Ricardo Weinlich

REGULAÇÃO DO CD95L POR PGE_2 E SEU IMPACTO NA MORTE DE LINFÓCITOS T

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Imunologia.

São Paulo

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Weinlich

REGULAÇÃO DO CD95L POR PGE_2 E SEU IMPACTO NA MORTE DE LINFÓCITOS T

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Imunologia.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

São Paulo

2008

À Renata, Maria Lucia,
Maximiliano e Cecília,
meus grandes amores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a você, que por uma falha imperdoável minha, não está vendo seu nome aqui. Não fique chateado(a) comigo, pois saiba que, apesar de não ter colocado no papel seu nome, carrego-o em meu coração.

Agradeço também ao povo do Estado, que através da FAPESP e do CNPq, financiou as pesquisas e pagou meu salário. Nunca perdi isto de perspectiva e espero que meu trabalho esteja à altura do investimento.

Agradeço à Universidade de São Paulo, especialmente ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, por ter fornecido a estrutura e as condições para a realização do meu doutorado.

Muito obrigado a todos os funcionários envolvidos com o Departamento de Imunologia, que transformam diariamente nosso local de trabalho em um ambiente muito agradável de conviver. Obrigado pessoal da portaria: Milton, Otacílio, Roberto, Nelson, Aírton! Valeu, pessoal do audiovisual: Andres, Moisés e Márcio! Obrigado pessoal do Biotério! Obrigado pessoal da Faísca (em especial, a Rosangela)! Quero agradecer a Áurea, que nos ajudou muito no laboratório e também à Sônia Baueb que, com sua presença amável e carinhosa, marcou todos nós.

Aos secretários do Departamento, Valéria, Jotelma, Amarildo, Amanda e Eni, um agradecimento especial, pois foram vocês que me guiaram pelos caminhos tão tortuosos da burocracia da Universidade.

Aos meus colegas de Departamento, principalmente àqueles que se envolvem, vestem a camisa, levam a sério, trabalham com afinco, se dedicam, deixo meu sincero agradecimento e minha esperança de tê-los, em breve, como colegas de profissão.

Aos professores do Departamento, obrigado por todos os momentos, sejam eles nas aulas, nas conversas de corredor, ou nas reuniões do Departamento, que me fizeram entender o que é fazer ciência de qualidade.

Meu muito obrigado aos grupos de pesquisa com os quais colaborei. Dra. Karina Bortoluci e Prof. Dr. Momtchilo Russo (Departamento de Imunologia – ICB/USP); Dra. Alziana Pedrosa e Profa. Dra. Ana Campa (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP), Dra. Isabelle Tanjoni e Profa. Dra. Ana Moura (Instituto Butantan), Dra. Janaína Fernandes e Profa Dra. Cerli Rocha Gattas (Departamento de Biofísica - UFRJ), Dr. Helotônio Carvalho e Prof. Dr.

Carlos Menck (Departamento de Microbiologia – ICB/USP). Muito trabalho, muita hora extra, muitos risos, muitas alegrias e muitas realizações. Além de me presentearam com artigos científicos, vocês me permitiram aprender muito com vocês. E o melhor de tudo é que, durante todo esse tempo, fomos nos tornando amigos, amigos que hoje fazem parte da minha vida, muito além das paredes do laboratório.

Gostaria de agradecer a todas as sugestões, críticas e elogios feitos pela minha banca de qualificação de Doutorado, composta pelos professores Nancy Starobinas, Niels Câmara e João Viola. Obrigado pela análise criteriosa do trabalho que apresentei aos senhores. Suas observações foram muito importantes para fazer da tese o que ela é agora.

Meu muito obrigado à Profa. Ises Abrahamsohn. De forma discreta, mas muito eficiente, sempre me incentivou cientificamente e me estimulou culturalmente. Tenho um profundo respeito à senhora e a admiro muito. Guardo com muita honra, e emoldurado na parede, um pequeno bilhete que a senhora um dia me deu após uma sessão de premiação de trabalhos do Departamento.

Ao Prof. Luiz Vicente Rizzo, quero agradecer pelas inúmeras conversas e bate-papos nas horas do almoço, do cafezinho e pelos corredores do Departamento. Quanto eu pude aprender sobre a vida acadêmica e sobre a vida! Um dia você me disse que, esporadicamente, encontramos pessoas que fazem a diferença. Saiba que, pra mim, você é uma delas.

Aos alunos do laboratório do Prof. Rizzo, obrigado por todos estes anos de convivência tão boa. Dividimos o mesmo laboratório que, na verdade, nunca foi dividido. Valeu, Lú, Alessandra, Julie, Lília, Adriana, Natalia, Tatiana, Gisele, Chris, Thais, Ivo, Jean, Kadu, Ulisses, Paolo e Luis. Obrigado pelo carinho e pela ajuda!

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório, muitíssimo obrigado. Ana, Clau, Daniel, Fabíola, Jackie, Júlia, Luciana, Moki, Maíra, Maria Emília e Welbert. Além de todos que já fizeram parte deste grupo: Jan, Bruna, Márcia, Crau, Axel, Gabi(s), Cris, Carla. Mesmo nos momentos mais duros, sempre me senti apoiado por vocês. Sei o quanto vocês torcem por mim e espero que saibam o quanto eu torço por cada um de vocês. Cada crítica, cada bronca, cada elogio, cada sugestão, cada palavra de carinho, foi essencial para minha formação científica e pessoal. Tenho muito orgulho de fazer parte deste grupo. Vai ser difícil encontrar tantas pessoas especiais em um espaço tão pequeno. Muito, muito, obrigado!

Ao meu orientador e amigo Prof. Gustavo Amarante-Mendes, meus mais sinceros agradecimentos. Desde o momento que te perguntei com seis meses de antecedência se me

aceitaria no seu laboratório, percebi que tinha escolhido certo. Difícil escolher entre tantas passagens em que sua orientação e estímulo foram essenciais, mas um deles me marcou muito. Quando já haviam se passado três meses do prazo da resposta do artigo científico e faltando poucas semanas pra vencer o prazo, já tinha praticamente jogado a toalha. Foi o seu incentivo e a sua fé implacáveis que não me deixaram desistir. Tenho como objetivo de vida me tornar líder de grupo de pesquisa. E, tenho certeza, que muito do que aprendi contigo vai ser extremamente útil tanto pra alcançar esse objetivo como pra poder lidar com esta responsabilidade. Valeu, chefe!

Várias pessoas não tiveram participação direta no meu dia-a-dia no laboratório, mas foram extremamente importantes como apoio emocional, psicológico e afetivo. E, talvez, meu débito com estas pessoas seja ainda maior, já que em diversos momentos tive que me ausentar e não pude dar a atenção merecida.

Aos meus amigos de tantos quilômetros Ane, Carol, Denise, Lívia, Mari, Caê, Chicão e Marquinhos;

Aos meus afilhados e amigos Rute e Flávio;

Aos meus grandes amigos de além-mar, Lú, Ivo e Kadu;

À Janine e Paty, amigas queridas, de café e forró; e

Aos meus irmãos, Gabi, Maurício, Carol, Alim, Hérika, Léo, Paty, Vini, Lírian, Fábio, Raquel, Gui, Vivian, Fer, Fafá, Lidi e Dú;

Muito obrigado!

E, por fim, minha família. Minha base, minha raiz, meu grande amor.

À Mamate, Beatriz, Íris e José Luiz, o ramo mineiro da família, obrigado pelo apoio, pela torcida e pela compreensão pelos momentos de ausência.

À minha irmã Renata, meu maior exemplo de superação e ao meu mais novo irmão Rodrigo, que forma com ela o casal mais lindo e apaixonado que conheço, obrigado.

À minha mãe Maria Lúcia e a meu pai Max. Se eu for para os meus filhos metade dos pais que vocês foram pra mim, minha maior meta na vida estará cumprida. Como posso agradecer duas pessoas que dedicaram suas vidas à minha irmã e a mim?

Ao meu grande amor, Cecília, que caminha comigo lado a lado, que muitas vezes me leva pela mão, que me dá a enorme alegria de poder desfrutar de sua companhia diária, muito, muito obrigado.

“Faço parte do mundo e, no entanto, ele deixa-me perplexo.”

Charles Chaplin

“sussurro sem som
onde a gente se lembra
do que nunca soube”

Guimarães Rosa

RESUMO

Weinlich R. Regulação do CD95L por PGE_2 e seu impacto na morte de linfócitos T [Tese de Doutorado - Imunologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Células apresentadoras de antígeno (APCs) controlam as respostas de linfócitos T por múltiplos mecanismos, que incluem a expressão de moléculas co-estimuladoras, a produção de citocinas e outros mediadores. Estes mecanismos exercem influência não só na proliferação, diferenciação e polarização dos linfócitos T, mas também interferem na sobrevivência destas células. No presente trabalho, foi demonstrado que fator(es) solúvel(eis) produzido(s) por APCs ativadas via receptores do tipo *Toll* (TLRs) suprimem a morte induzida por ativação (AICD) de linfócitos T. Este efeito foi observado em APCs não estimuladas, porém foi significativamente maior após estimulação das APCs com lipopolissacarídeo (LPS). Através do uso de diferentes camundongos nocautes, foi mostrado que a produção do fator protetor induzida por LPS é dependente da via de TLR4/MyD88 e independente de TLR2 e CD14. Este fator foi identificado como prostaglandina E_2 (PGE_2) e foi demonstrado que os sobrenadantes derivados de APC e a PGE_2 sintética bloqueiam a expressão de CD95L em linfócitos T estimulados via TCR/CD3. A inibição da expressão de CD95L reduz tanto a AICD como a morte de macrófagos, alvos do ataque citotóxico dos linfócitos T ativados. Foi demonstrado também que, ao invés de bloquear a via do CD95, a PGE_2 potencializa a morte induzida por anticorpos anti-CD95 agonistas. Os receptores de PGE_2, EP2 e EP4, parecem ser os responsáveis por mediar os efeitos supressores da PGE_2 na AICD, já que a estimulação farmacológica destes receptores mimetiza o efeito protetor da PGE_2 e seus respectivos antagonistas interferem com a proteção conferida pelos sobrenadantes de APCs e pela PGE_2 sintética. A ativação do EP2 e do EP4 age sinergicamente na ativação das vias dependentes da PKA e de EPAC, que contribuem para a inibição da AICD. Por fim, a ativação dos principais fatores de transcrição envolvidos com a expressão de CD95L (NFAT, AP-1 e NF-κB) não é bloqueada por PGE_2. Por outro lado, PGE_2 induziu a expressão de ICER, um repressor transcripcional, através da ativação de CREB. Em conjunto, estes resultados indicam que as APCs podem modular os níveis de expressão de CD95L através da secreção de PGE_2 em resposta ao LPS, através de uma via dependente de TLR4 e MyD88, com conseqüências tanto para a morte de linfócitos T quanto para a sua própria sobrevivência.

Palavras-Chave: Linfócito T; Apoptose; FasL/CD95L; Receptor de Morte; LPS - Lipopolissacarídeo; Receptor do Tipo Toll.

ABSTRACT

Weinlich R. CD95L downregulation by PGE_2 and its impact on T lymphocyte death [PhD Thesis - Immunology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Antigen-presenting cells (APCs) control T-cell responses by multiple mechanisms, including the expression of co-stimulatory molecules and the production of cytokines and other mediators that control T-cell proliferation, survival and differentiation. In this present work, it was demonstrated that soluble factor(s) produced by Toll-like receptor (TLR)-activated APCs suppress activation-induced cell death (AICD). This effect was observed in non-stimulated APCs, but it was significantly increased after lipopolysaccharide (LPS) treatment. Using different KO mice, it was found that the LPS-induced protective factor is dependent on TLR4/MyD88 and independent of TLR2 and CD14. The protective factor was identified as prostaglandin E_2 (PGE_2) and it was shown that both APC-derived supernatants and PGE_2 prevented CD95L upregulation in T cells in response to TCR/CD3 stimulation, thereby avoiding both AICD and activated T cell killing of target macrophages. It was also demonstrated that instead of blocking CD95 pathway, PGE_2 enhanced T cell death induced by agonistic anti-CD95 antibodies. The PGE_2 receptors, EP2 and EP4, appear to be involved in AICD suppression since pharmacological stimulation of these receptors mimics the protective effect on T cells and their respective antagonists interfere with the protection induced by either APCs derived or synthetic PGE_2. The engagement of EP2 and EP4 synergistically activates protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by cAMP pathways to prevent AICD. Finally, the activation of the main transcription factors involved in CD95L expression (NFAT, AP-1 and NF-κB) is not avoided by PGE_2. On the other hand, PGE_2 induces the expression of ICER, a transcriptional repressor of CD95L, through CREB activation. Taken together, these results indicate that APCs can regulate T-cell levels of CD95L by releasing PGE_2 in response to LPS through a TLR4/MyD88-dependent pathway, with consequences for both T cell and their own survival.

Keywords: T Lymphocyte; Apoptosis; FasL/CD95L; Death Receptor; LPS; Toll-like Receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por Fas-Fc* **45**

Figura 02. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de J774* **46**

Figura 03. *Cinética de produção do fator de proteção contra AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10 por cultura de células J774* **47**

Figura 04. *LPS não influencia diretamente a AICD* de *hibridomas de linfócitos T DO11.10* **48**

Figura 5. *Sobrenadantes de células J774, mas não de hibridomas de linfócitos T DO11.10, protegem DO11.10 da AICD* **49**

Figura 06. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PEC ou células dendríticas* **50**

Figura 7. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de células dendríticas* **51**

Figura 08. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PECs de camundongos C3H.Pas e C3H.HeJ* **53**

Figura 9. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PECs de camundongos C57Bl/6 WT, TLR2 KO e CD14 KO* **54**

Figura 10. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PECs extraídos de camundongos C57Bl/6 WT e MyD88 KO* **55**

Figura 11. *Efeito da cicloheximida na sobrevida de células J774 e na inibição da AICD* **57**

Figura 12. *Indução da expressão de ciclooxigenase-2 (Cox-2) e secreção de prostaglandina E_2 (PGE_2) induzida por LPS* **58**

Figura 13. *Influência de inibidores do metabolismo de ácido aracdônico na secreção de PGE_2 em células J774 e na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10* **59**

Figura 14. *Prostaglandina E_2 (PGE_2) inibe a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10* **60**

Figura 15. *PGE_2 inibe por tempo prolongado a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10.* **61**

Figure 16. *PGE_2 não afeta a proliferação dos hibridomas de linfócitos T DO11.10.* **62**

Figura 17. *Influência dos sobrenadantes de PECs na expressão gênica de CD95L, CD95 e FLIP de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimuladas por anticorpos anti-CD3* **64**

Figura 18. *Influência dos sobrenadantes de células dendríticas na expressão gênica de CD95L, CD95 e FLIP de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimuladas por anticorpos anti-CD3* **65**

Figura 19. *PGE_2 recombinante inibe a expressão gênica de CD95L mas não de CD95 e FLIP de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimuladas por anticorpos anti-CD3* **67**

Figura 20. *Sobrenadantes de cultura de PECs e PGE_2 inibem a expressão protéica de CD95L em hibridomas de linfócitos T DO11.10* **68**

Figura 21. *Ação dos sobrenadantes de cultura de J774 e PEC na morte de hibridomas de linfócitos T DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD95 agonistas.* **70**

Figura 22. *Influência da PGE_2 exógena na morte induzida por anticorpos anti-CD95 agonistas em hibridomas de linfócitos T DO11.10* **70**

Figura 23. *Expressão protéica dos receptores de PGE_2 em hibridomas de linfócitos T DO11.10, estimulados ou não por anticorpos anti-CD3* **72**

Figura 24. *Efeito da Forskolina, um ativador da produção de AMPc pela adenilato ciclase, na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **72**

Figura 25. *Efeito dose-resposta dos agonistas de EP2 e EP4 na proteção contra a AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10* **73**

Figura 26. *Efeito sinergístico entre os agonistas de EP2 e EP4 na proteção contra a AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10* **74**

Figura 27. *Efeito dos inibidores de EP2 e EP4 na proteção induzida por agonistas de EP2 e EP4 em hibridomas de linfócitos T DO11.10* **75**

Figura 28. *Efeito dos inibidores de EP2 e EP4 na proteção induzida por PGE_2 e sobrenadantes de J774 na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **76**

Figura 29. *Efeito combinado dos inibidores de EP2 e EP4 na proteção induzida por PGE_2 ou sobrenadantes de J774 na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **77**

Figura 30. *6-BnZ-cAMP, um análogo do AMPc específico para PKA, é capaz de inibir a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10, enquanto que o 8-pCPT-cAMP, um análogo do AMPc específico para EPAC, não*..... **79**

Figura 31. *8-pCPT-cAMP é capaz de potencializar o efeito do 6-BnZ-cAMP sobre a morte induzida por anti-CD3 em hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **79**

Figura 32. *PGE_2 não inibe a via de ativação do NFAT1, que é essencial para a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **81**

Figura 33. *Efeito da PGE_2 na translocação nuclear do NFAT1 após estimulação com ionomicina*..... **83**

Figura 34. *PGE_2 não inibe a atividade do promotores repórter 3xNFAT.Luciferase, co-transfectado ou não com NFAT1* **85**

Figura 35. Estimulação por anticorpos anti-CD3 e/ou *PGE_2 não ativam NF-κB, fator de transcrição não essencial para a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **88**

Figura 36. Efeito da estimulação por anticorpos anti-CD3 e/ou *PGE_2 na expressão de ICER e ativação de CREB em hibridomas de linfócitos T DO11.10*..... **89**

Figura 37. *PGE_2 inibe a expressão de CD95L induzida por anticorpos anti-CD3 em linfócitos T $CD4^+$ primários*... **91**

Figura 38. *Sobrenadantes de PEC, PGE_2, Forskolina e 6-Bnz-cAMP inibem a expressão de CD95L induzido por anticorpos anti-CD3 em linfócitos T $CD4^+$ primários*..... **92**

Figura 39. *PGE_2 e forskolina inibem a expressão de CD95L e a morte induzida por anticorpos anti-CD3 em blastos de linfócitos T $CD4^+$* **94**

Figura 40. *PGE_2 inibe a morte induzida por anticorpos anti-CD3 em ambas as populações de uma co-cultura de J774 e esplenócitos não-aderentes*..... **95**

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD – *Activation-Induced Cell Death* - Morte Celular Induzida por Ativação

APC – *Antigen Presenting Cell* - Célula Apresentadora de Antígeno

PEC – *Peritoneal Exsudate Cell* - Célula do exudato peritoneal

MHC – *Major Histocompatibility Complex* - Complexo de Histocompatibilidade Principal

TCR – *T Cell Receptor* - Receptor de Linfócitos T

TLR – *Toll-Like Receptor* - Receptor do Tipo Toll

PRR – *Pattern Recognition Receptor* - Receptor de Reconhecimento de Padrões

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Pattern* - Padrão Molecular Associado a Patógenos

LPS – *Lipopolysaccharide* - Lipopolissacarídeo

PGE_2 – *Prostaglandin* E_2 - Prostaglandina E_2

PKA – *cAMP-Dependent Protein Kinase A* - Fosfoquinase dependente de AMPc

EPAC - *Exchange protein directly activated by cAMP* - Proteína Trocadora Diretamente Ativada por AMPc

NFAT – *Nuclear Factor of Activated T Cell* - Fator Nuclear de Linfócitos T Ativados

NF-κB – *Nuclear Factor kappa B* - Fator Nuclear kappa B

AP-1 – *Activator Protein 1* - Proteína Ativadora 1

ICER – *Inducible cAMP early repressor* – Repressor Precoce Induzido por AMPc

CREB – *cAMP Responsive Element Binding Factor - Fator de Ligação a Elementos Respondedores a AMPc*

Cox-2 – *Cyclooxigenase-2* - Ciclooxigenase-2

SUMÁRIO

1 Introdução 17

1.1 Considerações Gerais 17

1.2 Ativação de macrófagos e células dendríticas e a interação com linfócitos T 18

1.3 Receptores do Tipo Toll (TLRs) 20

1.4 Subpopulações de Linfócitos T $CD4^+$ 21

1.5 Morte Celular Induzida por Ativação 23

1.6 Regulação do CD95L 26

1.7 Prostaglandina E_2 28

2 Objetivos 32

3 Materiais e Métodos 33

3.1 Células 33

3.2 Camundongos 33

3.3 Reagentes 34

3.4 Cultivo de células 34

3.5 Obtenção de células do exsudato peritoneal de camundongos (PECS) 35

3.6 Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos 35

3.7 Obtenção de sobrenadantes de células J774, PECs ou células dendríticas 36

3.8 Estimulação dos hibridomas com anti-CD3 36

3.9 Indução de morte dos hibridomas por anticorpos anti-CD95 37

3.10 Extração de RNA 37

3.11 Conversão de RNA para cDNA 37

3.12 RT-PCR 38

3.13 Dosagem de PGE_2 por ELISA 39

3.14 Imunofluorescência para proteínas de superfície 39

3.15 *Western-blot* 39

3.16 Transformação de Bactérias 40

3.17 Extração de DNA Plasmidial 40

3.18 Eletroporação 41

3.19 Ensaio de Luciferase 42

3.20 Imunocitoquímica para NFAT1 42

3.21 Obtenção e ativação de linfócitos T primários 43

3.22 Geração e ativação de blastos de linfócitos T 43

3.23 Marcação com CFSE e ensaio de proliferação 44

3.24 Co-cultura de células J774 e linfócitos T primários 44

3.25 Análises estatísticas 44

4 Resultados 45

4.1 Efeito de sobrenadantes de APCs em hibridomas de linfócitos T DO11.10 45

4.2 Participação dos receptores Toll-Like na produção do fator de inibição da AICD 52

4.3 Caracterização do fator de inibição da AICD presente nos sobrenadantes 55

4.4 Efeito da PGE_2 e dos sobrenadantes na via mediada por CD95/CD95L 62

4.5 Vias de sinalização induzidas pela PGE_2 71

4.6 Efeito da PGE_2 na ativação de fatores de transcrição 80

4.7 Efeito da PGE_2 na expressão de CD95L e AICD de linfócitos T primários 90

5 Discussão 97

5.1 Considerações iniciais 97

5.2 Efeito de sobrenadantes de APCs em hibridomas de linfócitos T DO11.10 98

5.3 Participação dos TLRs na produção do fator de inibição da AICD 100

5.4 Caracterização do fator de inibição da AICD presente nos sobrenadantes 102

5.5 Efeito da PGE_2 e dos sobrenadantes na via mediada por CD95/CD95L 104

5.6 Vias de sinalização induzidas pela PGE_2 109

5.7 Efeito da PGE_2 na ativação de fatores de transcrição 112

5.8 Efeito da PGE_2 na expressão de CD95L e AICD de linfócitos T primários..... 116

5.9 Considerações finais 116

6 Conclusões 118

Referências Bibliográficas 120

1 Introdução

1.1 Considerações Gerais

A correta ativação dos linfócitos T é um evento fundamental na obtenção de uma resposta imune eficiente contra patógenos e tumores e também importante para evitar efeitos colaterais indesejados, tais como o desenvolvimento de processos auto-imunes. Este processo tão refinadamente controlado ocorre em órgãos linfóides periféricos, que fornecem um micro-ambiente especial para uma interação totalmente concertada entre diversos tipos celulares e moléculas do sistema imune (Huang *et al.*, 2004). Nestes locais, na presença de antígenos, células apresentadoras de antígeno (APCs) e seus produtos solúveis, que incluem uma grande variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, os linfócitos T são ativados através da estimulação de seus receptores de antígeno (TCR) e moléculas co-estimuladoras. Como resultado, os linfócitos T começam a proliferar, se diferenciam em células efetoras ou de memória, exercem suas funções, sendo que grande parte destas células acaba morrendo ao final deste processo (Lenardo, 1996).

A deleção de linfócitos T auto-reativos é um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção da tolerância periférica, que ajuda a impedir o aparecimento de desordens auto-imunes (Hildeman *et al.*, 2002). Da mesma forma, a eliminação de linfócitos T cronicamente estimulados que potencialmente podem ser prejudiciais para o organismo pela produção de níveis anormais de citocinas inflamatórias é outra característica de um sistema imune eficiente e bem-regulado (Van Parijs *et al.*, 1998). Finalmente, a morte dos linfócitos T efetores no final de uma resposta imune é um mecanismo homeostático muito importante para reduzir a população que foi expandida durante a resposta imune e que não é mais necessária (Lenardo, 1996). Essa população expandida, se não reduzida, poderia competir por fatores de sobrevivência e de crescimento com clones de linfócitos T recém-ativados, impedindo a correta iniciação de uma nova resposta imune. Em todos os três casos, a morte acontece através de um programa geneticamente controlado denominado apoptose (Amarante-Mendes e Green, 1999). Pelo menos nos casos da eliminação de linfócitos T auto-reativos ou cronicamente estimulados, a apoptose ocorre por interação entre o CD95 e seu ligante CD95L, em um processo denominado morte celular induzida por ativação (AICD = *activation-induced cell death*) (Van Parijs *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2002). Na redução da população linfocitária ao final da resposta imune, quando não há mais o

antígeno, a morte via CD95/CD95L também pode ocorrer. Porém a via mediada por Bim parece ser ainda mais ativa e importante (Green, 2008). De fato, mutações deletérias nos genes de CD95L ou CD95 causam uma síndrome linfoproliferativa fortemente associada a processos auto-imunes tanto em modelos animais quanto em humanos (Bidere *et al.*, 2006; Rieux-Laucat *et al.*, 2003; Rieux-Laucat *et al.*, 1995) e, se combinada com deficiência em Bim, os efeitos são muito mais severos, com graves e múltiplas doenças auto-imunes (Hutcheson *et al.*, 2008).

