

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Fernanda De Nuzzi Dias

**ENVOLVIMENTO DE PGE2 NA DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS TH17 *IN VIVO* PELA FAGOCITOSE DE
CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS**

Araraquara

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA



Fernanda De Nuzzi Dias

**ENVOLVIMENTO DE PGE2 NA DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS TH17 *IN VIVO* PELA FAGOCITOSE DE
CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS**

Araraquara

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Fernanda De Nuzzi Dias

**ENVOLVIMENTO DE PGE2 NA DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS TH17 *IN VIVO* PELA FAGOCITOSE DE
CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia com ênfase em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo De Medeiros

Araraquara

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

D541e Dias, Fernanda de Nuzzi
 Envolvimento de PGE2 na diferenciação de células TH17 *In Vivo* pela fagocitose de células apoptóticas infectadas / Fernanda de Nuzzi Dias . – Araraquara, 2015
 85 f.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

 Orientador: Alexandra Ivo de Medeiros

 1. Infecção pulmonar. 2. Células apoptóticas infectadas. 3. Fagocitose. 4. PGE2. 5. Linfócitos Th17. 6. Indometacina. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*“A ambição da ciência não é abrir a porta do
saber infinito, mas pôr um limite ao erro infinito.”*
(Bertolt Brecht)

Dedico esta dissertação

*À minha família pelo apoio, incentivo e
carinho em todos os momentos. Sem eles
nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

- *A Deus por me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.*
- *À minha família, especialmente minha mãe Cleusa, meu pai Gilberto, meu irmão Rafael, meus avós Ofélia e Dorival e meu afilhado Hugo, os quais amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.*
- *À minha orientadora Profa. Alexandra Ivo de Medeiros por acreditar em mim, acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional, por me mostrar o caminho da ciência, pelos grandes ensinamentos tanto para carreira científica quanto para a vida, os quais levarei sempre comigo e, por ser exemplo como profissional e como pessoa.*
- *Aos amigos queridos (especialmente, Sara, Beatriz, Simone, Priscila e Amanda) que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio, tanto nos momentos bons quanto nas dificuldades. E pelos momentos de descontração, alegrias e muitas risadas.*
- *Aos meus colegas de laboratório Amanda, Naiara, Felipe, Victória, Letícia, Allan, Ana, Júlia, Flávio, Bruna, e a nossa técnica Vavá por participarem diretamente do desenvolvimento deste trabalho e por todo apoio e incentivo.*
- *A todos os colegas e professores da pós-graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia pelo convívio e aprendizado.*
- *A Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, FAPESP (2011/17611-7), CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.*

RESUMO

A fagocitose, por células dendríticas (CD), de células apoptóticas (CA) infectadas induz a produção de TGF- β , IL-6 e IL-23, propiciando um microambiente com condições ideais para diferenciação de células Th17. Recentes resultados obtidos por nosso grupo demonstram que a fagocitose, por CD, de células apoptóticas infectadas resulta também na produção de altos IL-1 β e PGE₂. A presença destes mediadores solúveis foi capaz de induzir a diferenciação de células Th17, *in vitro*, no entanto, a inibição da síntese de PGE₂, pelo tratamento com inibidor não seletivo da COX (Indometacina), resultou no aumento da porcentagem destes linfócitos. Neste estudo foi avaliado o efeito da fagocitose de células apoptóticas infectadas com *Escherichia coli* (CA+Ec) na diferenciação de células Th17 *in vivo* e o efeito de PGE₂ neste processo. A instilação de animais com CA+Ec, induziu a produção das citocinas IL-6, IL-1 β e TGF- β no pulmão, o que sugere que a presença de CA+Ec é capaz de gerar um microambiente favorável para induzir a diferenciação Th17. A instilação de CA+Ec promoveu a diferenciação de células Th17, assim como a produção de IL-17. Porém, o tratamento com inibidor de COX resultou no aumento na porcentagem e no número de células Th17 no pulmão. A presença destas células resultou no aumento na porcentagem de neutrófilos no tecido pulmonar que parece refletir na diminuição da carga bacteriana recuperada do pulmão, quando comparado com animais que não receberam o tratamento. Assim, o conjunto destes resultados sugere que a fagocitose de CA+E. coli promove a diferenciação de células Th17. No entanto, a secreção de PGE₂, pela fagocitose destas CA+Ec suprime a diferenciação e/ou migração de células Th17 para o pulmão, levando a inibição do recrutamento de neutrófilos e aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares.

Palavras-chave: infecção pulmonar; células apoptóticas infectadas; fagocitose; PGE₂; linfócitos Th17; Indometacina.

ABSTRACT

The phagocytosis of infected-apoptotic cells (iAC) by dendritic cells (DC) induces the production of TGF- β , IL-6 and IL-23, providing a microenvironment to Th17 cell differentiation. Recent data obtained in our group showed that the phagocytosis of infected-apoptotic cells by CD also results in high levels of IL-1 β and PGE2. The presence of these soluble mediators was able to induce the differentiation of Th17 cells, *in vitro*. However, the inhibition of PGE2 synthesis, by non-selective COX inhibitor (indomethacin), result the increase of percentage of Th17. In this study, it was evaluated the effect of phagocytosis of infected-apoptotic cells (AC+*E. coli*) during the Th17 cell differentiation, *in vivo*, and the effect of PGE2 in this process. The inoculation of AC+ *Ec* (in.) into lung induced the production of IL-6, IL-1 β and TGF- β in lung, suggesting that the presence of AC+*Ec* is able to induce a microenvironment favorable to Th17 cell differentiation. The instillation of AC+*Ec* induced the differentiation of Th17 cells. However, the treatment of the animals with COX inhibitor resulted in an increase in the percentage, and number, of Th17 cells in the lung. The presence of these cells increased in the percentage of neutrophils in the lung and that apparently reflect in bacterial clearance from the lung, compared to animals that received no treatment. Taken all together, the phagocytosis of AC+*Ec* promotes the Th17 cell differentiation. However, the production of PGE2 by efferocytosis suppresses the differentiation and / or migration of Th17 cells to the lungs, impair the recruitment of neutrophils and increase the susceptibility to lung infections.

Keywords: lung infection; infected apoptotic cells; phagocytosis; PGE2; Th17 lymphocytes; Indomethacin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Infecção com <i>E. coli</i> e instilação CA+E. coli.....	37
Figura 2: Detecção de CD contendo CA+ <i>Ec</i> marcadas com CFSE no pulmão.....	39
Figura 3: Detecção de CD contendo CA+ <i>Ec</i> +CFSE nos linfonodos proximais (LC e LM).....	40
Figura 4: Infecção com <i>E. coli</i> , instilação CA+ <i>Ec</i> e purificação de CD.....	42
Figura 5: Detecção de AC+ <i>Ec</i> +CFSE no interior de CD obtidas a partir de células do pulmão....	43
Figura 6: Fixação de AC+ <i>Ec</i> impede a perda da marcação com CFSE, <i>in vitro</i>	45
Figura 7: Fagocitose de CA+ <i>Ec</i> marcadas com CFSE e fixadas, por CD, <i>in vitro</i>	47
Figura 8: Fagocitose por CD de CA+ <i>Ec</i> /CFSE ⁺ fixadas, <i>in vivo</i>	50
Figura 9: Produção de citocinas mediante fagocitose de CA infectadas, <i>in vivo</i>	53
Figura 10: Envolvimento de PGE2 na diferenciação de células Th17 a partir de MC, <i>in vitro</i>	55
Figura 11: Infecção com <i>E. coli</i> instilação CA+ <i>Ec</i> e tratamento com indometacina.....	57
Figura 12: Efeito supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17 <i>in vivo</i> , no contexto de eferocitose (Pulmão).....	60
Figura 13: Envolvimento de PGE2 na diferenciação de células Th17 <i>in vivo</i> , no contexto de eferocitose (LC).....	63
Figura 14: Inibição de PGE2 promove a diferenciação de células Th17 e resulta no aumento da migração de neutrófilos e diminuição da recuperação de <i>E. coli</i> no pulmão.....	66

RESULTADOS SULEMETARES

Figura 1: Taxa de infecção de células RAW 264.7 (MØ) por <i>E.coli</i> -GFP.....	77
Figura 2: Células dendríticas são capazes de fagocitar MØ apoptóticos infectados.....	79
Figura 3: Determinação da incorporação de CFSE em CA infectadas.....	81
Figura 4: Comprovação da marcação com CFSE.....	83
Figura 5: Cinética da degradação de CFSE <i>in vitro</i>	85

LISTA DE ABREVIACÕES

AA - Ácido Aracdônico

AMPc - Adenosina Monofosfato cíclica

ATP - Adenosina Trifosfato

C57BL/6 - Camundongos isogênicos da linhagem C57 Black 6

CA - Células apoptóticas

CA+Ec - Células apoptóticas infectadas com *Escherichia coli*

CCR7 - *Chemokine (C-C motif) Receptor 7*

CD - Células dendríticas

CD4 - *Cluster Differentiation 4*

CFSE - *Carboxy Fluoresce in Succinimidyl Ester*

COPD - *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*

COX - Ciclooxygenase

cPLA₂ - *Cytosolic Phospholipases A₂*

CXCL21 - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 21*

DAMPs - *Damage-associated Molecular Pattern*

DMSO – *Dimethylsulfoxide*

DO – Densidade Ótica

Ec - *Escherichia coli*

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EP2 - *Prostaglandin E2 receptor*

G-CSF - *Granulocyte Colony Stimulating Factor*

GM-CSF - *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*

IDO - Indoleamina-2,3-Dioxigenase

i.n. - Intranasal

Indo - Indometacina

IL – Interleucina

IRF4 - *Interferon Regulatory Factor 4*

KC - *Murine Chemokines CXCL1*

LC - Linfonodo cervical

LM - Linfonodo do mediastino

LPS – *Lipopolysaccharide*

MFI - *Median Fluorescence Intensity*

MHC-II - *Major Histocompatibility Complex*

MSCs - *Mesenchymal stem cells*

NO - *Nitric Oxide*

PAF - *Platelet Activating Factor*

PAMPs - *Pathogens-associated Molecular Pattern*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PGE2 - Prostaglandina E2

PKA - *Protein kinase A*

PI – *Propidium Iodide*

PMN – Células polimorfonucleares

PRRs – *Pattern Recognition Receptors*

PS - *Phosfatidilserine*

RAW 264.7 - Macrófagos de linhagem tumoral

ROI – *Reactive Oxygen Intermediate*

ROR γ t - *Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t*

SBF - Soro Bovino Fetal

STAT - 3 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta*

Th17 - *T helper 17*

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor alpha*

Treg - T reguladoras

TxA2 - Tromboxano A2

UFC - Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
Enunciado do problema	13
Reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos	14
Efeito da eferocitose na modulação da resposta imune	16
Envolvimento de células Th17 nas infecções bacterianas	17
PGE2 na modulação da resposta imune	20
2. HIPÓTESE DE ESTUDO	24
3. OBJETIVO GERAL	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
Animais experimentais	26
Bactérias <i>E. coli</i>	26
Geração das células apoptóticas infectadas (CA+Ec)	27
Infecção com <i>E. coli</i> e instilação dos animais com células apoptóticas infectadas	28
Diferenciação de células dendríticas <i>in vitro</i>	28
Marcação de células apoptóticas com CFSE	29
Diferenciação de células Th17 e tratamento com indometacina, <i>in vivo</i>	29
Obtenção de células do parênquima pulmonar, linfonodos cervicais e do mediastino	30
Homogenato do pulmão	31
Ensaio imunoenzimático (ELISA)	32
Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares em linfócitos T CD4 por citometria de fluxo	32
Análise estatística	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

Avaliação <i>in vivo</i> da capacidade migratória de células dendríticas após fagocitose de CA+ <i>E. coli</i> +CFSE	34
Otimização da incorporação de CFSE em células apoptóticas infectadas após fixação com formaldeído	44
Avaliação <i>in vivo</i> da capacidade migratória de CD após a fagocitose de CA infectadas com <i>E. coli</i> + CFSE	48
Análise do padrão de citocinas produzido por CD após a fagocitose de células apoptóticas infectadas, <i>in vivo</i>	51
PGE2 na diferenciação de células Th17 no contexto de eferocitose	54
Efeito supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17, <i>in vivo</i>	56
Inibição de PGE2 no contexto de eferocitose aumenta a diferenciação de células Th17, promove o recrutamento de neutrófilos e diminuição da carga bacteriana no pulmão.....	64
7. CONCLUSÕES	67
Modelo proposto	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9. RESULTADOS SUPLEMENTARES	76
Geração de CA a partir de linhagem de macrófagos - RAW 264.7	76
Fagocitose de células apoptóticas por células dendríticas.....	78
Incorporação de CFSE em células apoptóticas infectadas	80
Confirmação da incorporação de CFSE por CA+ <i>Ec</i>	82
Cinética da degradação de CA+ <i>Ec</i> + CFSE por células dendríticas <i>in vitro</i>	84

1. INTRODUÇÃO

Enunciado do problema

A fagocitose de células apoptóticas é um processo dinâmico e de fundamental importância para a homeostase dos tecidos após uma injúria. Os fagócitos, dentre estes os macrófagos e células dendríticas (CD), além de serem uma das células envolvidas na remoção dessas células apoptóticas, também possuem um papel chave na primeira linha de defesa contra microrganismos e ativação de linfócitos T, respectivamente. A fagocitose por macrófagos de células apoptóticas estéreis resulta na produção de mediadores anti-inflamatórios, tais como TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), interleucina (IL)-10, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator ativador plaquetário (PAF) assim como a inibição de componentes da resposta inflamatória, como IL-1 β , IL-8, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alfa*), bem como leucotrieno C4 e tromboxano B2 (Fadok *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2013). Algumas doenças inflamatórias crônicas, como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), fibrose cística, ou a inalação de fumaça de cigarro e de gases tóxicos resultam em um grande acúmulo de células epiteliais e de neutrófilos apoptóticos no pulmão destes pacientes (Hiraiwa e Van Eeden, 2013; He *et al.*, 2015).

O microambiente supressor, gerado pela fagocitose destas células apoptóticas estéreis, tem sido sugerido como umas das possíveis causas do aumento da suscetibilidade a infecções pulmonares causadas tanto por bactérias, vírus e fungos, em indivíduos acometidos por doenças inflamatórias crônicas (Sethi e Murphy, 2008; Mccubbrey e Curtis, 2013). A presença de um microambiente que favorece a colonização e o estabelecimento dos micro-organismos resulta no recrutamento tanto de monócitos como de neutrófilos, que migram para o espaço bronco-

alveolar, fagocitam os micro-organismos e, após exercerem suas funções efetoras, podem morrer por apoptose por exaustão (pelo excesso de ativação).

Nas inflamações pulmonares crônicas, além do uso de antibióticos, utilizados para o controle da proliferação bacteriana, os corticóides e os NSAIDs (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), como Celecoxib, são uma das opções de tratamento nestes pacientes (Chmiel e Konstan, 2007). O uso de inibidores de ciclooxigenase (COX), como ibuprofeno e celecoxib, em diferentes modelos de infecções pulmonares bacterianas, confere a melhora nos mecanismos de defesa do hospedeiro e diminuição da carga bacteriana.

Portanto, este trabalho visa contribuir no entendimento do processo inflamatório crônico pulmonar e o aumento da suscetibilidade a infecção mediante ao acúmulo de células apoptóticas infectadas, assim como o efeito de inibidores de COX, na diminuição da carga bacteriana.

Reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada envolvido no desenvolvimento e remodelamento dos tecidos para manter a renovação tecidual homeostática. Morfologicamente, a morte celular por apoptose está associada com redução do volume celular, retração de pseudópode, condensação da cromatina, pouca ou nenhuma modificação estrutural das organelas citoplasmáticas, com manutenção da integridade da membrana plasmática (Kroemer *et al.*, 2009). A eferocitose é o termo proposto para designar o processo de fagocitose de células apoptóticas (CA) por fagócitos como, macrófagos e células dendríticas (Vandivier *et al.*, 2006). A rápida e eficiente remoção destas células previne a liberação de componentes intracelulares tóxicos, denominados DAMPs (*Damage-associated molecular pattern molecules*), como ocorre durante o processo de necrose celular (Jeannin *et al.*, 2008).

Recentes estudos demonstram que a detecção, o reconhecimento e a ingestão de células apoptóticas envolvem pelo menos três mecanismos: moléculas “eat-me” expressas na superfície de células apoptóticas, receptores endocíticos expressos em fagócitos, e moléculas solúveis que atuam favorecendo essa interação entre células apoptóticas e fagócitos. Assim, a eferocitose envolve uma complexa variedade de moléculas sinalizadoras de apoptose e receptores que cooperam para a homeostase imunológica (Jeannin *et al.*, 2008). Células do sistema imune possuem PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) capazes de reconhecer moléculas que passam a ser expressas na membrana celular, como a fosfatidilserina, permitindo o reconhecimento de células apoptóticas em fases bem precoces de morte celular (Fadeel *et al.*, 2010). Além disso, componentes do sistema complemento, como as colectinas, ficolinas e pentraxinas atuam como opsoninas facilitando o reconhecimento e remoção de células apoptóticas (Litvack e Palaniyar, 2010).

Um dos primeiros eventos no processo apoptótico é a perda da assimetria da dupla camada lipídica celular e, conseqüente exposição de fosfolipídios que normalmente estão dispostos na porção interna da membrana plasmática, como a fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (Roos *et al.*, 2004). A exposição e a oxidação destes fosfolipídeos na membrana celular parece ser imprescindível no reconhecimento por fagócitos como um sinal “eat-me” (Hall *et al.*, 2005).

As células polimorfonucleares (PMN) fazem parte da primeira linha de defesa do hospedeiro contra os patógenos. Estas células produzem espécies reativas do oxigênio e enzimas proteolíticas necessárias para eficiente lise bacteriana. No entanto, a liberação desses compostos na matriz extracelular resulta em efeitos deletérios no tecido. O tempo de vida de um neutrófilo circulante, *in vivo*, é de ~ 7-12 horas, sendo que na presença de estímulos inflamatórios como, LPS e citocinas inflamatórias, esse tempo pode ser ainda menor (Haslett

et al., 1991). Portanto, a eficiente e rápida remoção de PMN apoptóticos do local de inflamação é fundamental para prevenção deste dano tecidual.

Efeito da eferocitose na modulação da resposta imune

A ingestão de células apoptóticas, ou mesmo a interação destas células com macrófagos, promove a liberação de moléculas anti-inflamatórias, entre elas, TGF- β , IL-10, óxido nítrico (NO), PGE2, e PAF, enquanto inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, KC e leucotrieno C4 (Voll *et al.*, 1997); (Medeiros *et al.*, 2009).

Em relação aos efeitos de PGE2 oriunda da eferocitose, Medeiros *et al.* (2009) demonstraram *in vivo* que a instilação de células apoptóticas antes do desafio dos animais com *Streptococcus pneumoniae* promove o aumento da carga bacteriana no pulmão e disseminação hematogênica. No entanto, a capacidade imunossupressora da PGE2 no contexto da eferocitose foi comprovada através da instilação de CA em animais deficientes do receptor EP2, de PGE2. Os resultados demonstram que, na ausência de EP2, houve uma diminuição na recuperação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. pneumoniae* no pulmão quando comparado com o animal selvagem, e não foi observada disseminação hematogênica nestes animais (Medeiros *et al.*, 2009).

Torchinsky *et al.* (2009) demonstram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas, ou seja, células carregando PAMPs (*Pathogens-associated Molecular Pattern*) no interior do fagossoma, promove a síntese de IL-23, TGF- β e IL-6 por células dendríticas (Torchinsky *et al.*, 2009). O papel desses mediadores solúveis na diferenciação de células Th17 foi comprovado *in vitro* através da estimulação de células T “naive” com meio condicionado oriundo de CD incubadas com células apoptóticas infectadas. Os resultados demonstram que a

presença de um microambiente inflamatório, com a predominância de TGF- β e IL-6, gerado pela fagocitose de células apoptóticas infectadas, promove condições ideais para diferenciação de células Th17. Por outro lado, a incubação de células T “naive” na presença de meio condicionado obtido da fagocitose de células apoptóticas sem PAMPs, com predominância de TGF- β e IL-10, resulta na diferenciação de células T reguladoras (Treg). Curiosamente, apesar de muitos estudos sobre os mecanismos envolvidos na diferenciação de células Th17, esse foi o primeiro estudo que propôs um modelo fisiológico de diferenciação das mesmas. Esse mecanismo foi comprovado *in vivo* pelo modelo de infecção gastrointestinal por *Citrobacter rodentium*, conhecido por induzir resposta Th17, no qual a inibição da apoptose impediu a diferenciação *in vivo* deste subtipo celular (Torchinsky *et al.*, 2009).

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo demonstram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas promove, além da produção de citocinas, a síntese de altos níveis de PGE2. No entanto, nada se sabe sobre a participação de PGE2 e os mecanismos pelos quais esse mediador pode colaborar sinergicamente com TGF- β , IL-6 e IL-23, ou inibir o processo de diferenciação de células Th17, *in vivo*.

Envolvimento de células Th17 nas infecções bacterianas

A natureza do antígeno, através da interação com PRRs presentes nas células dendríticas, tem um papel chave na ativação destas células e no padrão de citocinas produzidas neste microambiente. Na presença do primeiro sinal (TCR/MHC) e de moléculas coestimuladoras, as citocinas promovem a ativação de fatores de transcrição em células T CD4⁺ “naive” levando à diferenciação em subtipos de linfócitos T, Th1, Th2, Th17 e Treg (Murphy e Stockinger, 2010; Tartar *et al.*, 2010).

