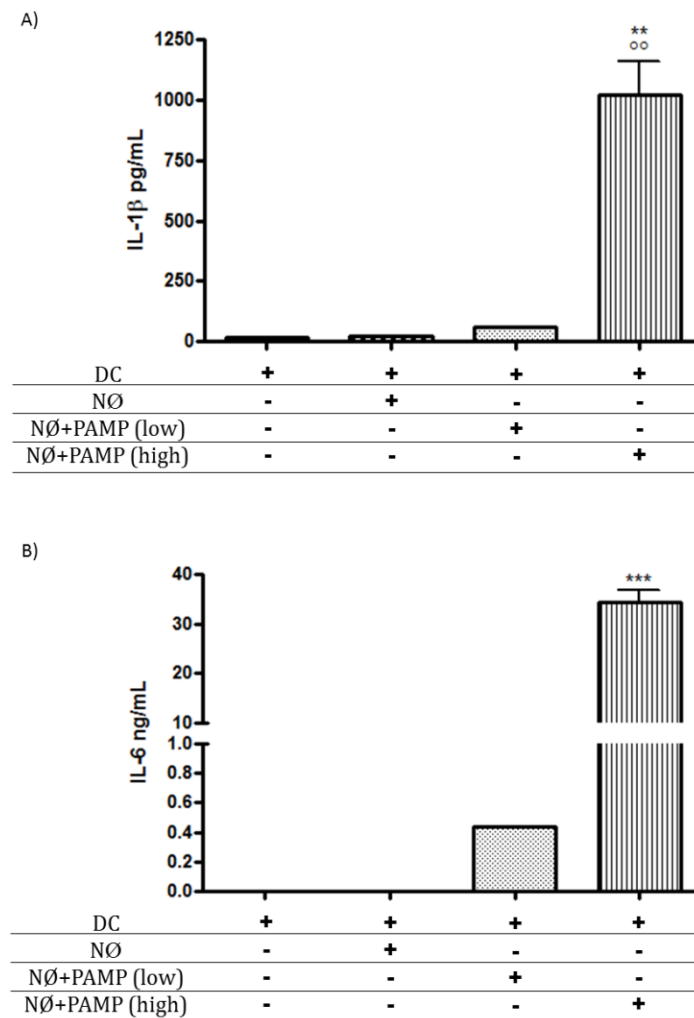


Figura 10. Produção de IL-1 β e IL-6 por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas com diferentes cargas bacterianas. As células dendríticas foram incubadas com células apoptóticas infectadas com baixa ou alta carga bacteriana, na proporção de 1CD:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-1 β (A) e IL-6 (B) foi analisada por Elisa. Sendo, **p<0,01, *** p<0,001 quando comparado ao grupo controle (grupo DC) e oop<0,01 quando comparado com os demais grupos.

TGF- β é uma das citocinas chaves envolvidas na diferenciação de células Th17 e, embora seja capaz de induzir a ativação FOXP3 (fator de transcrição relacionado a Treg), na presença de IL-6 resulta na ativação de ROR γ -t, fator de transcrição relacionado a células Th17. Dessa forma, a presença deste mediador é imprescindível para a diferenciação de células T “naive” em células Th17 (Yingz Cong *et al.* 2009). A produção de TGF- β por CD na presença das diferentes condições de células apoptóticas, AC+PAMP_{high} e AC+PAMP_{low}, foi detectada em níveis estatisticamente significativos quando comparado com CD incubadas apenas com meio. No entanto, assim como observado com as citocinas IL-1 β e IL-6, a incubação de CD com AC+PAMP_{high} foi capaz de induzir uma maior produção de TGF- β quando comparado com a condição AC+PAMP_{low}. Ou seja, durante o processo infeccioso a fagocitose de células apoptóticas contendo uma grande quantidade de PAMPs no seu interior, levaria à produção de mediadores solúveis como TGF- β , IL-1- β , IL-6 que favoreceriam a diferenciação de Th17. Além das citocinas, os resultados aqui apresentados demonstram que a fagocitose destas células promove a síntese de altos níveis de PGE₂ e, portanto, fortalece nossa hipótese da possível participação de PGE₂ neste processo de diferenciação de Th17.