Macrófagos e células dendríticas (DCs) agem como uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo, dado que funcionam como sensores de produtos microbianos e sinais de perigo e também como células apresentadoras de antígeno. A estimulação de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PPRs) por seus ligantes induz a ativação de macrófagos, bem como a maturação de DCs e a migração destas células dos tecidos periféricos para os linfonodos drenantes, onde irão interagir com os linfócitos T, ativando-os e induzindo a proliferação dos clones antígeno-específicos (Iwasaki e Medzhitov, 2004). Entre os receptores PPRs, a família dos receptores do tipo Toll (TLR = *Toll-like receptors*) tem um papel fundamental na iniciação e desenvolvimento das respostas imunes, já que, aparentemente, as células dendríticas só se tornam completamente maduras e ativas com capacidade de conduzir a correta ativação e diferenciação dos linfócitos T após a estimulação através de ligantes de TLRs (Pasare e Medzhitov, 2005; Sporri e Reis e Sousa, 2005). Sendo assim, resta saber se as células apresentadoras de antígeno e seus produtos solúveis produzidos após a percepção de ligantes de TLRs possuem a capacidade de não somente mediar a correta ativação e diferenciação dos linfócitos T, mas se também são capazes de modular a sobrevida destas células durante e após uma resposta imune.

1.2 Ativação de macrófagos e células dendríticas e a interação com linfócitos T

A ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos T somente ocorrem se estas células reconhecerem antígenos através da interação do TCR com fragmentos peptídicos apresentados por moléculas chamadas MHC (*major histocompatibility complex*). Os linfócitos T $CD4^+$ reconhecem antígenos apresentados por MHC classe II, presente em células apresentadoras de antígeno, enquanto que os linfócitos T $CD8^+$ reconhecem antígenos associados a moléculas de MHC classe I, presente em praticamente todas as células

nucleadas. Porém, para que haja a completa ativação dos linfócitos T, estas células precisam de sinais co-estimuladores durante o reconhecimento de antígenos complexados ao MHC. Caso o reconhecimento do antígeno+MHC ocorra na ausência dos co-estímulos, normalmente as células adquirem um estado anérgico (irresponsível), levando-as, em alguns casos, à morte (Gimmi *et al.*, 1993; Rathmell *et al.*, 1998). Antígenos próprios, que não causam inflamação e nem a ativação das células apresentadoras de antígeno, são apresentados aos linfócitos T na ausência das moléculas co-estimuladoras, limitando sua ativação e proliferação. Por isso, este mecanismo é considerado central na manutenção da tolerância periférica ao próprio (Appleman e Boussiotis, 2003). A quebra da tolerância aos auto-antígenos não está ainda totalmente elucidada, mas normalmente esta associada a algum processo inflamatório ou infeccioso, que faz com que este antígeno seja apresentado aos linfócitos T específicos numa situação de alta co-estimulação (Mataki *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2006).

O sinal co-estimulador, ou também chamado segundo sinal, melhor descrito até hoje é a interação entre o CD28, constitutivamente expresso em linfócitos T, e o B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) em APCs. A expressão de CD80 e o CD86 responde positivamente e de forma rápida e intensa à estimulação via ligantes de TLRs ou outros sinais de perigo e depende da via mediada pelo fator de transcrição NF-κB (Ghosh *et al.*, 1998). Além da interação entre CD28 e CD80/CD86, existem diversas pares de moléculas que podem transduzir sinais co-estimuladores, tais como CD40L/CD40, CD2/LFA3 e TIM-1/TIM-4 (Armitage *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 2005; Selvaraj *et al.*, 1987). As moléculas de adesão, integrinas e selectinas também são importantes para a correta ativação dos linfócitos T porque estabilizam o contato entre as APCs e os linfócitos T, permitindo que estas células interajam melhor e por mais tempo.

A ativação das APCs não só aumenta a capacidade de apresentação de antígeno e a expressão de moléculas de co-estimulação, mas também altera significativamente o perfil de produção e secreção de moléculas solúveis. Entre estas moléculas, algumas estimulam a proliferação, diferenciação e migração de linfócitos T, como a IL-12 e algumas quimiocinas, algumas estão envolvidas na atividade pró-inflamatória, como a IL-1, o TNF-α e o PAF, e outras atuam aumentando a própria atividade microbicida destas células, como a iNOS (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

1.3 Receptores do Tipo Toll (TLRs)

A ativação das APCs pela presença de patógenos ocorre por diversos mecanismos, com a participação de diferentes receptores denominados PRRs (*pattern-recognition receptors*). Dentre eles, destaca-se um conjunto de receptores denominados de receptores do tipo Toll (TLR = *Toll-Like Receptors*), que possuem a capacidade de se ligar a padrões moleculares freqüentemente associados a patógenos (PAMPs), tais como vírus, bactérias e fungos (Akira *et al.*, 2006). Os TLRs são proteínas transmembrânicas compostas de um domínio extracelular N-terminal rico em repetições de leucina, responsável pela interação com os ligantes, um domínio transmembrânico de passagem única e uma região intra-citoplasmática que contém um domínio TIR (Toll/IL-1 receptor), que é necessário a sinalização intracelular (Akira *et al.*, 2006; Bowie e O'Neill, 2000).

Foram descritos, até o momento, treze diferentes receptores desta família em camundongos e dez em humanos, sendo que cada um deles reconhece padrões moleculares distintos (Kawai e Akira, 2007). Por exemplo, TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (Hoshino *et al.*, 1999). TLR2, em heterodímeros formados ou com TLR1 ou TLR6 reconhecem diferentes componentes de bactérias, incluindo peptideoglicanos e lipoproteínas, além de zimosan derivado de fungos (Sato *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2000). Diacilglicerol e triacilglicerol podem ser reconhecidos por TLR2/TLR6 e TLR2/TLR1, respectivamente (Takeuchi *et al.*, 2001). TLR3 se liga a RNA viral dupla-fita enquanto que TLR7 reconhece RNA de simples-fita (Alexopoulou *et al.*, 2001; Diebold *et al.*, 2004). TLR5 se liga a flagelina e TLR9 reconhece DNA rico em seqüências CPG (Hayashi *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2000). Recentemente, componentes não associados a patógenos, inclusive moléculas endógenas estão sendo descritos como ligantes de TLR (Smiley *et al.*, 2001; Vabulas *et al.*, 2002). Porém, a relevância fisiológica deste reconhecimento ainda não foi muito esclarecida. Interessantemente, os receptores associados a reconhecimento viral, TLR3, TLR7 e TLR9 estão expressos em endossomos enquanto que os outros estão localizados na superfície celular (Akira *et al.*, 2006).

Após a interação com seu ligante, os TLRs se dimerizam e sofrem mudanças conformacionais que permitem o recrutamento das moléculas adaptadoras para o domínio intracelular TIR. Existem quatro diferentes moléculas adaptadoras, sendo elas MyD88, Mal/TIRAP-1, TRIF/Ticam-1 e TRAM (Oshiumi *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). As diferenças nas respostas encontradas pela ativação de TLRs distintos podem

ser explicadas, em parte, pelo uso seletivo destas moléculas adaptadoras. MyD88 e TRIF são, por exemplo, responsáveis pela indução de duas vias distintas, sendo que a via do MyD88 ativa preferencialmente NF-κB, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e no aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e a via do TRIF ativa principalmente a expressão de interferons do tipo I (Kawai e Akira, 2007; Yamamoto *et al.*, 2002).

A via dependente de MyD88 é central para a sinalização de todos os TLRs, com exceção do TLR3. Com a ativação do TLR, ocorre o recrutamento de MyD88 para o receptor via domínio TIR (Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998), permitindo o recrutamento da proteína IRAK4, que se ativa e fosforila IRAK1 (Wesche *et al.*, 1997). Após dissociação do receptor, a IRAK1 é capaz de ativar TRAF6 (Cao *et al.*, 1996) que, com o auxílio de NEMO e TAK-1, ativa a IKKβ e também as quinases p38 e JNK (Takeuchi *et al.*, 2000). O aumento da atividade da IKKβ ativa a degradação da molécula inibitória IκB, ativando o fator de transcrição NF-κB, responsável pela expressão de diversos genes pró-inflamatórios (Deng *et al.*, 2000). No caso de TLR2 e TLR4, a MyD88 necessita da molécula adaptadora TIRAP-1 para interagir com o domínio TIR destes receptores (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002). Dentre os genes regulados pela via dependente de MyD88, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias IL-12, a IL-1, o TNF-α, a IL-6, as enzimas das vias da metabolização de ácido aracdônico, tais como a Cox-2 e a PGES-1 e as moléculas envolvidas na apresentação de antígenos e co-estimulação, como o MHC classe II, CD80, CD86, além de enzimas envolvidas na via microbicida, tais como a iNOS (Kawai *et al.*, 1999).

Apesar da via do MyD88 ser a principal via de sinalização dos TLRs, existe uma via independente desta molécula adaptadora que é iniciada por TRIF (em TLR4 é necessária também a molécula adaptadora TRAM) (Yamamoto *et al.*, 2003), que ativa os fatores de transcrição IRF3 e/ou IRF7 (Kawai *et al.*, 2001), culminando na expressão de genes da família do IFN do tipo I, como IFN-β e quimiocinas (Yamamoto *et al.*, 2002).

1.4 Subpopulações de Linfócitos T CD4$^+$

Uma resposta imune eficiente depende da ativação de compartimentos específicos de seu sistema de acordo com a natureza do patógeno presente. A orquestração desta diferenciação de resposta é mediada principalmente pelos linfócitos T CD4$^+$, que durante a

iniciação de uma resposta imune, se diferenciam em Th1 e Th2 dependendo, sobretudo, das citocinas presentes no microambiente. E são principalmente as células apresentadoras de antígeno que modificam o microambiente, produzindo perfis de citocinas distintos de acordo com o patógeno percebido (Iwamoto *et al.*, 2007; Kadowaki *et al.*, 2001; Moser e Murphy, 2000). A polarização para um perfil Th1 ocorre principalmente em altas concentrações de IL-12 e/ou IFN-γ e baixas concentrações de IL-4 e a polarização para Th2 acontece na condição oposta, ou seja, altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN-γ/IL-12 (Seder e Paul, 1994). Além dessas duas subpopulações celulares, recentemente foi descrita uma terceira população de T $CD4^+$ efetoras, denominada Th17, por ter como principal característica a secreção de IL-17. Sua diferenciação em camundongos ocorre na presença de IL-6 e TGF-β ou IL-6, IL-1 e IL-23 em humanos (Steinman, 2007). A polarização entre estas três subpopulações parece ocorrer de forma mutuamente excludente, já que as citocinas essenciais para determinada população inibe a diferenciação das outras como, por exemplo, o IFN-γ, que inibe tanto o aparecimento de Th2 como de Th17 e a IL-17/IL-23, que inibe Th1 (Harrington *et al.*, 2005) .

As células Th1 estão envolvidas na ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos, produção de anticorpos da classe IgG e, portanto, essenciais ao combate a infecções por patógenos intracelulares. A exacerbação destas respostas mediadas por Th1 estão relacionadas às principais doenças auto-imunes, tais como lúpus e diabetes tipo I e hipersensibilidades do tipo tardia. Os linfócitos Th2, por sua vez, estão associados a respostas contra helmintos e organismos extracelulares, principalmente por sua capacidade de promover a produção de IgE. São responsáveis também pelo desenvolvimento de quadros atópicos. Já as Th17 são importantes personagens na resposta a determinados tipos de fungos e também na ativação e recrutamento de neutrófilos, amplificando a inflamação tecidual. Estão fortemente associadas a diversas síndromes autoimunes, que anteriormente eram descritas como conseqüência da desregulação de linfócitos Th1, tais como a artrite reumatóide, doença de Alzheimer e colite (Cooke, 2006).

Além dos mecanismos que regem a diferenciação e polarização dos linfócitos T $CD4^+$, a manutenção e a retração destas diferentes subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ efetores tem um grande impacto no estabelecimento de uma resposta imune focada e eficiente na eliminação dos patógenos e também para a manutenção desta resposta dentro de níveis não deletérios para o organismo. Um dos mecanismos responsáveis pela retração populacional dos linfócitos previamente ativados e expandidos durante uma resposta imune

é denominada AICD. Originalmente descrita em hibridomas de linfócitos T (Brunner *et al.*, 1995), esta via de apoptose logo foi encontrada tanto em Th1 como em Th2 (Ramsdell *et al.*, 1994) e mais recentemente também em Th17 (Zhang *et al.*, 2008).

1.5 Morte Celular Induzida por Ativação

Morte celular induzida por ativação (AICD = a*ctivation-induced cell death*) foi o nome dado para o processo de apoptose de linfócitos T desencadeado pela re-estimulação via TCR/CD3, sendo inicialmente descrito em hibridomas de linfócitos T (Brunner *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1989). Posteriormente, o mesmo mecanismo foi encontrado em linfócitos T maduros pré-ativados e em todas as sub-populações de linfócitos T $CD4^+$ (Ashwell *et al.*, 1987; Russell *et al.*, 1991). A principal via de AICD é dependente de um aumento dos níveis de CD95L e da interação desta molécula com seu receptor CD95 na superfície das células alvo, seja de maneira autócrina, isto é, na própria célula que passou a expressar CD95L, ou de maneira parácrina, caracterizando o chamado fratricídio de linfócitos T (Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995).

Camundongos MRL/lpr e MRL/gld, que possuem uma deficiência na expressão de CD95 e CD95L, respectivamente, apresentam um fenótipo bastante semelhante, com linfadenopatia e esplenomegalia causada pelo acúmulo de linfócitos ativados (Andrews *et al.*, 1978; Roths *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1992). A incidência de doenças auto-imunes nestes camundongos é bastante aumentada e ocorre em múltiplos órgãos, indicando que o acúmulo de células ativadas que deveriam estar morrendo por AICD via CD95/CD95L não é só um problema de aumento dos órgãos linfóides, mas também um distúrbio grave nos processos de tolerância periférica (Nagata e Suda, 1995). Estes animais normalmente morrem de nefrite ou artrite em torno do quinto mês de vida (Cohen e Eisenberg, 1991). Em humanos, a ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) é uma doença linfoproliferativa, com hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, como alta incidência de linfomas, causada principalmente por deficiências na expressão de CD95 e/ou CD95L ou por moléculas da via de sinalização desencadeada, tais como a caspase-8 e o FADD (Poppema *et al.*, 2004; Rieux-Laucat *et al.*, 1995).

Apesar da AICD ter sido descrita nas três sub-populações de linfócitos T $CD4^+$, algumas diferenças na susceptibilidade e nas vias bioquímicas utilizadas durante o processo

da AICD foram prontamente demonstradas. Inicialmente, notou-se que Th1 era muito mais susceptível que Th2 e diversas diferenças foram encontradas entre estes dois tipos celulares, como a expressão diferencial de caspase-8 e CD95L, a expressão de perfis diferentes de glicosilação, a expressão de moléculas inibidoras de caspases (SPI-2A), entre outras (Liu *et al.*, 2004; Ramsdell *et al.*, 1994; Toscano *et al.*, 2007). Porém, mais do que diferenças na modulação da mesma via bioquímica, demonstrou-se que as próprias vias de execução da AICD são diferentes. Enquanto Th1 depende majoritariamente da expressão *de novo* da molécula de CD95L, que se liga ao seu receptor cognato, ativando a caspase-8 e assim desencadeando uma cascata de ativação de caspases, células Th2 são mais dependentes da degranulação e liberação interna de Granzima B (GrB) (Devadas *et al.*, 2006). Linfócitos Th2 derivados de camundongos deficientes para GrB são totalmente refratários à AICD enquanto linfócitos Th1 continuam sensíveis a este tipo de morte (Devadas *et al.*, 2006). Da mesma forma, linfócitos Th1 de camundongos deficientes em CD95L são insensíveis à AICD. Este padrão de resistência à morte se reflete diretamente nos fenótipos encontrados nestes animais deficientes. Enquanto o camundongo deficiente em CD95L desenvolve múltiplas desordens autoimunes, o que sugere um padrão Th1 de resposta (Nagata e Suda, 1995), o camundongo deficiente em granzima B desenvolve asma mais grave, mostrando um favorecimento do perfil Th2 de resposta imune (Devadas *et al.*, 2006). Quanto aos mecanismos envolvidos na AICD de Th17 há somente um único trabalho científico, publicado em julho do ano corrente, que mostra que a principal via envolvida na morte destas células é mediada por CD95L e CD95, de forma similar a que ocorre em linfócitos Th1 (Zhang *et al.*, 2008). Este dado é concordante com os apresentados pelo grupo do Prof. Galli, que mostra que o perfil de expressão de moléculas de superfície, tais como CD95, PDL-1 e CD153, nos linfócitos Th17 é mais similar ao apresentado por Th1 do que por Th2 (Nakae *et al.*, 2007).

Todos estes dados em conjunto levaram os pesquisadores a formular uma teoria na qual a população de linfócitos T expandida após uma resposta imune seria contraída através deste mecanismo de morte dependente de CD95L e CD95 denominado AICD. Na ausência desta eliminação, as células ativadas se acumulariam, e a produção exacerbada de citocinas facilitaria a quebra da tolerância, gerando síndromes auto-imunes, o que explicaria o fenótipo encontrado nos animais deficientes de CD95L e CD95 e nos pacientes com ALPS (Rieux-Laucat *et al.*, 1995).

Porém, algumas observações feitas não encaixavam corretamente na teoria, sendo que a principal crítica que existia era que a população de células expandidas em animais

deficientes de CD95L e CD95 era uma população não-convencional, TCR$\alpha\beta^+$ B220$^+$ CD3$^+$ CD4$^-$ CD8$^-$, que não ocorre normalmente durante uma resposta imune. Outro ponto é que, dependendo do patrimônio genético do camundongo deficiente em CD95, como por exemplo, em C57Bl/6, o acúmulo de linfócitos T, a produção de auto-anticorpos e o aparecimento de distúrbios auto-imunes eram bem menores (Theofilopoulos e Dixon, 1985).

O desenvolvimento de um camundongo nocaute para Bim, uma molécula da família Bcl-2, desafiou a importância da AICD, mostrando que a deleção de linfócitos T periféricos seria muito mais dependente de Bim do que da via dependente de CD95 (Hildeman *et al.*, 2002). O Bim é um gatilho da via de apoptose mediada pela mitocôndria e tem um papel central na morte de linfócitos T causada pela deprivação de citocinas (O'Connor *et al.*, 1998). Portanto, a contração clonal após a resposta imune parecia ser mais ligada à falta de fatores de sobrevivência e crescimento do que a um estímulo via receptores de morte.

Recentemente, publicações utilizando camundongos duplo nocaute para CD95 e Bim mostraram que ambas as vias são complementares e sinérgicas, tanto para conter o aparecimento de síndromes auto-imunes como na contração de populações expandidas. O grupo do Prof. Perlman mostrou que, nestes camundongos, o desenvolvimento dos distúrbios auto-imunes foi muito mais precoce e grave, ocorrendo já na 16ª semana de vida (Hutcheson *et al.*, 2008). Já o grupo do Prof. Bouillet mostrou que a contração da população expandida por uma infecção aguda com o vírus HSV-1KOS era totalmente dependente da via do Bim, mas que a morte dos linfócitos T expandidos pela infecção crônica com o vírus MHV-68 dependia de ambas as vias (Hughes *et al.*, 2008). Por fim, a infecção com o vírus LCMV Armstrong, que causa uma infecção relativamente aguda, levava a uma deleção clonal dependente tanto de Bim como de CD95/CD95L (Weant *et al.*, 2008).

Portanto, a teoria mais aceita atualmente sobre a participação da via de CD95 e do Bim na redução de populações de linfócitos T expandidas leva em consideração a forma e duração da apresentação dos antígenos patogênicos. Se a infecção é rapidamente eliminada e a apresentação de antígenos pelas células dendríticas fica rapidamente limitada, provavelmente a concentração dos fatores de sobrevivência e seus receptores se tornam limitantes e a via preferencial de morte é a via mediada por Bim. Porém, quando o antígeno persiste por causa de uma infecção crônica, os linfócitos T recebem continuamente estímulos, evitando assim a ativação da via mediada por Bim. Porém, nesta situação, o estímulo crônico pelo antígeno leva à expressão de CD95L, que acaba por matar a célula por AICD. Neste caso, a expressão de CD95L pelos linfócitos T pode também matar as células

dendríticas, o que limitaria a apresentação de antígeno, diminuindo a quantidade de sinais de sobrevivência, desencadeando nos linfócitos T o acúmulo de Bim e a morte por esta via (Green, 2008).

1.6 Regulação do CD95L

Por ser um evento central na regulação de vida e morte de diversos tipos celulares, inclusive linfócitos T maduros, a modulação da transcrição gênica do CD95L foi extensamente estudada. Com o seqüenciamento da região 5' do gene do CD95L e seu promotor, vários sítios de ligação consenso para diferentes fatores de transcrição foram descritos e validados. Entre os principais fatores de transcrição capazes de interagir com a região promotora do CD95L, estão o NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), o NF-κB (nuclear factor *kappa B*), AP-1 (*activator protein-1*), os Egr (*early growth response genes*), c-Myc, SP-1 (*secretory protein-1*) e os IRFs (*interferon regulatory factors*) (Zhang *et al.*, 2004).

O NFAT é um fator de transcrição ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3 e parece ser o principal regulador da expressão de CD95L. A primeira prova formal que o NFAT estava envolvido com a transcrição do CD95L foi através do uso da ciclosporina A (CsA), que inibe a ativação do NFAT por impedir sua desfosforilação dependente de calcineurina (Loh *et al.*, 1996). Foram identificados dois domínios de interação com o NFAT no promotor de CD95L (Latinis *et al.*, 1997) e experimentos com plasmídeos repórteres mostraram que o NFAT quando se liga aos seus sítios de ligação consenso é capaz de induzir transcrição gênica (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998). Camundongos mutantes para NFAT apresentam expressão deficiente de CD95L e em alguns modelos causam doenças linfoproliferativas (Hodge *et al.*, 1996). A indução de CD95L por NFAT requer a cooperação de AP-1 (Fos/Jun) e pode ser potencializada por SP-1 (Peterson *et al.*, 1996). A expressão ectópica do dominante-negativo de AP-1 diminui drasticamente a expressão de CD95L dependente de NFAT (Baumann *et al.*, 2003).

A família dos fatores de transcrição Egr parece ser importante na expressão de CD95L em linfócitos, apesar da deficiência de Egr1 não causar desordens linfoproliferativas comuns à deficiência da expressão do CD95L. São os únicos fatores de transcrição produzidos *de novo* durante a indução da AICD (Ashwell *et al.*, 2000). A potente indução do CD95L mediada por Egr2 e/ou Egr3 é bloqueada pela ação da ciclosporina A (Mittelstadt e Ashwell, 1998),

sendo que estudos posteriores demonstraram que a expressão tanto de Egr2 como de Egr3 são dependentes do NFAT. Sendo assim, o estímulo via TCR/CD3 ativa o NFAT que, por sua vez, induz a expressão de Egr2 e/ou Egr3 (Rengarajan *et al.*, 2000). Estes fatores de transcrição agem sinergicamente, através de sítios de ligação consenso justapostos no promotor (Norian *et al.*, 1998). A expressão de Egr3 é maior em células Th1 do que em células Th2, o que pode estar na origem da diferença de susceptibilidade destas células à AICD (Rengarajan *et al.*, 2000).

Outro fator de transcrição bastante descrito na indução de CD95L em vários tecidos é o NF-κB. Apesar do promotor de CD95L apresentar um único domínio consenso de ligação com este fator de transcrição, o NF-κB parece mediar diversos estímulos apoptóticos que utilizam a via do CD95/CD95L, como o etoposídeo (Baldwin, 1996), a deprivação de timina (Harwood *et al.*, 2000), além da própria AICD (Kasibhatla *et al.*, 1999).

O c-Myc dimeriza com seu parceiro Max após estimulação do TCR/CD3, tornando-se um complexo transcripcionalmente ativo (Kasibhatla *et al.*, 2000). Seqüências anti-senso para o gene do c-myc abolem a expressão deste fator de transcrição, bloqueando a AICD em diversos hibridomas de linfócitos T (Shi *et al.*, 1992). A expressão de CD95L também está sob a influência direta da família dos receptores IRF. A deleção ou mutagênese do sítio de ligação para IRF resulta na expressão de CD95L e ensaios de *gel shift* demonstraram a ligação específica do IRF-1 e IRF-2 ao promotor (Chow *et al.*, 2000).

Além de fatores de transcrição que regulam positivamente a transcrição do CD95L, há também a participação de fatores repressores de transcrição, como é o caso do GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine-zipper*), um gene regulado por glicocorticóides, capaz de bloquear o aumento de CD95L em hibridomas, interferindo com o processo de apoptose por AICD (D'Adamio *et al.*, 1997).