Os linfócitos Th17 estão envolvidos na proteção do hospedeiro contra infecções por bactérias extracelulares e fungos, mas também têm um papel patogênico em doenças auto-imunes, tais como artrite reumatóide, esclerose múltipla, psoríase e doença inflamatória do intestino (Van Hamburg *et al.*, 2013). A diferenciação das células T "naive" em células Th17 é regulada pela presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β no microambiente (Wei *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009). Células Th17 efectoras são caracterizadas como preferenciais produtoras de IL-17A além de IL-17F, IL-21 e IL-22 e, suas citocinas efectoras, as quais são expressas via ativação do fator de transcrição STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) dependente de ROR γ t (*Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t*), medeiam os mecanismos de defesa do hospedeiro contra várias infecções, especialmente infecções por bactérias extracelulares. (Yang *et al.*, 2007). Além de serem identificadas pela expressão do fator de transcrição ROR γ t, as células Th17 expressam vários receptores de tráfico, dentre os quais, o receptor de quimiocina CCR6, que é expresso por células Th17 induzidas *in vivo* e *in vitro*, tanto de humanos quanto de camundongos. (Wang *et al.*, 2009). Assim, CCR6 é um marcador funcional importante para células Th17 e contribui para a sua migração preferencial para um local de inflamação em particular. (Hirota *et al.*, 2007).

Em murinos, TGF- β e IL-6 iniciam a diferenciação de células Th17 através da ativação de STAT-3, induzindo a expressão do receptor de IL-23 (IL-23R). A citocina IL-23, proveniente das CD, é então responsável pela manutenção e expansão das células Th17 (Veldhoen *et al.*, 2006). Além disso, as células Th17 também secretam IL-21 que, de maneira autócrina, sustenta e promove a sua própria diferenciação mediada por STAT-3 (Korn *et al.*, 2007). A IL-1 β atua na polarização Th17 em camundongos através da via de p38 MAPK e da proteína serina-treonina quinase AKT/mTOR. IL-1 β induz também IRF-4, que regula a função autócrina da IL-21 (Chen *et al.*, 2008).

IL-17A representa a citocina que é a assinatura das células Th17 efectoras, e embora tenha sido primeiramente identificada em células T CD4⁺, a IL-17A também pode ser produzida por células T CD8⁺ (Happel *et al.*, 2003) e células da imunidade inata, tais como, células T $\gamma\delta$ (Lockhart *et al.*, 2006), neutrófilos (Ferretti *et al.*, 2003), e macrófagos alveolares (Song *et al.*, 2008). Uma das primeiras atividades documentadas de IL-17A foi o aumento de G-CSF em células estromais de medula óssea humana, o que resultou na diferenciação de células progenitoras em neutrófilos *in vitro* (Fossiez *et al.*, 1996). Curiosamente, IL-17F é incapaz de suportar a proliferação de precursores de granulócitos *in vitro* (Starnes *et al.*, 2001). Tanto a IL-17A, como a IL-17F, apresentam semelhante potencial de recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção, sendo este um dos principais mecanismos de ação de células Th17 efectoras (Liang *et al.*, 2007).

O papel da IL-17A no pulmão pode ser patogênico ou de proteção (Curtis e Way, 2009). Embora a elevada expressão de IL-17A esteja relacionada a doenças inflamatórias das vias aéreas tais como asma (Molet *et al.*, 2001), fibrose cística (Tan *et al.*, 2011) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), este perfil de resposta pró-inflamatória parece desempenhar um papel protetor importante contra vários micro-organismos (McAllister *et al.*, 2005).

Em relação à *Streptococcus pneumoniae*, a citocina IL-17 tem sido descrita como relevante fator na defesa do hospedeiro contra tal patógeno. A imunização com bactérias íntegras mortas confere proteção contra a colonização pneumocócica através da produção da citocina IL-17A, a qual induz tanto o recrutamento como uma melhor atividade microbicida pelos neutrófilos. A proteção contra a colonização da bactéria foi significativamente prejudicada em animais deficientes para receptores de IL-17A (Lu *et al.*, 2008). Em outro estudo, a imunização via intranasal (i.n.) com *S. pneumoniae* induziu uma resposta Th17 que foi protetora contra a colonização destas bactérias nas vias aéreas, impedindo desta forma, o estabelecimento da infecção (Moffitt *et al.*, 2011).

Utilizando um modelo de infecção por *K. pneumoniae* foi demonstrado que a sinalização via IL-17R é crítica para o recrutamento inicial de neutrófilos e indução local de G-CSF e MIP-2. Camundongos deficientes do receptor para IL-17 apresentaram inibição do recrutamento de neutrófilos para o pulmão após a infecção por *K. pneumoniae*, e significativo aumento da incidência de bacteremia e mortalidade em resposta à infecção. Este efeito foi mediado principalmente através da diminuição da produção de IL-17 e moléculas efetoras incluindo G-CSF e CXCL21 (Ye *et al.*, 2001).

Em outro estudo, verificou-se uma rápida produção de IL-17 após infecção intraperitoneal (i.p.) com *E. coli*. A presença desta citocina parece ser crítica para o recrutamento de neutrófilos e defesa do hospedeiro contra esta infecção bacteriana (Shibata *et al.*, 2007 Kishihara & Yoshikai, 2007).

PGE2 na modulação da resposta imune

Os prostanóides são mediadores lipídicos solúveis sintetizados a partir da biossíntese do ácido araquidônico (AA) pela ação das enzimas cicloxigenases (COX) que apresentam duas isoformas: 1 e 2. A COX-1 é expressa constitutivamente, já a COX-2 é induzida por estímulos estressores e é regulada positivamente em casos de inflamações e infecções locais (Smith *et al.*, 2000).

A hidrólise de fosfolipídios de membrana, da maioria das células do nosso corpo, pela enzima fosfolipase A2 resulta na liberação do ácido araquidônico, primordialmente a partir da membrana nuclear. O AA sofre a ação de COX-1/COX-2 sendo convertido primeiramente em prostaglandina (PG) G2 e posteriormente ocorre a conversão de PGG2 em PGH2. Esse metabólito pode sofrer a ação de diferentes sintases, dependendo do tecido ou da célula em questão, resultando na formação de PGI2, PGF2, PGD2, PGE2 ou tromboxanos A₂ (TxA₂).

Dentre as PGs, a PGE2 é um dos mediadores mais abundantes produzidos nos diferentes tecidos e um dos principais mediadores lipídicos sintetizados por macrófagos e outros diferentes tipos celulares (Brock *et al.*, 2003).

A prostaglandina E2 exerce suas funções efetoras por meio da sua interação com quatro receptores, sendo eles EP1, EP2, EP3 e EP4. Esses subtipos de receptores variam em sua estrutura molecular, propriedades de ligação à PGE2, distribuição tecidual, expressão e transdução de sinais (Sugimoto e Narumiya, 2007). Dentre esses, EP1, EP2 e EP4 são expressos em altos níveis em células T “naive” em camundongos, enquanto EP3 são pouco expressos ou inexistentes (Nagamachi *et al.*, 2007). Boniface *et al.* (2009) demonstraram que a ativação de células T humanas aumenta em cerca de duas a três vezes a expressão dos receptores EP2 e EP4 (Boniface *et al.*, 2009). Ambos EP2 e EP4 estão acoplados à subunidade alfa estimuladora da proteína G (G_{α_s}), induzindo a ativação de adenilato ciclase, enzima que converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (AMPc). Esse mensageiro secundário é responsável pela desfosforilação de proteína quinase A (PKA), que resulta na ativação de fatores de transcrição que modulam a proliferação e diferenciação de células T (Hirata e Narumiya, 2012; Sreeramkumar *et al.*, 2012).

Esses receptores medeiam as funções da PGE2 tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. A atuação da PGE2 na imunidade adaptativa vem sendo desvendada nos últimos anos e, recentes trabalhos demonstram uma importante função imunomoduladora deste mediador lipídico (Yao *et al.*, 2009). Diversos mecanismos moleculares já foram propostos para explicar a ação da PGE2 na modulação da diferenciação e proliferação das células T, e tal mediador pode agir tanto suprimindo quanto auxiliando a resposta imune. Um dos mecanismos anti-inflamatórios da PGE2 está associado à inibição de IL-2, IL-12 e IFN- γ , e o aumento na expressão de IL-4 e IL-5, modificando o balanço entre células Th1 e Th2 (Snijdwint *et al.*, 1993; Demeure *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998).

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 E2 aumenta a expressão dos receptores para a IL-1 (IL-1R) e IL-23 (IL-23R) em células T em diferenciação e, em combinação com citocinas que promovem a diferenciação da subpopulação Th17, aumenta a fosforilação do fator de transcrição STAT3 e induz uma mudança qualitativa e quantitativa na função e fenótipo de Th17 para um padrão mais inflamatório/patogênico (Boniface *et al.*, 2009). Em modelos experimentais, 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 aumentar a produção de IL-23 por CD, colaborando indiretamente na expansão de Th17 (Yao *et al.*, 2009); (Schirmer *et al.*, 2010), demonstrando assim, ter grande atuação na modulação da imunidade adaptativa.

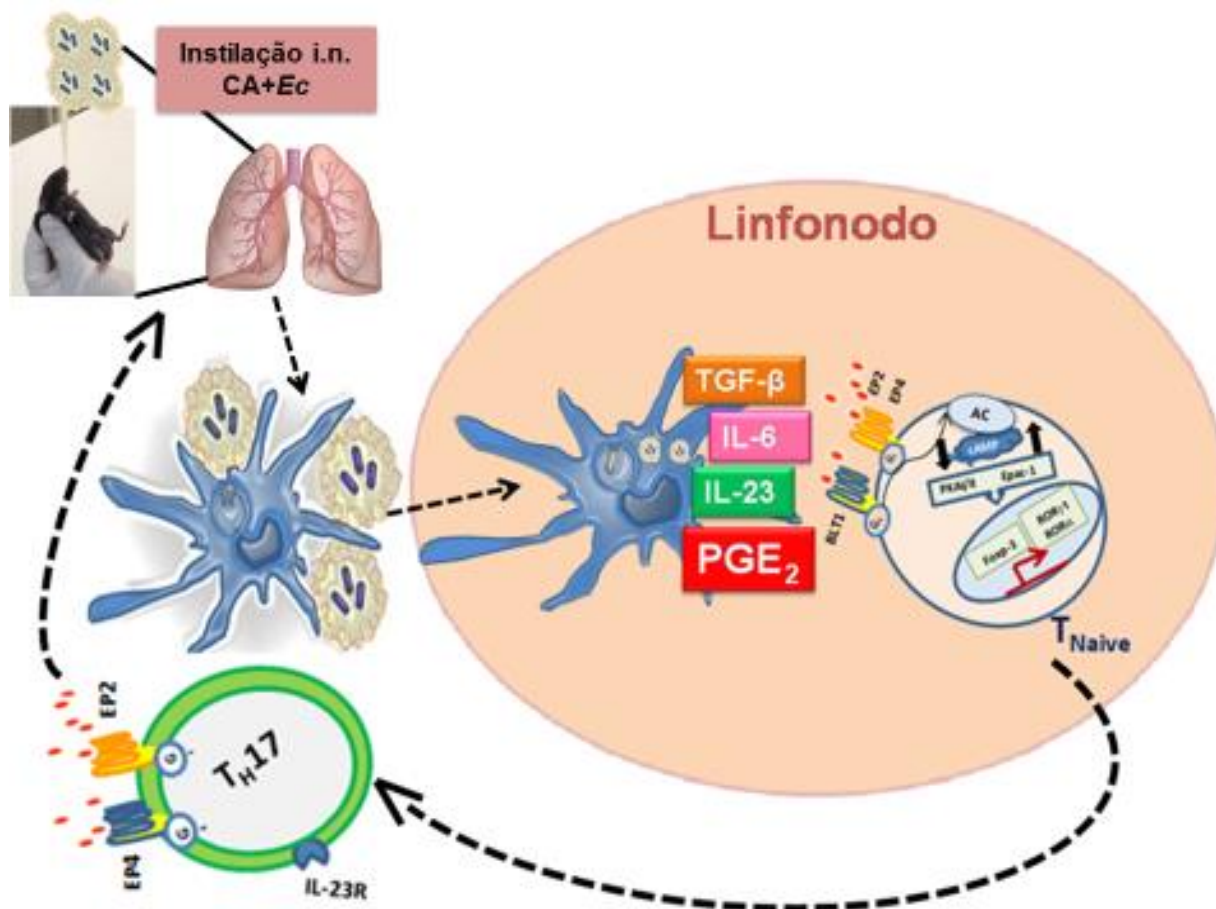
Em contrapartida Valdez *et al.* (2012) demonstraram que a adição de PGE2 no início da polarização notavelmente reduz a produção de IL-17 por um efeito combinatório de EP2 e EP4. Estes resultados indicam que a PGE2 pode atuar via receptores EP2 e EP4 para suprimir a indução de IL-17 durante a diferenciação de células T (Valdez *et al.*, 2012), em contraste com dados da literatura onde a estimulação secundária das células Th17 anteriormente polarizadas em combinação com PGE2, IL-23, ou ambos, aumenta a produção de IL-17. (Chizzolini *et al.*, 2008; Boniface *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009).

Além disso, é descrita a ação da PGE2 suprimindo a resposta imune mediada por células Th17. Células-tronco mesenquimais (MSCs) podem inibir células Th17 através da produção de diversos mediadores anti-inflamatórios, tais como CCL2, IL-10, TGF- β , PGE2, indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) (Qu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Duffy *et al.* (2011) demonstraram que MSCs são capazes de suprimir a diferenciação de células Th17 através de um mecanismo

que é iniciado pelo contato MSC/célula-T, mas indiretamente por PGE2 atuando através do receptor EP4. (Duffy *et al.*, 2011).

Sabe-se que durante o processo infeccioso pulmonar há o recrutamento de um grande número de neutrófilos para o local afetado que fagocitam os micro-organismos e após algumas horas morrem por apoptose. Recentes resultados obtidos, in vitro, por nosso grupo de pesquisa demonstram que a fagocitose por CD de células apoptóticas infectadas gera um microambiente propício para diferenciação de células Th17, com a produção de citocinas como TGF- β e IL-6, além de altos níveis de PGE2. Porém, ao contrário da hipótese inicial, a presença de PGE2 neste microambiente leva a uma inibição da diferenciação destas células Th17. No entanto, até o momento, nada se tem descrito sobre o potencial de células apoptóticas infectadas promoverem a diferenciação de células Th17 em modelos de infecção pulmonar, tão pouco o efeito de PGE2 neste contexto de eferocitose.

2. HIPÓTESE DE ESTUDO



A hipótese deste estudo fundamenta-se em que durante um processo infeccioso ocorra o acúmulo de células apoptóticas infectadas no pulmão que serão fagocitadas por macrófagos e células dendríticas. Esta remoção de células apoptóticas infectadas promoveria o microambiente propício para diferenciação de células Th17 através da produção de citocinas como TGF-β e IL-6, por células dendríticas, bem como produção de PGE₂, a qual poderia participar auxiliando ou inibindo a diferenciação de células Th17 *in vivo*.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, o impacto de células apoptóticas infectadas na diferenciação de células Th17 e a participação de PGE2 neste processo utilizando um modelo de infecção pulmonar.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar, *in vivo*, a maturação e a capacidade migratória de células dendríticas após fagocitose de CA+Ec;
- ❖ Investigar o potencial de células apoptóticas infectadas *in vivo* na diferenciação de células Th17 no ambiente pulmonar;
- ❖ Determinar o envolvimento de PGE2, oriunda da fagocitose por CD de células apoptóticas infectadas, na diferenciação de células Th17;
- ❖ Avaliar a função efetora das células Th17 quanto ao recrutamento de neutrófilos e controle da carga bacteriana no microambiente pulmonar.

5. MATERIAL E MÉTODOS

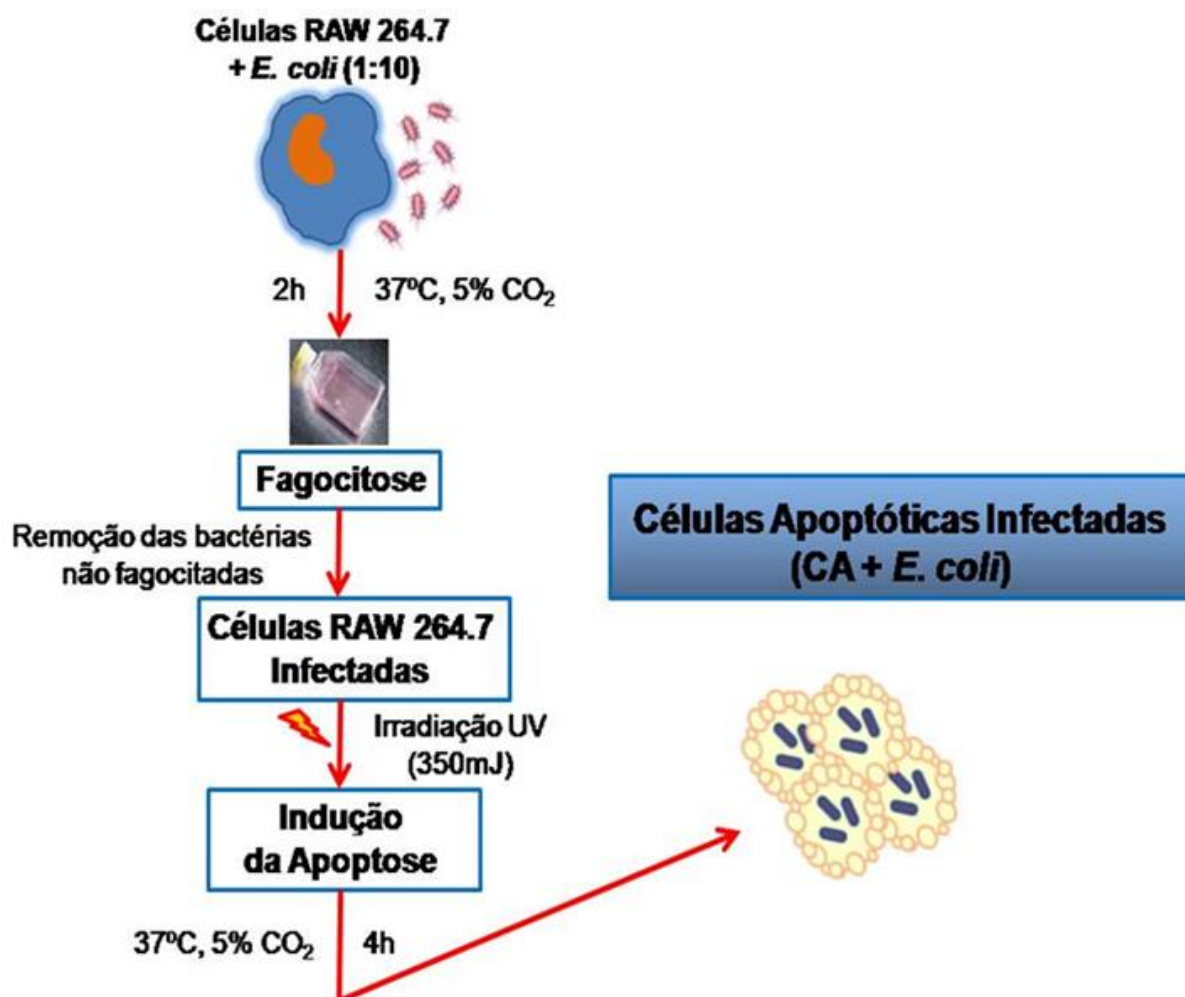
Animais experimentais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 8 a 14 semanas de idade foram obtidas 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 controlado e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos foram julgados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araraquara. Número do protocolo 45/2013.

Bactérias *E. coli*

Bactérias *Escherichia coli* (cepa ATCC 25992) mantidas a -80°C foram reativadas, recuperadas em meio sólido (Difco™ LB AGAR, MILLER Luria-Bertani) e mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37°C “overnight”. No dia seguinte, as bactérias foram ressuspensas em meio líquido (Difco™ LB, Broth Luria-Bertani) estéril e mantidas por 24 horas a 37°C sob agitação. Após o período de incubação, foi feita a quantificação das bactérias pela leitura da Densidade Ótica (DO), e estas foram centrifugadas e lavadas com solução salina tamponada (PBS) estéril gelada para posterior incubação com células RAW 264.7 e infecção dos animais.

Geração das células apoptóticas infectadas (CA+Ec)



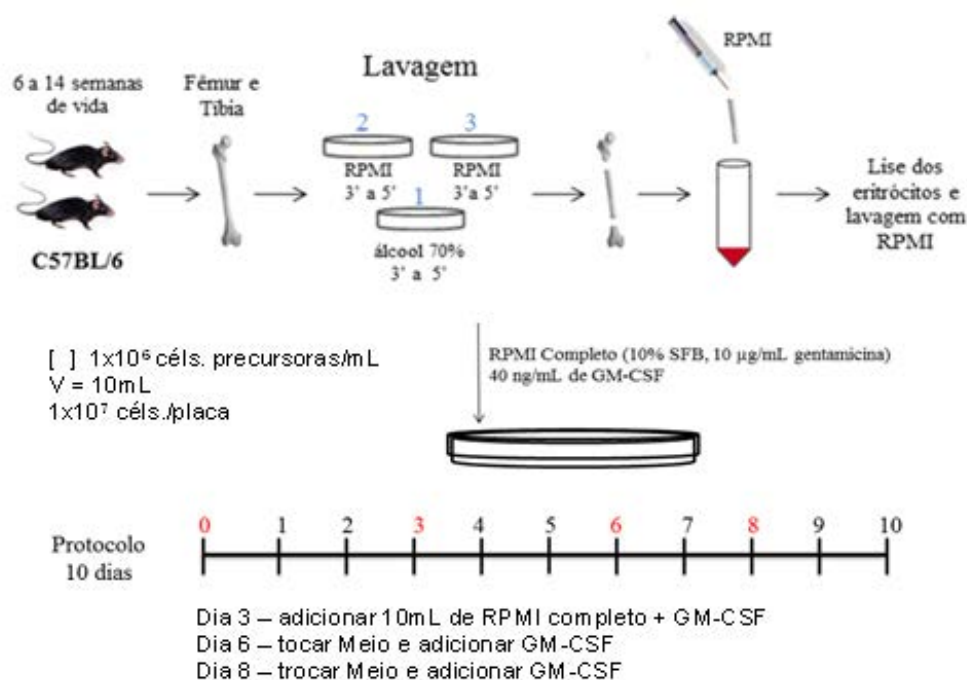
Como fonte de células apoptóticas infectadas, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram incubados com *E. coli* na proporção 1:10 (MOI 1:10 mØ:Ec) por 2 horas para fagocitose das bactérias. Após período de incubação, as células foram lavadas 3X com PBS, para remoção de bactérias não fagocitadas, e irradiadas a 350mJ (radiação UV, aparelho VilberLourmat, BLX-254) e novamente incubados por 4 horas para indução de apoptose. A porcentagem de células apoptóticas (precoce ou tardia) foi determinada pela marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo. Células apoptóticas são representadas pela marcação da fosfatidilserina externalizada na membrana celular Anexina V⁺, células em

apoptose tardia, duplo positivas, ou necróticas representadas pela marcação intracelular PI⁺, e células viáveis duplo negativas. (Resultados Suplementares - Figura 1).