Desta forma, ao final deste projeto, sob a supervisão dos experimentos do doutorando Felipe Fortino, finalizamos a padronização e otimização dos diferentes protocolos de geração de células apoptóticas assim como a caracterização dos mediadores solúveis presentes no meio condicionado para realização dos experimentos de diferenciação de Th17.

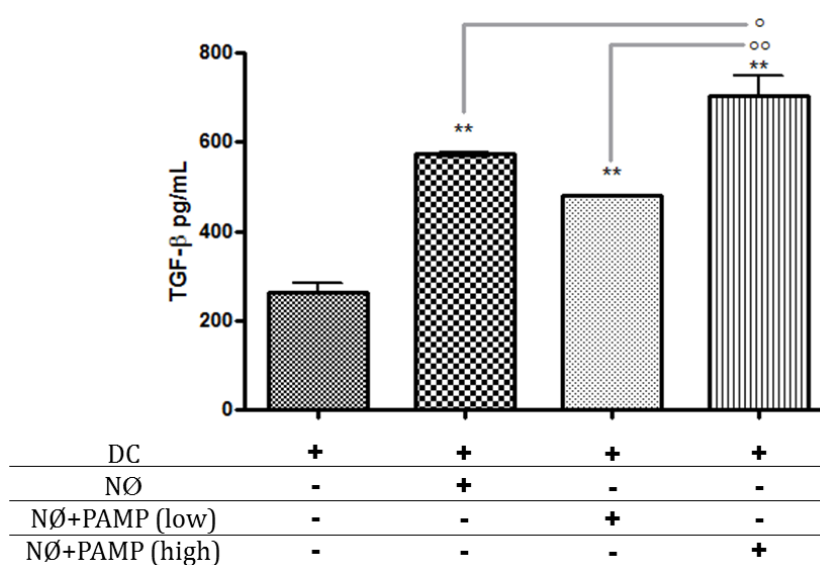


Figura 11. Produção de TGF- β por células dendríticas após a fagocitose de células apoptóticas infectadas. As células dendríticas foram incubadas com células apoptóticas infectadas com baixa ou alta carga bacteriana, na proporção de 1CD:3ACs. Após 18 horas a 37°C, o sobrenadante foi coletado e a concentração TGF- β foi analisada por Elisa. Sendo, **p<0,01, quando comparado ao grupo controle (grupo DC) e op<0,05, oop<0.01 quando comparado entre os grupos indicados pelas linhas.

CONCLUSÕES

As células dendríticas diferenciadas apresentam fenótipo imaturo, o que é importante, uma vez que, a priori, realizaremos o ensaio de fagocitose. Ambos os protocolos de geração de células apoptóticas infectadas foram eficientes quanto à baixa porcentagem de células necróticas e, portanto, com a predominância de células apoptóticas precoces. A otimização do protocolo de geração de células apoptóticas (protocolo 2) com a inclusão da irradiação foi de suma importância para a obtenção de melhores resultados, já que esta mudança resultou no maior rendimento de células apoptóticas precoces sem aumento no número de células necróticas.

Pudemos também concluir que a fagocitose de células apoptóticas infectadas induz maior produção de PGE_2 quanto maior for sua proporção de células apoptóticas para células dendríticas. O mesmo pode ser observado quando da quantificação das citocinas envolvidas, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TGF-}\beta$. Além disso, a padronização de duas condições de células apoptóticas infectadas, $\text{AC+PAMP}_{\text{high}}$ e $\text{AC+PAMP}_{\text{low}}$, permitirá o entendimento da dinâmica da produção de mediadores solúveis pro CD durante a cinética do processo infeccioso.

Em suma, a partir da validação da geração de células dendríticas imaturas e otimização do protocolo de células apoptóticas infectadas obtivemos um meio condicionado contendo $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e $\text{TGF-}\beta$ assim como o mediador de interesse no nosso estudo PGE_2 . Os experimentos que validarão a eficiência deste meio condicionado em promover a diferenciação de células T “naive” em células Th17 já estão sendo realizados pelo doutorando Felipe Fortino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAO, J. et al. Pneumococcal ClpP modulates the maturation and activation of human dendritic cells: implications for pneumococcal infections. *Journal of leukocyte biology*. v93, n5, p 737-749, 2013.
2. DIEU, MC. et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine*. v188, n2, p373-386, 1998.
3. SOZZANI S. et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*. v.161, n.3, p1083-1086, 1998.
4. KROEMER G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. v16, n1, p3-11, 2009.
5. JEANNIN, P., JAILLON, S., DELNESTE, Y., Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current opinion in immunology*. v.20, n.8, p530-537, 2008.
6. FADEEL B, XUE D, KAGAN V. Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochemical and biophysical research communications*. v396, n1, p7-10, 2010.
7. ROOS, A., et al. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *European journal of immunology*. v34, n4, p921-929, 2004.
8. MIYANISHI, M., TADA, K., KOIKE, M., UCHIYAMA, Y., KITAMURA, T., NAGATA, S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. v450, n.7168, p435-439, 2007.
9. PARK, S.Y., et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell death and differentiation*. v15, n1, p192-201, 2008.