Em 1993, foi descrito um repressor transcripcional, denominado ICER (*Inducible cAMP early repressor*), que é formado através do uso de um promotor intrônico do gene do CREM (*cAMP responsive element modulator*) (Molina *et al.*, 1993). É composto essencialmente do domínio de ligação ao DNA (DBD) deste gene, sendo induzido rápida e fortemente pelo aumento nos níveis de AMPc (Molina *et al.*, 1993). Este pequeno repressor trancripcional pode agir formando heterodímeros inativos com CREB (*cAMP responsive element binding factors*) ou ocupando sítios de ligação consenso CRE (*cAMP-responsive element*) (Molina *et al.*, 1993). Vários fatores de transcrição utilizam os sítios CRE para interagir com os promotores, entre eles o CREB e as variantes do CREM, mas também o AP-

1, indicando que o ICER é capaz de inibir não só sua família gênica, mas também outros fatores transcripcionais (Masquilier e Sassone-Corsi, 1992). Além disso, a ocupação dos sítios CRE leva a um bloqueio na resposta de fatores que se ligam a sítios adjacentes. Esta inibição ocorre porque ICER não possui o domínio de recrutamento de CBP/p300, um co-fator essencial para a montagem da maquinaria transcripcional. Um dos exemplos é que a ausência da interação entre a CBP/p300 e o NFAT ou NF-κB afetam sua capacidade indutora (Garcia-Rodriguez e Rao, 1998; Gerritsen *et al.*, 1997). Portanto, é possível que imaginar uma competição entre ICER e proteínas que se ligam a CRE, tais como CREB e AP-1, em sítios adjacentes aos sítios de ligação de NFAT ou NF-κB, bloqueando o recrutamento de CBP/p300 e impedindo a correta transcrição gênica mediada por estes fatores de transcrição.

Tanto forskolina, um agonista da adenilato ciclase, como PGE_2 são capazes de induzir um rápido aumento de ICER em timócitos e linfócitos T maduros (Bodor *et al.*, 1996), bloqueando a transativação do promotor de IL-2 (Bodor *et al.*, 2001). E, em 2002, o grupo do Prof. Gress, mostrou que aumento de AMPc por forskolina pode inibir a expressão do CD95L via indução de ICER (Bodor *et al.*, 2002). Todavia, ainda resta ser provado se o ICER tem um papel fundamental na inibição do CD95L ou se a PGE_2 utiliza outros mecanismos para a inibição da expressão deste gene.

Em resumo, a expressão do CD95L é um mecanismo extremamente regulado e complexo, onde diversos fatores de transcrição agem de forma aditiva, antagônica e/ou sinérgica, fazendo com que a somatória de todas estas influências seja realmente importante para o resultado final.

1.7 Prostaglandina E_2

Prostaglandinas (PG) são moléculas derivadas de lipídios geradas pelo metabolismo seqüencial do ácido araquidônico pela ação de ciclooxigenases e prostaglandina-sintases. O ácido araquidônico é um ácido graxo insaturado contendo 20 carbonos e está presente em membranas celulares. Após sua liberação da membrana pela ação da fosfolipase A_2, entra em um ciclo oxidativo, que culmina na produção de PGH_2 (Smith *et al.*, 2000). Esta prostaglandina inicial é bastante instável e é rapidamente metabolizada para as cinco principais prostaglandinas com efeitos fisiológicos relevantes *in vivo*. São elas: PGE_2, $PGF_2\alpha$, PGD_2, PGI_2 e tromboxano. O padrão de produção de prostaglandinas de uma determinada

célula depende muito do perfil das enzimas expressas envolvidas na síntese de cada uma das prostaglandinas.

As ciclooxigenases, enzimas essenciais na produção das PGs, possuem duas isoformas principais. A ciclooxigenase-1 (cox-1) é descrita, raras exceções, como sendo constitutivamente expressa, participando na manutenção dos níveis basais das prostaglandinas, exercendo funções de homeostase fisiológica (Dubois *et al.*, 1998). Já a expressão de ciclooxigenase-2 (Cox-2) é induzível por diversos mecanismos, especialmente pelas citocinas e estímulos pró-inflamatórios, como lipopolissacarídeos de bactérias (Martin *et al.*, 1994).

O efeito das prostaglandinas é mediado por oito receptores acoplados a proteínas G, da família dos receptores *rhoposin-like* (GPCRs). Estes receptores são classificados pela prostaglandina com a qual faz interação, subdividindo-se em DP, FP, IP, TP e EP (1 a 4) e possuem homologia de aproximadamente 20 a 30% entre eles (Breyer *et al.*, 2001). A sinalização destes receptores é mediada pelas diferentes proteínas G acopladas, sendo que cada proteína G tem a capacidade de ativar diferentes vias bioquímicas. O mecanismo preciso da ação das prostaglandinas, portanto, é determinado por uma imbricada combinação de interações entre os ligantes/receptores, dependendo de vários fatores, como a afinidade do ligante, o perfil de expressão dos receptores, a ativação diferencial das vias bioquímicas e o contexto celular no qual ocorre a sinalização. Conseqüentemente, uma determinada prostaglandina pode ter ações antagônicas em contextos celulares distinto (Davis *et al.*, 2004; Walch *et al.*, 2001).

A prostaglandina E_2 é a principal prostaglandina produzida em diversas condições, especialmente durante a resposta imune. O macrófago, por exemplo, produz uma quantidade basal de tromboxano maior que PGE_2. Porém, após estímulo com LPS, a razão entre estes dois prostanóides se inverte e o macrófago passa a produzir PGE_2 em grandes quantidades (Tilley *et al.*, 2001). Sua influência no sistema imune é complexa, tendo ação em vários tipos celulares, como os macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, causando efeitos tanto anti- como pró-inflamatórios. A diversidade destes efeitos é devida, em parte, à existência de quatro receptores do subtipo EP, sendo que existe heterogeneidade quanto às proteínas G acopladas a estes receptores (Kobayashi e Narumiya, 2002).

Os EPs foram originalmente classificados por sua função nos músculos lisos, formando basicamente dois grupos. O primeiro, denominado de “relaxante”, é formado pelos EP2 e EP4, que se acoplam à proteína G_s. Quando há a sinalização por estes

receptores, ocorre a ativação da adenilato ciclase com o conseqüente aumento de AMPc, normalmente levando à ativação da fosfoquinase A (PKA) que, por sua vez, ativa o fator de transcrição CREB (Nishigaki *et al.*, 1996; Rubin *et al.*, 1991). Recentemente, foi descrita uma nova via dependente de AMPc porém independente de PKA, que é mediada pelo EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*) e culmina na ativação da via de PKB (Jing *et al.*, 2004). Em oposição, os receptores EP1 e EP3 estão ligados a funções constritoras e inibitórias, estando acoplados a proteínas G_q e G_i. Agem elevando os níveis de cálcio intracelular e inibindo o aumento de AMPc, respectivamente (Breyer *et al.*, 2001). A análise de expressão destes receptores em células do sistema imune mostrou uma ampla distribuição, sendo que tanto células dendríticas e macrófagos (Harizi *et al.*, 2003; Kabashima *et al.*, 2003), como linfócitos B e T (Tilley *et al.*, 2001) podem expressar os quatro subtipos.

A PGE_2 pode atuar em diversos momentos da vida dos linfócitos T, desde o desenvolvimento, maturação e até durante a realização de suas funções efetoras. A título de exemplo, o aumento de AMPc via receptor EP2 e EP4 parece mediar a proteção de timócitos duplo-positivos da morte por seleção negativa (Goetzl *et al.*, 1995). O receptor EP2 também está envolvido na inibição da proliferação de linfócitos T causada pela PGE_2 (Chemnitz *et al.*, 2006; Chouaib *et al.*, 1985). Por fim, a PGE_2 parece ter uma ação no desvio da resposta imune, favorecendo uma resposta mais Th2 (Kaur *et al.*, 1999).

Neste trabalho, serão apresentados resultados mostrando que os sobrenadantes de macrófagos e células dendríticas estimuladas por LPS são capazes de impedir a AICD de linfócitos T. Como será demonstrado, a estimulação por LPS para a produção deste fator protetor depende da via mediada por TLR4/MyD88 e é independente de TLR2 e CD14. A PGE_2 foi caracterizada como o principal componente destes sobrenadantes responsável pela redução da AICD e também do bloqueio da morte dos macrófagos-alvo, através da supressão da expressão de CD95L nos linfócitos T. A PGE_2, sintética ou derivada dos sobrenadantes, age através dos receptores EP2 e EP4, aumentando os níveis intracelulares de AMPc, que ativam a via da PKA. A via da EPAC, também ativada pelo AMPc, não é capaz de bloquear a AICD sozinha, mas contribui para amplificar a resistência à AICD mediada pela PKA. Além de bloquear a expressão de CD95L, a PGE_2 é capaz de potencializar a morte induzida por anticorpos anti-CD95, aumentando a susceptibilidade destas células à expressão de CD95L nos tecidos adjacentes. A ativação dos fatores de transcrição NFAT, AP-

1 e NF-κB não parece ser afetada diretamente pela via da PGE_2, porém há a possibilidade de que a interação destes fatores de transcrição com o promotor de CD95L seja inibida pela expressão de ICER, que é induzida por PGE_2.

Em resumo, é a primeira vez que se demonstra que linfócitos T ativados num contexto onde existem APCs estimuladas via TLR expressam baixos níveis de CD95L, o que evita a AICD prematura destes linfócitos e também protege as APCs de serem mortas durante a apresentação de antígeno.

2 Objetivos

- Avaliar se fatores solúveis secretados por células apresentadoras de antígeno possuem efeito inibidor na AICD de linfócitos T $CD4^+$;

- Analisar se a ativação das APCs através de receptores do tipo Toll (TLRs) induz e/ou aumenta a secreção do fator inibidor;

- Investigar qual é a via de sinalização iniciada por LPS na indução da produção do fator inibidor;

- Caracterizar o fator inibidor;

- Avaliar o efeito do fator inibidor na expressão das moléculas envolvidas na via do CD95L/CD95, responsáveis pelos eventos iniciais da AICD em linfócitos T $CD4^+$;

- Investigar se o fator inibidor modula a morte induzida por estimulação do receptor CD95;

- Analisar qual é a via de sinalização induzida pelo fator inibidor que medeia a inibição de AICD em linfócitos T $CD4^+$;

- Estudar o impacto do fator inibidor na ativação dos fatores de transcrição relevantes para a expressão do CD95L;

- Avaliar se o fator inibidor reduz a AICD e as moléculas envolvidas neste processo também em linfócitos T $CD4^+$ primários; e

- Investigar se o fator inibidor também bloqueia a morte das células apresentadoras de antígeno pelos linfócitos T $CD4^+$.

3 Materiais e Métodos

3.1 Células

O hibridoma DO11.10 foi derivado de linfócitos T $CD4^+$ extraídos de camundongos BALB/c Tg (DO11.10)10Loh fundidos com células BW5147 $TCR\beta^{-/-}$, de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Haskins *et al.*, 1983; Kappler *et al.*, 1981). Esta linhagem murina apresenta mais de 85% de seus linfócitos com TCR transgênico para um peptídeo de ovalbumina (OVA323-339) apresentado em um contexto MHC classe II $I\text{-}A^d$. Este hibridoma foi originalmente cedido pelo Dr. Douglas Green (La Jolla Institute for Allergy & Immunology, San Diego, CA, EUA).

A linhagem celular Jurkat foi estabelecida a partir de linfócitos T humanos de sangue periférico de um garoto de 14 anos durante sua primeira crise de leucemia aguda linfoblástica em 1976. Esta célula expressa o complexo TCR/CD3, produz grandes quantidades de IL-2 somente após ativação e foi obtida da ATCC (Manassas, VA, EUA).

A linhagem macrofágica J774A1 (J774) foi estabelecida a partir de um tumor macrofágico de camundongo BALB/c fêmea (Ralph *et al.*, 1976) e foi obtida da ATCC.

3.2 Camundongos

Todos os camundongos utilizados foram originários do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os procedimentos para a manipulação dos camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA). Os animais utilizados nos experimentos eram todos machos e variavam entre 5 e 6 semanas de idade.

As linhagens utilizadas foram BALB/c, BALB/c Tg (DO11.10) 10Loh, C57Bl/6, C57Bl/6.MyD88 KO, C57Bl/6.CD14 KO, C57Bl/6.TLR2 KO, C57Bl/6.IL-12 KO, C57Bl/6.IFN-γ KO, C57Bl/6.IL-12.IFN-γ KO, C3H/HeJ, C3H/HePas e 129.

3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados para as reações de PCR, para a extração de RNA e conversão para cDNA bem como os oligonucleotídeos e o CFSE foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Os anticorpos anti-CD4.FITC (clone H129.19), anti-CD95L.PE (clone MFL3), anti-CD28 (clone 37.51), anti-CD95 (clone Jo2) e o Fas.Fc foram obtidos da BD PharMingen Co. (San Diego, CA, EUA). Os anticorpos anti-NFAT1 e anti-fosfo-NFAT1 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Viola (INCA-RJ). Os anticorpos anti-NF-κB (#3034), anti-Fosfo-NF-κB (#3033), anti-IκB (#9242), anti-CREB (#9197) e anti-Fosfo-CREB (#9198) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA).

As colunas e kits de extração plasmidial são da marca Qiagen (Germantown, MD, EUA). Indometacina, NS398, PGE_2, Butaprost, H6809 e anticorpos anti-EP1 a anti-EP4 foram adquiridas da Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, EUA). LPS (lipopolissacarídeo) de *E. coli,* ciclosporina A, lactacistina, ionomicina, PMA e forskolina foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e o AACOCF3 da Biomol International (Plymouth Meeting, PA, EUA). 6-Bnz-cAPM e 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP foram comprados da Biolog LSI (Bremen, Alemanha) e ONO-AE1-329 e ONO-AE3-208 são da marca ONO Pharmaceuticals (Osaka, Japan).

3.4 Cultivo de células

O cultivo dos hibridomas DO11.10, Jurkat e J774 foi feito em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2mM glutamina e antibiótico (100 U/L penicilina + 100 μg/L estreptomicina) em garrafas horizontais de 25 ou 75 cm^2 mantidas em estufa a 37 ^oC e 5% CO_2. O repique foi realizado, em média, três vezes por semana.

O cultivo das células dendríticas e das células de exsudato peritoneal foi feito com meio DMEM suplementado com 100 μM aminoácidos essenciais, 100 μM vitaminas, 2 mM L-glutamina, 100 μg/ml gentamicina, 50 μM 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sódio, contendo 5% de soro fetal bovino em placas de 100 mm^2, mantidas em estufa a 37 ^oC e 5% CO_2.

Os linfócitos T primários foram cultivados em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sódio, 100 μM aminoácidos essenciais, 100 μM vitaminas, 100 μM 2-mercaptoetanol, 100 U/L penicilina e 100 μg/L estreptomicina em placas de 100 mm^2, mantidas em estufa a 37 ^oC e 5% CO_2.

O uso das células para experimentos foi condicionado ao mínimo de 95% de viabilidade verificada por exclusão a Azul de Tripan 0,2%. A contagem do número de células tanto para repique como para a execução dos experimentos foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.5 Obtenção de células do exsudato peritoneal de camundongos (PECS)

Para a elicitação de células para a cavidade peritoneal, injetou-se intra-peritonealmente 1 ml de tioglicolato a 3% em cada camundongo quatro dias antes de seu sacrifício. Após o sacrifício, fez-se a lavagem peritoneal com 5 a 10 ml de PBS. Para tanto, este volume de tampão salino foi injetado na cavidade peritoneal e, em seguida, recolhido com a própria seringa. Na seqüência, as células foram centrifugadas a 210 g por cinco minutos a 4 ^{o}C e ressuspendidas em meio RPMI enriquecido com 10% soro fetal bovino. Por fenotipagem de CD11b e F4/80, observou-se que mais de 95% das células eram macrófagos (dados não mostrados).

3.6 Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos

Foram extraídas células da medula óssea dos fêmures e tíbias dos camundongos através de jatos de meio, com o uso de seringa e agulha hipodérmica. Estas células, após centrifugação a 200 g por 5 min, foram cultivadas por sete dias em placa de 6 poços na concentração de $2x10^6$ células/ml em um volume total de 7 ml contendo 20 ng/ml de GM-CSF recombinante murino. No terceiro dia, mais 20 ng/ml de GM-CSF foi adicionado ao meio. Alternativamente, além do GM-CSF, as células foram incubadas com 100 U/ml IL-4. Após este período de incubação, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas à placa foram recolhidas. Estas células foram consideradas células dendríticas (DCs), de acordo com o protocolo modificado de (Inaba *et al.*, 1992). A confirmação foi feita por fenotipagem de CD11b e CD11c, sendo que as células dendríticas são duplo-positivas para estes marcadores (dados não mostrados).

3.7 Obtenção de sobrenadantes de células J774, PECs ou células dendríticas

Um milhão de células dendríticas ou PECs num volume final de 1ml foram adicionadas por poço a placas de 24 poços e, após 4h em estufa (5% CO_2 e 37 ^oC), as células não-aderidas foram descartadas e 1 ml de meio foi reposto. As células J774 foram plaqueadas na mesma concentração, porém, não houve descarte das células não-aderentes. Após 24h de incubação em estufa, o sobrenadante destas culturas celulares foram transferidos para tubos e centrifugados a 600 g por 5 min a 4 ^oC para remoção dos contaminantes celulares. A estocagem destes sobrenadantes foi feita a -20 ^oC por até um mês.

Em diversos experimentos, as células foram submetidas a diversos tratamentos e estímulos, possivelmente alterando a composição do sobrenadante. Todos os tratamentos foram ministrados durante as 24horas de produção do sobrenadante.

Foi utilizado o lipopolissacarídeo (LPS) a 1 μg/ml para ativação dos PECs e células J774 e maturação das células dendríticas. Para a inibição da síntese protéica, a cicloheximida foi usada nas doses de 0,04 e 0,2 μM. Os inibidores da via do metabolismo do ácido aracdônico usados foram: Indometacina (10 μg/ml; inibidor de Cox-1 e Cox-2), NS398 (10 μM; inibidor de Cox-2) e AACOCF3 (10 μM; inibidor da fosfolipase A_2). Se usados em combinação com LPS, os inibidores foram adicionados 30 min antes do estímulo.

3.8 Estimulação dos hibridomas com anti-CD3

O anticorpo anti-CD3 utilizado (clone 2C11) é derivado do hibridoma denominado 145-2C11 (Leo *et al.*, 1987) e foi produzido e purificado em nosso laboratório. Para expor as células ao anti-CD3 é necessário primeiramente imobilizá-lo na placa de cultura. Para tanto, o anticorpo foi diluído em tampão Tris 50 mM pH 9,0 na concentração desejada e 100 μl desta solução foram plaqueados em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo reto. A placa foi incubada em estufa por duas horas ou por 18h a 4 ^oC e, em seguida, retirou-se o líquido da placa, lavando uma vez com o tampão correspondente. Após este procedimento, 1-2,5x10^5 células foram plaqueadas num volume final de 100 μl e incubadas a 37 ^oC e 5% de CO_2 pelos períodos desejados. Alternativamente, utilizou-se a placa de 24 poços de fundo

chato, com o plaqueamento de 500 µl de anticorpo e $7,5x10^5$ células em volume final de 500µl.

3.9 Indução de morte dos hibridomas por anticorpos anti-CD95

Alternativamente à indução de morte por anticorpos anti-CD3, os hibridomas de linfócitos T DO11.10 foram submetidos a estímulo por anticorpos anti-CD95 agonistas (clone Jo2; BD Biosciences). Para tanto, $2x10^5$ células foram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo reto na presença de 1 µg/ml anti-CD95 num volume final de 100 µl e incubadas a 37 ^oC e 5% de CO_2 pelos períodos desejados.

3.10 Extração de RNA

Um a cinco milhões de células foram transferidas para um tubo de 1,5 ml e centrifugadas a 420 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,5 ml de TRIsol (Invitrogen) agitando em vortex lento. Após 5min de incubação em temperatura ambiente adicionou-se 0,1 ml de clorofórmio seguida de nova incubação por 2 min. Centrifugou-se a 12.000 g por 15 min a 4 ^oC e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi então adicionado 1 vol de isopropanol (0,25 ml) seguido por uma incubação a -20 ^oC por 2h. Centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 ml de Etanol 75% e posteriormente centrifugou-se a 7500 g por 5 min a 4^oC. Secou-se o precipitado e ressuspendeu-se em 30 µl de água destilada, livre de RNAse e DNAse. A quantificação foi feita utilizando-se um espectrofotômetro (*SpectraMax 190 – Molecular Devices*) com comprimento de onda de 260/280 nm.

3.11 Conversão de RNA para cDNA

Um a três microgramas de RNA foi diluído em 11 µl de água livre de RNAses e colocado em tubos de 0,5 ml. Foi adicionado 1,0 µl de 500 ug/ml de oligo dT, seguido de aquecimento a 70 ^oC por 10 min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 8 µl do mix

Superscript (4 µl de Tampão 5 X; 1 µl de dNTP 10 mM; 2 µl de DTT 0,1 M e 1,0 µl Superscript R/T II 200 U/µl) e incubou-se a 42 ^{o}C por 50 min. A enzima foi inativada incubando-se a 90 ^{o}C por 5 min seguidos por 5 min a 4 ^{o}C. Foi acrescentado 1 µl de RNAse H e deixou-se em incubação por mais 20 min a 37 ^{o}C para remover as fitas de RNA. O volume final foi acertado para 100 ul com água livre de RNAses.

3.12 RT-PCR

Cada reação foi composta por 5 µl de tampão 10 X, 1 µl de 10 mM DNTPs, 1,5 µl de $MgCl_2$, 1 µl de cada oligonucleotídeo (15 pmoles/µl), 0,5 µl de Taq DNA polimerase e 1, 5 ou 10 µl da amostra de cDNA, em um volume final de 50 µl. O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 95°C/300s + N(95°C/45s, TA/60s, 72°C/45s) + 72°C/120s, sendo N o número de ciclos e TA a temperatura de anelamento estimada para cada par de oligonucleotídeos. As amostras foram armazenadas a -20 ^{o}C.

Os pares de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes de interesse estão discriminados na Tabela 1, que ainda inclui o tamanho esperado para os produtos de PCR.

Tabela 1. Seqüência dos pares de oligonucleotídeos utilizados, o fragmento gênico amplificado correspondente e o tamanho esperado do produto da reação.

Fragmento Gênico	*Primer Forward*	*Primer Reverse*	*Tamanho esperado amplificação (pb)*
Actina	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	349
CD95	GAGGACTGCAAAATGAATGGGG	ACAACCATAGGCGATTTCTGGG	319
CD95L	CAGCAGTGCCACTTCATCTTGG	TTCACTCCAGAGATCAGAGCGG	471
FLIP	TGTTCCACGCATACACTTTGTCC	CATGACATAACCCAGATTGTTCGC	502
ICER	ATGGCTGTAACTGGAGATGAAACT	CTAATCTGTTTTGGGAGAGCAAATGTC	750

As amostras resultantes deste processo foram aplicadas em gel de agarose 1,5% e visualizadas através de um transiluminador de UV para que, em comparação com o marcador molecular, fosse analisado se os tamanhos de amplificação obtidos correspondiam aos esperados. Estas imagens foram digitalizadas com a ajuda do software *Adobe PhotoShop* versão 7.0 (*Adobe Systems Incorporated*) e as análises densitométricas foram feiras através do *software Alpha Easy* versão 5.5 (*Alpha Inotech Coorporation*).

3.13 Dosagem de PGE_2 por ELISA

A análise da PGE_2 nos sobrenadantes foi feita através da técnica de ELISA sanduíche, utilizando-se um *kit* comercial da Cayman Chemicals, segundo os protocolos do fabricante. Em resumo, 100 µl de cada amostra foi incubada com o eicosanóide conjugado com acetilcolinesterase e anticorpos específicos em uma placa de 96 poços revestida de anticorpos anti-IgG. Após a adição do substrato enzimático, a densidade ótica das amostras foi determinada por leitura a 412 nm em espectrofotômetro e a quantificação foi feita através de curvas-padrão, sendo o resultado convertido a pg/ml.

3.14 Imunofluorescência para proteínas de superfície

2,5 a $5x10^5$ células foram centrifugadas a 240 g por 5 min a 4 ^oC e ressuspendidas em 200 µl de DBSS enriquecido com 5% Soro Fetal Bovino e 0,1% azida sódica. Após nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em 20 µl da mesma solução contendo os anticorpos desejados. Após 30 min de incubação a 4 ^oC no escuro, as células foram lavadas duas vezes em 200 µl de DBSS contendo 0,1% azida. Em seguida foram ressuspendidas em 300 µl de DBSS com 0,1% azida e 1% paraformaldeído. A leitura no citômetro de fluxo foi feita até 1 h após este tratamento. O DBSS é composto de 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,36 g $Na_2HPO_4.7H_2O$, 0,06 g KH_2PO_4 e 1 g glicose em 1 L de água milliQ. Os anticorpos utilizados foram o anti-CD3.FITC, o anti-CD4.FITC e o anti-CD95L.PE, todos na concentração 0,5 µg/ml.