Infecção com *E. coli* e instilação dos animais com células apoptóticas infectadas

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.), com xilazina/ketamina (Ketamina - cloridrato de cetamina 10%, Agener União, uso veterinário e Xilazin - cloridrato xilazina 2%, Syntec, uso veterinário) e instilados (i.n.) com uma suspensão de 1×10^6 *E. coli*, e ou, 1×10^7 células apoptóticas infectadas em PBS estéril, em um volume final de 30µL, sendo instilado 15µL por nostrin. Em seguida os animais foram instilados com mais 30µL de PBS para lavagem do trato respiratório.

Diferenciação de células dendríticas *in vitro*



Células dendríticas foram diferenciadas a partir da medula óssea obtida do fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6. As extremidades dos ossos foram removidas e com o auxílio de

uma seringa e agulha a medula foi lavada com meio RPMI completo (suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal - SBF, 50µg/mL de Gentamicina-Gibco®, Piruvato de Sódio e Aminoácidos Essenciais) para obtenção de células da medula óssea. A suspensão celular obtida foi lisada, lavada, diluída em Azul de Trypan e então realizada a contagem das células viáveis. O número de células foi ajustado para 1×10^7 células precursoras em um volume de 10mL de meio RPMI completo na presença de 40ng/mL de GM-CSF (Peprotech). A suspensão celular foi colocada em placas de Petri (BD Falcon™, 100x20mm) e incubadas por 10 dias em estufa 5% de CO₂ a 37°C para diferenciação em células dendríticas. No terceiro dia de cultura foi adicionado 10mL de meio RPMI completo contendo GM-CSF e, nos 6° e 8° dias de cultura foi realizada a troca total do meio com adição de GM-CSF.

Marcação de células apoptóticas com CFSE

Para padronização da concentração ótima de CFSE a ser utilizada, células apoptóticas, infectadas ou não infectadas, foram incubadas com 10mL de PBS estéril aquecido contendo 1µM, 2,5µM, 5µM ou 10µM de CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, 5mM - FITC) por 15 minutos em estufa 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente o sobrenadante foi coletado e foi adicionado à cultura 10mL de meio RPMI com antibiótico e 10% de SBF aquecido, e as células foram novamente incubadas por 30 minutos para retirada do excesso de CFSE não incorporado. Após a marcação com CFSE, a incorporação do corante foi avaliada por citometria de fluxo.

Diferenciação de células Th17 e tratamento com indometacina, *in vivo*

Para comprovar os resultados obtidos *in vitro*, fomos avaliar a diferenciação de células Th17 no ambiente pulmonar e o envolvimento de PGE2 nesse contexto. Animais foram infectados com 1×10^6 *E. coli* através de instilação i.n. e após 24 horas foram instilados com

1×10^7 CA+*Ec*. As concentrações utilizadas e períodos avaliados foram previamente padronizados por nosso grupo de pesquisa. Para avaliar o envolvimento de PGE2 no processo de diferenciação de células Th17, os animais foram divididos em grupos experimentais:

1) Grupo controle: animais não infectados com *E. coli*, não instilados com CA+*Ec*, tratados ou não tratados com indometacina.

2) Grupo *E. coli*: animais infectados com *E. coli*, não instilados com CA+*Ec*, tratados ou não tratados com indometacina.

3) Grupo CA+*Ec*: animais infectados com *E. coli*, instilados com CA+*Ec*, tratados ou não tratados com indometacina.

Os animais receberam 100µg/animal de indometacina, ou PBS via i.p. em dias alternados (Valdez *et al.*, 2012), por 4 vezes a partir de 48 horas após a instilação de CA+*Ec*. No dia seguinte ao quarto tratamento, os animais foram novamente instilados com 1×10^6 *E. coli* e após 24 horas eutanasiados. A diferenciação de células Th17 foi avaliada no pulmão e nos linfonodos do mediastino e cervicais. Desse modo, nós avaliamos se na ausência de PGE2 ocorre diferenciação de células Th17.

Obtenção de células do parênquima pulmonar, linfonodos cervicais e do mediastino

Após procedimentos de infecção com *E. coli* e instilação de células apoptóticas infectadas os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os pulmões foram perfundidos com 10mL de PBS estéril, por meio de injeção no ventrículo cardíaco esquerdo, e então removidos para obtenção de células do parênquima pulmonar. Os lóbulos dos pulmões foram fragmentados no aparelho GentleMACS™ Dissociator e digeridos em 13mL de RPMI

contendo gentamicina e collagenase D (1mg/mL, Roche), mantidos por 45 minutos a 37°C, sob agitação. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de meio RPMI com antibiótico contendo 10% de SBF para impedir a ação da protease e, portanto, bloquear a digestão celular. Para dispersão das células do parênquima, os fragmentos foram homogeneizados com a ajuda de uma seringa e passando por peneira, para exclusão de resquícios de tecidos, a suspensão celular foi transferida para um novo frasco de 50mL e as células foram centrifugadas por 10 minutos, 1500rpm e 4°C. Os eritrócitos foram removidos por lise celular. As células obtidas foram fixadas em PBS estéril com 4% de formaldeído por 15 minutos a 4°C, novamente centrifugadas e ressuspensas em meio de congelamento (SBF com 10% de DMSO). As amostras foram congeladas em freezer -80°C para posterior análise. O mesmo procedimento de congelamento celular foi utilizado na suspensão celular obtida dos linfonodos mediastinais e cervicais. Para obtenção de células dos linfonodos, esses órgãos linfóides foram macerados em peneira, as células obtidas foram centrifugadas e fixadas, e em seguida ressuspensas em meio de congelamento e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise por citometria de fluxo.

Homogenato do pulmão

O lóbulo superior esquerdo do pulmão de cada animal foi removido, mantido em tubo criogênico e congelado em freezer -80°C até a análise das amostras. Para a realização da técnica de ELISA, para a detecção de citocinas, os tecidos foram submetidos à homogeneização em PBS, contendo inibidor de protease, utilizando o equipamento Homogenizer Workcenter (IKA T10). Em seguida os tecidos homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 8000rpm e 4°C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente e mantido a -80°C para posterior quantificação das citocinas.

Também foi removido o lóbulo inferior esquerdo de cada animal para avaliação da sobrevivência bacteriana. Os tecidos foram submetidos à homogeneização em PBS utilizando o equipamento Homogenizer Workcenter (IKA T10), e as suspensões puras e nas diluições 10^1 , 10^2 e 10^3 foram plaqueadas em meio sólido (Difco™ LB AGAR, MILLER Luria-Bertani) e incubadas em estufa 5% de CO₂ a 37°C, após 24 horas foi feita a contagem da recuperação de UFC de *E. coli*.

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O sobrenadante do homogenato pulmonar foi avaliado quanto à presença das citocinas IL-6 (limite de detecção da curva – 1000 pg/mL), IL-1 β (2000 pg/mL), TGF- β (2000 pg/mL), e PGE2 (1000 pg/mL) (PGE₂ EIA Kit, Cayman Chemicals). A quantificação foi realizada de acordo com os protocolos dos respectivos fabricantes. Resultados expressos em pg/mL.

Análise da expressão de marcadores de superfície e intracelulares em linfócitos T CD4 por citometria de fluxo

Linfócitos obtidos do parênquima pulmonar foram estimulados por 4 horas com 0.1 μ g/mL de PMA (Sigma), 0.5 μ g/mL de Ionomicina (A23187) e 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma). Após período de incubação as células foram incubadas com anticorpos Fcblock (para bloquear receptores Fc na membrana celular, BD Pharmingen™), anti-CD3 (BD Pharmingen™- FITC) e anti-CD4 (BD Pharmingen™ -PE) e em seguida permeabilizadas com PermWash (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus) por 15 minutos e, então, incubadas intracelularmente com anticorpo anti-IL-17 (BD Pharmingen™ - APC). A porcentagem e a MIF (mediana da intensidade de fluorescência) de linfócitos Th17 foram avaliados em

citômetro de fluxo FACS Canto™ (Becton& Dickinson, San Diego, CA, USA) e analisados pelo programa FCS 4 Express FlowCytometry.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ SD e foram analisados utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para as comparações entre dois grupos experimentais serão utilizados o teste de Student's t e para as comparações entre três ou mais grupos experimentais será aplicada a análise de variância ANOVA seguido de teste de comparação múltipla Dunnett ou Tukey. Serão consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação *in vivo* da capacidade migratória de células dendríticas após fagocitose de CA+E. coli+CFSE

Células dendríticas são células residentes distribuídas pelos diferentes tecidos e apresentam um papel chave na interface entre a resposta imune inata e adaptativa, sendo estas as mais eficientes na ativação de linfócitos T “naive”. A habilidade destas células destaca-se por sua capacidade fagocítica, enquanto imatura e, após sua ativação e maturação, tornam-se eficientes células migratórias para a região paracortical, rica em linfócitos T, nos linfonodos. O microambiente gerado por CD tolerogênicas apresentam uma maior produção de TGF- β , IL-10 e indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), necessárias para a diferenciação de células T-regs (Li e Shi, 2015), enquanto que células dendríticas imunogênicas liberam grandes quantidades de TGF- β , IL-6 e IL-23 necessárias para diferenciação e manutenção de linfócitos Th17 (Lutz e Schuler, 2002).

Recentes resultados, *in vitro*, obtidos por nosso grupo demonstram que, a fagocitose por CD de CA estéreis (não infectadas) impede a maturação das células dendríticas, representada pela baixa expressão de MHC-II, CD86 e CCR7, resultando em uma baixa capacidade migratória destas células e na produção de mediadores anti-inflamatórios como TGF- β , IL-10 e PGE2. Entretanto, a fagocitose de células apoptóticas infectadas (contendo micro-organismos no seu interior) resulta na ativação e maturação dessas células dendríticas, como pode ser observado pela maior expressão dos receptores supracitados, e aumenta a capacidade migratória dessas células, *in vitro*, bem como a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-23, TGF- β e IL-6. Portanto, a partir destes resultados podemos sugerir a modulação de CD através da fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas, mimetizando um estado tolerogênico

e imunogênico da resposta imune em uma situação de homeostase e em um processo infeccioso, respectivamente.

Nosso grupo tem como um dos principais focos de pesquisa o entendimento dos mecanismos efetores da resposta imune no ambiente pulmonar contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. No intuito de tentar reproduzir, *in vivo*, os resultados obtidos *in vitro*, em um modelo de infecção pulmonar por *E. coli* foram avaliados tanto o fenótipo de maturação, como a capacidade migratória de células dendríticas, após a fagocitose de CA infectadas, no pulmão, linfonodos cervicais e do mediastino.

Inicialmente, para os experimentos *in vivo*, foi padronizada a concentração ótima de incorporação de CFSE por CA infectadas, utilizando diferentes concentrações do corante fluorescente. Células RAW 264.7 foram infectadas com *E. coli* e a apoptose celular induzida por UV. Não foram observadas diferenças significativas em termos de porcentagem de células positivas e mediana da intensidade de fluorescência (MIF) quando avaliadas as concentrações de 5 μ M e 10 μ M de CFSE, portanto, a concentração de CFSE utilizada nos subsequentes experimentos foi de 5 μ M (Resultados Suplementares - Figura 3). Em todos os experimentos realizados a incorporação de CFSE, por células apoptóticas infectadas, foi confirmada por citometria de fluxo antes da instilação destas nos animais (Resultados Suplementares - Figura 4).

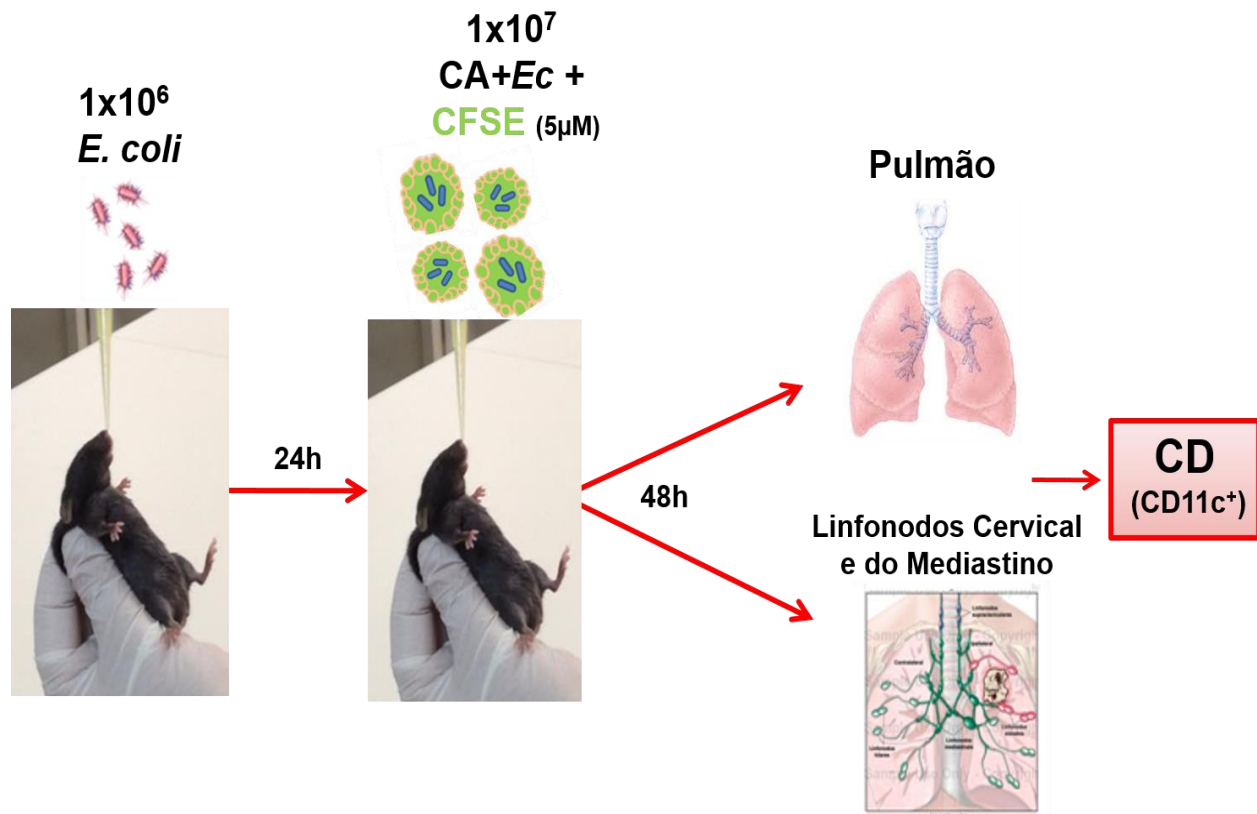
No início do processo infeccioso, após o rompimento de barreiras físicas e químicas, ocorre a invasão dos micro-organismos patogênicos no tecido, que ativam células residentes como, macrófagos e CD, e geram um microambiente inflamatório que favorece o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. Estas células inflamatórias uma vez no tecido fagocitam estes micro-organismos e após horas ou dias morrem no local da infecção gerando, portanto, as células apoptóticas infectadas. Estas serão removidas rapidamente por CD

e macrófagos residentes presentes no tecido acometido. Como descrito anteriormente, as CD contendo estas células apoptóticas infectadas no interior, *in vitro*, apresentam um fenótipo de maturação que favorece o recrutamento destas células na presença de CCL19 e CCL21, sabidamente expressas na região paracortical dos linfonodos, rica em linfócitos T.

Um crescente corpo de evidências experimentais indica que o paradigma da função "sentinela" de CD se aplica muito bem ao sistema respiratório. Isto implica um recrutamento constante de CD no pulmão, capacidade para detectar e capturar antígenos inalados e, eficiente transporte de antígenos processados para os linfonodos. A inalação de bactérias ou partículas virais induz um rápido influxo de CD nas vias aéreas de camundongos, e a resolução da inflamação normalmente restaura os números basais de CD pulmonares (Mcwilliam *et al.*, 1994).

Esses dados da literatura dão suporte para nossos experimentos *in vivo*. Desse modo, nos primeiros ensaios *in vivo* foi avaliado se as células apoptóticas infectadas, marcadas com CFSE, seriam interiorizadas por células dendríticas imaturas presentes no pulmão e, essa fagocitose levaria a maturação e subsequente migração destas células para os linfonodos proximais. Para provar nossa hipótese, foi utilizado o delineamento experimental demonstrado na Figura 1, na tentativa de tentar mimetizar o início deste processo infeccioso.

Figura 1: Infecção com *E. coli* e instilação CA+*E. coli*

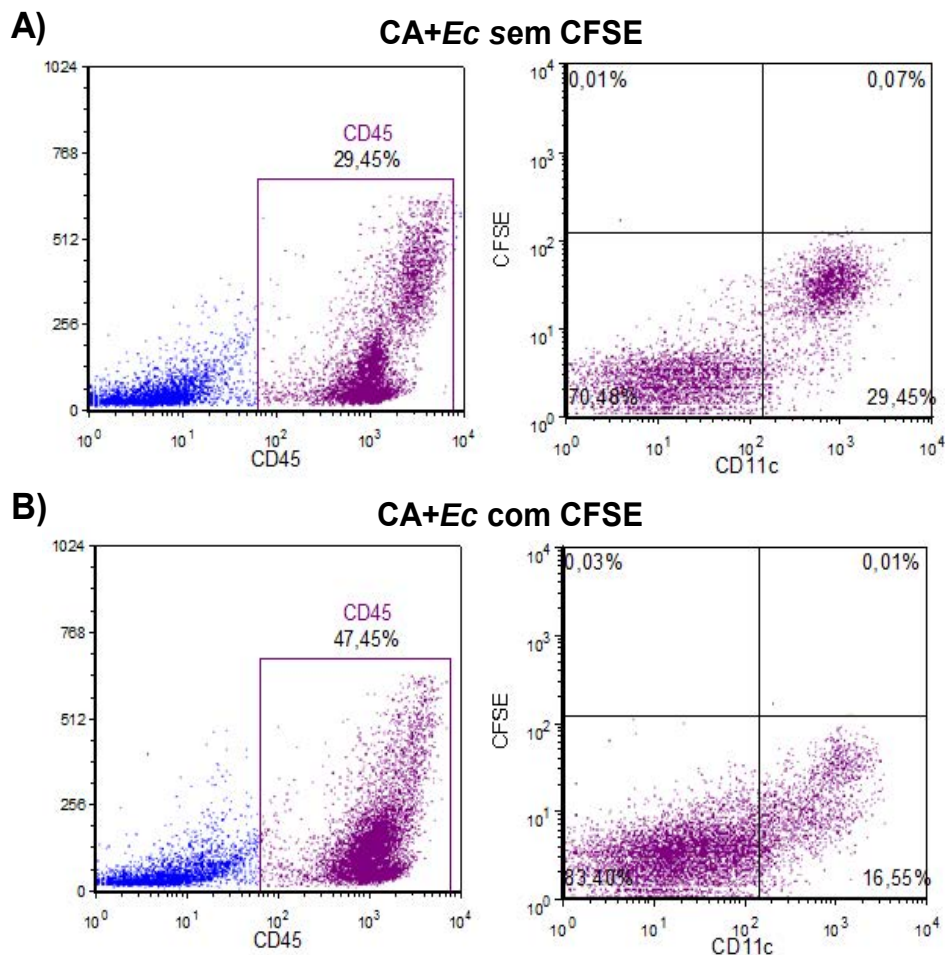


Células Raw 264.7 foram infectadas com *E. coli* e posteriormente foi induzida a apoptose por radiação de 350mJ de luz UV. CA+*E. coli* forma marcadas com 5 μ M de CFSE. Animais C57BL/6 foram instilados i.n. com 1×10^6 *E. coli* e após 24 h, novamente instilados com 1×10^7 CA+Ec+CFSE. Após 48 h os animais foram eutanasiados e os pulmões e os linfonodos (mediastino e cervicais) foram coletados. A suspensão celular obtida foi marcada com anti-CD45 (APC), e então células CD11c⁺ (PEcy-7) forma avaliadas quanto a porcentagem de células positivas para CFSE por citometria de fluxo.

Após 48 h da instilação com CA+*Ec*+CFSE, foi detectado ~ 18% de células dendríticas (CD45⁺CD11c⁺) no pulmão destes animais. No entanto, em nenhuma das amostras de pulmões avaliadas foi observado células CD11c⁺ positivas para CFSE, que indicam a fagocitose por CD de células apoptóticas infectadas com *E. coli*. (Figura 2). Além disso, tanto nos linfonodos do mediastino (LM) como nos cervicais (LC) foi observado entre 3% a 4% de células CD45⁺CD11c⁺, no entanto, assim como observado nas células do pulmão, não foi possível detectar qualquer positividade de CA+*E.coli*+CFSE (Figura 3).