10. PARK, D., et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*. v450, n7168, p430-434, 2007.
11. GREENBERG, ME., SUN, M., ZHANG, R., FEBBRAIO, M., SILVERSTEIN, R., HAZEN, SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*. v203, n12, p2613-2625, 2006.
12. VOLL, RE., HERRMANN, M., ROTH, EA., STACH, C., KALDEN, JR., GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. v390, n6658, p350-351, 1997.
13. FADOK, VA., BRATTON, DL., KONOWAL, A., FREED, PW., WESTCOTT, JY., HENSON, PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation*. v101, n4, p890-898, 1998.
14. MEDEIROS, A.I., SEREZANI, C.H., LEE, S.P., PETERS-GOLDEN, M. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. *The Journal of experimental medicine*. v206, n1, p61-68, 2009.
15. MCDONALD, P.P., FADOK, V.A., BRATTON, D., HENSON, P.M.. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol*. v163, n11, p6164-6172, 1999.
16. FREIRE-DE-LIMA, C.G., et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*. v403, n6766, p199-203, 2000.
17. TORCHINSKY, M.B., GARAUDE, J., MARTIN, A.P., BLANDER, J.M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*. v458, n7234, p78-82, 2009.

18. BURKE, J.E., DENNIS, E.A. Phospholipase A2 biochemistry. Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. v23, n1, p49-59, 2009.
19. SMITH, W.L., DEWITT, D.L., GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annual review of biochemistry.v69, p145-182, 2000.
20. ROUZER, C.A., MARNETT, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. Journal of lipid research. v50, p29-34, 2009.
21. SCHUSTER, V.L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. Annual review of physiology. v60, p221-242, 1998.
22. SUGIMOTO, Y., NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. The Journal of biological chemistry. v282, n16, p11613-11617, 2007.
23. BONIFACE, K., et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. The Journal of experimental medicine. v206, n3, 535-548, 2009.
24. NAGAMACHI, M., et al. Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. The Journal of experimental medicine. v204, n12, p2865-2874, 2007.
25. BREYER, R.M., BAGDASSARIAN, C.K., MYERS, S.A., BREYER, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annual review of pharmacology and toxicology. v41, p661-690, 2001.
26. SEREZANI, C.H., BALLINGER, M.N., ARONOFF, D.M., PETERS-GOLDEN, M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. American journal of respiratory cell and molecular biology. v39, n2, p127-132, 2008.
27. BARATELLI, F., et al. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells. J Immunol. v175, n3, p1483-1490, 2005.

28. BETZ, M., FOX, B.S., Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* v146, n1, p108-113, 1991.
29. YAO, C., et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nature medicine.* v15, n6, p633-640, 2009.
30. NATARAJ, C, et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *The Journal of clinical investigation.* v108, n8, p1229-1235, 2001.
31. VANG, T., ABRAHAMSEN, H., MYKLEBUST, S., HOREJSI, V., TASKEN, K. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein kinase a inhibits T cell receptor signaling. *The Journal of biological chemistry.* v278, n20, p17597-17600, 2003.
32. MUSTELIN, T., TASKEN, K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *The Biochemical journal.* v371, n1, p15-27, 2003.
33. SCHIRMER, C., KLEIN, C., VON BERGEN, M., SIMON, JC., SAALBACH, A. Human fibroblasts support the expansion of IL-17-producing T cells via up-regulation of IL-23 production by dendritic cells. *Blood.* v116, n10, p1715-1725, 2010.
34. LEMOS, H.P., et al. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* v106, n14, p5954-5959, 2009.
35. LUTZ, M.B., et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods.* v223, n1, p77-92, 1999.