3.15 *Western-blot*

Para a preparação das amostras (lisado total), uma alíquota da ordem de 10^6 células de cada suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 210 g e o sedimento celular solubilizado em 80-100 µl de tampão de amostra contendo SDS (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de 2-mercaptoetanol). A amostra foi, então, aquecida a 100 ^oC por 5 minutos e estocada no freezer –20 ^oC.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8 a 15% contendo SDS e foram submetidas à carga elétrica – 3 h a 80 V – para a realização da eletroforese. A presença de detergente (SDS) desnatura as proteínas das amostras e neutraliza suas cargas, fazendo com que elas migrem no gel de acordo com sua massa molecular.

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF – 4h a 0,2 A – e marcadas com os anticorpos específicos. A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência utilizando o kit ECL (Amershan), com a posterior exposição das membranas a um filme de auto-radiografia, conforme protocolo do fabricante. Os filmes foram escaneados e digitalizados pelo *software HP PrecisionScan LTX* (Epson Co.).

3.16 Transformação de Bactérias

As bactérias foram transformadas pelo método de choque térmico. Os plasmídeos foram adicionados a 50 µL de bactérias competentes, em gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados a 42 °C por 1min30s e rapidamente transferidos para gelo, incubando-se por mais 5min. Adicionou-se na seqüência, 450 ml de LB e as bactérias foram incubadas por 1 h a 37 °C, sob agitação orbital para expressão do gene de resistência. Após este período, 50 µl da suspensão de bactérias foram plaqueados em placas de Petri com meio sólido LB (1,5 g/L de ágar e 50 µg/mL de ampicilina), incubando-a na estufa a 37 °C por um período de 14 a 16h.

3.17 Extração de DNA Plasmidial

Para a obtenção de plasmídeos em grande escala, utilizamos as colunas QIAGEN 100 ou 500, para midi-prep e maxi-prep, respectivamente, aplicando o protocolo de lise alcalina padrão, descritos no manual do produto. Após a transformação bacteriana, uma colônia foi selecionada e cultivada em 3 mL de meio líquido LB contendo ampicilina na concentração descrita acima, por 8h a 37 °C sob agitação constante (300 rpm). A seguir, esta cultura foi diluída 1:1000 em meio LB com antibiótico. As bactérias foram então crescidas por 14-16h a 37 °C em agitação de 300 rpm e em seguida, centrifugadas a 6000*g*/15min/4°C. O

precipitado foi ressuspendido na solução P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 100 µg/ml de RNAse A) e a lise celular ocorreu pela adição da solução P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), por 5 min a 4 °C. Após este período adicionamos a solução P3, de neutralização (3 M acetato de potássio pH=5,5), mantendo a mistura por 15-20 minutos no gelo. Para a separação do DNA dos resíduos bacterianos, o lisado bacteriano foi centrifugado a 20.000*g*/30min/4°C (Himac C30B2, Hitachi) e o precipitado descartado. A solução contendo o DNA foi aplicada a colunas contendo resina de sílica para ligação do DNA. As colunas foram lavadas com uma solução de 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH=7,0) e 15% de isopropanol, e o DNA foi recuperado por eluição em uma solução de 1,6 M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH=8,5) e 15% isopropanol. O DNA foi precipitado com 0,7 vol de isopropanol, e centrifugado por 30min/15.000*g*/4°C. O precipitado foi lavado duas vezes para remoção de sais e outros reagentes com 2 mL de etanol 70% por centrifugação a 15.000*g*/10min. O precipitado de DNA plasmidial foi ressuspendido em 50 µL de tampão solução de TE pH=8,0 (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA), ou 50% TE, 50% H_2O milli-Q.

3.18 Eletroporação

$3x10^6$ células DO11.10 ou Jurkat foram ressuspendidas em 600 µl meio DMEM sem soro e transferidas para uma cubeta de 0,4 mm próprias para eletroporação. A estas células foram adicionadas diferentes combinações de plasmídeos previamente determinadas. Nestas combinações sempre existiam três plasmídeos: o primeiro denominado pRL.TK.Renilla codifica para luciferase de renila e é útil para normalização da transfecção, já que este promotor confere expressão basal e não modulável. O segundo plasmídeo é o de superexpressão gênica. Foram utilizados os pcDNA5.Vetor e o pcDNA5.NFAT1, sendo que o último codifica para NFAT1. Por fim, utilizou-se um plasmídeo repórter contendo o promotor responsivos a NFAT, sendo ele o 3xNFAT.Luciferase.

O pulso eletromagnético foi realizado na máquina GenePulser II (Biorad), utilizando-se diferentes combinações de voltagem e capacitância. Após a eletroporação, as células ficaram em repouso por 15 min na cubeta, antes de serem avolumadas para 12 ml de meio RPMI completo, descartando o precipitado que se forma durante a eletroporação, que é composto em sua grande maioria por células mortas durante o choque. Em cada poço de uma placa de 6 poços foram colocados 4 ml, sendo que estas ficaram em repouso por mais

30 min em temperatura ambiente antes de serem levadas à estufa. Este procedimento foi adotado para maximizar o fechamento dos poros gerados pelo pulso eletromagnético reduzindo os níveis de morte causados por um possível excesso de gás carbônico da estufa permeando as células e acidificando-as. Em geral, as células foram incubadas por 24h antes de se prosseguir com os tratamentos desejados.

3.19 Ensaio de Luciferase

Após um período de descanso de 18 a 24h posteriormente à eletroporação, diferentes estímulos foram aplicados e 6h depois as células foram recolhidas para leitura da expressão de luciferase. Para tanto, as células foram transferidas para um tubo de 15 ml e centrifugadas a 300 g por 5 min a 4 ^{o}C. Em seguida, o precipitado de células foi ressuspendido em 1 ml de PBS e transferido para um eppendorf de 1,5 ml, que foi centrifugado novamente. Ao precipitado celular foram adicionados 50 µl da solução de lise 1X fornecida pelo fabricante do kit (PROMEGA). Após 15 min de incubação em temperatura ambiente com agitação constante, e uma rápida centrifugação a velocidade máxima, 10 µl desta amostra foram adicionados a uma placa de ELISA fundo chato e branco. A leitura foi feita em um luminômetro automático que injeta nos diferentes poços tanto a luciferina quanto a renila. A luminescência capturada foi transformada em unidades relativas de luz (RLU) e o resultado é dado pela razão entre a RLU da reação com luciferina e a RLU da reação com renila.

3.20 Imunocitoquímica para NFAT1

A preparação das células para imunocitoquímica foi feita usando lamínulas cobertas com gelatina 2% dentro de poços de placas de 24 poços. Para cada amostra, foram adicionadas 40.000 células em 1 ml de meio RPMI 10% por poço e ficaram 16-18h na estufa a 37 ^{o}C. Após o período desejado, à cultura foram adicionados 200 µl de paraformaldeído a 4% para fixação das células e foram então marcadas com anticorpos anti-NFAT1 (1:200) por 2h, seguido de marcação com anticorpo secundário (1:100) por 30 min e 200 µl de Solução DAPI (300 mM) por 1 min (para coloração do núcleo). As lamínulas foram na seqüência

tratadas com 5 µl de N-propil-galato e colocadas em lâminas, sendo vedadas com esmalte incolor. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de fluorescência acoplado a um computador, sendo que as imagens obtidas com o filtro vermelho são referentes à marcação com anti-NFAT1 e as com filtro azul à marcação com DAPI. As imagens obtidas em cada campo podem ser superpostas, criando uma imagem denominada de MERGE.

3.21 Obtenção e ativação de linfócitos T primários

Baços ou linfonodos foram removidos de camundongos BALB/c ou BALB/c Tg DO11.10 e, por esmerilhação com lâminas foscas, as células foram liberadas dos seus órgãos de origem. Os eritrócitos foram removidos por lise em solução de cloreto de amônia e as células aderentes foram removidas através de ensaios de adesão em placa por 2h. As células restantes foram lavadas por, pelo menos, três vezes, contadas e plaqueadas de acordo com os protocolos envolvidos.

Para ativação, $2{,}5x10^5$ células foram estimuladas com 1 µg/ml anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa de 96 poços de fundo chato em um volume final de 100 ul por 8 a 12h.

3.22 Geração e ativação de blastos de linfócitos T

Para a geração de blastos de linfócitos T, 10^6 células foram estimuladas por 48h com 1 µg/ml anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa e 1 µg/ml anti-CD28 solúvel em placas de 6 poços, num volume final de 1 ml. Células foram lavadas e cultivadas por mais quatro a seis dias na presença de 100 U/ml de IL-2 recombinante humana (Proleukin – Zodiac Prod. Farm. – Brasil), com troca a cada dois dias. Na seqüência, as células mortas e debris celulares foram eliminados por gradiente de Ficoll-Hypaque (GE HealthCare), lavadas pelo menos 3 vezes, contadas e plaqueadas conforme os protocolos envolvidos. Por fenotipagem via citometria de fluxo e utilizando anticorpos anti-CD3 e anti-CD4, confirmou-se que mais de 95% das células eram duplo-positivas para estes dois marcadores.

Para ativação, $2{,}5x10^5$ células foram estimuladas com 1 µg/ml anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa de 96 poços de fundo chato em um volume final de 100 µl por 8 a 12h.

3.23 Marcação com CFSE e ensaio de proliferação

Para marcação com CFSE, 1 µM CFSE foi adicionado a suspensões unicelulares de células DO11.10 ou J774 em PBS, numa concentração de $5x10^6$ células/ml. Após 5 min de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 10 vol de PBS 5% FBS, seguidos de centrifugação imediata a 200 g, 5 min a 4 ^oC. Foram feitas no mínimo quatro lavagens em PBS 5% antes da ressuspensão das células em meio de cultura. Para os ensaios de proliferação, as células DO11.10 foram tratadas com diferentes estímulos e após os períodos desejados, a diluição do CFSE nas células-filhas foi analisada por citometria de fluxo. Alternativamente, a marcação com CFSE foi utilizada para discriminação de populações distintas em co-culturas celulares.

3.24 Co-cultura de células J774 e linfócitos T primários

Para avaliação da citotoxicidade de linfócitos T $CD4^+$ contra células J774, foi feita uma co-cultura de células, contendo uma proporção de três linfócitos primários por cada célula J774, num total de $4x10^5$ células/ml. Para a discriminação das populações durante as análises de citometria de fluxo, as células J774 foram marcadas com CFSE (ver protocolo acima). Assim, as células positivas para CFSE são consideradas J774 enquanto as negativas representam os linfócitos T $CD4^+$. As co-culturas foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença ou não de PGE_2.

3.25 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um *software* computacional chamado *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 5. O teste usado foi o ANOVA, seguido pelo teste Tukey. O primeiro tipo de análise foi utilizado para averiguar se o fenômeno observado era resultante da variação entre os diferentes tratamentos e não de uma combinação aleatória. A segunda análise consistiu em comparar tratamentos dois a dois e ver se estes eram significativamente diferentes entre si. Valores de $p<0,01$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 Resultados

4.1 Efeito de sobrenadantes de APCs em hibridomas de linfócitos T DO11.10

Para avaliar a influência das moléculas solúveis produzidas e liberadas por células apresentadoras de antígeno na sobrevivência de linfócitos T, foi inicialmente utilizado um modelo onde hibridomas de linfócitos T DO11.10 foram estimulados com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa, simulando o estímulo de MHC+antígeno no complexo TCR/CD3, levando as células à morte por um processo conhecido como *activation-induced cell death* (AICD) (Shi *et al.*, 1989). Esta morte é dependente da interação entre o CD95 e seu ligante CD95L (Brunner *et al.*, 1995), sendo que o Fas.Fc, derivado de uma fusão entre a porção do receptor CD95 que interage com CD95L e regiões Fc de anticorpos IgG, é capaz de inibir a morte induzida por anticorpos anti-CD3 (Figura 1).

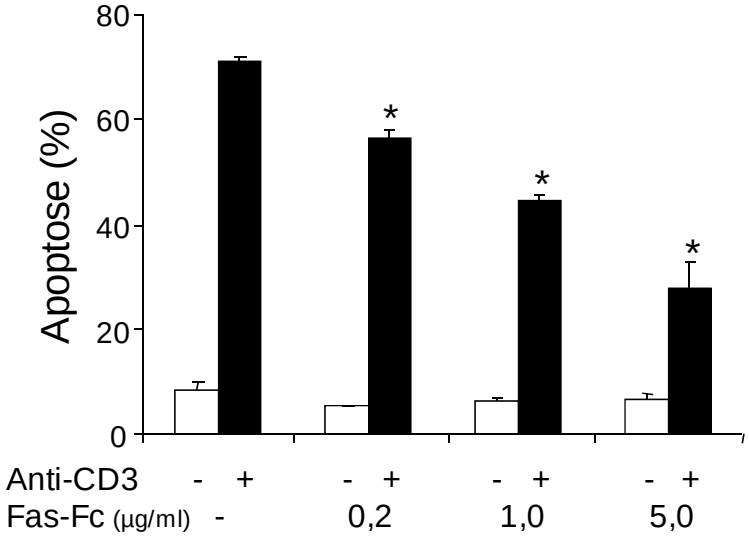

Figura 1. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por Fas-Fc*. Duzentas mil células foram estimuladas ou não por 18h com 1µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços com diferentes concentrações de Fas.Fc (0,2 a 5,0 µg/ml). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Às culturas de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimulados ou não com anticorpos anti-CD3, foram adicionados diferentes sobrenadantes de culturas de macrófagos ou células dendríticas. Primeiramente, sobrenadantes de células J774, uma linhagem macrofágica murina derivada de camundongo fêmea BALB/c, foram gerados através de

cultura de um milhão de células na presença ou ausência de 1 μg/ml de LPS (lipopolisacarídeo bacteriano) derivado de *E. coli*. Estes sobrenadantes foram adicionados aos hibridomas de linfócitos T DO11.10 durante a estimulação destas com anticorpos anti-CD3 e as taxas de apoptose foram analisadas por incorporação de iodeto de propídeo em HFS e citometria de fluxo. Os sobrenadantes de células J774 são inócuos quando adicionados às células DO11.10 não estimuladas (dados não mostrados). Porém, quando as células DO11.10 são induzidas à morte por anticorpos anti-CD3, os sobrenadantes adquirem capacidade inibitória, ou seja, reduzem a taxa de AICD (Figura 2). É interessante notar que este efeito é dose-dependente e que é potencializado pela presença de LPS durante a geração do sobrenadante (Figura 2).

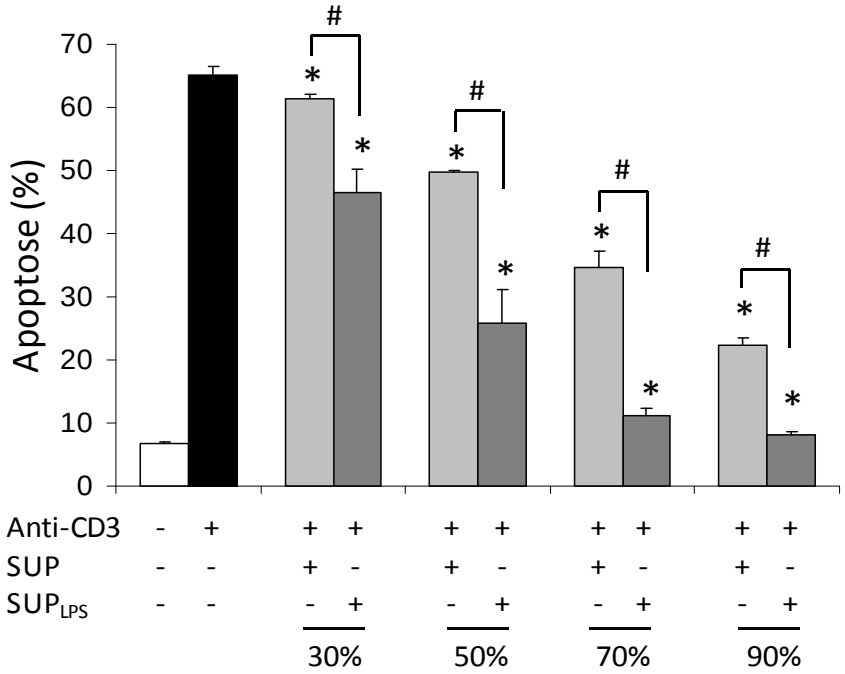

Figura 2. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de J774*. Duzentas mil células foram incubadas por 18h em diferentes concentrações de sobrenadante de J774 na presença ou não de 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células J774 estimuladas ou não com 1 μg/ml LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

A potência dos sobrenadantes também se correlaciona com o tempo da cultura e da incubação com LPS. Sobrenadantes recolhidos após 24h de cultura protegem melhor do que

os sobrenadantes de 4h e, novamente, o tratamento com LPS aumentou o efeito protetor dos sobrenadantes (Figura 3).

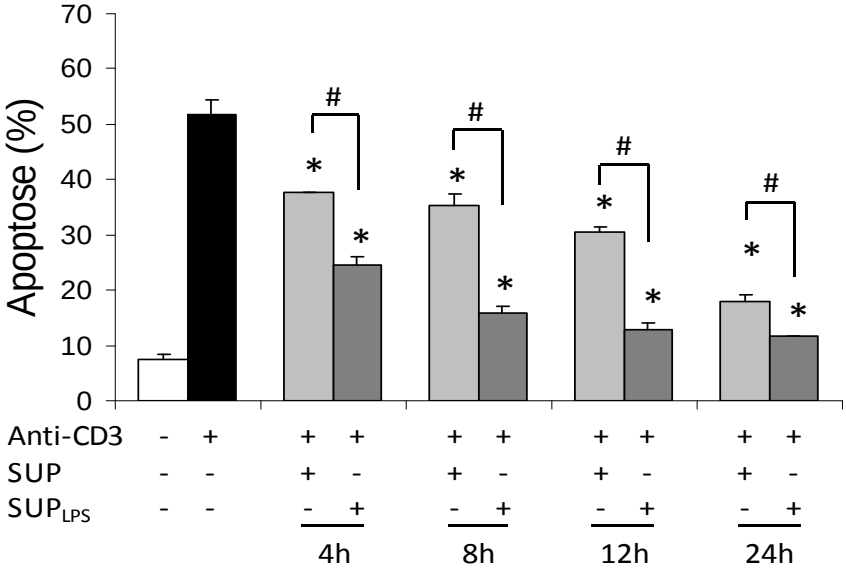

Figura 3. *Cinética de produção do fator de proteção contra AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10 por cultura de células J774*. Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas por 18h com anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença de sobrenadantes de diferentes tempos de cultura de células J774. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por diferentes períodos (4-24h) de um milhão de células J774 estimuladas ou não com 1 μg/ml LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Uma das hipóteses sobre a ação protetora do LPS é que ele agiria diretamente nos hibridomas de linfócitos T DO11.10, sendo que os sobrenadantes somente serviriam como carreadores da endotoxina. Para eliminar esta possibilidade, células DO11.10 foram incubadas diretamente com LPS na mesma concentração utilizada (1 μg/ml) e em condições experimentais iguais ao experimento anterior. Não houve qualquer alteração na taxa de apoptose nestas células (Figura 4), indicando que, mesmo que o LPS seja carreado, a ação inibidora da endotoxina não ocorre diretamente sobre os hibridomas.

Havia também a possibilidade de que o efeito dos sobrenadantes sobre a morte dos hibridomas DO11.10 era através da exaustão de componentes do meio, tais como o soro fetal bovino, fatores de crescimento ou citocinas, causada pela cultura prévia dos das APCs com o mesmo meio. Para descartar esta hipótese, sobrenadantes de cultura de hibridomas de linfócitos T e de células J774 estimulados ou não com 1 μg/ml LPS foram gerados lado a lado utilizando as mesmas condições experimentais e concentrações celulares. Como pode

ser observado na figura 5, somente os sobrenadantes das culturas de J774 protegeram os hibridomas de linfócitos T DO11.10 da morte por AICD, já que os sobrenadantes de cultura de DO11.10 não reduziram as taxas de apoptose.

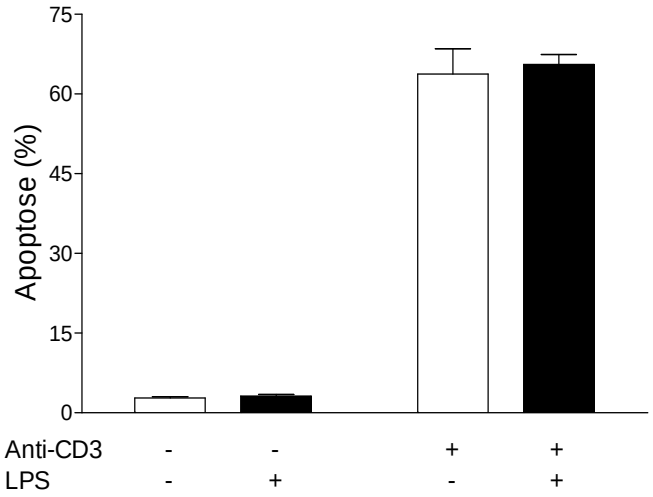

Figura 4. *LPS não influencia diretamente a AICD* de *hibridomas de linfócitos T DO11.10*. Duzentas mil células foram incubadas por 18h na presença ou não de 1μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços e/ou 1 μg/ml de LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão.

Em seguida, foi verificado se o resultado obtido com a linhagem macrofágica J774 se estende também para células do exsudato peritonial recém-isolados de camundongos (PECs) e para células dendríticas derivadas de medula óssea.

Para obtenção dos PECs, as células do peritônio foram recolhidas após quatro dias da injeção de tioglicolato em camundongos C57Bl/6, plaqueadas e, após 4h de incubação, as células não-aderentes foram descartadas. As células aderidas à placa foram denominadas de PECs, sendo que a fenotipagem por CD11b e F4/80 mostrou que aproximadamente 95% das células são macrófagos. Para a derivação de células dendríticas, células da medula óssea foram obtidas e cultivadas por sete dias na presença de GM-CSF. Ao final deste período, as células não aderentes foram descartadas e as células aderentes foram consideradas células dendríticas, já que a fenotipagem utilizando anti-CD11c e CD11b mostrou que a grande maioria das células são duplo-positivas para estes marcadores (dados não mostrados).

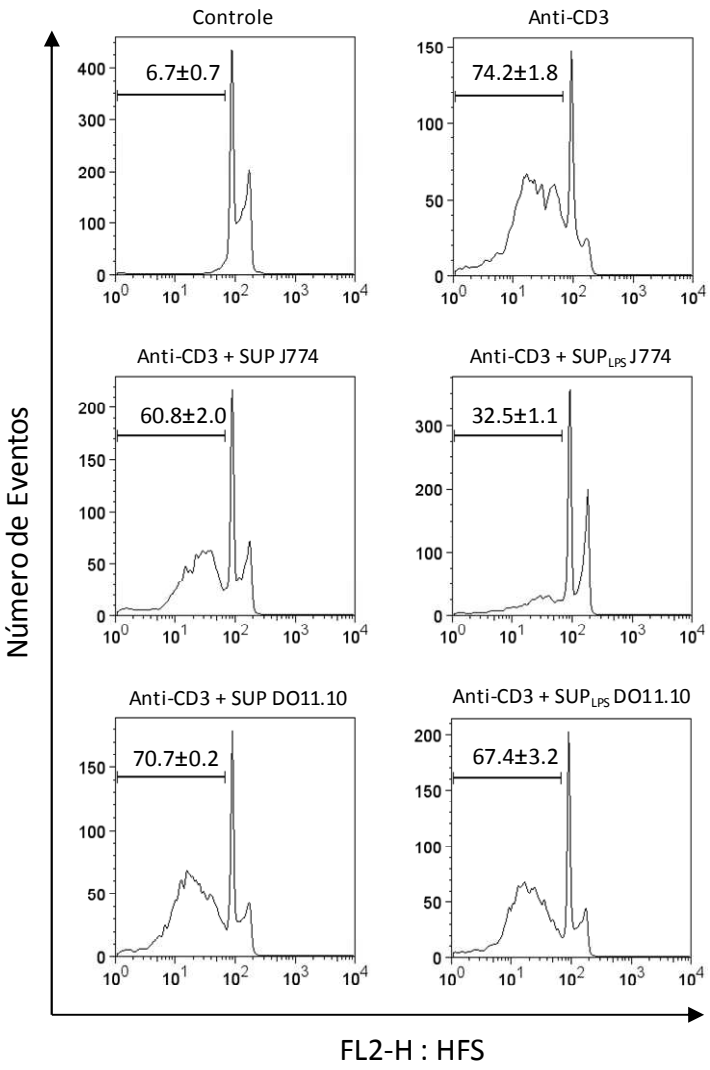

Figura 5. *Sobrenadantes de células J774, mas não de hibridomas de linfócitos T DO11.10, protegem DO11.10 da AICD.* Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas por 18h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença de sobrenadante de cultura de J774 ou DO11.10. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células J774 ou DO11.10 estimuladas ou não com 1 µg/ml LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. Os gráficos ilustram os resultados obtidos para cada tratamento, com a média e o desvio padrão no canto superior direito.

Os PECs e as DCs foram mantidos em cultura por 24 horas na presença ou ausência de 1 µg/ml LPS para geração de sobrenadantes, que foram posteriormente usados em ensaios de AICD. A figura 6 mostra que tanto o sobrenadante dos PECs quanto das dendríticas reduzem a AICD em hibridomas DO11.10. Da mesma forma que em J774, o LPS foi capaz de potencializar a produção do fator inibidor, já que os sobrenadantes derivados de células estimuladas com LPS apresentaram proteção significativamente maior se comparados com os derivados de células não estimuladas.