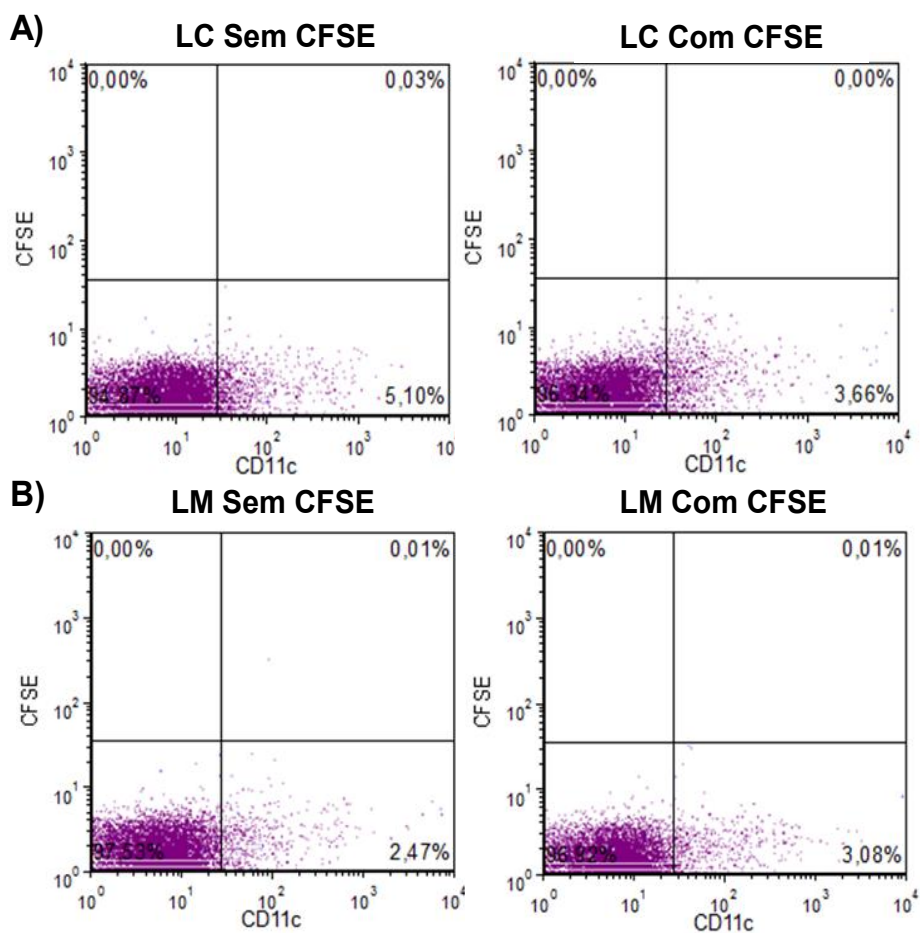
Devido à ausência de células CD11c⁺ positivas para CFSE no pulmão dos animais após 48 h da instilação, foi avaliado a cinética de degradação destas CA infectadas conjugadas com CFSE por CD, *in vitro*.

Figura 2: Detecção de CD contendo CA+Ec marcadas com CFSE no pulmão



C57BL/6 foram infectados (i.n.) com 1×10^6 *E. coli* e após 24 h instilados com 1×10^7 CA+Ec marcadas ou não marcadas com CFSE. Após 48 h os pulmões foram coletados e a porcentagem de CD ($CD45^+/CD11c^+$) avaliada por citometria de fluxo. As células obtidas dos pulmões foram marcadas com anti-CD45 e então selecionadas para $CD11c^+$. A) *Dotplot* da porcentagem de células dendríticas $CD45^+CD11c^+$, não marcadas com CFSE (controle) no pulmão; B) *Dotplot* da porcentagem de células dendríticas $CD45^+CD11c^+$, marcadas com CFSE no pulmão. Dados de um experimento representativo, de 2 experimentos individuais. N = 3 animais por grupo.

Figura 3: Detecção de CD contendo CA+Ec+CFSE nos linfonodos proximais (LC e LM)



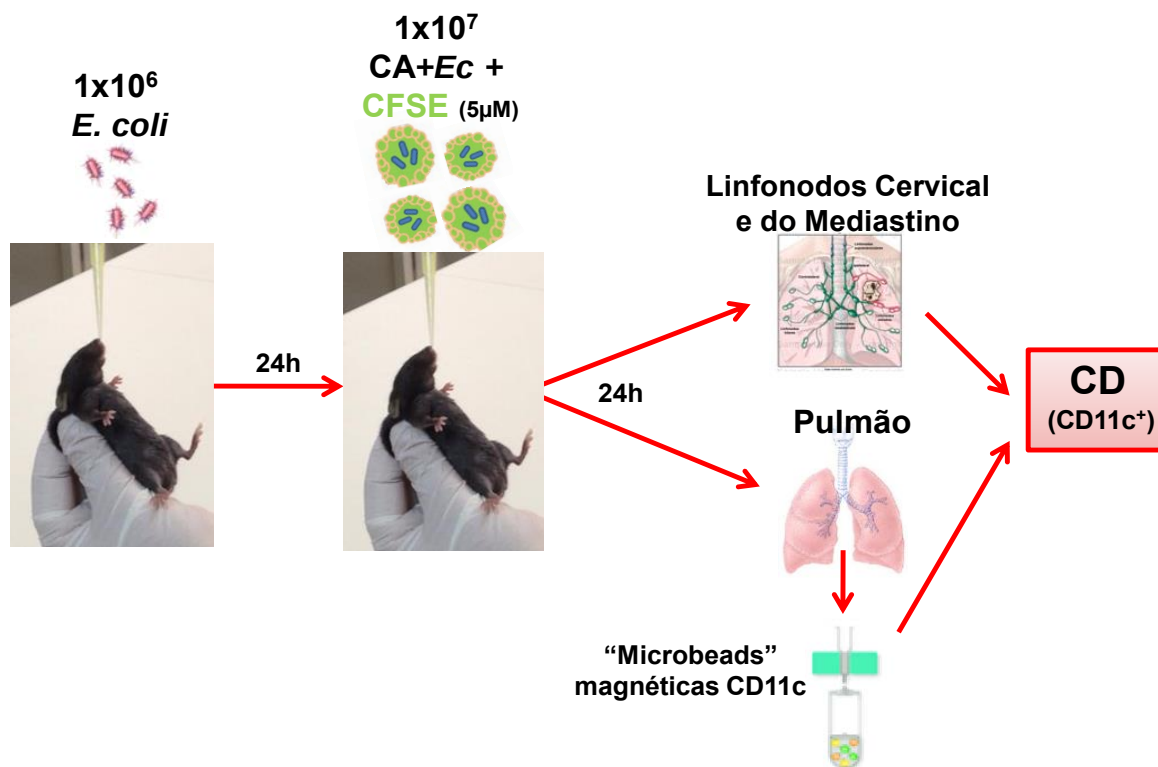
C57BL/6 foram infectados (i.n.) com 1×10^6 *E. coli* e após 24 h instilados com 1×10^7 CA+Ec marcadas ou não marcadas com CFSE. Após 48 h os linfonodos cervicais e do mediastino foram coletados e a porcentagem de CD (CD45⁺/CD11c⁺) avaliada por citometria de fluxo. As células obtidas foram marcadas com anti-CD45 e então selecionadas para CD11c⁺. A) *Dotplot* das porcentagens de células dendríticas CD45⁺CD11c⁺, marcadas e não marcadas com CFSE nos linfonodos cervicais (LC); B) *Dotplot* das porcentagens de células dendríticas CD45⁺CD11c⁺, marcadas ou não marcadas com CFSE nos linfonodos do mediastino (LM). Dados de um experimento representativo, de 2 experimentos individuais. N = 3 animais por grupo.

A fim de tentar elucidar a inexistência de marcação de CFSE em CD isoladas do pulmão, inicialmente foi realizada *in vitro* uma cinética de degradação da marcação do CFSE em células apoptóticas infectadas após 24 h, 36 h e 48 h, para tentarmos extrapolar os períodos a serem avaliados nos experimentos *in vivo*. Os resultados demonstram que até 48 h não houve mudanças significativas na porcentagem de células positivas para CFSE, ou seja, ~ 40% das células apoptóticas infectadas eram positivas para CFSE (AC+Ec/CFSE⁺). No entanto, a partir de 48 h, foi observada uma diminuição em MIF quanto a expressão de CFSE (Resultados Suplementares - Figura 5). A partir dos resultados obtidos *in vitro*, o período de 24 h foi o estipulado para avaliar, *in vivo*, a presença de células AC+Ec+CFSE no interior de CD obtidas do pulmão.

Na tentativa de enriquecer a porcentagem de células CD11c⁺, as células totais obtidas do pulmão foram isoladas em coluna com "microbeads" magnéticas anti-CD11c. Além disso, a suspensão celular obtida do pulmão e dos linfonodos foram marcadas com anticorpo anti-Ly6G (PE) para excluir a contaminação de neutrófilos em nossa marcação, visto que estas células também expressam CD11c^{low} (Figura 4).

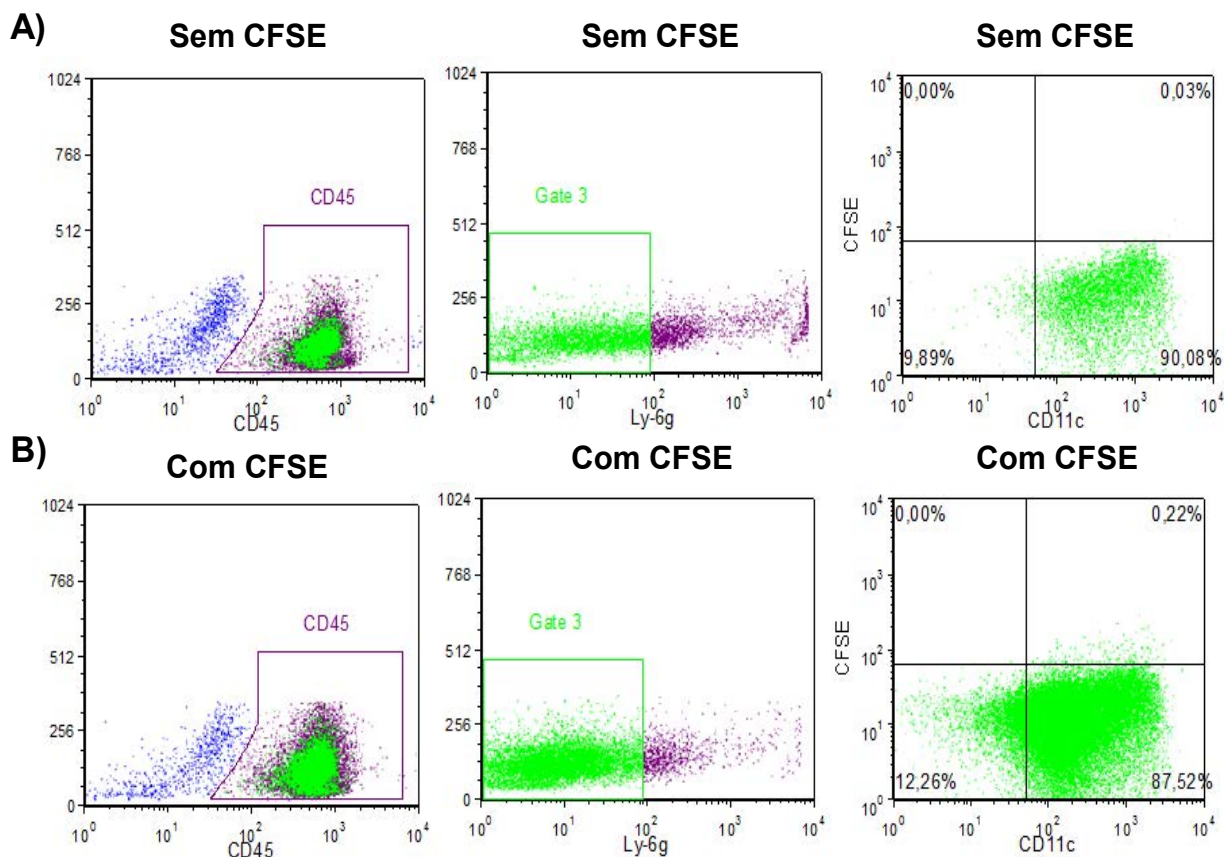
Devido a etapa de enriquecimento de CD pela seleção apenas de células CD11c⁺ (utilizando "microbeads") e exclusão de neutrófilos da análise, 90% da suspensão celular do pulmão de animais instilados com células apoptóticas infectadas, marcadas ou não com CFSE, eram CD45⁺/Ly6g⁻/CD11c⁺. Os resultados demonstram que, após 24 h de instilação nos animais com CA+E. coli+CFSE apenas uma pequena porcentagem das CD foi positiva para CFSE (~ 0,22%), ou seja, possuíam células apoptóticas infectadas no seu interior (Figura 5A e B). Em nenhuma das amostras dos linfonodos analisadas, mediastino ou cervical, foi observada células CD11c⁺ positivas para CFSE (Dados não mostrados).

Figura 4: Infecção com *E. coli*, instilação CA+*Ec* e purificação de CD



Células Raw 264.7 foram infectadas com *E. coli* e posteriormente foi induzida a apoptose por radiação de 350mJ de luz UV. CA+E. coli forma marcadas com 5 μ M de CFSE. Animais C57BL/6 foram instilados i.n. com 1×10^6 *E. coli* e após 24 h, novamente instilados com 1×10^7 CA+*Ec*+CFSE. Após 24 h os animais foram eutanasiados e os pulmões e os linfonodos (mediastino e cervicais) foram coletados. As células obtidas dos pulmões foram purificadas em coluna com "microbeads" magnéticas anti-CD11c. A suspensão celular obtida dos pulmões e linfonodos foram marcadas com anti-CD45 (APC), anti-Ly6g (PE) e anti-CD11c (PEcy-7), e a população de CD CD11c⁺ foi avaliada quanto a porcentagem de células positivas para CFSE por citometria de fluxo.

Figura 5: Detecção de AC+*Ec*+CFSE no interior de CD obtidas a partir de células do pulmão



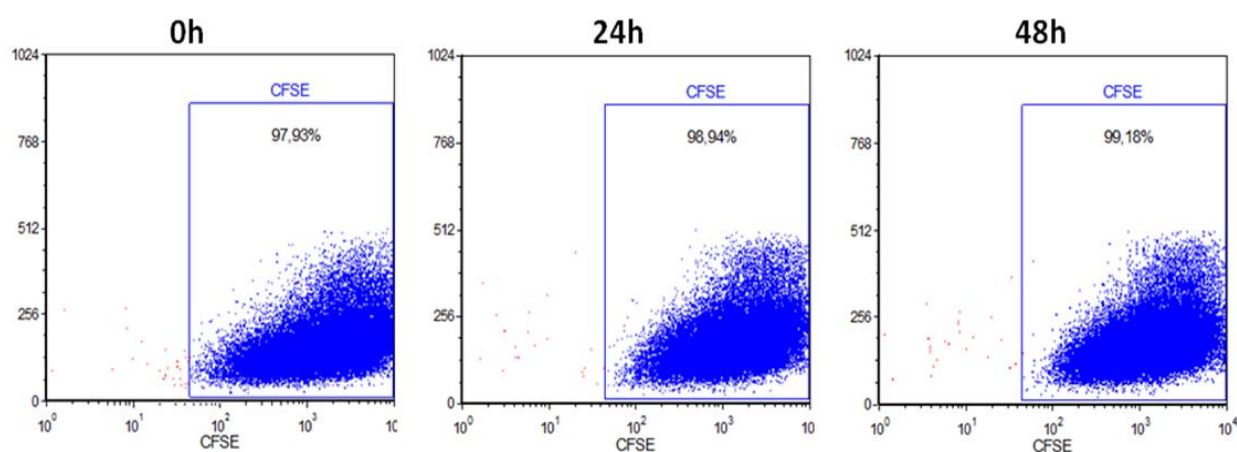
Animais C57BL/6 foram instilados i.n. com 1×10^6 *E. coli* e após 24h estes foram novamente instilados com 1×10^7 CA+*Ec* marcadas ou não com CFSE. Após 24h da instilação com CA infectadas, os animais foram eutanasiados e os pulmões e linfonodos do mediastino e cervicais foram coletados. As células obtidas dos pulmões foram purificadas em coluna com "microbeads" magnéticas anti-CD11c, em seguida marcadas com anti-CD45, anti-Ly6g e anti-CD11c, e a população de CD foi analisada por citometria de fluxo. A) *Dotplot* da porcentagem de células dendríticas CD45⁺Ly6g⁻CD11c⁺, não marcadas com CFSE (controle) no pulmão; B) *Dotplot* da porcentagem de células dendríticas CD45⁺Ly6g⁻CD11c⁺ marcadas com CFSE no pulmão. Dados de um experimento representativo, de 2 experimentos individuais. N = 3 animais por grupo.

Otimização da incorporação de CFSE em células apoptóticas infectadas após fixação com formaldeído

Conforme observado nos resultados da cinética de degradação de CFSE *in vitro* (Figura 5, Material suplementar), as CA+Ec marcadas com CFSE, perdem aproximadamente 50% a marcação de CFSE após 24 h de cultura. Além disso, a MIF de CA+Ec/CFSE⁺ diminui após 36 h e 48 h de incubação *in vitro*. Além disso, *in vivo*, após 24 h de instilação dos animais foi observado apenas uma baixa porcentagem de CD (CD45⁺Ly6g⁻CD11c⁺) positivas para CFSE, ou seja, contendo CA+Ec no pulmão destes animais. Uma vez que a fonte de nossas CA infectadas é uma linhagem de macrófagos (linhagem de macrófagos RAW 264.6), ou seja, com alta taxa de proliferação, a diminuição de MIF em CA incorporadas com CFSE poderia ser devido a proliferação destas células e diluição da marcação do corante. Portanto, a fim de otimizar nosso protocolo de fagocitose de CA+Ec/CFSE⁺, e tentar aumentar a detecção destas células no interior de CD *in vivo*, CA+Ec+CFSE foram fixadas com formaldeído impedindo desta forma a proliferação de CA e diluição do CFSE.

Para tanto, os resultados obtidos *in vitro* comprovam que a fixação das CA+Ec após a marcação impediu a diluição do CFSE, ou seja, ~ 98% das CA+Ec mantiveram-se positivas para CFSE até 48 h após a marcação (Figura 6).

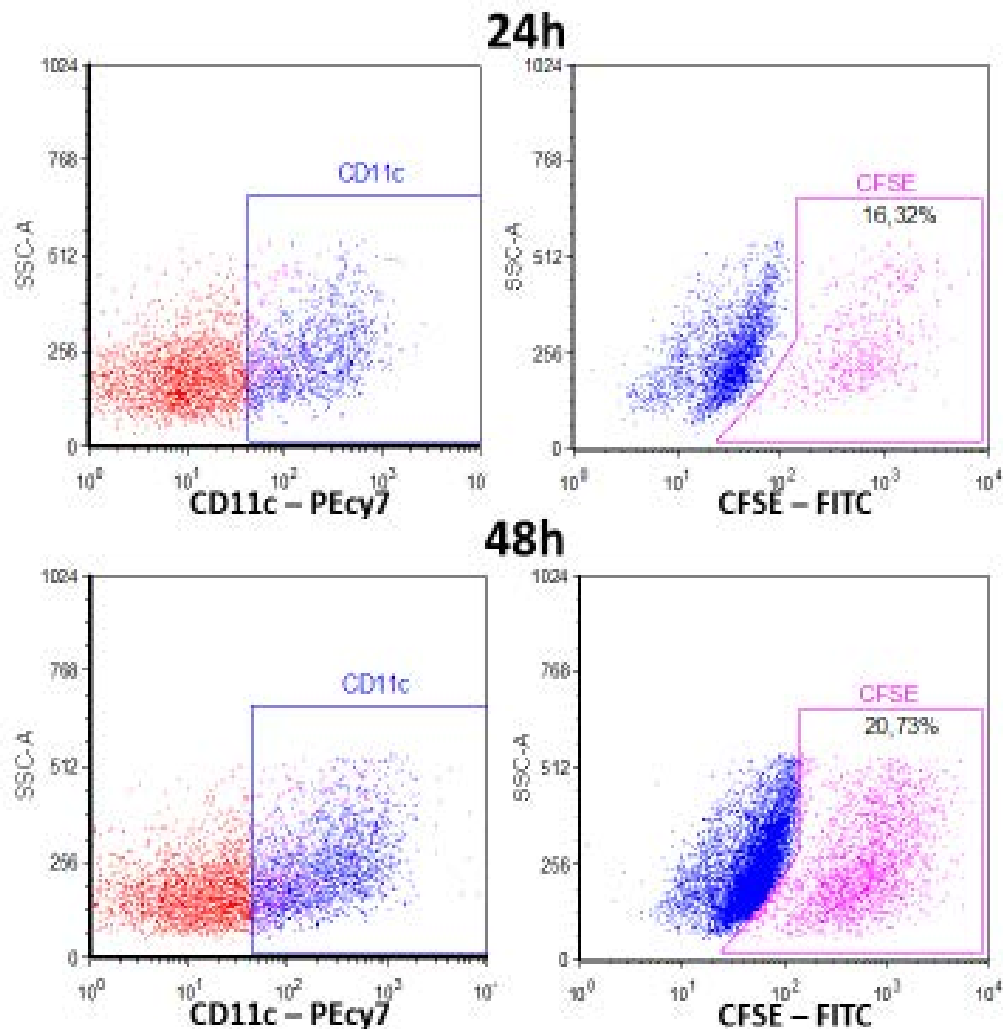
Figura 6: Fixação de AC+Ec impede a perda da marcação com CFSE, *in vitro*



CA+Ec foram marcadas com 5 μ M de CFSE, posteriormente fixadas com PBS 4% de formaldeído e, incubadas em estufa 5% de CO₂ a 37° C. Após 24 h e 48 h as células foram recuperadas e a porcentagem de células positivas para CFSE foi determinada por citometria de fluxo. Dados representativos de 1 experimento individual realizado em triplicata.