Os mesmos experimentos foram realizados com sobrenadantes obtidos de diversas culturas de PECs elicitados por tioglicolato, incluindo a linhagem imortalizada de macrófago (P388D1 – originada de camundongo DBA/2) e células do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c, C3H.HePas e 129. Em todos os casos, o padrão de resposta foi o mesmo, ou seja, há um nível basal de proteção conferido pelos sobrenadantes, que é potencializado quando se adiciona LPS à cultura dos PECs (dados não mostrados). Sendo assim, pelo menos *in vitro*, todas as preparações de células macrofágicas testadas são capazes de produzir um fator solúvel que antagoniza a morte de linfócitos T por AICD.

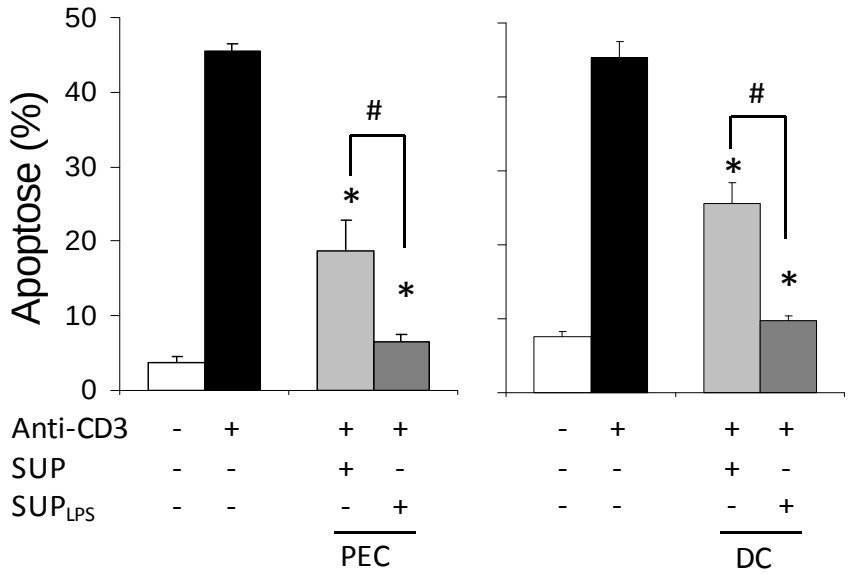

Figura 6. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de* ***(A)*** *PEC ou* ***(B)*** *células dendríticas*. Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas por 18h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de sobrenadante de **(A)** células aderentes do exsudato peritoneal (PEC) ou **(B)** células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos C57Bl/6. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células estimuladas ou não com 1 µg/ml LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Quanto às células dendríticas, foi avaliado se condições diferentes de diferenciação poderiam influenciar na produção do fator inibidor da AICD de linfócitos T. Para tanto, o primeiro passo foi derivar células dendríticas de medula óssea utilizando 20 ng/ml GM-CSF combinado ou não com 100 U/ml IL-4. A proteção conferida pelos sobrenadantes de células dendríticas derivadas nestas duas condições diferentes foi muito similar, tanto para células não estimuladas como para células estimuladas com LPS (Figura 7A).

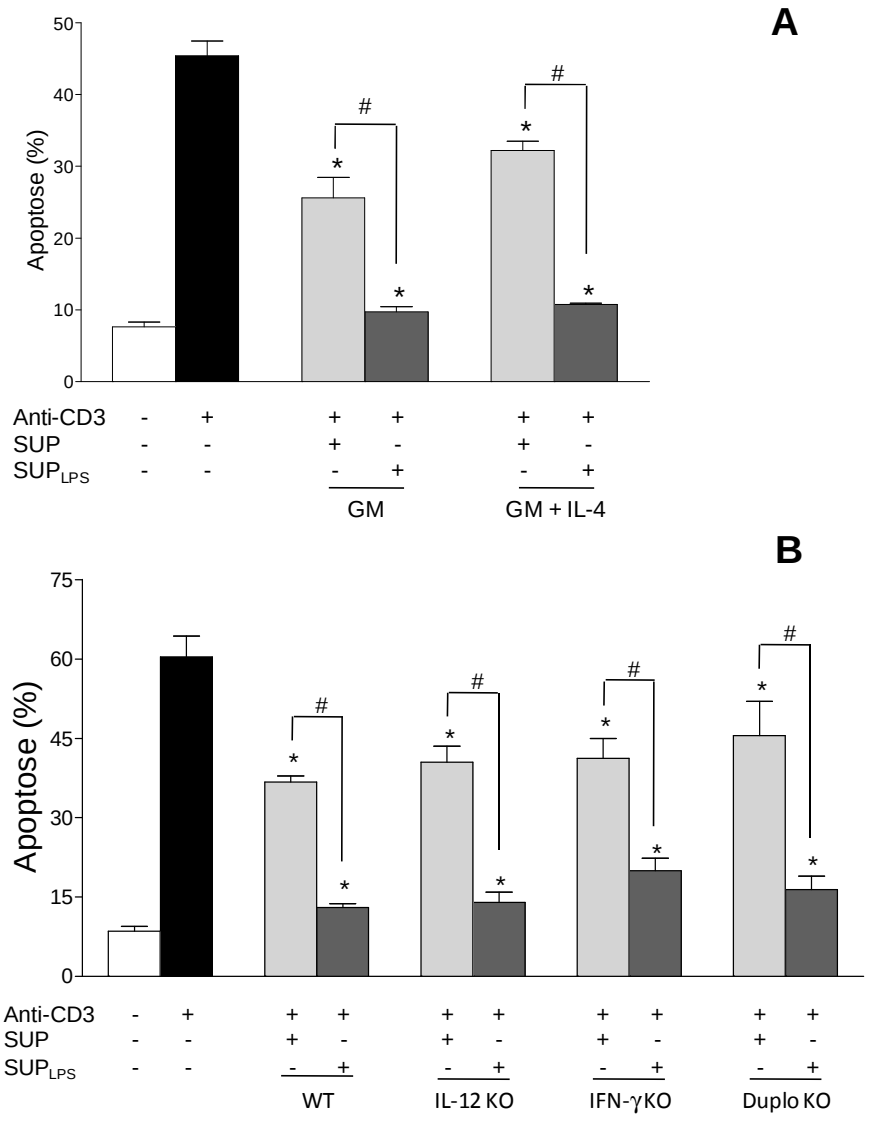

Figura 7. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de células dendríticas*. Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas por 18h com 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de sobrenadante de células dendríticas **(A)** derivadas de medula óssea com GM-CSF ou GM-CSF e IL-4 ou **(B)** derivadas de medula óssea de camundongos C57Bl/6 WT, IL-12 KO, IFN-γ KO e duplo KO. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células estimuladas ou não com 1 μg/ml de LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Como as citocinas IL-12 e IFN-γ podem participar da maturação de células dendríticas (Bastos *et al.*, 2004; Frucht *et al.*, 2001; Puddu *et al.*, 1997), foi avaliado se estas citocinas estavam envolvidas na produção do fator inibidor da AICD de linfócitos T. Células dendríticas foram, então, diferenciadas a partir de medula óssea de camundongos nocautes para IL-12, IFN-γ ou nocautes para ambas as citocinas. Os sobrenadantes destas células, estimuladas ou

não com LPS, foram usados durante ensaios de AICD com hibridomas de linfócitos T DO11.10. A proteção obtida com os sobrenadantes das células dendríticas nocautes não foi diferente da obtida com célula dendríticas derivadas de camundongos selvagens (Figura 7B), indicando que ambas as citocinas não são necessárias para a produção do fator inibidor da morte de linfócitos T.

4.2 Participação dos receptores Toll-Like (TLRs) na produção do fator de inibição da AICD

Com o objetivo de investigar se a ação do LPS no aumento do efeito inibidor dos sobrenadantes de macrófagos e células dendríticas é dependente da sinalização via TLRs e suas moléculas associadas, foram utilizadas diversas linhagens de camundongos nocautes para estas proteínas.

Primeiramente, foram utilizadas duas linhagens de camundongo C3H, sendo que uma delas era deficiente em TLR4 (C3H.HeJ) e a outra era a contra-parte selvagem (C3H.HePas) (Glode *et al.*, 1976). Os sobrenadantes derivados de PECS de ambas as linhagens de camundongos apresentaram a mesma proteção basal contra a AICD. Porém, enquanto os PECs derivados de camundongos selvagens C3H.HePas foram capazes de responder normalmente ao estímulo por LPS, refletido em um aumento da potência do sobrenadante correspondente, os PECs deficientes para TLR4 (C3H.HeJ) foram refratários à ação do LPS, mantendo os mesmos níveis de proteção obtidos com as células não estimuladas (Figura 8). Em conjunto estes dados indicam que a proteção basal conferida pelos sobrenadantes é independente de TLR4 e o aumento deste efeito é dependente de TLR4.

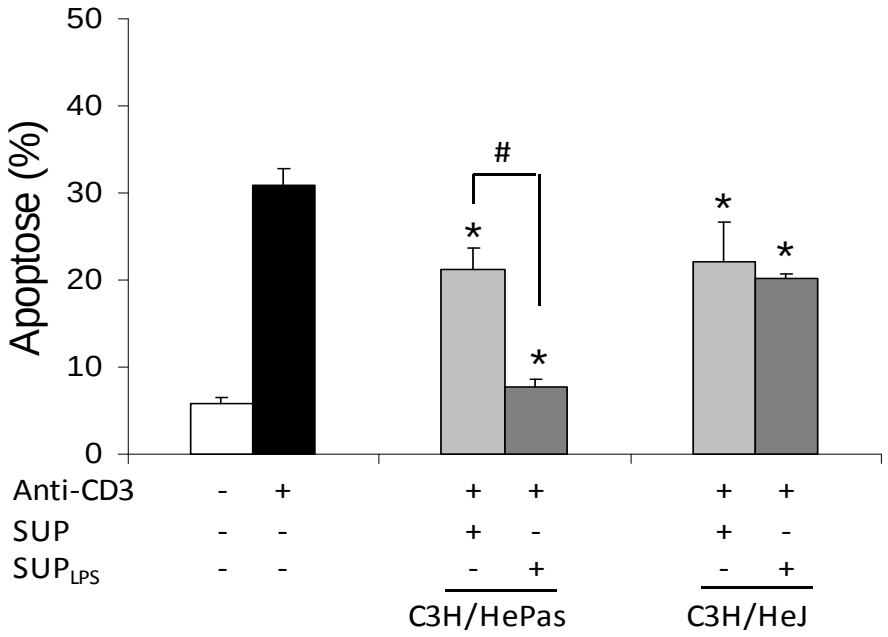

Figura 8. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PECs de camundongos C3H.Pas e C3H.HeJ*. Duzentas mil células foram incubadas por 18h com sobrenadantes de macrófagos na presença ou não de 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de macrófagos de camundongos C3H.HePas ou C3H.HeJ estimulados ou não com 1 μg/ml de LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Dando seqüência aos experimentos, camundongos deficientes em CD14 e TLR2 foram utilizados para elucidar o papel destas moléculas na sinalização por LPS no presente modelo. Camundongos C57Bl/6 foram utilizados como controle por possuírem o mesmo patrimônio genético que as linhagens deficientes. Da mesma forma como descrito acima, macrófagos elicitados por tioglicolato foram recolhidos do peritônio destes animais e mantidos em cultura por 24h na presença ou ausência de LPS. O sobrenadante foi recolhido e testado como inibidor da morte de hibridomas DO11.10 por anticorpos anti-CD3. A deficiência de expressão das moléculas de CD14 ou TLR2 não interferiu no potencial de proteção conferida pelos sobrenadantes dos PECS estimulados com LPS (Figura 9), demonstrando que a sinalização do LPS neste modelo é independente de CD14 e TLR2.

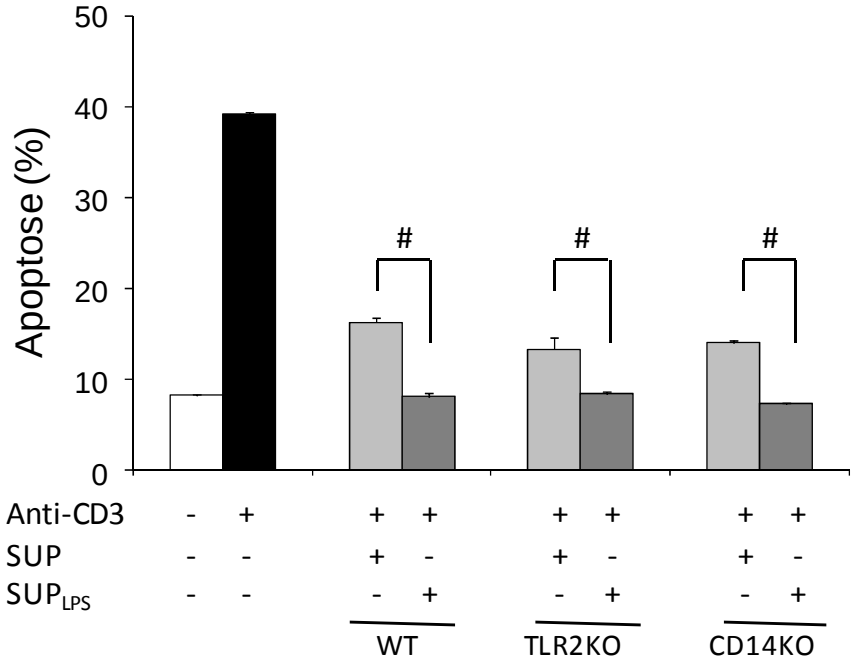

Figura 9. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PECs de camundongos C57Bl/6 WT, TLR2 KO e CD14 KO*. Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas por 18h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de sobrenadante de PECs derivados de camundongos C57Bl/6 WT, TLR2 KO e CD14 KO. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células estimuladas ou não com 1 µg/ml de LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Como a proteína MyD88 é central na sinalização intracelular desencadeada por praticamente todos os TLRs, sua participação na produção do fator inibidor da AICD foi investigada. Para tanto, os sobrenadantes de PECs derivados de camundongos MyD88 nocautes estimulados ou não com LPS foram comparados com os sobrenadantes de PECs derivados de camundongos selvagens. Como pode ser observado na figura 10, a proteção normalmente conferida pelos sobrenadantes foi totalmente perdida quando foram utilizadas células nocautes para MyD88, mesmo quando estimuladas com LPS. Estes resultados indicam que o MyD88 é essencial tanto para a produção basal do fator inibidor da AICD como para a potencialização induzida por LPS.

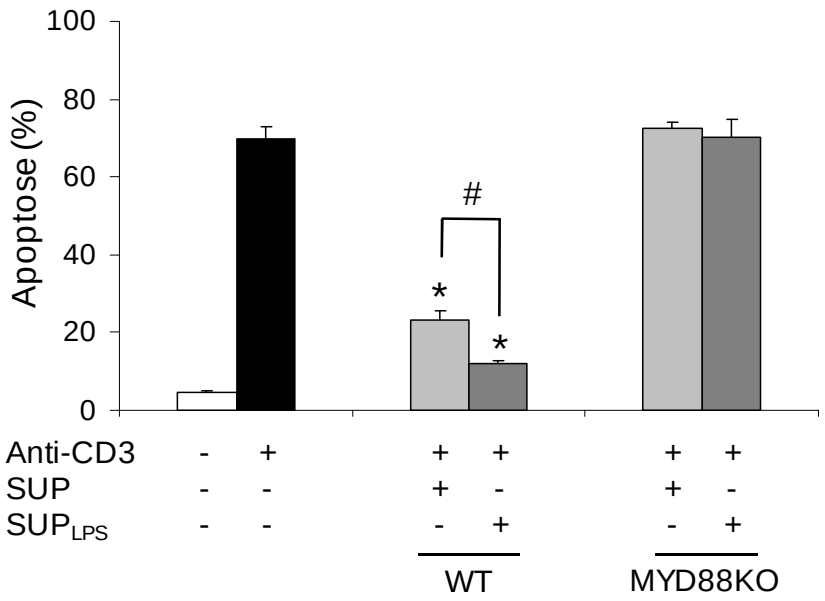

Figura 10. *Inibição de AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10 por sobrenadante de cultura de PECs extraídos de camundongos C57Bl/6 WT e MyD88 KO*. Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas por 18h com 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de sobrenadante de PECs derivados de camundongos C57Bl/6 WT ou MyD88 KO. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células estimuladas ou não com 1 μg/ml de LPS. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

4.3 Caracterização do fator de inibição da AICD presente nos sobrenadantes

Como o efeito do LPS na produção do fator inibidor da AICD via TLR4 é mediado pela ativação de MyD88, um fator de transcrição que modifica o padrão de expressão de vários genes, o próximo passo na caracterização deste componente inibidor foi averiguar se sua produção é dependente de síntese protéica.

Portanto, para investigar a dependência de síntese protéica na produção deste fator, foi usada a cicloheximida (CHX), um inibidor de síntese protéica, durante a obtenção dos sobrenadantes. Como a CHX em altas doses pode induzir apoptose, primeiramente foi feita uma curva dose-resposta quanto à sensibilidade das células à morte por esta droga, para se encontrar a maior dose não-letal passível de ser usada. Como resultado, foi escolhida a concentração de 0,2 μM (Figura 11A).

Esta concentração também foi testada nos hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimulados ou não com anticorpos anti-CD3 (Figura 11B). A CHX não induziu morte nestas células e também não inibiu a morte por estimulação com anticorpos anti-CD3. Este dado é especialmente importante para descartar a possibilidade de que o efeito encontrado com os sobrenadantes de células tratadas com CHX fosse, na verdade, resultante de uma ação direta deste inibidor nos hibridomas DO11.10. A CHX reduziu fortemente os níveis de proteção causados tanto por sobrenadantes de células não estimuladas como também de células estimuladas por LPS (Figura 11C), indicando que ou o fator inibidor é uma proteína ou sua síntese depende de uma proteína recém-sintetizada.

Para aprofundar a caracterização da natureza molecular do fator protetor, sobrenadantes de células J774 estimulados por LPS foram incubados por 15 min a 70 ^{o}C ou tratados com proteinase K para inativação de proteínas. Em ambos os casos, não houve alteração da função protetora dos sobrenadantes (dados não mostrados). Em conjunto com os dados da figura 11C, deduz-se que o efeito protetor não é mediado *per se* por uma proteína, mas a produção deste fator inibidor é dependente de síntese protéica.

Dentre as principais moléculas induzidas pela via de TLR4/MyD88, destaca-se a prostaglandina E_2 (PGE_2), um mediador lipídico anti-inflamatório, cuja síntese depende da expressão da ciclooxigenase-2 (Cox-2), uma proteína fortemente induzida por LPS (Hwang, 2001). Para investigar se a PGE_2 pode ser um dos fatores secretados por macrófagos com capacidade de inibir a AICD de linfócitos T, o primeiro passo foi averiguar se o LPS induzia a expressão de Cox-2 e se esta expressão era funcional, ou seja, se havia a produção de prostaglandinas.

Extratos celulares de J774 (Figura 12A) e de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 (dados não mostrados) foram feitos a partir da cultura destas células na presença ou não de 1 μg/ml LPS por 24h e analisados através de *western blot,* utilizando anticorpos anti-Cox-2. Os sobrenadantes destas culturas também foram utilizados para se avaliar a concentração de PGE_2 secretada através da técnica de ELISA (Figura 12B). Como pode ser observado, houve um forte aumento na expressão de Cox-2 nas células estimuladas com LPS, que se correlaciona diretamente com uma maior concentração de PGE_2 encontrada no sobrenadante correspondente. Estes dados indicam que há uma produção basal de PGE_2 e que o LPS potencializa a produção e secreção deste mediador lipídico.

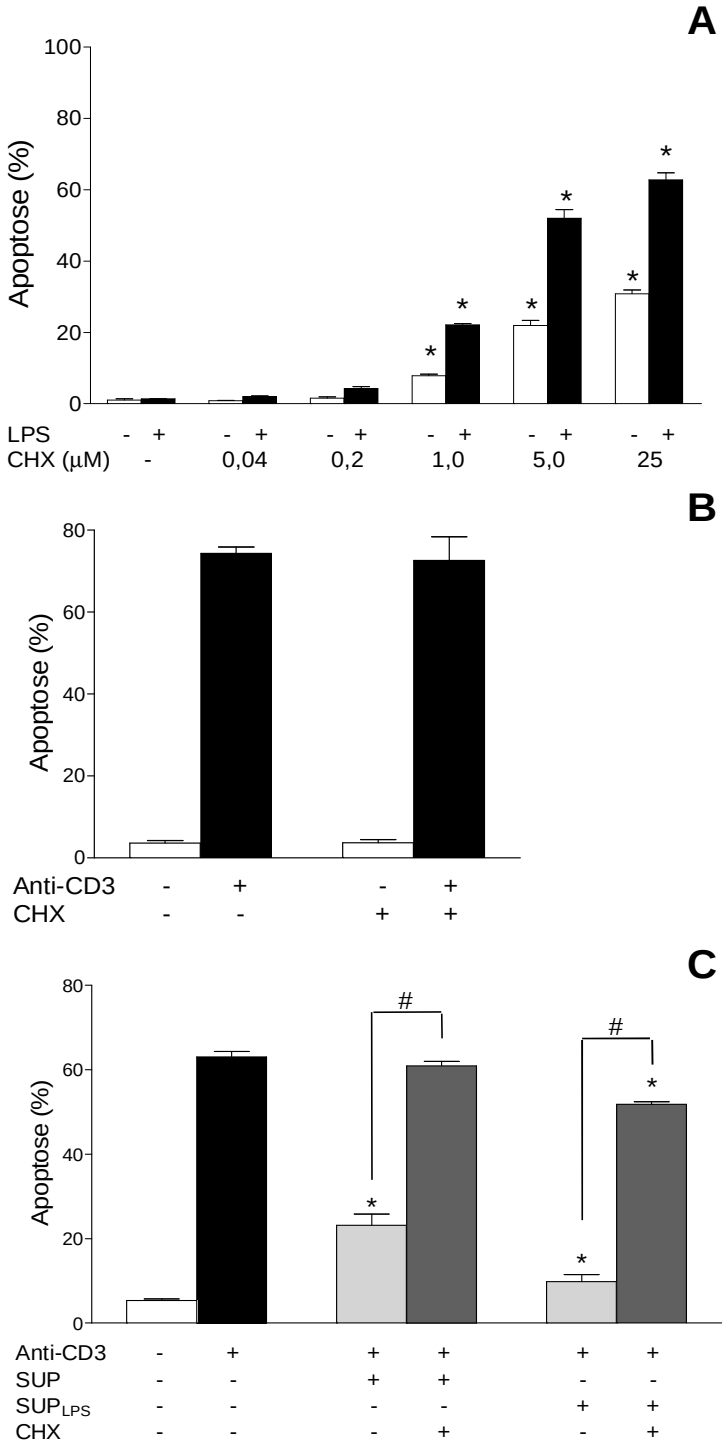

Figura 11. *Efeito da cicloheximida na sobrevida de células J774 e na inibição de AICD em hibridomas DO11.10*. **(A)** Um milhão de células J774 foram estimuladas ou não com 1 μg/ml de LPS por 24h em placas de 24 poços. Diferentes doses de cicloheximida (CHX) foram adicionadas durante às culturas, que foram analisadas quanto à taxa de morte induzida por CHX. **(B-C)** Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas ou não com anticorpos anti-CD3 adsorvidos a placas de 96 poços na presença ou não de **(B)** 0,2 μM CHX ou **(C)** sobrenadantes de macrófagos. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com 1μg/ml de LPS, na presença ou não de 0,2 μM CHX. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células (A) não-estimuladas ou (B-C) estimuladas com anti-CD3 e (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

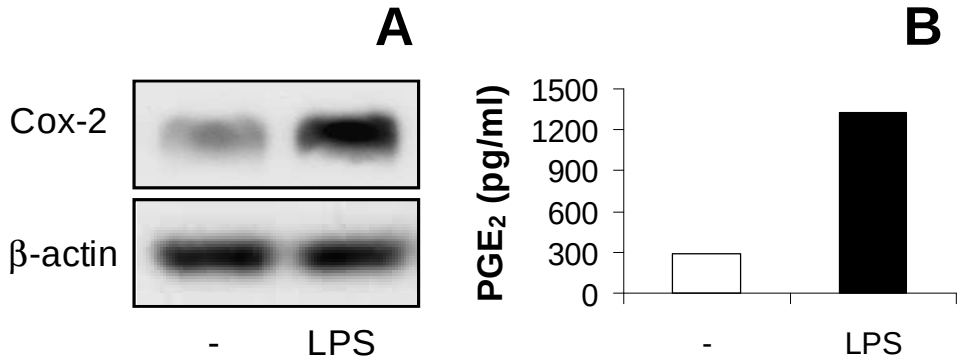

Figura 12. *Indução da expressão de ciclooxigenase-2 (Cox-2) e secreção de prostaglandina E_2 (PGE_2) induzida por LPS*. **(A)** Quantificação da expressão de Cox-2 por *western blot* em células J774 estimuladas ou não com 1 μg/ml LPS por 24h. **(B)** Quantificação de PGE_2 nos sobrenadantes. Um milhão de macrófagos peritoneais de C57Bl/6 foram cultivados com ou sem estímulo de 1 μg/ml LPS em placa de 24 poços. Os sobrenadantes foram recolhidos após 24h e as células foram processadas para se obter o extrato total. O extrato das células foi analisado por *western blot*, utilizando-se anticorpos anti-Cox-2 para quantificação de Cox-2 e anticorpos anti-actina como controle da quantidade de proteína carregada no gel. Os sobrenadantes foram dosados por ELISA através de kit comercial, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para verificar se a PGE_2 é um dos componentes ou o componente presente nos sobrenadantes com propriedades inibitórias da AICD, foram utilizados três diferentes inibidores da produção de prostaglandinas durante a produção dos sobrenadantes – a indometacina, o NS398 e o AACOCF3 – sendo que cada um destes inibidores age de maneira distinta. A indometacina age bloqueando a ação tanto da Cox-1 quanto da Cox-2 (Seibert *et al.*, 1997; Tavares e Bennett, 1993). O NS398 é um inibidor específico para Cox-2 (Futaki *et al.*, 1994) e o $AACOCF_3$ (*arachidonyltrifluoromethane*) bloqueia o metabolismo total do ácido araquidônico, por suprimir a atividade da fosfolipase A2 (PLA_2) (Fukunaga *et al.*, 1996). Parte dos sobrenadantes foi utilizada para a dosagem de PGE_2 e outra parte foi utilizada em ensaios de AICD, sendo que os resultados estão compilados na figura 13.