Antes de iniciar os experimentos *in vivo*, foi realizada uma cinética de fagocitose por CD, de CA+Ec+CFSE *in vitro*, para confirmar o melhor período para recuperação de CD no pulmão dos animais. As CD, diferenciadas de medula óssea, foram incubadas com CA+Ec+CFSE fixadas, na proporção 1:3, e após 24 h e 48 h de co-cultura estas foram recuperadas, marcadas com anti-CD11c e avaliadas quanto a porcentagem de CD (CD11c⁺) positivas para CFSE, por citometria de fluxo. Após 24 h e 48 h, 16 – 20% das CD (CD11c⁺) eram positivas para CFSE, ou sejam estas CD fagocitaram CA+Ec, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7: Fagocitose de CA+Ec marcadas com CFSE e fixadas, por CD, *in vitro*



CA+Ec foram marcadas com 5 μ M de CFSE, posteriormente fixadas com PBS 4% de formaldeído e, incubadas com CD em estufa 5% de CO₂ a 37° C por 24 h e 48 h. Após esses períodos de incubação as células recuperadas foram marcadas com anti-CD11c (PEcy-7) e a porcentagem de células CD11c⁺ positivas para CFSE (FITC) foi determinada por citometria de fluxo. Dados representativos de 1 experimento individual realizado em triplicata.

Avaliação *in vivo* da capacidade migratória de CD após a fagocitose de CA infectadas com *E. coli* + CFSE

A partir das otimizações referentes aos resultados obtidos nas Figuras 5 e 6, os experimentos *in vivo* foram novamente realizados seguindo o mesmo delineamento experimental descrito na Figura 4. Os pulmões e linfonodos dos animais infectados com *E. coli* e instilados com CA+*Ec*+CFSE foram recuperados após 24 h e 48 h da instilação e as células obtidas do pulmão foram purificadas em coluna com "microbeads" magnéticas anti-CD11c. Após 24 h, ~ 43% da suspensão celular obtida do pulmão de animais instilados com CA+*Ec*+CFSE ou CA+*Ec* sem CFSE, eram CD45⁺CD11c⁺. Porém, a fixação das CA+*Ec* com CFSE não foi capaz de otimizar os resultados obtidos previamente, ou seja, não houve um aumento na porcentagem de CA+*Ec*+CFSE no interior de CD (Figura 8A e B). Em nenhuma das amostras dos linfonodos analisadas, mediastino ou cervical, foi observada células CD11c⁺ positivas para CFSE (Dados não mostrados).

Uma das justificativas quanto as diferenças obtidas dos resultados *in vitro* e *in vivo* quanto ao índice de fagocitose por CD de CA+*Ec*+CFSE, seria a origem das CD analisadas nos diferentes experimentos. Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas CD oriundas de células de medula óssea diferenciadas *in vitro*. Por outro lado, nos experimentos *in vivo* avaliamos CD purificadas do parênquima pulmonar, ou seja, CD teciduais. A expressão de receptores envolvidos na fagocitose de CA por CD oriundas do pulmão ou da medula óssea podem diferir, justificando a diferença encontrada da presença CA+*Ec*+CFSE no interior destas CD.

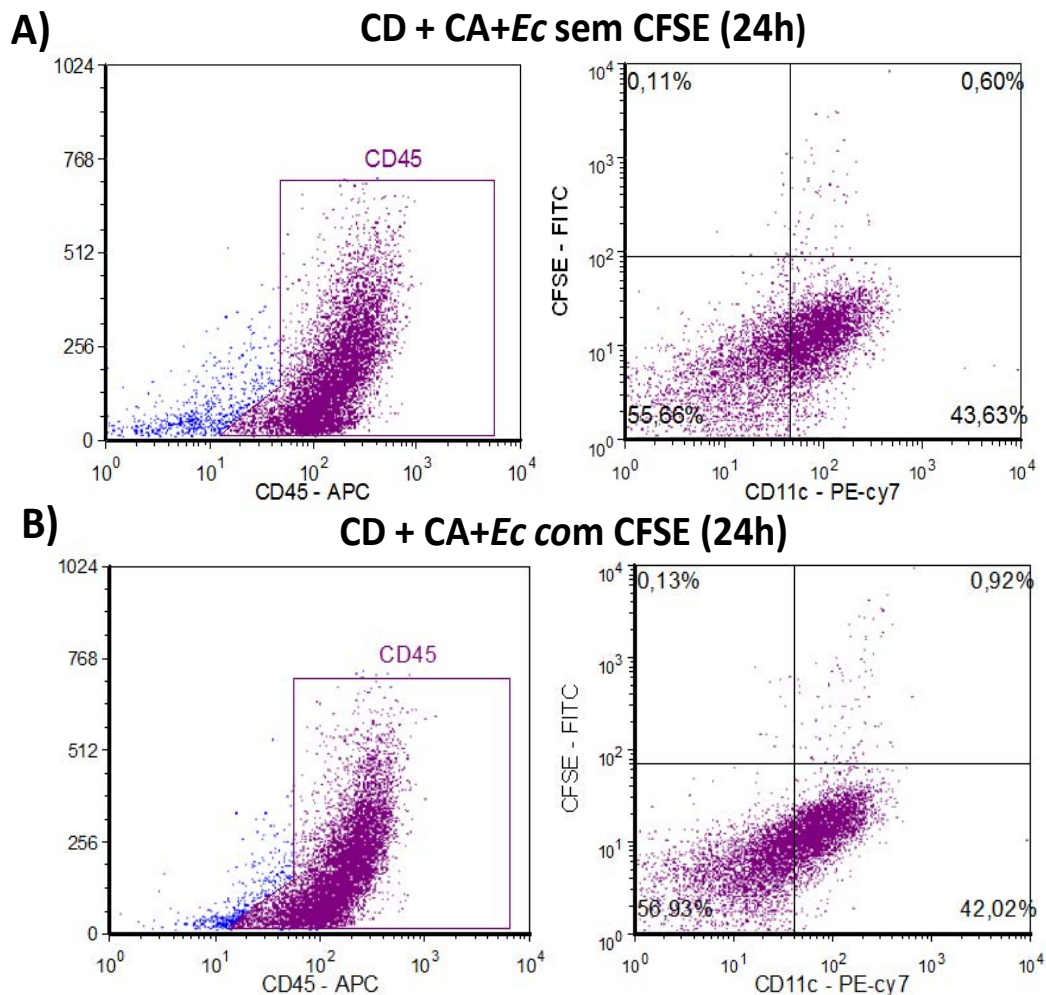
Além disso, no pulmão de camundongos foram descritas quatro subpopulações: as intra-epiteliais, as que compõe a lâmina própria, e as CD11c⁺/CD11b⁻ e CD11c⁺/CD11b⁺, residentes no parênquima pulmonar. Além destas sub-populações de CD residentes, durante um processo infeccioso ocorre a migração de CD LY6C⁺ derivadas de monócitos (Hu e Pasare, 2013). Em

camundongos, uma pequena porcentagem de CD, CD11C⁺ CD103⁺, parecem ser as células responsáveis em capturar células apoptóticas no pulmão e migrarem para os linfonodos proximais, em um contexto inflamatório induzido pela instilação prévia com LPS (Desch *et al.*, 2011). Novos experimentos deverão ser realizados na tentativa de comprovar, *in vivo*, a presença destas CA+Ec+CFSE utilizando marcadores como CD103 em células do parênquima pulmonar de animais instilados com CA+Ec+CFSE.

Outra explicação para os resultados obtidos seria a disponibilidade ou acesso de CA+Ec+CFSE aos diferentes compartimentos pulmonares. Trabalhos na literatura demonstram que o reconhecimento de proteínas antigênicas solúveis (conjugadas com FITC) inoculadas via intratraqueal promoveram apenas a incorporação e migração de apenas uma sub-população de CD para os linfonodos. Ou seja, uma fração considerável de CD do pulmão não foram hábeis em capturar macromoléculas ou antígenos inoculados devido a disponibilidade destes nos diferentes compartimentos do pulmão. Esses dados demonstram que há uma considerável heterogeneidade existente tanto na taxa de rotatividade como nas funções de diferentes subconjuntos de CD pulmonares (Vermaelen *et al.*, 2001).

Portanto, devido à baixa expressão de CFSE em CD isoladas do pulmão dos animais instilados nossos resultados *in vivo* não foram capazes de comprovar a fagocitose de CA+Ec por CD. Além disso, as diferenças entre CD oriundas de precursores da medula óssea, as quais foram utilizadas nos experimentos *in vitro*, e CD pulmonares também poderiam justificar a baixa detecção de fagocitose de CA+Ec por CD *in vivo*. No entanto, os experimentos *in vitro* sugerem que a eferocitose por CD é capaz de promover a maturação e ativação dessas células, tornando-se assim hábeis em migrar para os linfonodos proximais e desempenhar suas funções efectoras como APC, iniciando uma resposta imune adaptativa.

Figura 8: Fagocitose por CD de CA+Ec/CFSE⁺ fixadas, *in vivo*



Animais C57BL/6 foram instilados i.n. com 1×10^6 *E. coli* e após 24 h os mesmos foram novamente instilados com 1×10^7 CA+Ec marcadas ou não com CFSE e fixadas com PBS 4% de formadeído. Após 24 h os animais foram eutanasiados e os pulmões foram coletados e a porcentagem de CD (CD45⁺/CD11c⁺) avaliada por citometria de fluxo. As células obtidas foram purificadas em coluna com "microbeads" magnéticas CD11c, marcadas com anti-CD45 e então selecionadas para CD11c⁺. A) *Dotplot* da porcentagem de células dendríticas CD45⁺CD11c⁺, não marcadas com CFSE (controle) no pulmão; B) *Dotplot* da porcentagem de células dendríticas CD45⁺CD11c⁺ marcadas com CFSE no pulmão. Dados representativos de 1 experimento individual. N = 3 animais por grupo.

Análise do padrão de citocinas produzido por CD após a fagocitose de células apoptóticas infectadas, *in vivo*.

Outra maneira de comprovar indiretamente que as células apoptóticas infectadas instiladas nos animais foram internalizadas por fagócitos residentes no pulmão, seria quantificar as citocinas produzidas neste microambiente pulmonar. Ou seja, células dendríticas, após a fagocitose de células apoptóticas infectadas, seriam ativadas e produziriam citocinas que favorecem a diferenciação de subtipos de linfócitos T. A fagocitose por CD, de células apoptóticas infectadas, *in vitro*, resulta na produção de IL-6, devido ao reconhecimento de *E. coli* via TLR 4/MyD88 presente no interior do endossomo, assim como de TGF- β , pela interação de fosfatidilserina a receptores específicos presentes na membrana celular. Desse modo a presença de IL-6, juntamente com TGF- β proporciona um ambiente adequado para diferenciação de células Th17 (Torchinsky *et al.*, 2009).

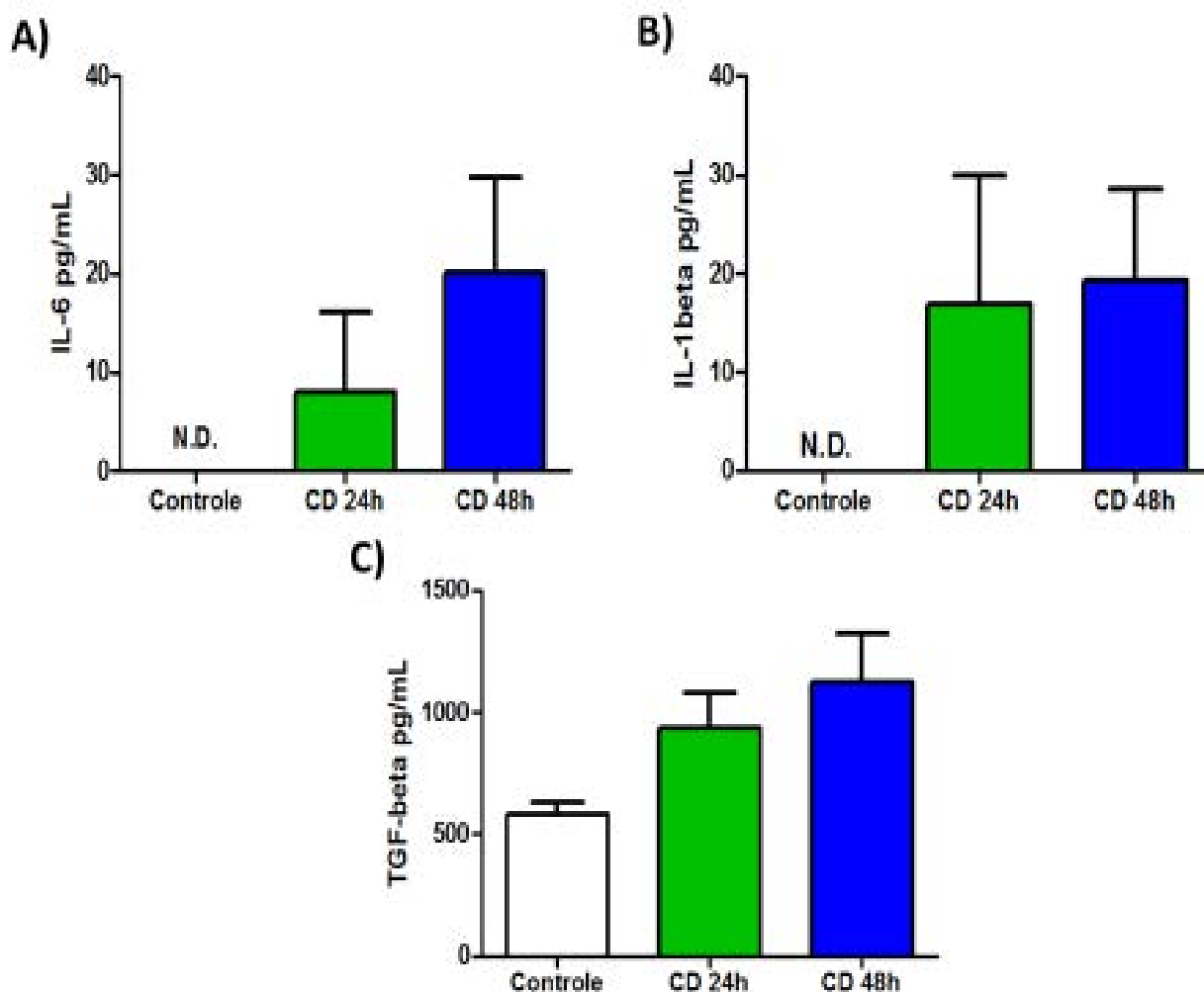
Desta forma, devido aos resultados não convincentes obtidos *in vivo*, ou seja, a baixa porcentagem de CD contendo no seu interior AC+*Ec*+CFSE, foi avaliada a produção de citocinas envolvidas na diferenciação de células Th17, a fim de comprovar indiretamente, que houve a fagocitose por CD de AC+*Ec* no pulmão destes animais. A instilação de CA infectadas no pulmão dos animais após 24 h e 48 h resultou em um aumento nos níveis de IL-6, IL-1 β e TGF- β quando comparado com os níveis obtidos no pulmão de animais controle (Figura 9A, B e C). Esses resultados corroboram com os resultados *in vitro* obtidos por nosso grupo de pesquisa.

A presença de PGE2 após 24 h e 48 h de instilação de CA infectadas também foi determinada no homogenato pulmonar. No entanto, a diluição das amostras utilizada no ensaio (3:1) não permitiu quantificar os níveis de PGE2, pois os valores de D.O. de todas as amostras avaliadas extrapolaram os valores do maior ponto da curva padrão (Dados não mostrados).

Outras diluições do homogenato pulmonar serão testadas para quantificação de PGE2 secretada nas diferentes condições experimentais.

Desse modo, podemos sugerir que a instilação de células apoptóticas infectadas nos animais promove a secreção de citocinas importantes para a diferenciação de células Th17.

Figura 9: Produção de citocinas mediante fagocitose de CA infectadas, *in vivo*



Animais C57BL/6 foram instilados i.n. com 1×10^6 *E. coli* e após 24 h novamente instilados com 1×10^7 CA+*Ec* marcadas ou não com CFSE e fixadas com PBS 4% de formaldeído. Após 24 h e 48 h os animais foram eutanasiados e os pulmões foram coletados, processados, centrifugados e o sobrenadante foi avaliado quanto a presença de IL-6 (A), IL-1 β (B) e TGF- β (C) por ELISA. Resultados representativos de 1 experimento realizado em triplicata. Análise realizada pelo programa GraphPad Prism 5.0.

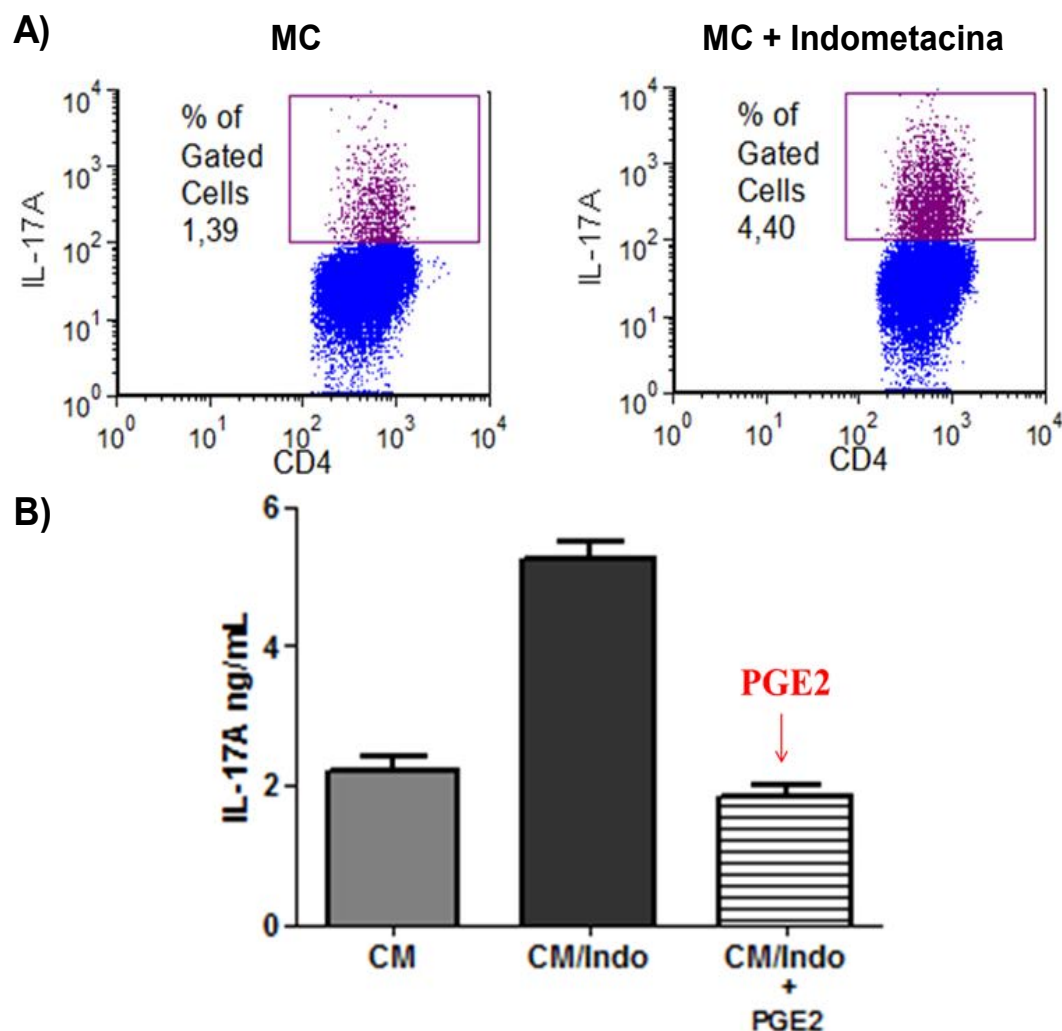
PGE2 na diferenciação de células Th17 no contexto de eferocitose

Nosso grupo de pesquisa tem como interesse avaliar o efeito de diferentes fontes de células apoptóticas (infectadas e/ou não infectadas) na modulação da resposta imune, tanto na imunidade inata como na adaptativa. Já é bem estabelecido na literatura que a fagocitose de CA por macrófagos alveolares (Medeiros *et al.*, 2009), assim como macrófagos isolados do peritônio (Fadok *et al.*, 1998) resulta na liberação de PGE2.

Vários trabalhos na literatura descrevem os diversos efeitos da PGE2 na diferenciação das distintas subpopulações de células T CD4⁺, e já se tem bem descrito o envolvimento desse mediador lipídico na modulação da diferenciação de células Th17, podendo estimular ou suprimir a resposta Th17 em diferentes contextos. No entanto, nada se tem descrito sobre o envolvimento de PGE2, oriunda da fagocitose de células apoptóticas infectadas, na diferenciação de células do perfil Th17.

Recentes resultados, *in vitro*, obtidos por nosso grupo demonstram que a PGE2 tem um papel chave na supressão da diferenciação de células Th17. A fagocitose por CD, de células apoptóticas infectadas promove a síntese de TGF- β , IL-6, IL-1 β e PGE2 que resulta na diferenciação de células Th17. No entanto, diferente da hipótese inicial, a inibição da síntese de PGE2, pelo tratamento com inibidor não seletivo da COX (Indometacina), resultou no aumento da porcentagem de células Th17, assim como a produção de altos níveis de IL-17A (Figura 10A e B). Corroborando com os dados obtidos, a adição exógena de PGE2 foi capaz de reverter a produção de IL-17A aos níveis produzidos na condição meio condicionado sem tratamento com indometacina. (Dados não publicados, referentes à tese dos alunos de doutorado Felipe e Naiara).