As três drogas diminuíram drasticamente a concentração de PGE_2 nos sobrenadantes das células J774 estimuladas por LPS, demonstrando que estes inibidores estão funcionando e exercendo corretamente suas funções (Figura 13A). Estes sobrenadantes com baixas concentrações de PGE_2 apresentaram uma forte redução na capacidade protetora (Figura 13B). Em conjunto, estes resultados fortalecem a hipótese que a PGE_2 é um dos fatores (ou o fator) secretados por PECs e DCs que age na supressão da morte de hibridomas de linfócitos T por AICD.

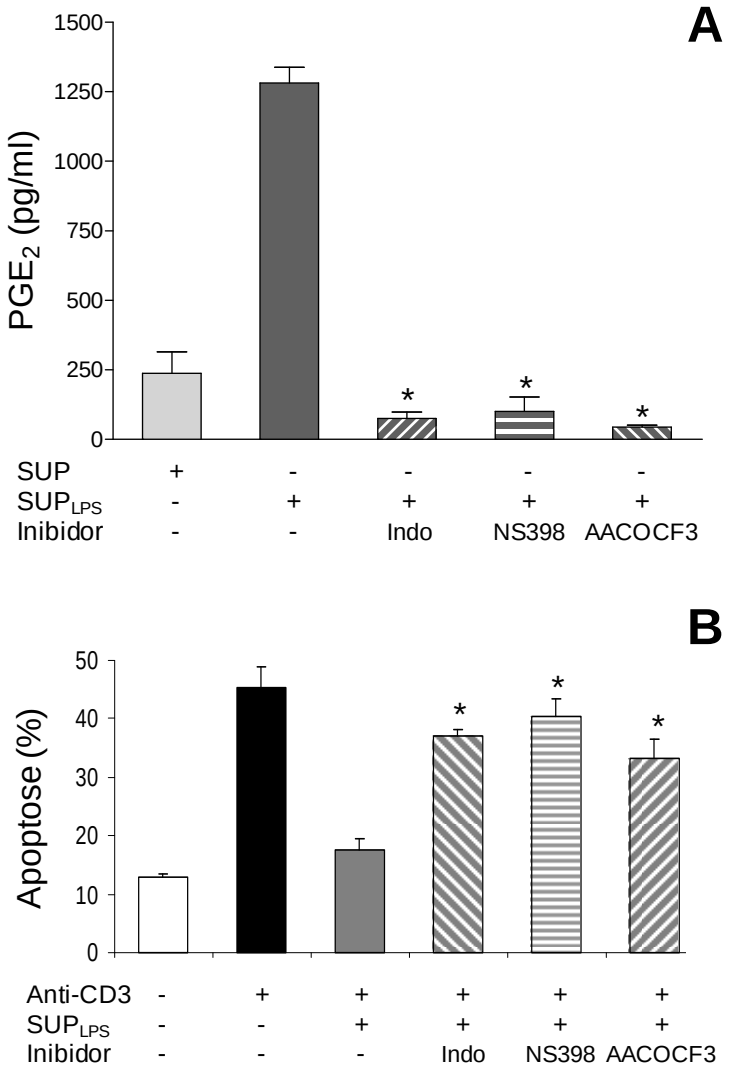

Figura 13. *Influência de inibidores do metabolismo de ácido aracdônico na secreção de PGE_2 em células J774 e na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*. **(A)** Um milhão de células J774 foram cultivados com ou sem estímulo de LPS 1 µg/ml em placa de 24 poços. Trinta minutos antes do estímulo por LPS a cultura de células foi tratada com diferentes drogas inibidoras de enzimas da via de metabolismo do ácido aracdônico: 10 µg/ml Indometacina, 10 µM NS398 ou 10 µM AACOCF3. **(B)** Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas ou não com anticorpos anti-CD3 adsorvidos a placas de 96 poços na presença dos diferentes sobrenadantes gerados em (A). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação ao SUP_{LPS}. $p<0,01$.

Após mostrar que os sobrenadantes com níveis reduzidos de PGE_2 perdem grande parte do seu potencial protetor (Figura 13), o passo seguinte foi avaliar se a adição de PGE_2 sintética era capaz de mimetizar os efeitos dos sobrenadantes no bloqueio da AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10. Os hibridomas DO11.10 que foram estimulados por anticorpos anti-CD3 foram protegidos da AICD na presença de PGE_2, de forma dose-dependente (Figura 14), mais uma vez mostrando que o efeito do sobrenadante é, pelo menos, em grande parte, mediado por PGE_2.

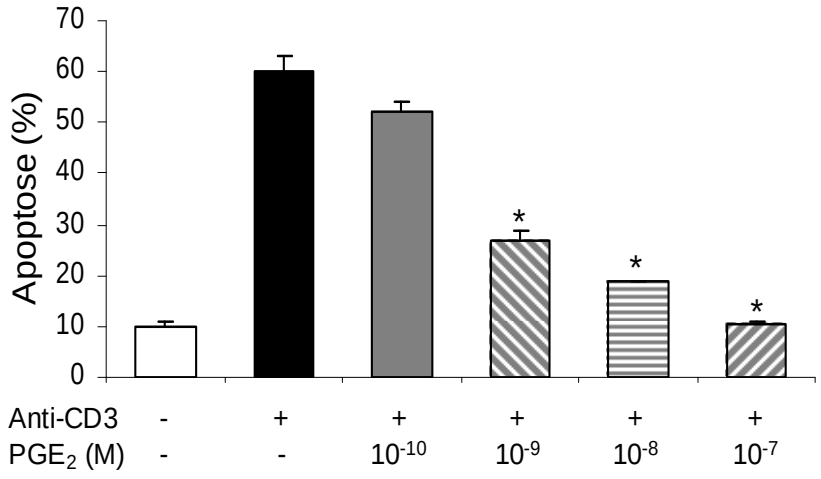

Figura 14. *Prostaglandina E_2 (PGE_2) inibe a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*. Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas ou não com anticorpos anti-CD3 adsorvidos a placas de 96 poços por 18h na presença de diferentes concentrações de PGE_2 (10^{-10} a 10^{-7} M). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Até este momento, todos os experimentos de proteção contra a AICD haviam sido feitos utilizando-se um período de estimulação com anticorpos anti-CD3 não superior à 18h. Para analisar se a PGE_2 e, conseqüentemente, os sobrenadantes, conferiam uma proteção a longo prazo e não somente um atraso na indução de apoptose foi feita uma cinética de até 48h de estimulação com anticorpos anti-CD3 na presença ou não de PGE_2. Mesmo após dois dias de incubação, a PGE_2 continuou efetiva, reduzindo significativamente as taxas de apoptose induzidas por anticorpos anti-CD3 (Figura 15). As células sobreviventes da estimulação com anti-CD3 na presença de PGE_2 foram lavadas e replaqueadas em cultura, mostrando-se viáveis e apresentado taxas normais de crescimento (dados não mostrados).

Como existem relatos na literatura mostrando que, em alguns casos, a AICD ocorre somente se a célula entra em mitose (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999; Fotedar *et al.*, 1995) e a PGE_2 foi descrita como um fator anti-proliferativo (Chouaib *et al.*, 1985; Klingemann *et al.*, 1986; Okano *et al.*, 2006), havia a possibilidade que o efeito da PGE_2 não era diretamente no mecanismo de indução de morte e sim por inibição do ciclo celular. Portanto, para saber se este mediador lipídico exerce ação anti-proliferativa nos hibridomas de linfócitos T DO11.10, as células foram coradas com CFSE, (um corante vital que se divide igualmente entre as células-filhas geradas de uma mitose), tratadas ou não com 10^{-7} M PGE_2 e analisadas em

diferentes tempos de incubação (12, 24, 36 e 48h). A figura 16A mostra que a PGE_2 não altera a proliferação destas células em qualquer um dos tempos observados.

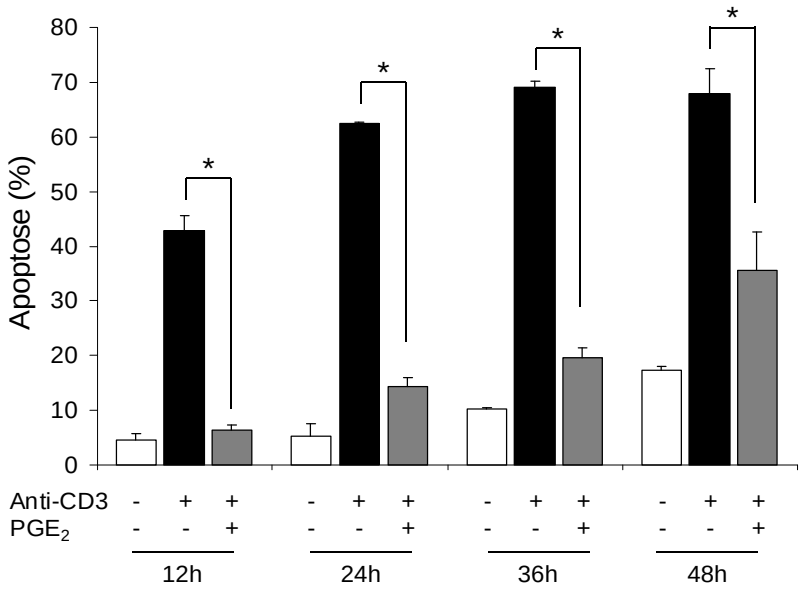

Figura 15. *PGE_2 é capaz de inibir por tempo prolongado a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10.* Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas ou não por 12h, 24h, 36h ou 48h com anticorpos anti-CD3 adsorvidos a placas de 96 poços na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. (#): estatisticamente significativo entre as amostras demarcadas. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Como existem relatos na literatura mostrando que, em alguns casos, a AICD ocorre somente se a célula entra em mitose (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999; Fotedar *et al.*, 1995) e a PGE_2 foi descrita como um fator anti-proliferativo (Chouaib *et al.*, 1985; Klingemann *et al.*, 1986; Okano *et al.*, 2006), havia a possibilidade que o efeito da PGE_2 não era diretamente no mecanismo de indução de morte e sim por inibição do ciclo celular. Portanto, para saber se este mediador lipídico exerce ação anti-proliferativa nos hibridomas de linfócitos T DO11.10, as células foram coradas com CFSE, (um corante vital que se divide igualmente entre as células-filhas geradas de uma mitose), tratadas ou não com 10^{-7} M PGE_2 e analisadas em diferentes tempos de incubação (12, 24, 36 e 48h). A figura 16A mostra que a PGE_2 não altera a proliferação destas células em qualquer um dos tempos observados.

Em uma segunda abordagem, os hibridomas DO11.10 corados com CFSE foram estimulados com anticorpos anti-CD3 na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2 e analisadas após

48h de cultura (Figura 16B). Nestas condições, a PGE_2 também não causa redução na proliferação celular. Como controle da inibição de proliferação, hibridomas DO11.10 foram tratados com cicloheximida, que resultou numa inibição significativa da divisão celular.

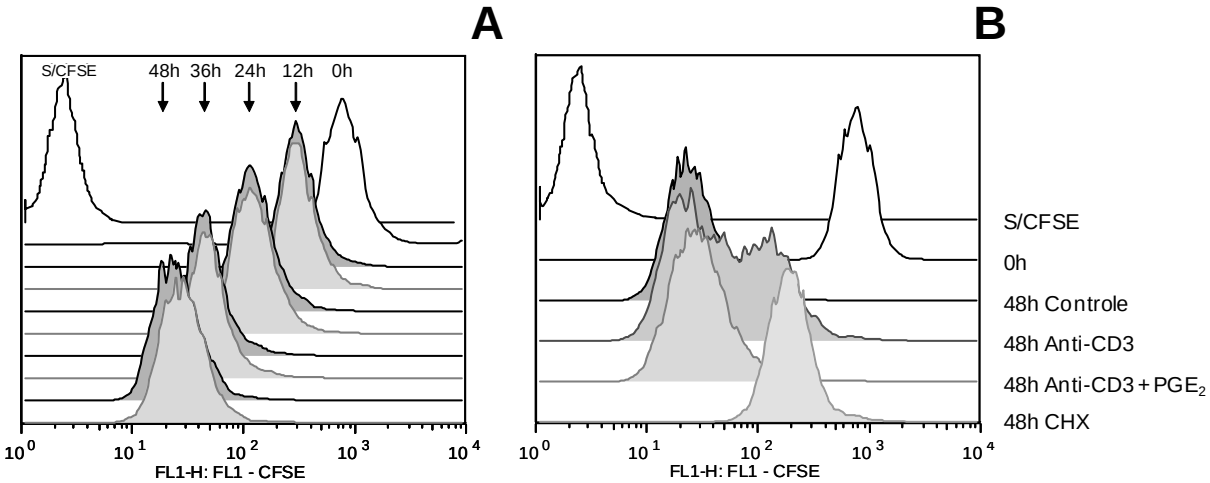

Figure 16. *PGE_2 não afeta a proliferação dos hibridomas de linfócitos T DO11.10.* **(A)** Meio milhão de células DO11.10 foram marcadas com CFSE e incubadas na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2 por 12h, 24h, 36h e 48h. Após os períodos apropriados, a diluição do CFSE foi analisada através de citometria de fluxo. Cinza escuro: células não tratadas. Cinza claro: células tratadas com PGE_2. **(B)** Meio milhão de células DO11.10 foram marcadas com CFSE e estimuladas ou não por 48h com 1 µg/ml anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. Como controle de inibição de ciclo celular, células DO11.10 foram tratadas com 0,4 µg/ml of cicloheximida (CHX). Após 48h, a diluição do CFSE foi analisada através de citometria de fluxo.

4.4 Efeito da PGE_2 e dos sobrenadantes na via mediada por CD95/CD95L

O passo seguinte foi entender como a PGE_2 derivada dos diferentes sobrenadantes de culturas de PECs ou DCs agem para evitar a morte de células DO11.10 por estimulação via anticorpos anti-CD3. Uma possibilidade é que podem agir alterando a expressão gênica/protéica de moléculas associadas aos eventos iniciais da AICD, tais como o CD95L, CD95 e FLIP. Sendo assim, a expressão de moléculas que participam da via de CD95 foram analisadas através da técnica de RT-PCR. Para tanto, as células foram incubadas por um período de duas horas com as diversas combinações entre anticorpos anti-CD3 e sobrenadantes de cultura celulares estimuladas ou não com LPS. Em seguida, o RNA destas amostras foi extraído e convertido para cDNA para análise da expressão gênica.

Inicialmente, foram usados os sobrenadantes de PECs de camundongos C57Bl/6 estimulados (SUP_{LPS}) ou não (SUP) com 1 µg/ml LPS (Figura 17). A expressão da molécula

CD95 não sofreu alterações significativas em nenhum dos tratamentos nos diversos experimentos realizados, indicando que, ao menos transcripcionalmente, a regulação da expressão da molécula de CD95 não parece ser importante para o processo de inibição da AICD (Figura 17B).

A molécula de FLIP tampouco variou de forma a explicar a inibição da morte por sobrenadantes de PECs (Figura 17C). O pequeno aumento obtido na incubação com anti-CD3 não se repetiu em todos os experimentos realizados (dados não mostrados). De qualquer modo, este aumento não foi potencializado pela adição dos sobrenadantes, o que descarta a modulação transcripcional de FLIP como sendo o mecanismo de inibição de morte.

O padrão de expressão gênica encontrado para a molécula CD95L foi mais condizente com os níveis de AICD nos diferentes tratamentos (Figura 17A). Esta molécula, ausente na condição controle, foi fortemente induzida por anticorpos anti-CD3. Porém, na presença de SUP de PEC, os níveis de expressão de CD95L induzidas por anti-CD3 foram reduzidos, sendo que esse efeito foi muito mais pronunciado se usado o SUP_{LPS}.

Em seguida, os mesmos experimentos foram realizados utilizando-se sobrenadantes de células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos de C57Bl/6 estimulados (SUP_{LPS}) ou não (SUP) com 1 μg/ml LPS. Os resultados foram muito similares aos encontrados com os sobrenadantes de PEC, ou seja, CD95 e FLIP não exibem modulação significativa pelos diferentes tratamentos, enquanto que o CD95L é induzido fortemente pelo anti-CD3, que é antagonizado pelo SUP de DC e, de maneira ainda mais potente, pelo SUP_{LPS} de DC (Figura 18).

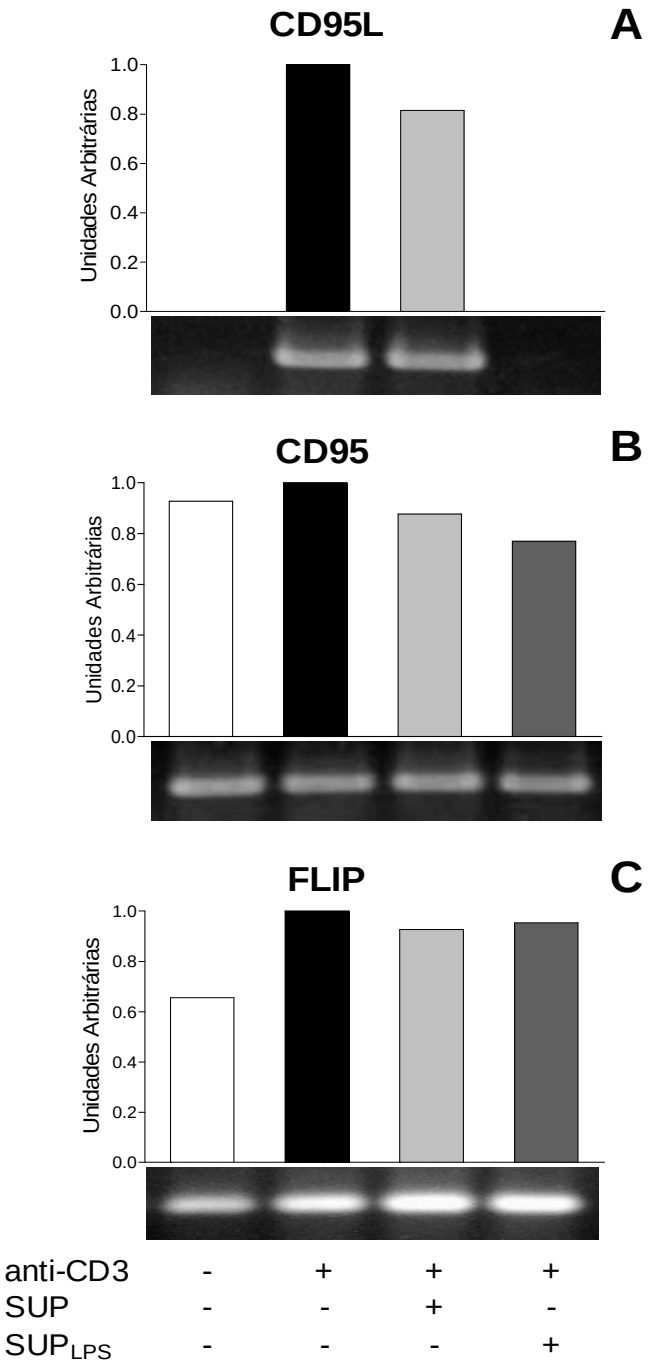

Figura 17. *Influência dos sobrenadantes de PECs na expressão gênica de CD95L, CD95 e FLIP de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimuladas por anticorpos anti-CD3*. Um milhão de células DO11.10, distribuídas em cinco poços, foram incubadas por 2h com sobrenadantes de macrófagos na presença ou não de 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de PECs de camundongos C57Bl/6 estimuladas (SUP_{LPS}) ou não (SUP) com 1 μg/ml de LPS. As amplificações das moléculas de **(A)** CD95L, **(B)** CD95 e **(C)** FLIP foram feitas com temperatura de anelamento (TA) de 64 °C, 66 °C e 60 °C e 33, 28 e 30 ciclos, respectivamente. Seguiu-se o protocolo descrito na seção "materiais e métodos". Os valores estão normalizados em relação à segunda coluna, que corresponde ao tratamento somente com anticorpos anti-CD3. Os valores estão também normalizados pelo valor correspondente da amplificação de actina.

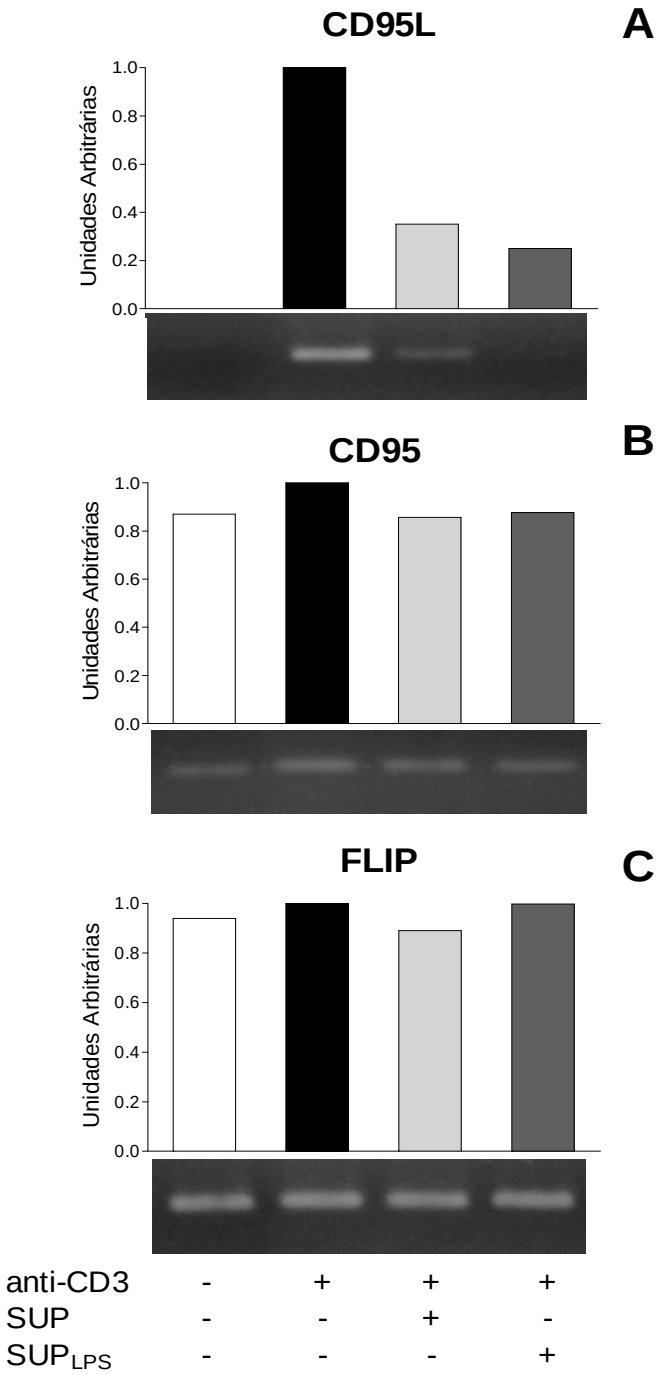

Figura 18. *Influência dos sobrenadantes de células dendríticas na expressão gênica de CD95L, CD95 e FLIP de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimuladas por anticorpos anti-CD3*. Um milhão de células DO11.10, distribuídas em cinco poços, foram incubadas por 2h com sobrenadantes de macrófagos na presença ou não de 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de células dendríticas derivadas de camundongos C57Bl/6 estimuladas (SUP_{LPS}) ou não (SUP) com 1 μg/ml de LPS. As amplificações das moléculas de **(A)** CD95L, **(B)** CD95 e **(C)** FLIP foram feitas com temperatura de anelamento (TA) de 64 ^{o}C, 66 ^{o}C e 60 ^{o}C e 33, 28 e 30 ciclos, respectivamente. Seguiu-se o protocolo descrito na seção "materiais e métodos". Os valores estão normalizados em relação à segunda coluna, que corresponde ao tratamento somente com anticorpos anti-CD3. Os valores estão também normalizados pelo valor correspondente da amplificação de actina.