Figura 10: Envolvimento de PGE2 na diferenciação de células Th17 a partir de MC, *in vitro*

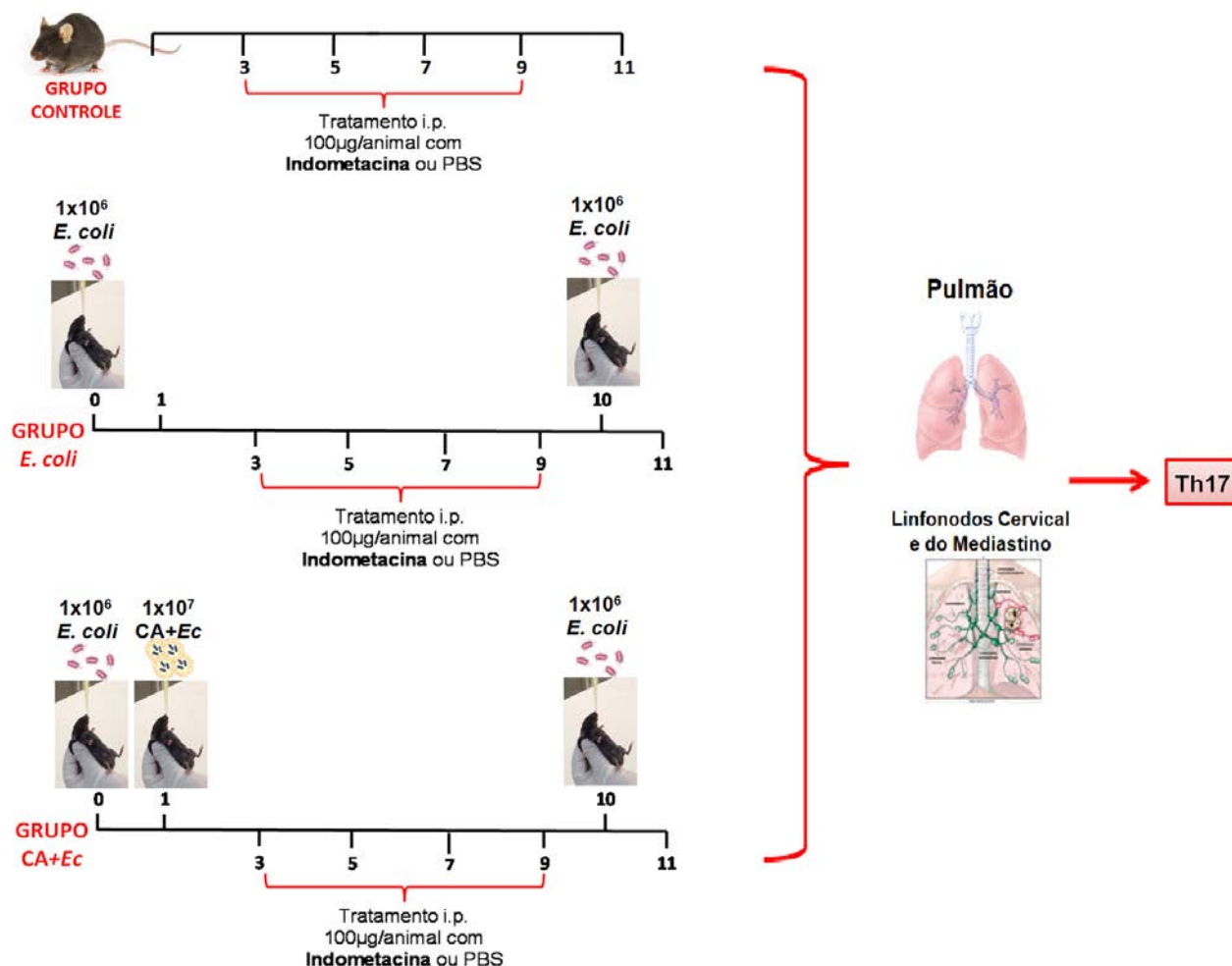


Células dendríticas previamente diferenciadas foram colocadas em cultura com CA+Ec e incubadas por 18 h para formação do meio condicionado (CM). Linfócitos T obtidos do baço de camundongos C57BL/6 foram purificados em coluna com "microbeads" magnéticas CD4⁺CD62L⁺ (Miltenyi). As células T CD4⁺ "naive" foram estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 e adicionadas em cultura com o MC, e foi ou não adicionada indometacina, incubação por 4 dias. A) *Dotplot* da porcentagem de células Th17 diferenciadas a partir de meio condicionado com e sem indometacina. B) Gráfico da expressão da citocina IL-17A em três diferentes condições: meio condicionado, meio condicionado com Indometacina e meio condicionado com Indometacina + PGE2 exógena (Dados não publicados, Felipe Fortino, Naira Dejana *et al.*, 2014).

Efeito supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17, *in vivo*

Mediante aos resultados promissores obtidos *in vitro* quanto ao papel supressor de PGE2 na diferenciação de Th17 no contexto de eferocitose, o último objetivo deste projeto foi validar esses resultados utilizando um modelo experimental de infecção pulmonar *in vivo*. Para tanto, os animais foram infectados (i.n.) previamente com *E. coli*, na tentativa de mimetizar um processo infeccioso ou inflamatório, e após 24 h os mesmos foram instilados com CA+Ec na presença ou ausência do tratamento com indometacina, conforme descrito no delineamento experimental abaixo (Figura 11).

Figura 11: Infecção com *E. coli* instilação CA+Ec e tratamento com indometacina



Animais C57BL/6 foram infectados (i.n.) com 1×10^6 *E. coli* e instilados com 1×10^7 CA+Ec. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo controle: animais não infectados com *E. coli* e não instilados com CA+Ec, tratados ou não tratados com Indo; Grupo *E. coli*, animais infectados com *E. coli*, não instilados com CA+Ec e tratados ou não tratados com Indo; Grupo CA + Ec: animais infectados com *E. coli*, após 24 h instilados com CA+Ec, tratados ou não tratados com Indo. Os animais foram tratados com Indometacina (100 ug/animal) ou PBS i.p., a cada 2 dias, por 4X. Após 24 h do último tratamento os animais foram re-instilados (i.n.) com 1×10^6 *E. coli* e no dia seguinte eutanasiados. Foi feita a coleta dos pulmões e linfonodos cervicais e do mediastino, as suspensões celulares obtidas foram analisadas quanto à porcentagem de células positivas para Th17 e a MIF para IL-17, por citometria de fluxo.

Corroborando com os resultados descritos previamente *in vitro*, as células isoladas do pulmão de animais instilados com CA infectadas e tratados com indometacina (CA+E. coli+ Indo) apresentaram um aumento na porcentagem de células positivas para Th17 (~ 7,8%) quando comparadas com as células isoladas dos animais que receberam apenas CA+Ec (3,3%) (Figura 12C). Quando as diferenças são avaliadas em número absoluto de células os resultados são evidentes. Os animais instilados com CA+Ec e tratados com Indo apresentaram um aumento de ~ 4x no número de células Th17 no pulmão, quando comparado com o número destas células obtidas dos animais instilados com CA+E. coli que não receberam Indo (Figura 12F).

Além disso, em relação aos grupos controles, foi observada uma baixa porcentagem de células Th17 no pulmão dos animais (~ 1,5%) que receberam ou não tratamento com indometacina (Figura 12A). No grupo infectado apenas com E. coli foi observado um aumento (~ 3,15%) de células Th17 e, o tratamento com indometacina promoveu um modesto aumento dessas células nos pulmões (~ 4%) (Figura 12B).

Esses resultados demonstram que a instilação de células apoptóticas contendo E. coli no seu interior resultou na diferenciação de células Th17, as quais foram observadas no pulmão dos animais, quando comparado com o grupo controle. No entanto, quando os animais foram tratados com indometacina houve um aumento na porcentagem de células positivas e na quantidade de IL-17 (indiretamente determinada pela intensidade de fluorescência – MIF), assim como em número absoluto de células Th17 que migraram para o pulmão destes animais (Figura 12D, E e F).

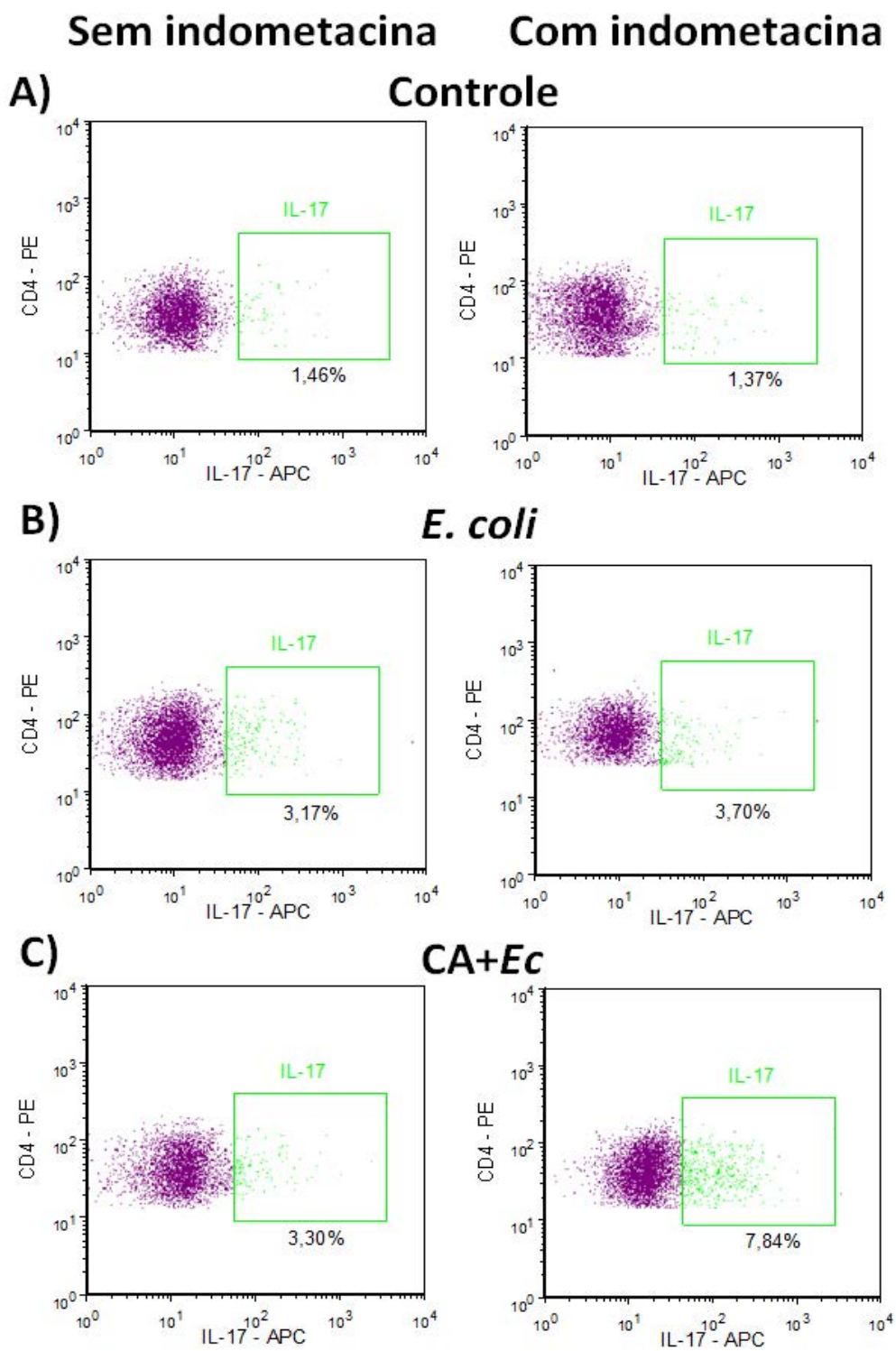
Torchinsky, *et al.* (2009) demonstraram que a fagocitose de CA por CD promove a diferenciação de Th17 pela produção de IL-6 e TGF- β , no entanto, não foi avaliada a produção e envolvimento de PGE2 nesse contexto (Torchinsky *et al.*, 2009). Dados, *in vitro*, obtidos recentemente por nosso grupo mostram que a fagocitose por CD, de CA+Ec induz a produção

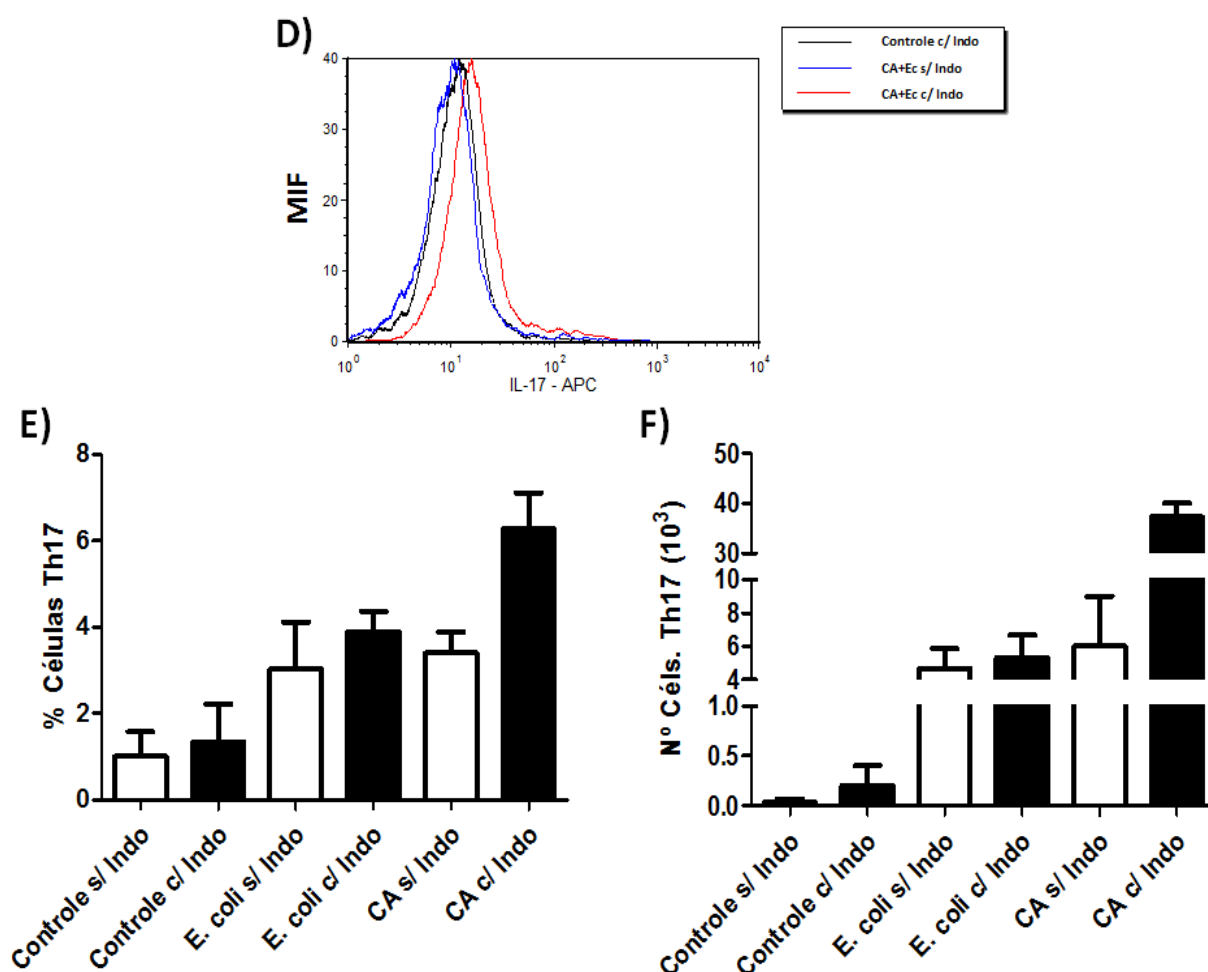
de altos níveis de PGE2 (~ 10x maior) quando comparados com os níveis deste mediador produzidos por CD na presença de CA não infectadas. Portanto, os níveis elevados de PGE2, produzidos após a instilação de CA+*Ec*, gera um microambiente que inibe a diferenciação de células Th17, pela presença de PGE2, e esse efeito é revertido pelo tratamento com inibidor de COX, indometacina.

Já se tem bem estabelecido na literatura que bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, induzem a síntese de PGE2 (Agard *et al.*, 2013) e diferenciação de células Th17 (Tsai *et al.*, 2013). No entanto, nossos dados sugerem que baixos níveis de PGE2 são produzidos pela infecção com *E. coli*, desse modo, a inibição deste mediador lipídico, pelo tratamento com indometacina, não levou ao aumento de diferenciação de células Th17 nesses animais. No entanto, a presença de *E. coli* no interior de CA resulta na produção de altos níveis de PGE2 pela eferocitose por CD.

Nossos resultados *in vivo* demonstram que há a diferenciação de células Th17 no contexto de CA+*Ec* e que o tratamento com indometacina potencializa essa diferenciação, sugerindo um papel crítico da PGE2 na supressão do desenvolvimento desse subtipo celular no contexto de eferocitose de células infectadas.

Figura 12: Efeito supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17 *in vivo*, no contexto de eferocitose (Pulmão)





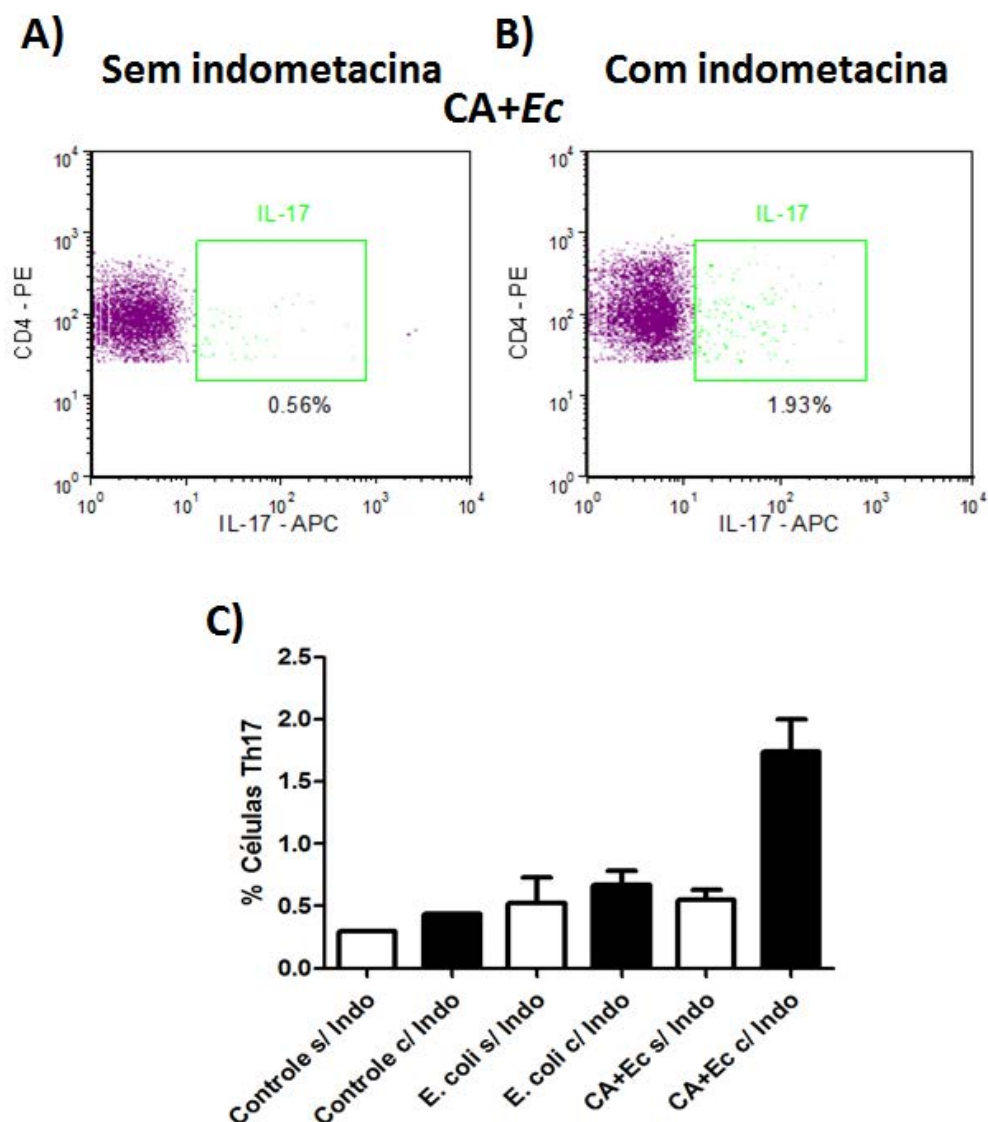
Animais C57BL/6 foram instilados com CA+E. coli e alguns grupos receberam ou não o tratamento com Indometacina. O tratamento foi realizado a cada 2 dias (i.p.), com 100µg/animal, por 4 vezes. Um dia após o último tratamento os animais foram novamente instilados com 1×10^6 E.coli, e após 24 h eutanasiados para obtenção das células dos pulmões, linfonodos cervicais e do mediastino. A) Grupo controle: animais tratados com indometacina (Controle c/ Indo) ou não tratados (Controle s/ Indo); B) Grupo E. coli: animais infectados com E. coli tratados com indometacina (E. coli c/ Indo) ou não tratados (E. coli s/ Indo); C) Grupo CA+Ec: animais infectados com E. coli, instilados com CA infectadas e tratados com Indo (CA+Ec c/ Indo) ou não tratados com Indometacina (CA+Ec s/ Indo). D) Dotplot da sobreposição dos histogramas representativos entre os grupos controle, CA+Ec s/ Indo e CA+Ec c/ Indo (MIF); E) Gráfico representativo da % de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ nos pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais. F) Gráfico representativo do número absoluto de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ em relação a contagem de leucócitos totais dos pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais. Análise realizada pelo programa GraphPadPrism 5.0. Dados de um experimento representativo, de 3 experimentos individuais. N= 3 animais por grupo.

Nos linfonodos cervicais foi observado o mesmo efeito biológico dos resultados descritos no pulmão. Tanto em animais do grupo controle, como em animais apenas infectados com *E. coli* tratados ou não com Indo, não foi possível detectar células positivas para Th17 (Dados não mostrados). Nos animais infectados com *E. coli* e instilados com CA+*Ec*, que não receberam Indo, foi observado um aumento na porcentagem de células Th17 quando comparados com animais controles. No entanto, o tratamento com Indo dos animais infectados com *E. coli* e instilados com CA+*Ec* resultou em um aumento em $\sim 3x$ na porcentagem de células T CD4 positivas para IL-17 (Figura 13A, B e C). Portanto, esses resultados corroboram com os dados anteriores, demonstrando que a eferocitose leva a produção de elevados níveis de PGE2 por células dendríticas previamente ativadas no pulmão e, a presença desse mediador nos linfonodos, parece inibir a diferenciação de células Th17. Ou seja, nossos dados sugerem que o tratamento dos animais com indometacina promove uma maior diferenciação de células Th17 nos linfonodos, em resposta ao microambiente propício (com presença de IL-6 e TGF- β) gerado pelas CD que fagocitaram CA+*Ec* nos pulmões e migraram para os linfonodos.