Estes resultados, portanto, sugerem fortemente que o mecanismo utilizado pelos sobrenadantes de PECs e DCs para inibir a morte por AICD é a inibição da expressão de CD95L, alçando a regulação transcripcional da molécula CD95L a um lugar central no controle da vida e morte dos linfócitos T durante a estimulação do complexo TCR/CD3.

Como anteriormente foi demonstrado que o principal fator presente nos sobrenadantes responsável pela inibição da AICD em hibridomas de linfócitos T é a PGE_2 (Figuras 13 e 14), o passo seguinte foi investigar se a PGE_2 era realmente a responsável pela inibição da expressão de CD95L. Com este objetivo, hibridomas DO11.10 foram estimulados com anticorpos anti-CD3 na presença de diferentes concentrações de PGE_2 (10^{-8} a 10^{-6} M) por 2h seguido de extração de RNAm e síntese de cDNA, para análise da expressão gênica por RT-PCR.

Se for correta a premissa de que um dos principais mecanismos de bloqueio da AICD pelos sobrenadantes é via inibição da indução de CD95L pela PGE_2 presente nos mesmos, a adição de PGE_2 sintética deveria repetir este padrão. E é justamente isto que foi encontrado (Figura 19). A inibição da expressão gênica de CD95L induzida por anticorpos anti-CD3 foi diretamente proporcional à concentração utilizada de PGE_2 exógena. Além disso, a PGE_2 não alterou a transcrição de CD95 e FLIP, o que está de acordo com os dados previamente obtidos com os sobrenadantes (Figuras 17 e 18).

Segundo os relatos na literatura, o principal ponto de regulação da expressão da molécula de CD95L é no nível transcripcional, sendo que a expressão protéica normalmente reflete as variações ocorridas durante a transcrição (Pinkoski e Green, 1999). Porém, existem diversos mecanismos de regulação pós-transcripcionais e pós-traducionais que poderiam interferir na quantidade real de moléculas de CD95L presentes na superfície das células. Como a AICD ocorre justamente pela ligação entre as moléculas de CD95 e CD95L na membrana celular, é de extrema importância avaliar se a expressão de CD95L é, de alguma forma, alterada por estes mecanismos pós-transcripcionais. Além disso, mesmo na ausência destes mecanismos, a análise da expressão protéica é relevante, pois pode reforçar os dados obtidos com análise da expressão gênica.

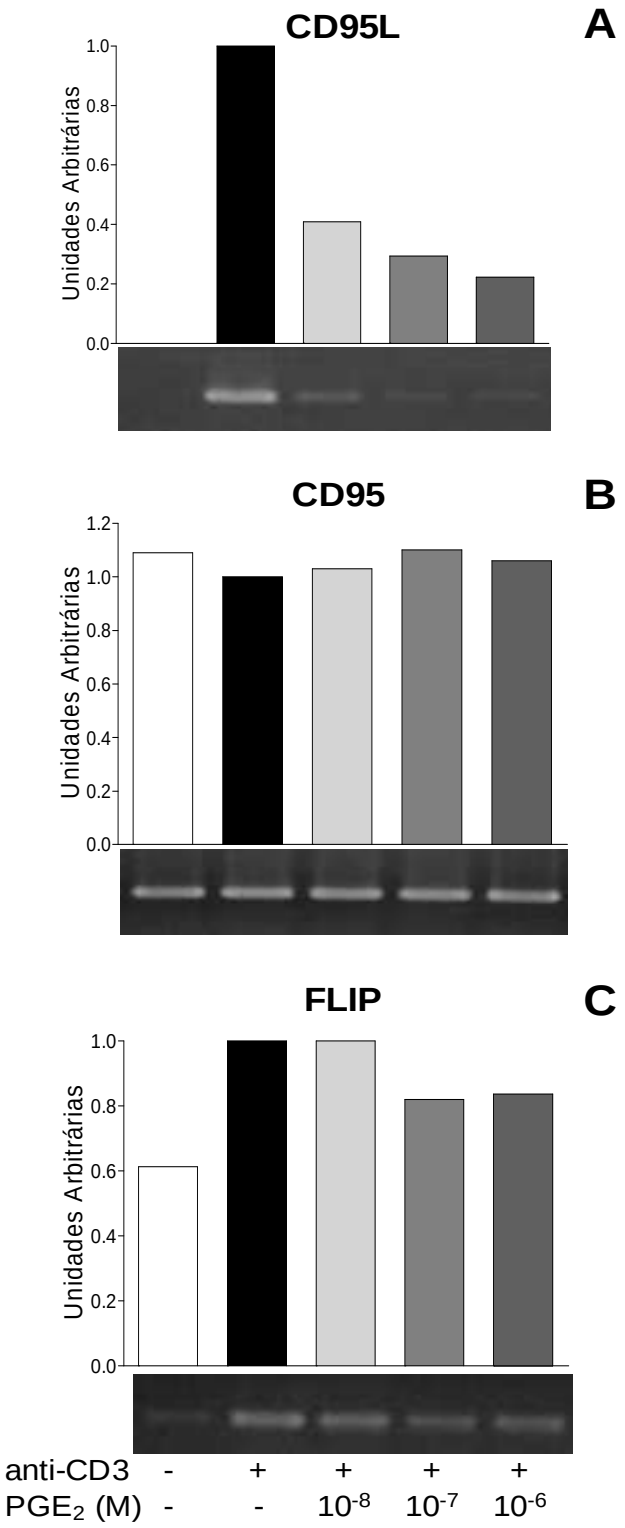

Figura 19. *PGE_2 recombinante inibe a expressão gênica de CD95L mas não de CD95 e FLIP de hibridomas de linfócitos T DO11.10 estimuladas por anticorpos anti-CD3*. Um milhão de células DO11.10, distribuídas em cinco poços, foram estimuladas por 2h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços, na presença de diferentes concentrações de PGE_2 (10^{-6} a 10^{-8} M). As amplificações das moléculas de CD95L, CD95 e FLIP foram feitas com temperatura de anelamento (TA) de 64 °C, 66 °C e 60 °C e 33, 28 e 30 ciclos, respectivamente. Seguiu-se o protocolo descrito na seção "materiais e métodos". Os valores estão normalizados em relação à segunda coluna, que corresponde ao tratamento somente com anticorpos anti-CD3. Os valores estão também normalizados pelo valor correspondente da amplificação de actina.

Sendo assim, os hibridomas de linfócitos T DO11.10 foram incubados por 8h com anticorpos anti-CD3 na presença ou não de sobrenadantes derivados de PEC estimulados com 1 μg/ml LPS ou 10^{-7} M PGE_2. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD95L.PE, fixadas e analisadas através de citometria de fluxo. Como estas células não foram permeabilizadas, a intensidade de fluorescência reflete a expressão de CD95L na superfície celular.

A figura 20 mostra que a estimulação por anticorpos anti-CD3 foi capaz de aumentar significativamente a expressão de CD95L. Quando a estimulação das células por anticorpos anti-CD3 foi acompanhada da adição de sobrenadante de culturas de PECs estimulados com LPS (SUP_{LPS}) ou de células dendríticas (dados não mostrados), houve uma forte redução da expressão de CD95L. O mesmo resultado foi encontrado quando se adicionou 10^{-7} M PGE_2.

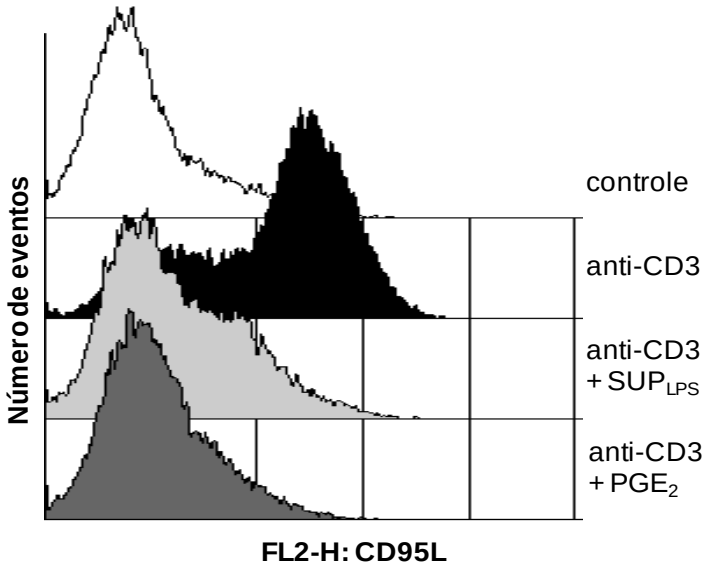

Figura 20. *Sobrenadantes de cultura de PECs e PGE_2 inibem a expressão protéica de CD95L em hibridomas de linfócitos T DO11.10*. As células foram estimuladas por 8h com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa e incubados com sobrenadante derivados de culturas de PECs estimuladas com 1 μg/ml LPS ou 10^{-7} M PGE_2 recombinante. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído, marcadas com anticorpos anti-CD95L.PE e analisadas através de imunofluorescência por citometria de fluxo. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

Todos os resultados obtidos em relação à expressão protéica de CD95L estão em concordância com os dados obtidos para a expressão gênica desta molécula. Desta forma, não paira dúvidas de que a PGE_2, seja ela sintética ou derivada dos sobrenadantes de PECs ou DCs, é capaz de inibir a principal via de indução de AICD, que é o aumento de expressão de CD95L.

Por fim, se o bloqueio da AICD conferido pelos SUPs ocorre somente pela inibição da expressão do CD95L, estes mesmos sobrenadantes não deveriam ser capazes de inibir a estimulação feita diretamente no receptor CD95 ou em qualquer ponto posterior. Por outro lado, caso a proteção ocorresse, ficaria demonstrado que há mais de um ponto de modulação da AICD pelos sobrenadantes. Portanto, com o objetivo de se estudar a influência dos sobrenadantes na via de indução de morte iniciada pela ativação do receptor CD95, anticorpos agonistas anti-CD95 (clone Jo2) foram adicionados a culturas de células DO11.10, conjuntamente com sobrenadantes de J774 (Figura 21A) ou de macrófagos peritoniais de camundongos 129 (Figura 21B). A estimulação com o anti-CD95 induziu morte de forma estatisticamente significativa em células DO11.10. Porém, diferentemente do que foi observado durante o estímulo com anticorpos anti-CD3, os sobrenadantes não foram capazes de antagonizar a morte induzida por anticorpos anti-CD95. Na verdade, o que ocorreu foi justamente o contrário. Tanto os sobrenadantes de células estimuladas com LPS quanto os sobrenadantes de culturas não-estimuladas exacerbaram as taxas de apoptose de forma estatisticamente significativa (Figura 21). Sobrenadantes de culturas de PECs de diversas linhagens de camundongos, como BALB/c e C57Bl/6, foram testadas, apresentando resultados muito semelhantes (dados não mostrados).

Restava saber se o efeito potencializador da morte das células DO11.10 por anticorpos anti-CD95 pelos sobrenadantes também era causada pela prostaglandina E_2 ou se este efeito era gerado por algum outro composto secretado pelos PECs. Para tanto, células DO11.10 foram estimuladas com anticorpos anti-CD95 na presença de diversas concentrações de PGE_2 sintética e as taxas de apoptose avaliadas após 18h de cultura. Como pode ser observado na figura 22, a PGE_2 aumentou a taxa de morte causada pelos anticorpos anti-CD95 da mesma forma que ocorreu com os sobrenadantes, sugerindo que a PGE_2 presente nos sobrenadantes é responsável também pela exacerbação da morte causada pelos sobrenadantes.

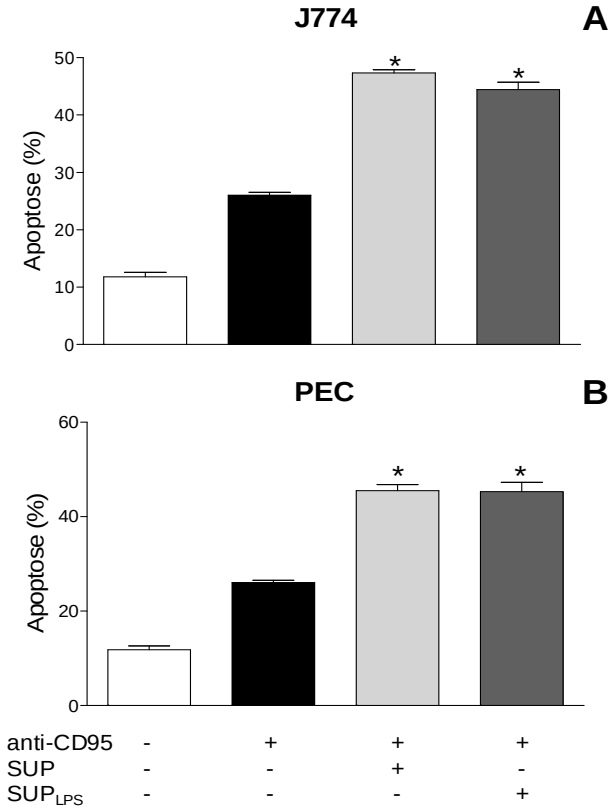

Figura 21. *Ação dos sobrenadantes de cultura de **(A)** J774 e **(B)** PEC na morte de hibridomas de linfócitos T DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD95 agonistas*. Duzentas mil células foram incubadas por 18h com sobrenadantes de macrófagos na presença ou não de 1 µg/ml de anticorpos anti-CD95 agonistas. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura por 24h de um milhão de **(A)** células J774 ou **(B)** células aderentes do exsudato peritoneal de camundongos 129 estimulados ou não com 1 µg/ml de LPS em placas de 24 poços. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*):estatisticamente significativo em comparação com o estímulo de anti-CD95.

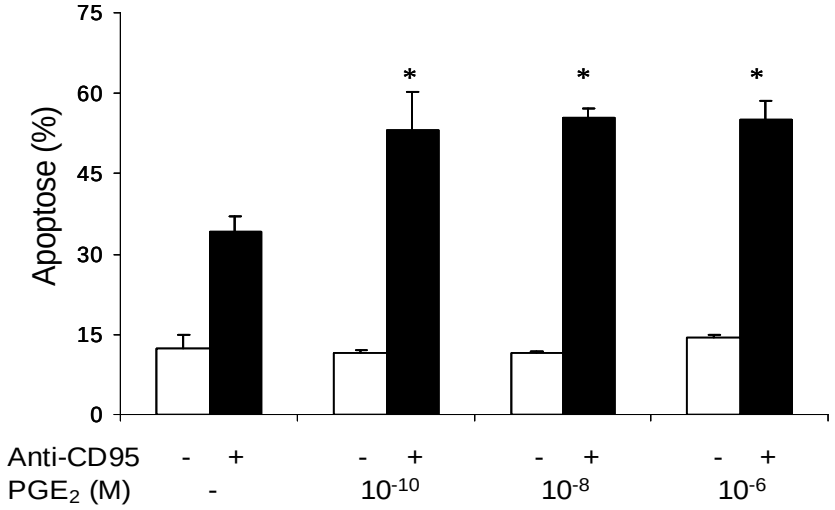

Figura 22. *Influência da PGE$_2$ exógena na morte induzida por anticorpos anti-CD95 agonistas em hibridomas de linfócitos T DO11.10.* Duzentas mil células foram estimuladas por 18h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD95 agonistas na presença de diferentes doses de prostaglandina E_2 (10^{-6} a 10^{-10} M). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*):estatisticamente significativo ao anti-CD95.

4.5 Vias de sinalização induzidas pela PGE_2

Até este ponto do trabalho, foi possível caracterizar a PGE_2 como o fator (ou, pelo menos, um dos mais importantes fatores) presente nos sobrenadantes responsável pelo bloqueio da AICD, a via de indução da produção deste composto pelas células estimuladas por LPS, além do efeito da PGE_2 no bloqueio da expressão de CD95L em hibridomas de linfócitos T. O próximo passo era entender como a PGE_2 age nas células DO11.10 para exercer tal inibição. Sendo assim, a série de experimentos abaixo tem como objetivo dissecar as vias intracelulares importantes na sinalização da inibição do CD95L e, conseqüentemente, da morte por AICD.

Portanto, para estudar como a PGE_2 sinaliza a repressão transcripcional de CD95L, o primeiro passo foi analisar a expressão dos seus receptores. Existem quatro diferentes receptores de PGE_2, denominados EP1 a EP4, sendo que cada um apresenta propriedades bioquímicas distintas dependendo do tipo de proteína-G associada. EP1 normalmente se liga à proteína G_q e induz o aumento de Ca^{2+} intracelular (Breyer *et al.*, 2001). Os receptores EP2 e EP4 se associam com a proteína G_s, com conseqüente ativação de adenilato ciclase e aumento de AMPc (Nishigaki *et al.*, 1996). Por outro lado, o receptor EP3 se liga a proteína G_i e apresenta efeitos contrários, ou seja, inibe a produção de AMPc (Breyer *et al.*, 2001).

Para descobrir qual dos receptores está associado com a proteção contra a AICD conferida por PGE_2, a expressão dos níveis protéicos de cada receptor foi avaliada por *western blot*. Com exceção do EP1, todos os outros três receptores estão expressos nos hibridomas DO11.10 e nenhum deles foi modulado pela estimulação por anticorpos anti-CD3 (Figura 23).

Como os EP2, EP3 e EP4 estão ligados principalmente à modulação dos níveis de AMPc intracelular, foi testado se o aumento dos níveis deste segundo mensageiro protegia as células DO11.10 da AICD ou não. Para tanto, a forskolina, um diterpeno capaz de ativar diretamente a adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc (de Souza *et al.*, 1983), foi adicionada a células DO11.10 durante a indução de AICD por anticorpos anti-CD3.

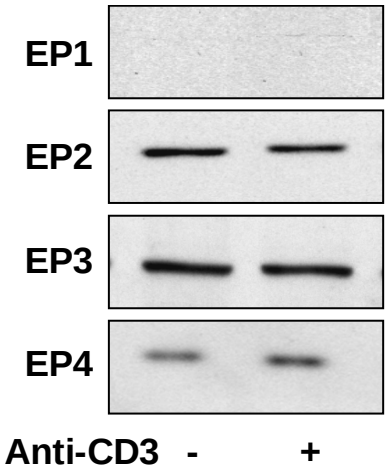

Figura 23. *Expressão protéica dos receptores de PGE_2 em hibridomas de linfócitos T DO11.10, estimulados ou não por anticorpos anti-CD3*. Um milhão de células foram cultivadas em poços adsorvidos ou não com 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 por 8h. Após este período, as células foram lisadas, obtendo-se o conteúdo protéico total. A expressão dos receptores de PGE_2 (EP1-4) foi analisado através da técnica de *Western Blot*.

O tratamento com forskolina reduziu significativamente os níveis de apoptose nos hibridomas DO11.10, de forma dose-dependente (Figura 24). Este resultado indica que o aumento do AMPc através da ativação da adenilato ciclase medeia o efeito da PGE_2 na AICD. Sendo assim, a hipótese que se impõe é que os receptores EP2 e/ou EP4, associados a proteínas G_s, estimuladoras da adenilato ciclase, devem ser os principais mediadores da proteção induzida por PGE_2.

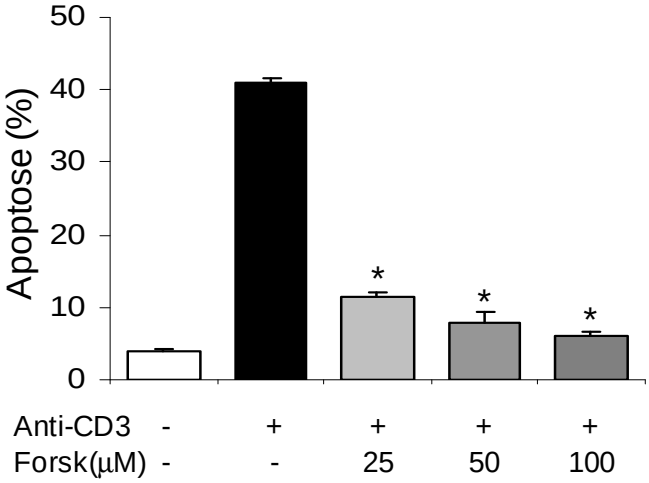

Figura 24. *Efeito da Forskolina, um ativador da produção de AMPc pela adenilato ciclase, na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*. Duzentas mil células foram estimuladas por 18h com 1μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de diferentes concentrações de forskolina (25 a 100μM). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Portanto, para avaliar se os receptores EP2 e/ou EP4 estão envolvidos na proteção induzida por PGE_2, foram utilizados agonistas altamente específicos para cada um dos receptores: butaprost (específico para EP2) e ONO-AE1-329 (específico para EP2). Nenhum dos compostos se mostrou tóxico nas concentrações utilizadas quando adicionados aos hibridomas DO11.10, sendo que doses mais altas causaram morte celular (dados não mostrados). A figura 25 mostra que ambos os agonistas inibem a morte induzida por anticorpos anti-CD3, de forma dose-dependente, indicando que ambos os receptores EP2 e EP4 estão envolvidos com o bloqueio da AICD.

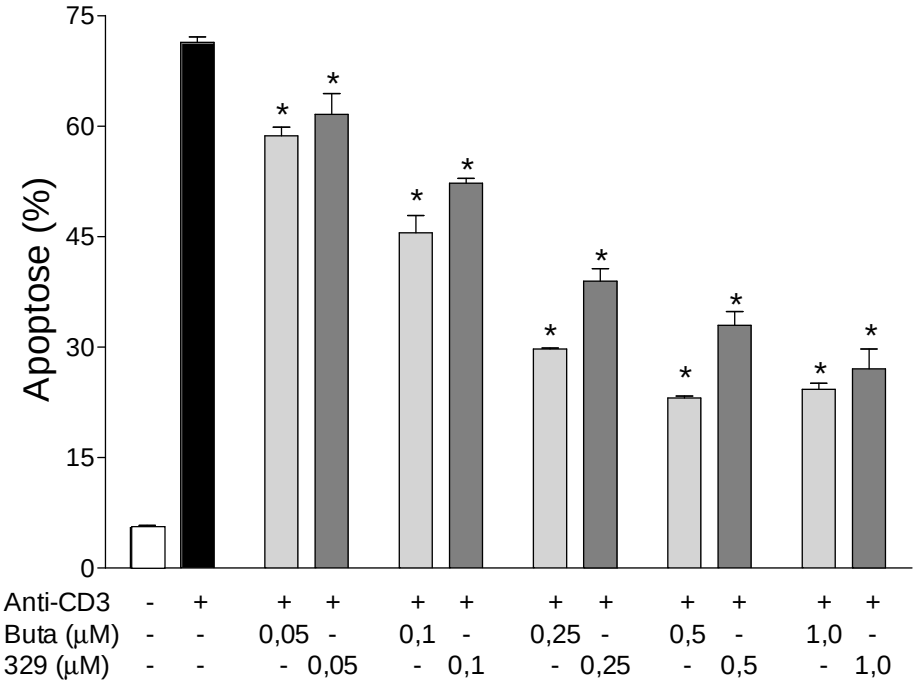

Figura 25. *Efeito dose-resposta dos agonistas de EP2 e EP4 na proteção contra a AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10.* Duzentas mil células foram estimuladas durante 18h por 1 μg/mL de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de diferentes concentrações do agonista de EP2 (Butaprost) ou EP4 (ONO-AE1-329). A quantificação de apoptose foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras apresentam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): diferença estatisticamente significativa em relação às células estimuladas por anti-CD3 (barra preta). $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Na seqüência, foi analisada a possibilidade de que os receptores EP2 e EP4 funcionassem de forma conjunta, aditiva. As células DO11.10 foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 imobilizados em placa e os agonistas foram adicionados às culturas tanto sozinhos quanto em combinação. Vale a pena ressaltar que, quando em combinação,

os agonistas foram adicionados em uma concentração duas vezes menor (25 nM ou 50 nM) para que a soma das concentrações (25+25 nM ou 50+50 nM) ficasse equivalente às doses usadas individualmente (50nM ou 100mM). Surpreendentemente, quando adicionados em conjunto, os agonistas de EP2 e EP4 resultaram numa proteção significativamente maior do que quando adicionados separadamente (Figura 26).