Nos linfonodos do mediastino não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (Dados não mostrados). A ausência de detecção de células Th17 nos linfonodos mais proximais ao pulmão, os do mediastino, sugere que o desafio destes animais com *E. coli* no pulmão promove o recrutamento destas células Th17, diferenciadas no linfonodo proximal, para o pulmão, justificando desta forma a ausência destas células nos linfonodos do mediastino.

Não foram observadas células T CD4⁺IFN- γ ⁺ nos animais infectados e instilados com CA+*Ec* com ou sem tratamento com indometacina, sugerindo que nos animais em que a PGE2 não é inibida, esta não auxilia na diferenciação de células do perfil Th1 (Dados não mostrados).

Figura 13: Envolvimento de PGE2 na diferenciação de células Th17 *in vivo*, no contexto de eferocitose (LC)



Animais C57BL/6 foram instilados com CA+E. coli e alguns grupos receberam ou não o tratamento com Indometacina. O tratamento foi realizado a cada 2 dias (i.p.), por 4 vezes, com 100µg/animal. Um dia após o último tratamento os animais foram novamente instilados com 1×10^6 E.coli, e após 24 h eutanasiados para obtenção das células dos pulmões, linfonodos cervicais e do mediastino. A) Animais infectados com E. coli, instilados com CA infectadas e não tratados com Indo (CA+Ec s/ Indo); B) Animais infectados com E. coli, instilados com CA infectadas e tratados com Indometacina (CA+Ec c/ Indo); C) Gráfico representativo da % de células CD3⁺CD4⁺ IL-17⁺ nos linfonodos cervicais dos animais dos diferentes grupos experimentais. Análise feita pelo programa GraphPadPrism 5.0. Dados de um experimento representativo, de 3 experimentos individuais. N= 3 animais por grupo.

Inibição de PGE2 no contexto de eferocitose aumenta a diferenciação de células Th17, promove o recrutamento de neutrófilos e diminuição da carga bacteriana no pulmão.

Embora a elevada expressão de IL-17A esteja relacionada a doenças inflamatórias das vias aéreas tais como asma (Molet *et al.*, 2001), fibrose cística (Tan *et al.*, 2011) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), este perfil de resposta pró-inflamatória parece desempenhar um papel protetor importante contra vários micro-organismos (McCallister *et al.*, 2005). Tanto IL-17A como IL-17F apresentam semelhante potencial de recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar se o aumento no número de células Th17, observado no pulmão de animais que receberam CA+E. coli e foram tratados com indometacina, promove uma inibição da carga bacteriana pelo aumento no recrutamento de neutrófilos para o pulmão.

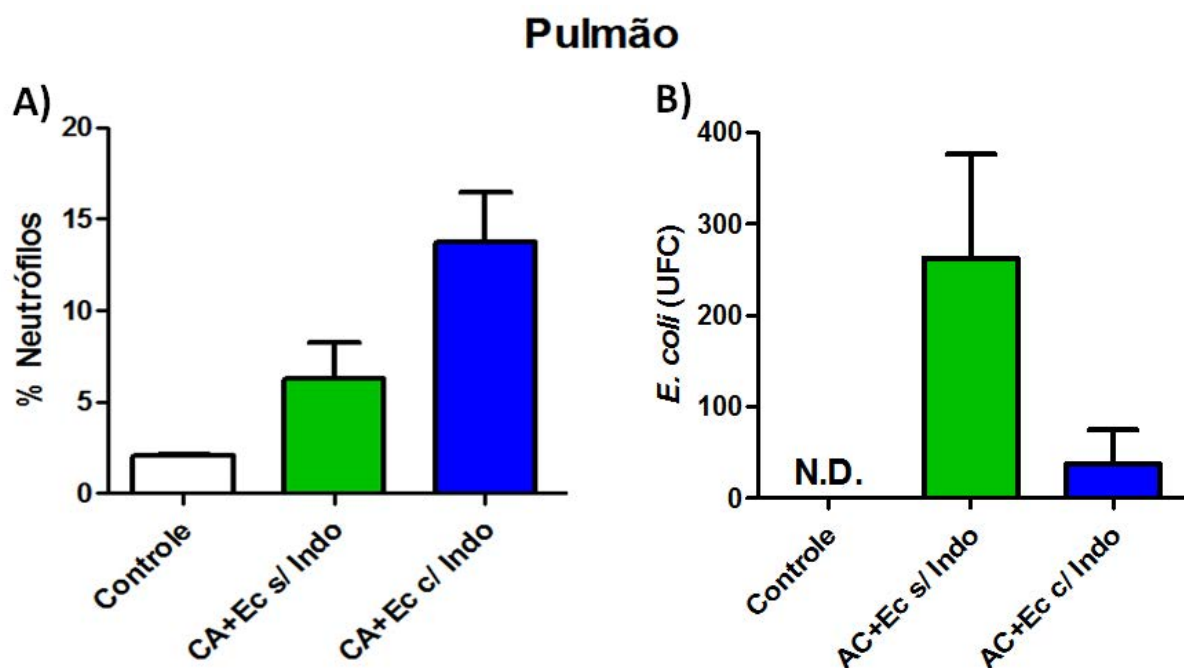
Os resultados demonstram que animais que foram instilados com CA+E. coli apresentam um recrutamento de neutrófilos para o pulmão, quando comparado aos animais controles que receberam apenas PBS. No entanto, o recrutamento destes neutrófilos para o pulmão não foi capaz de conter a proliferação bacteriana. Por outro lado, o tratamento dos animais com Indo, após a instilação dos animais com CA+E. coli, resultou no aumento do recrutamento de neutrófilos e diminuição da carga bacteriana para o pulmão, quando comparado com animais que não receberam tratamento com Indo (Figura 14A e B). Esses resultados corroboram com dados obtidos de diferenciação de células Th17 *in vivo*, demonstrando que os animais tratados com indometacina apresentam maior quantidade de neutrófilos no pulmão, provavelmente em resposta a maior recrutamento e/ou diferenciação de células Th17 no pulmão desses animais.

Um mecanismo bem descrito de células Th17 efetoras, secretoras de IL-17A e IL-17F, é o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. Porém, além da IL-17, sabe-se que células Th17 produzem IL-22 (Liang *et al.*, 2006) que, juntamente com IL-17, potencializa o recrutamento de neutrófilos, estimulando a produção de quimiocinas (CXCL1, CXCL5, CXCL8) (Andoh *et al.*, 2005), assim como a produção de proteínas antimicrobianas como β -defensinas (Sabat *et al.*, 2014).

Sabe-se que a inibição de PGE2 pode beneficiar o hospedeiro durante infecções bacterianas (Agard *et al.*, 2013). Camundongos deficientes de COX-2 demonstram um aumento na sobrevivência pós-infecção contra vários patógenos bacterianos. Camundongos deficientes de COX-2^{-/-} expostos a doses elevadas de LPS (i.p.) apresentam aumento da sobrevivência quando comparado com os animais selvagens (Ejima *et al.*, 2003). Além disso, camundongos COX-2^{-/-} também demonstram maiores taxas de sobrevivência associada a menor carga bacteriana no fígado e no baço após infecção intravenosa com *S. pyogenes* (Bowman e Bost, 2004). No entanto, nestes estudos não foi observado qualquer correlação da presença de PGE2 com aumento de células Th17.

Nossos resultados *in vivo* comprovam os resultados previamente obtidos *in vitro*, demonstrando o papel supressor de PGE2 na diferenciação de células Th17, no contexto de fagocitose de células apoptóticas infectadas. Desse modo, podemos sugerir que a inibição de PGE2 promove maior diferenciação de células Th17 e estas são recrutadas para pulmão exercendo suas funções efetoras, através da liberação de citocinas do perfil Th17, que resulta no recrutamento de neutrófilos para o tecido pulmonar. O aumento na porcentagem de neutrófilos parece refletir na diminuição da carga bacteriana recuperada do pulmão destes animais, no entanto, outros experimentos utilizando anticorpos bloqueadores para IL-17/e ou IL-22 serão testados para comprovar os resultados obtidos.

Figura 14: Inibição de PGE2 promove a diferenciação de células Th17 e resulta no aumento da migração de neutrófilos e diminuição da recuperação de *E. coli* no pulmão



Células obtidas do pulmão de animais dos diferentes grupos experimentais foram marcadas com anti-CD11b e anti-LY6G e o número de neutrófilos foi avaliado por citometria de fluxo (A); Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos LY6G⁺ no pulmão dos diferentes grupos experimentais. (B) O lóbulo inferior esquerdo do pulmão foi homogeneizado e UFC de *E. coli* foram recuperadas. Dados de um experimento representativo, de 3 experimentos individuais. N= 3 animais por grupo. Análise estatística realizada pelo programa GraphPadPrism 5.0.

7. CONCLUSÕES

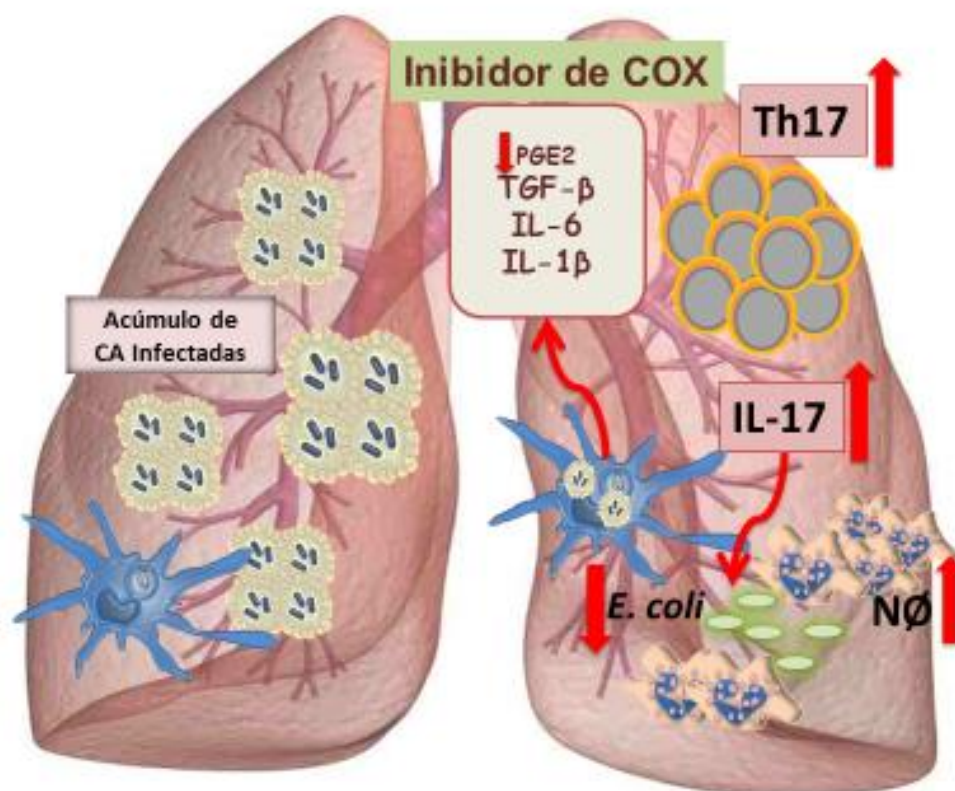
❖ Os resultados *in vivo* demonstram que a instilação de CA+Ec promove um microambiente favorável para diferenciação de células Th17, com presença de TGF- β , IL-6 e IL-1 β . No entanto, não foi possível comprovar a fagocitose por CD destas CA+Ec/CFSE⁺, tão pouco a capacidade migratória destas CD para os linfonodos.

❖ A instilação de animais com CA+Ec promove a diferenciação de células Th17, porém, o tratamento dos animais com inibidor de PGE2 (Indometacina) resultou no aumento de células Th17 no pulmão.

❖ A inibição da PGE2, pelo tratamento com indometacina, promove o aumento de células Th17 no pulmão, associado com um aumento no número de neutrófilos e diminuição da carga bacteriana no pulmão.

Modelo proposto

Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que a fagocitose de CA infectadas promove a diferenciação de células Th17. No entanto, a secreção de PGE2, pela fagocitose destas células apoptóticas infectadas suprime a diferenciação de células Th17 nos linfonodos, impedindo a migração destas células para o pulmão resultando num aumento da suscetibilidade a infecções pulmonares.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARD, M.; ASAKRAH, S.; MORICI, L. A. PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 3, p. 45, 2013. ISSN 2235-2988 (Electronic) 2235-2988 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23971009>>.

ALAM, M. M. et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever Asia-2 genotype, Pakistan. *Emerg Infect Dis*, v. 19, n. 6, p. 1017-9, Jun 2013. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23735999>>.

ANDOH, A. et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology*, v. 129, n. 3, p. 969-84, Sep 2005. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16143135>>.

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>>.

BOWMAN, C. C.; BOST, K. L. Cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production in mesenteric lymph nodes and in cultured macrophages and dendritic cells after infection with Salmonella. *J Immunol*, v. 172, n. 4, p. 2469-75, Feb 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764719>>.

BROCK, T. G. et al. Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 71, n. 3-4, p. 131-45, 2003. ISSN 1098-8823 (Print) 1098-8823 (Linking).

CHEN, Q. et al. IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor. *Immunity*, v. 29, n. 6, p. 899-911, Dec 19 2008. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19062315>>.

CHIZZOLINI, C. et al. Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood*, v. 112, n. 9, p. 3696-703, Nov 1 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698005>>.

CHMIEL, J. F.; KONSTAN, M. W. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med*, v. 28, n. 2, p. 331-46, Jun 2007. ISSN 0272-5231 (Print) 0272-5231 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467552>>.

CHUNG, E. Y.; KIM, S. J.; MA, X. J. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res*, v. 16, n. 2, p. 154-61, Feb 2006. ISSN 1001-0602 (Print) 1001-0602 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474428>>.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, v. 126, n. 2, p. 177-85, Feb 2009. ISSN 1365-2567 (Electronic) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125888>>.

DEMEURE, C. E. et al. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur J Immunol*, v. 27, n. 12, p. 3526-31, Dec 1997. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464843> >.

DESCH, A. N. et al. CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J Exp Med*, v. 208, n. 9, p. 1789-97, Aug 29 2011. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859845> >.

DUFFY, M. M. et al. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol*, v. 41, n. 10, p. 2840-51, Oct 2011. ISSN 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710489> >.

EJIMA, K. et al. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J*, v. 17, n. 10, p. 1325-7, Jul 2003. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738799> >.

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. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 396, n. 1, p. 7-10, May 21 2010. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494102> >.

FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, v. 101, n. 4, p. 890-8, Feb 15 1998. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466984> >.

FERRETTI, S. et al. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol*, v. 170, n. 4, p. 2106-12, Feb 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574382> >.

FOSSIEZ, F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, v. 183, n. 6, p. 2593-603, Jun 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676080> >.

HALL, M. O. et al. Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, v. 81, n. 5, p. 581-91, Nov 2005. ISSN 0014-4835 (Print) 0014-4835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949798> >.

HAPPEL, K. I. et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol*, v. 170, n. 9, p. 4432-6, May 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707317> >.

HASLETT, C. et al. Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. *Chest*, v. 99, n. 3 Suppl, p. 6S, Mar 1991. ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1997278> >.

HE, Z. H. et al. Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema. *Tob Induc Dis*, v. 13, n. 1, p. 6, 2015. ISSN 2070-7266 (Print) 1617-9625 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25814921> >.

HIRAIWA, K.; VAN EEDEN, S. F. Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 619523, 2013. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24058272>>.

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>>.

HIROTA, K. et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*, v. 204, n. 12, p. 2803-12, Nov 26 2007. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025126>>.

HU, W.; PASARE, C. Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. *J Leukoc Biol*, v. 94, n. 3, p. 409-21, Sep 2013. ISSN 1938-3673 (Electronic) 0741-5400 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825388>>.

JEANNIN, P.; JAILLON, S.; DELNESTE, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol*, v. 20, n. 5, p. 530-7, Oct 2008. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555676> >.

KIM, S.; CHUNG, E. Y.; MA, X. Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells. *Cell Cycle*, v. 4, n. 2, p. 231-4, Feb 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15655362>.

KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, v. 448, n. 7152, p. 484-7, Jul 26 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581588>>.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan 2009. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846107>>.

LI, H.; SHI, B. Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell Mol Immunol*, v. 12, n. 1, p. 24-30, Jan 2015. ISSN 2042-0226 (Electronic) 1672-7681 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109681>>.

LIANG, S. C. et al. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol*, v. 179, n. 11, p. 7791-9, Dec 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025225>>.

LIANG, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*, v. 203, n. 10, p. 2271-9, Oct 2 2006. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982811>>.

LITVACK, M. L.; PALANIYAR, N. Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun*, v. 16, n. 3, p. 191-200, Jun 2010. ISSN 1753-4267 (Electronic) 1753-4259 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529971>>.

LOCKHART, E.; GREEN, A. M.; FLYNN, J. L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*, v. 177, n. 7, p. 4662-9, Oct 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982905>>.

LU, Y. J. et al. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog*, v. 4, n. 9, p. e1000159, 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802458>>.

LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, v. 23, n. 9, p. 445-9, Sep 2002. ISSN 1471-4906 (Print) 1471-4906 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200066>>.

MCALLISTER, F. et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol*, v. 175, n. 1, p. 404-12, Jul 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972674>>.

MCCUBBREY, A. L.; CURTIS, J. L. Efferocytosis and lung disease. *Chest*, v. 143, n. 6, p. 1750-7, Jun 2013. ISSN 1931-3543 (Electronic) 0012-3692 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732585>>.

MCWILLIAM, A. S. et al. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med*, v. 179, n. 4, p. 1331-6, Apr 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145044>>.

MEDEIROS, A. I. et al. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. *J Exp Med*, v. 206, n. 1, p. 61-8, Jan 16 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124657>>.

MOFFITT, K. L. et al. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe*, v. 9, n. 2, p. 158-65, Feb 17 2011. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320698>>.

MOLET, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, v. 108, n. 3, p. 430-8, Sep 2001. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544464>>.

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

NAGAMACHI, M. et al. Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J Exp Med*, v. 204, n. 12, p. 2865-74, Nov 26 2007. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967902> >.

QU, X. et al. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol*, v. 40, n. 9, p. 761-70, Sep 2012. ISSN 1873-2399 (Electronic) 0301-472X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634392> >.

ROOS, A. et al. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *European Journal of Immunology*, v. 34, n. 4, p. 921-929, 2004. ISSN 1521-4141. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/eji.200424904> >.

SABAT, R.; OUYANG, W.; WOLK, K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*, v. 13, n. 1, p. 21-38, Jan 2014. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378801> >.

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. 1715-1725, September 9, 2010. Disponível em: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/116/10/1715.abstract> >.

SETHI, S.; MURPHY, T. F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, v. 359, n. 22, p. 2355-65, Nov 27 2008. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038881> >.

SHIBATA, K. et al. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol*, v. 178, n. 7, p. 4466-72, Apr 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372004> >.

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> >.

SNIJDEWINT, F. G. et al. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol*, v. 150, n. 12, p. 5321-9, Jun 15 1993. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390534> >.

SONG, C. et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol*, v. 181, n. 9, p. 6117-24, Nov 1 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941201> >.

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> >.

STARNES, T. et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol*, v. 167, n. 8, p. 4137-40, Oct 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591732> >.

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>>.

SUN, Y. et al. Mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis display impaired function in inhibiting Th17 cells. *J Immunol Res*, v. 2015, p. 284215, 2015. ISSN 2314-7156 (Electronic) 2314-7156 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918734>>.

TAN, H. L. et al. The Th17 pathway in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 184, n. 2, p. 252-8, Jul 15 2011. ISSN 1535-4970 (Electronic) 1073-449X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474644>>.

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>>.

TORCHINSKY, M. B. et al. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*, v. 458, n. 7234, p. 78-82, Mar 5 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262671>>.

TSAI, H. C. et al. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. *Clin Dev Immunol*, v. 2013, p. 267971, 2013. ISSN 1740-2530 (Electronic) 1740-2522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956759>>.

VALDEZ, P. A. et al. Prostaglandin E2 suppresses antifungal immunity by inhibiting interferon regulatory factor 4 function and interleukin-17 expression in T cells. *Immunity*, v. 36, n. 4, p. 668-79, Apr 20 2012. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464170>>.

VAN HAMBURG, J. P. et al. IL-17/Th17 mediated synovial inflammation is IL-22 independent. *Ann Rheum Dis*, v. 72, n. 10, p. 1700-7, Oct 2013. ISSN 1468-2060 (Electronic) 0003-4967 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328939>>.

VANDIVIER, R. W.; HENSON, P. M.; DOUGLAS, I. S. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*, v. 129, n. 6, p. 1673-82, Jun 2006. ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778289>>.

VELDHOFEN, M. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, v. 24, n. 2, p. 179-89, Feb 2006. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473830>>.

VERMAELEN, K. Y. et al. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med*, v. 193, n. 1, p. 51-60, Jan 1 2001. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136820>>.

VOLL, R. E. et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, v. 390, n. 6658, p. 350-1, Nov 27 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389474>>.

WANG, C. et al. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol*, v. 2, n. 2, p. 173-83, Mar 2009. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129757>>.

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>>.

WU, C. Y. et al. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol*, v. 161, n. 6, p. 2723-30, Sep 15 1998. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743329>>.

YANG, X. O. et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*, v. 282, n. 13, p. 9358-63, Mar 30 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277312>>.

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>>.

YE, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*, v. 194, n. 4, p. 519-27, Aug 20 2001. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514607>>.

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>>.

9. RESULTADOS SUPLEMENTARES

Geração de CA a partir de linhagem de macrófagos - RAW 264.7

Inicialmente avaliamos o índice de fagocitose de *E. coli* por células RAW 264.7 (MØ) utilizando *E. coli*-GFP em proporções e tempos distintos para entendermos a cinética da infecção. Após a incubação, os MØ foram avaliados quanto a porcentagem de células infectadas, células GFP⁺.

Após a padronização do índice de infecção realizamos a padronização da indução de apoptose nas células infectadas (MØ+*Ec*). As células infectadas foram posteriormente irradiadas com diferentes proporções de luz UV e em seguida analisadas quanto a marcação da fosfatidilserina expressa na membrana celular, pela anexina V, e Iodeto de Propídeo (PI), que determina a % de necrose celular pela marcação de componentes intracelulares expostos devido a perda da integridade da membrana. Cerca de 87% dos MØ apresentaram positividade para *E.coli*, a porcentagem de fagocitose das bactérias pelos MØ é expressa pela emissão de fluorescência GFP (Figura 1A). A porcentagem de apoptose dos MØ+*E. coli* observada foi de aproximadamente 70% (Figura 1B), apresentando apenas uma pequena porcentagem de células necróticas (Anexina⁺/PI⁺). Para posteriores ensaios experimentais escolhemos como fonte de células apoptóticas infectadas MØ infectados com *E. coli* na proporção 1:10 e irradiados com 350mJ de luz UV (CA+*Ec*).

Células Apoptóticas Infectadas

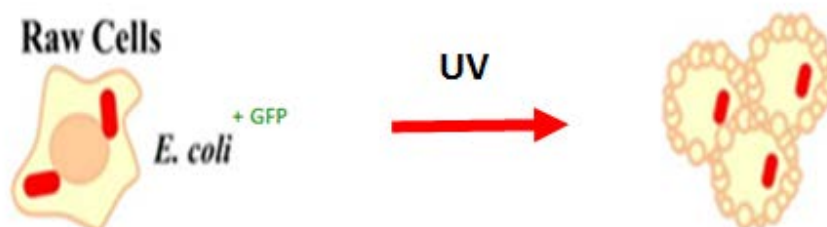
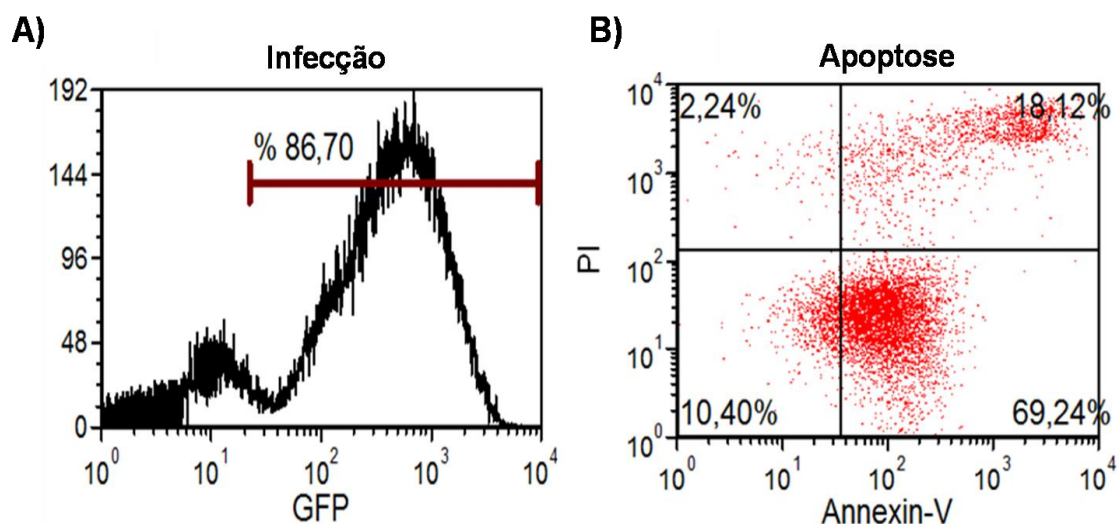


Figura 1: Taxa de infecção de células RAW 264.7 (MØ) por *E.coli*-GFP



MØ foram incubados overnight, em estufa 5% CO₂ a 37°C para aderência celular. Em seguida os MØ foram infectados com *E.coli*-GFP na proporção 1:10 e as células foram incubadas por 2 h. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias não fagocitadas e avaliadas quanto a expressão de GFP por citometria de fluxo. Os MØ foram também marcados com PI (marcador nuclear - necrose celular) e Anexina-V (marcador de fosfatidilserina de membrana - apoptose celular) e o estado de morte celular foi avaliado por citometria de fluxo. A) Porcentagem de fagocitose das bactérias pelos MØ, expresso pela emissão de fluorescência GFP. B) *Dotplot* da porcentagem de células apoptóticas (AnexinaV⁺) e células em apoptose tardia, duplo positivas (PI⁺/Anexina V⁺).

Fagocitose de células apoptóticas por células dendríticas

O último passo da padronização de MØ como fonte de células apoptóticas infectadas foi avaliar a capacidade de CD fagocitarem MØ apoptóticos. Desse modo, CD foram colocadas em cultura com MØ apoptóticos infectados marcados com CFSE e incubadas por 4 h, em seguida as CD foram marcadas com anti-CD11c e a eferocitose foi analisada por citometria de fluxo. As células dendríticas foram capazes de fagocitar os MØ apoptóticos infectados (CA+Ec), com taxa de fagocitose próxima aos 50%, conforme demonstrado no *dotplot* na população duplo positiva CD11c⁺CFSE⁺ (Figura 2). Os resultados obtidos com MØ apoptóticos infectados foram muito semelhantes aos obtidos com neutrófilos apoptóticos infectados, anteriormente utilizados (Dados não mostrados). Ou seja, os macrófagos apoptóticos infectados foram tão eficientes quanto neutrófilos apoptóticos em termos de capacidade fagocítica por CD. Deste modo, conseguimos padronizar uma nova fonte de células apoptóticas infectadas, minimizando drasticamente o uso de animais durante o desenvolvimento deste projeto.

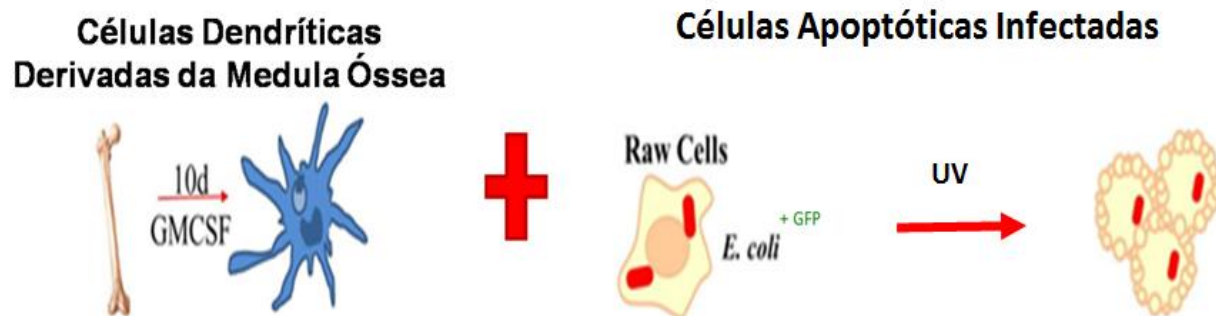
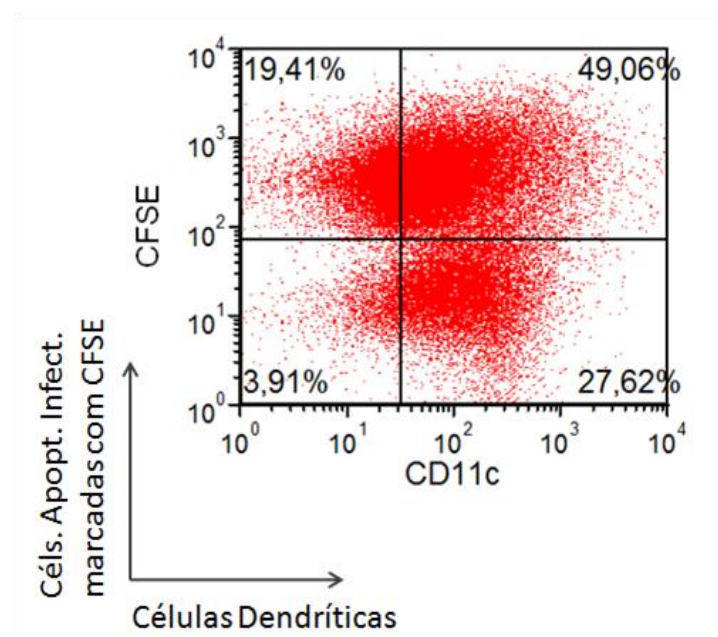


Figura 2: Células dendríticas são capazes de fagocitar MØ apoptóticos infectados

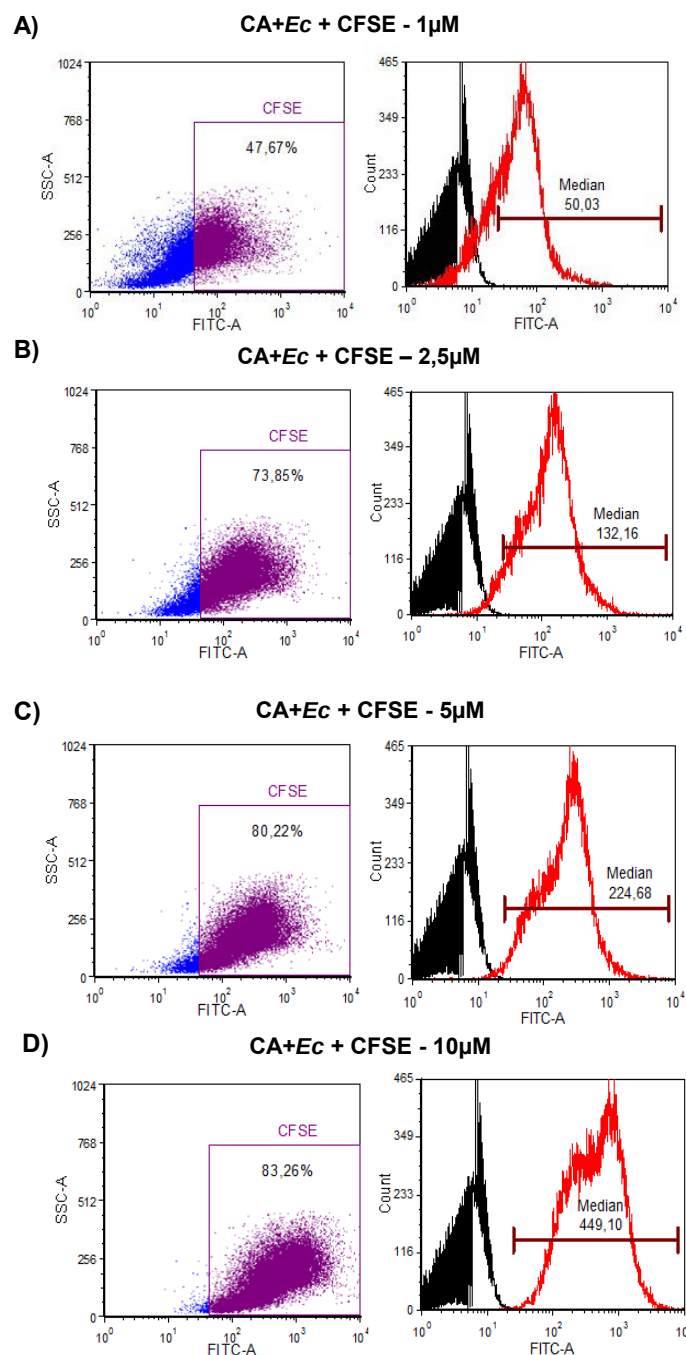


CD foram incubadas com CA+*Ec*, irradiadas com 350mJ de luz UV e marcadas com CFSE, e a co-cultura foi incubada por 4 h em estufa 5% CO₂ a 37°C. Após a incubação as células foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de moléculas de superfície celular CD11c. Dotplot representativo da população de CD que fagocitaram CA+*Ec* - CD11c⁺CFSE⁺.

Incorporação de CFSE em células apoptóticas infectadas

Para a padronização da concentração ótima de incorporação de CFSE (FITC) por CA, células RAW 264.7 foram infectadas com *E. coli* e a apoptose celular foi induzida por UV, conforme descrito previamente em materiais e métodos. As células foram marcadas com diferentes concentrações de CFSE: 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M para determinar a concentração não tóxica e com alta intensidade de fluorescência. Na menor concentração de CFSE (1 μ M) apenas 48% das células foram capazes de incorporar o CFSE. No entanto, nas concentrações subsequentes houve um aumento concentração dependente tanto quanto a porcentagem de células positivas quanto de MIF (Figura 3A e B). Como não houve diferenças quantitativas em termos de porcentagem e MIF entre as concentrações de 5 μ M e 10 μ M (Figura 3C e D), optamos pela concentração de 5 μ M nos experimentos subsequentes.

Figura 3: Determinação da incorporação de CFSE em CA infectadas

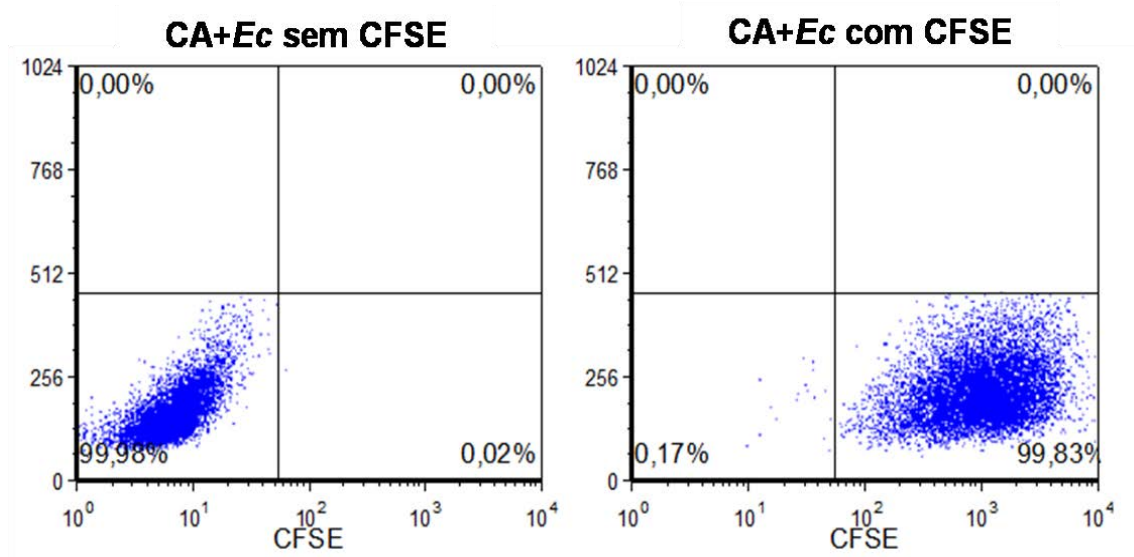


CA+Ec foram incubadas com diferentes concentrações de CFSE e analisadas quanto a porcentagem de células positivas e a mediana da intensidade de fluorescência (MIF). A) *Dotplot* da porcentagem de células CFSE⁺ e análise comparativa da expressão de CFSE pela sobreposição de histogramas da condição concentração 1μM sobre o histograma do controle; B) *Dotplot* da porcentagem de células CFSE⁺ e análise comparativa da expressão de CFSE pela sobreposição de histogramas da condição concentração 2,5μM sobre o histograma do controle; C) *Dotplot* da porcentagem de células CFSE⁺ e análise comparativa da expressão de CFSE pela sobreposição de histogramas da condição concentração 5μM sobre o histograma do controle; D) *Dotplot* da porcentagem de células CFSE⁺ e análise comparativa da expressão de CFSE pela sobreposição de histogramas da condição concentração 10μM sobre o histograma do controle.

Confirmação da incorporação de CFSE por CA+Ec

Antes da instilação de CA infectadas nos animais, a marcação com CFSE das diferentes condições foram confirmadas por citometria de fluxo. Aproximadamente 100% das células foram positivas para CFSE (5 μ M) antes da instilação nos animais (Figura 4). Confirmada a eficiência da marcação das CA+Ec as mesmas foram utilizadas nos experimentos *in vivo*.

Figura 4: Comprovação da marcação com CFSE

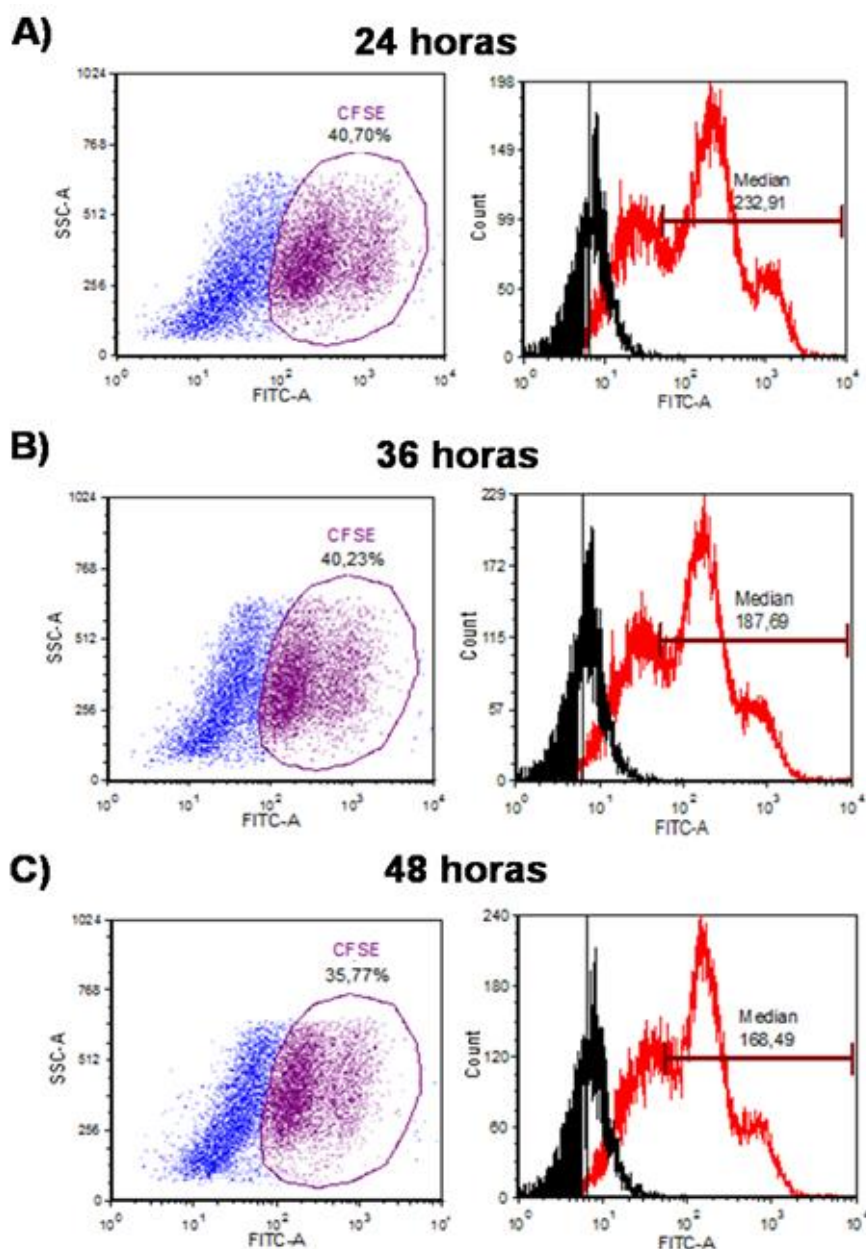


Dotplot representativo da porcentagem de células apoptóticas infectadas marcadas com CFSE em comparação com as células não marcadas.

Cinética da degradação de CA+Ec + CFSE por células dendríticas *in vitro*

A fim de tentar elucidar a inexistência de marcação de CFSE em CD, foi realizada uma cinética de degradação da marcação do CFSE em células apoptóticas infectadas, para tentarmos extrapolar os períodos a serem avaliados nos experimentos *in vivo*. As CA infectadas foram incubadas com 5 μ M de CFSE, em estufa 5% de CO₂ a 37°C, conforme descrito detalhadamente em materiais e métodos e, após 24, 36 e 48 h estas células foram avaliadas quanto a expressão de CFSE, por citometria de fluxo. Após 24 h de marcação com CFSE, ~ 40% de CA+Ec apresentaram-se positivas para CFSE, comparado a praticamente 100% de marcação de CA+Ec logo após a incubação com CFSE. A partir de 36 h a porcentagem de células CFSE⁺ manteve-se, no entanto, houve uma diminuição na MIF em ~ 50% em células CFSE⁺ quando comparado com a condição após 24 h de marcação (Figuras 5A e B). Após 48 h observou-se uma modesta redução tanto na porcentagem, como na MIF de células CFSE⁺, quando comparado com células após 24 h de marcação (Figuras 5A e C).

Figura 5: Cinética da degradação de CFSE *in vitro*



CA+Ec foram marcadas com 5 μ M de CFSE e incubadas em estufa 5% de CO₂ a 37°C. Nos tempos 24, 36 e 48 h as células foram recuperadas e foi feita análise da expressão de CFSE (FITC) por citometria de fluxo. A) *Dotplot* da porcentagem de células marcadas e expressão da mediana de fluorescência de CFSE (MIF) na condição após 24 h de marcação; B) *Dotplot* da porcentagem de células marcadas e expressão da mediana de fluorescência de CFSE (MIF) na condição após 36 h de marcação; C) *Dotplot* da porcentagem de células marcadas e expressão da mediana de fluorescência de CFSE (MIF) na condição após 48 h de marcação.