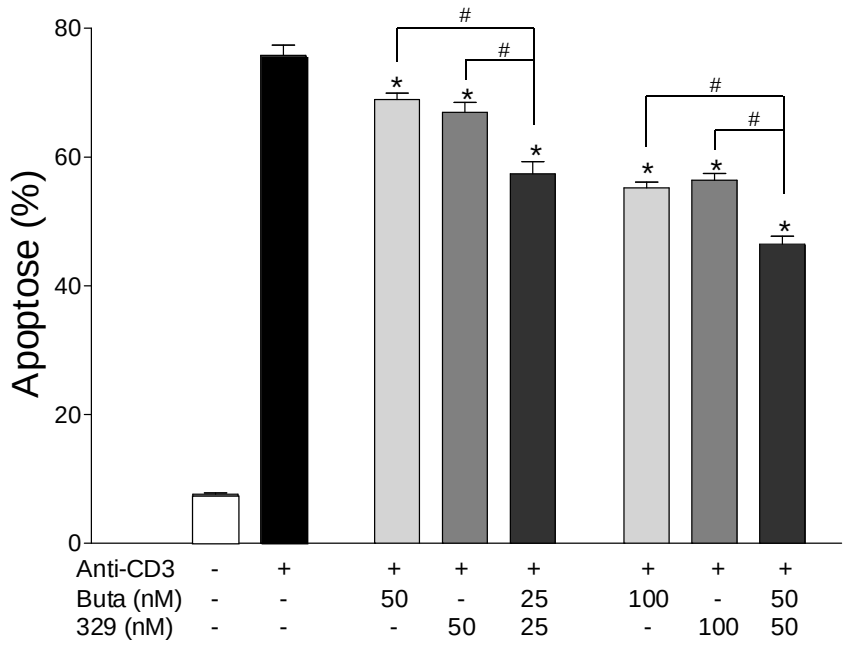

Figura 26. *Efeito sinergístico entre os agonistas de EP2 e EP4 na proteção contra a AICD em hibridomas de linfócitos T DO11.10*. Duzentas mil células foram estimuladas durante 18h por 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de diferentes concentrações do agonista de EP2 (Butaprost) e EP4 (ONO-AE1-329), sozinhos ou em combinação. A quantificação de apoptose foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras apresentam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*) diferença estatisticamente significativa em relação às células estimuladas por anti-CD3 (barra preta). (#) estatisticamente diferentes entre si. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY). Experimento representativo de quatro experimentos realizados.

Apesar dos agonistas serem excelentes indicativos da participação do EP2 e do EP4 na via de supressão da AICD, a prova irrefutável que estes receptores são importantes para este mecanismo advém do uso de inibidores específicos. Caso contrário, sempre há a possibilidade que a sinalização via EP2/EP4 mimetize a ação da PGE_2, mas que isso não passe de uma coincidência. Com a obtenção dos inibidores específicos para EP2 (AH6809) e para EP4 (ONO-AE3-208), foi possível realizar uma série de experimentos para confirmar a relevância destes receptores no fenômeno de inibição da AICD.

Primeiramente, os inibidores de EP2 e EP4 foram adicionados diretamente a células DO11.10 para se estudar a possível toxicidade destes compostos. Os resultados mostraram que a concentração máxima não tóxica encontrada foi 10 µM tanto para AH6809 quanto para ONO-AE3-208 (dados não mostrados). Em seguida, os antagonistas de EP2 e EP4 foram avaliados quanto a sua especificidade de ação. Para tanto, cada antagonista foi combinado com ambos os agonistas de EP2 e EP4 (butaprost e ONO-AE1-329, respectivamente) e o impacto sobre os níveis de apoptose foram quantificados. O resultado esperado era que o antagonista de EP2 fosse capaz de inibir a ação somente do agonista de EP2 e não de EP4, e vice-versa. A figura 27 mostra que, apesar de não serem capazes de inibir totalmente a ação dos agonistas, os inibidores são totalmente específicos, não interferindo na sinalização do outro receptor.

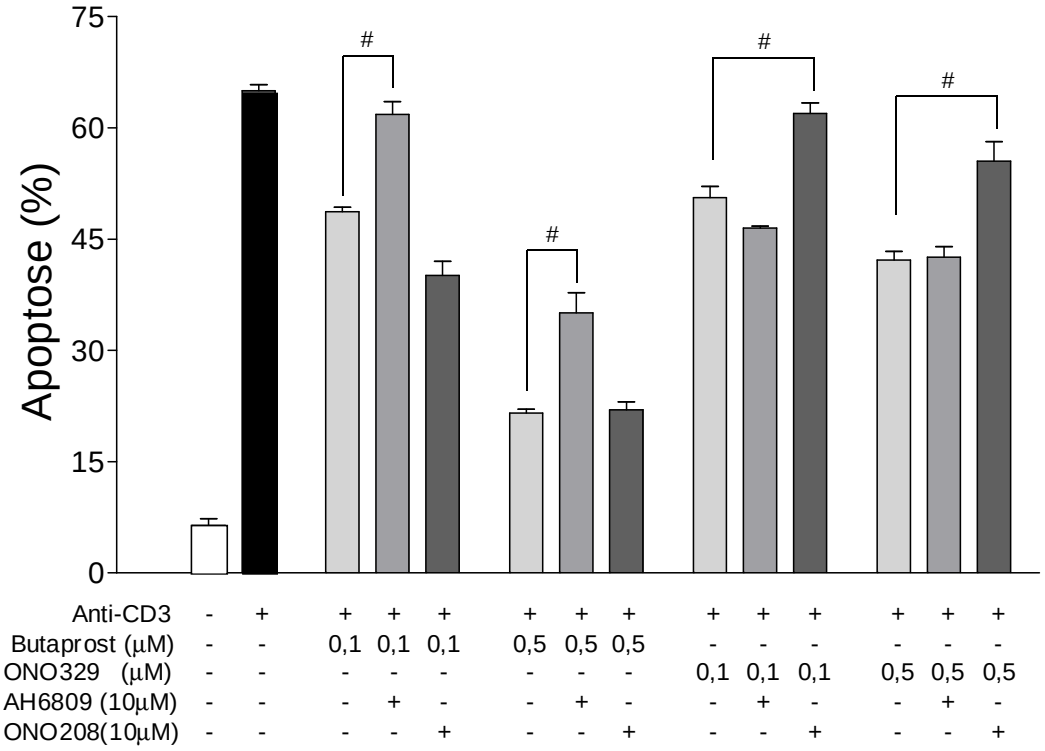

Figura 27. *Efeito dos inibidores de EP2 e EP4 na proteção induzida por agonistas de EP2 e EP4 em hibridomas de linfócitos T DO11.10.* Duzentas mil células foram estimuladas durante 18h por 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não dos agonistas específicos para EP2 (Butaprost) ou EP4 (ONO-AE1-329). Previamente, as células foram tratadas por 30 min com inibidores específicos para EP2 (10 µM AH6809) ou EP4 (10 µM ONO-AE3-208). A quantificação de apoptose foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras apresentam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (#) estatisticamente diferentes entre si. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Após o estabelecimento da dose ideal de uso de cada um dos inibidores, da confirmação que são altamente específicos e que não são tóxicos às células, foi possível realizar o experimento para verificar se o bloqueio de algum dos receptores interferiria na proteção induzida pelos sobrenadantes de macrófagos e pela PGE_2. Hibridomas DO11.10 foram pré-tratados por 30 min ou com 10 µM AH6809 ou com 10 µM ONO-AE3-208 e, em seguida, estimulados com anticorpos anti-CD3 imobilizados em placa e incubados com 10^{-8}M PGE_2 ou com sobrenadantes de células J774 estimuladas por LPS. Ambos os inibidores reverteram parcialmente a ação tanto da PGE_2 como dos sobrenadantes de macrófagos estimulados por LPS (Figura 28), indicando que EP2, bem como EP4, são importantes para o efeito anti-apoptótico em DO11.10.

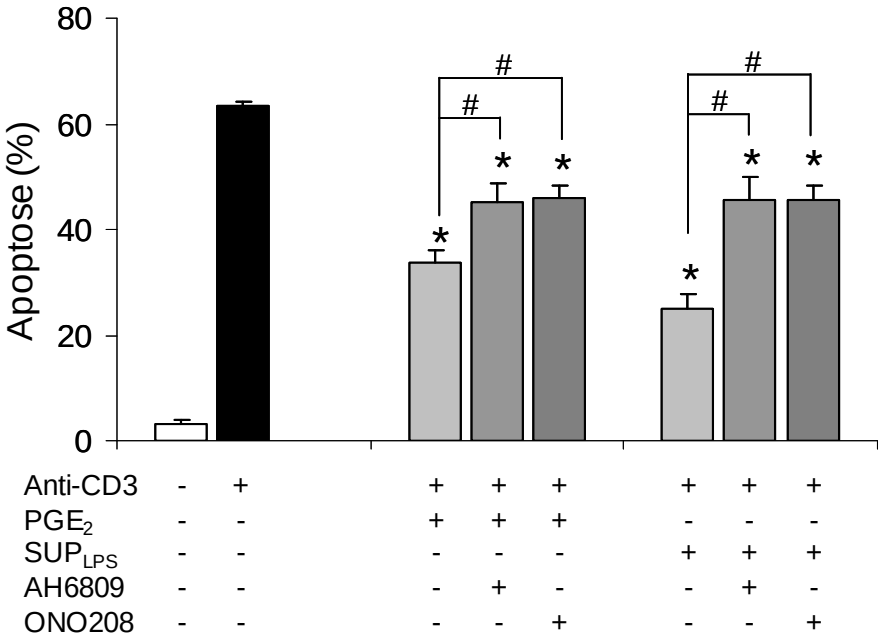

Figura 28. *Efeito dos inibidores de EP2 e EP4 na proteção induzida por PGE_2 e sobrenadantes de J774 na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10*. Duzentas mil células foram estimuladas durante 18h por 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de 10^{-8}M PGE_2 ou de sobrenadante de macrófagos J774 estimulados por LPS. Previamente, as células foram tratadas por 30min com inibidores específicos para EP2 (10 µM AH6809) ou EP4 (10 µM ONO-AE3-208). A quantificação de apoptose foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras apresentam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): diferença estatisticamente significativa em relação às células estimuladas por anti-CD3+agonista (barra cinza claro). (#): estatisticamente diferentes entre si. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY).

Como a inibição do efeito anti-apoptótico induzido por cada um dos antagonistas não foi total, foram feitos experimentos onde os antagonistas de EP2 e EP4 foram adicionados simultaneamente para se investigar se havia efeito aditivo entre os dois inibidores. Células DO11.10 foram pré-tratadas com 10 µM AH6809, 10 µM ONO-AE3-208 ou ambos e, em

seguida, induzidas à AICD na presença de 10^{-8} M PGE_2 (Figura 29A) ou na presença de sobrenadantes de células J774 estimuladas com 1 μg/ml LPS (Figura 29B). Em ambos os casos, o efeito combinado dos antagonistas é estatisticamente maior do que quando as células são tratadas com somente um deles, demonstrando que ambos os receptores são importantes para a proteção contra a AICD mediada pela PGE_2, agem simultaneamente e de forma não redundante.

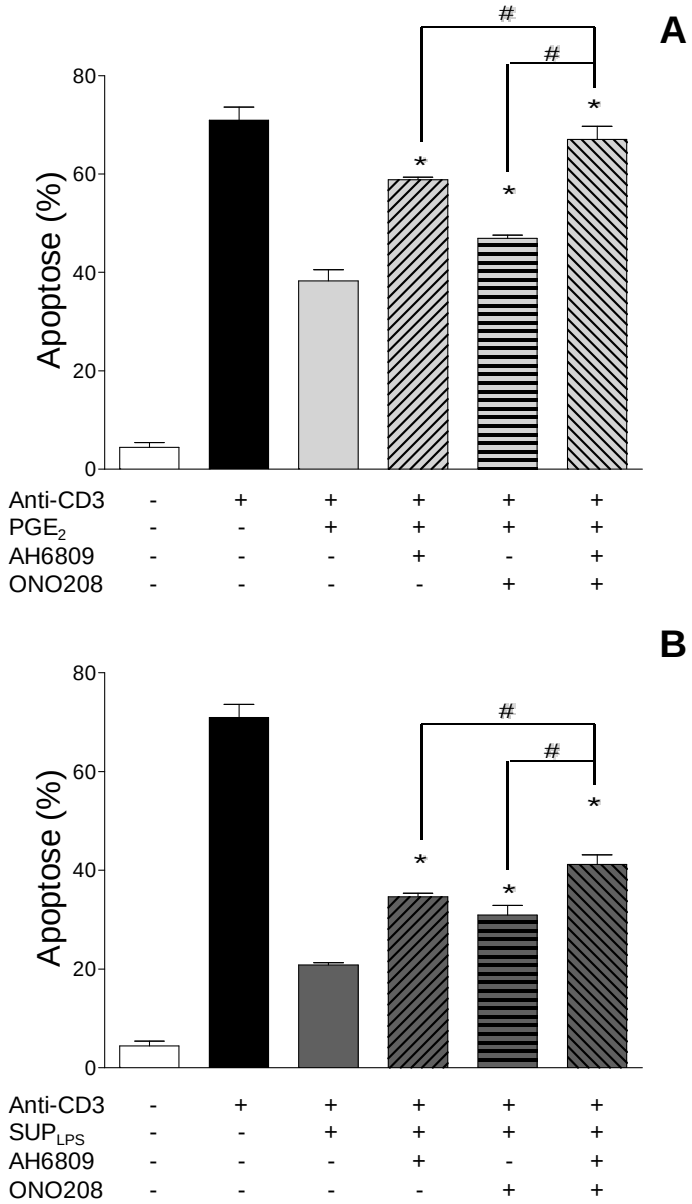

Figura 29. *Efeito combinado dos inibidores de EP2 e EP4 na proteção induzida por* ***(A)*** *PGE_2 ou* ***(B)*** *sobrenadantes de J774 na AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10.* Duzentas mil células foram estimuladas durante 18h por 1 μg/mL de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de **(A)** 10^{-8} M PGE_2 ou **(B)** sobrenadante de macrófagos J774 estimulados por LPS. Previamente, as células foram tratadas por 30min com inibidores específicos para EP2 (10 μM AH6809), EP4 (10 μM ONO-AE3-208) ou a combinação de ambos antagonistas. A quantificação de apoptose foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. (*): diferença estatisticamente significativa em relação às células estimuladas por (a) anti-CD3 + PGE_2 ou (b) anti-CD3 + SUP_{LPS}. (#): estatisticamente diferentes entre si. Representativo de três experimentos independentes.

Como já apontado anteriormente, a ligação da PGE_2 com o receptor EP2 ou EP4, desencadeia a ativação da adenilato ciclase de forma dependente da proteína G_s. A adenilato ciclase converte ATP em AMP cíclico, um importante segundo mensageiro (Regan, 2003). Este aumento do AMPc pode ser correlacionado com a proteção conferida pela PGE_2, já que a adição da forskolina mimetizou os efeitos antiapoptóticos da PGE_2.

O AMP cíclico produzido neste contexto ativa duas principais vias, uma dependente de fosfoquinase A (PKA) (Bauman *et al.*, 1994; Rubin *et al.*, 1991) e outra, recém-descoberta, mediada por EPAC e independente de PKA (Jing *et al.*, 2004). Existem dois análogos do AMPc que são exclusivos para cada uma das vias citadas, sendo eles: o 6-BNZ (N^6-Benzoyl-cAMP), um ativador seletivo da PKA e o 8pCPT (8-4-Chlorophenilthio-2'-O-methil-cAMP), um ativador exclusivo da via da EPAC/cAMP-GEF, ambos da companhia *BIOLOG*. Sendo assim, para testar qual das duas vias era importante na proteção contra a AICD, hibridomas DO11.10 foram estimulados por 18h com anticorpos anti-CD3 na presença de concentrações crescentes dos dois produtos (67,5 - 250 µM).

Como resultado, o composto ativador da PKA exibiu um efeito dose-dependente de redução da morte causada pela estimulação do complexo TCR/CD3. Já o análogo exclusivo da via de EPAC não surtiu efeito, sendo inócuo nas concentrações utilizadas (Figura 30). Portanto, estes dados apontam para a dependência da atividade de PKA no efeito da PGE_2 sobre a AICD.

Na seqüência, foi feito um experimento para averiguar se doses sub-ótimas dos análogos do AMPc eram capazes de agir sinergicamente, na tentativa de se evidenciar alguma participação da via de EPAC, já que foi encontrado um poder sinérgico dessas duas vias bioquímicas no crescimento de neuritos (Kiermayer *et al.*, 2005) Como pode ser visto na figura 31, o composto 8pCPT não é capaz de inibir sozinho a morte por AICD. Porém, na concentração usada ele foi capaz de potencializar o efeito do análogo do AMPc que induz a via de PKA, aumentando significativamente a proteção conferida pelo 6-BNZ. Isto indica que, apesar da via do EPAC não ser essencial para a inibição da morte, a ativação desta via pela produção aumentada de AMPc pode contribuir para uma maior potência do efeito da PGE_2 sobre a AICD.

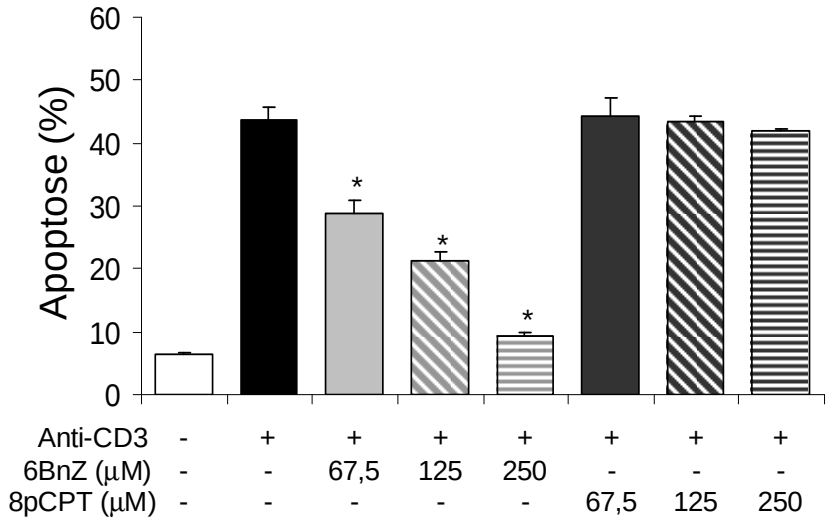

Figura 30. *6-BnZ-cAMP, um análogo do AMPc específico para PKA, é capaz de inibir a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10, enquanto que o 8-pCPT-cAMP, um análogo do AMPc específico para EPAC, não.* Duzentas mil células foram estimuladas por 18h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença ou não de diferentes concentrações de 6-BnZ-cAMP ou 8-pCPT-cAMP (67,5 a 250 µM). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. p<0,01 (Teste ANOVA e TUKEY).

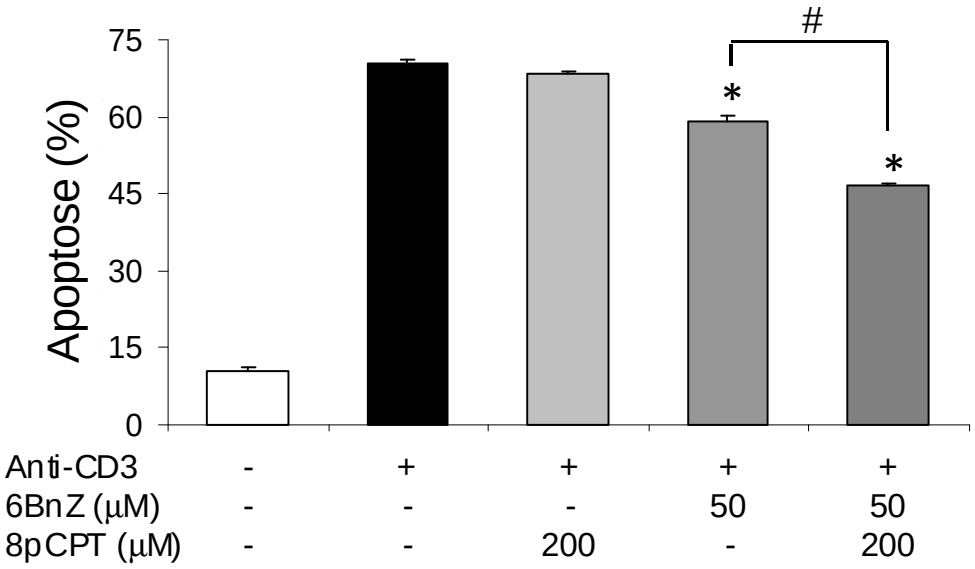

Figura 31. *8-pCPT-cAMP é capaz de potencializar o efeito do 6-BnZ-cAMP sobre a morte induzida por anti-CD3 em hibridomas de linfócitos T DO11.10*. Duzentas mil células foram incubadas por 18h com 6-BnZ-cAMP, 8-pCPT-cAMP ou ambos (50 e 200 µM, respectivamente) e concomitantemente estimuladas por 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. (#): estatisticamente significativo entre si. p<0,01 (Teste ANOVA e TUKEY).

Em resumo, esta série de experimentos mostrou que a PGE_2, seja ela sintética ou derivada da cultura de células apresentadoras de antígeno estimuladas com LPS, inibe a AICD através da ação sinergística dos receptores EP2 e EP4, que aumentam a produção de AMPc, ativando a via da PKA, cujo efeito é potencializado pela via do EPAC.

4.6 Efeito da PGE_2 na ativação de fatores de transcrição

Como já foi discutido anteriormente, a expressão de CD95L está condicionada à ativação de diversos fatores de transcrição, entre eles o AP-1, NFAT e NF-κB (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2002; Mittelstadt e Ashwell, 1999), sendo sua regulação basicamente feita no nível transcripcional.

Portanto, para continuar a desvendar como a via de sinalização iniciada por PGE_2, dependente do aumento do AMPc e mediada por PKA inibe a transcrição do CD95L, a influência da PGE_2 na ativação dos principais fatores de transcrição foi investigada.

Há uma enorme variabilidade dos fatores de transcrição participantes na expressão de CD95L dependendo da natureza do estímulo e do tipo celular (Latinis *et al.*, 1997; McClure *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999), mas na maioria dos casos o principal fator de transcrição envolvido é o NFAT1 (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998). Sendo assim, inicialmente foi averiguado se a via dependente do NFAT1 era essencial para a indução da AICD e, portanto, da expressão de CD95L. Para tanto, foi utilizada a Ciclosporina A (CsA), uma droga que impede a ativação da calcineurina, cuja atividade é essencial para a ativação do NFAT (Lee e Park, 2006) durante a indução de AICD. Como resultado, houve uma completa inibição da morte mesmo quando se utilizou doses baixas de CsA (Figura 32A). Esta informação sugere que a AICD destas células é totalmente dependente da via da calcineurina. Isto não exclui, obviamente, a participação de outros fatores de transcrição, mas aponta para uma participação central da ativação do NFAT1 nestes processos.

Uma das formas de se observar a ativação do NFAT1 é através da análise da razão entre a quantidade de moléculas de NFAT1 desfosforilada (forma ativa) e fosforilada (forma inativa). A metodologia escolhida para fazer esta análise foi o *western blot,* sendo que através de anticorpos anti-NFAT1 foi possível evidenciar as bandas de NFAT1 ativado e não ativado, por migrarem diferencialmente em gel de acrilamida Bis-Tris.

A estimulação via TCR/CD3 de hibridomas DO11.10 causou um aumento significativo da banda inferior acompanhada pela redução da banda superior, indicando que houve forte ativação do NFAT1 (Figura 32B). A CsA, como esperado, foi capaz de inibir completamente a desfosforilação do NFAT, mostrando que o experimento está funcionando corretamente. Porém, a adição de PGE_2 não foi capaz de alterar a razão entre as bandas da forma ativa e inativa do NFAT1 se comparada com a amostra somente induzida com anti-CD3, mostrando que este composto não age neste ponto da via de ativação do NFAT1, mesmo em doses elevadas (10^{-7} M).

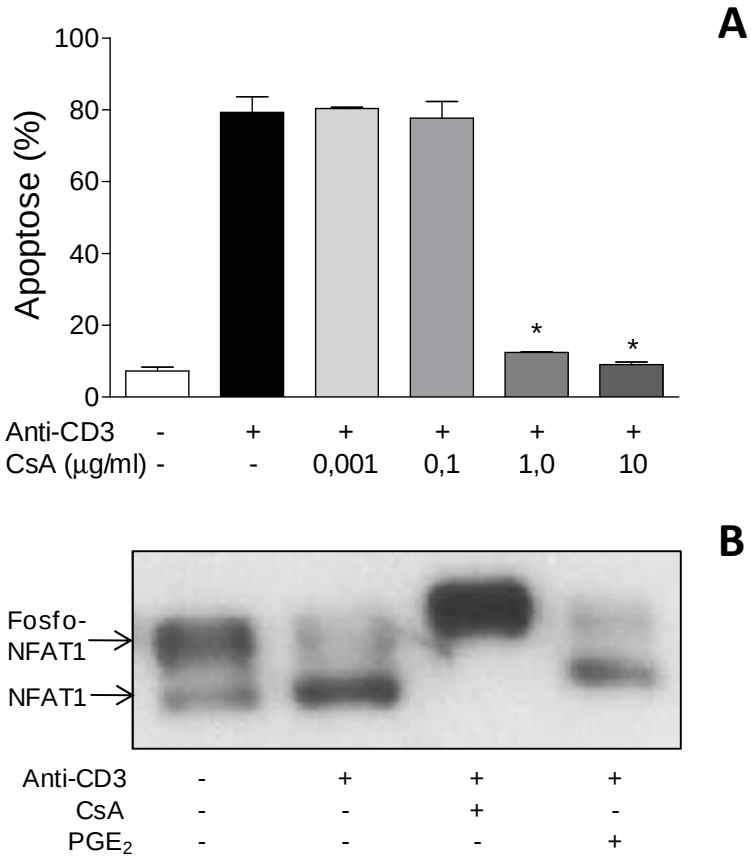

Figura 32. *PGE_2 não inibe a via de ativação do NFAT1, que é essencial para a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10.* **(A)** Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas durante 18h por 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença de diferentes concentrações de ciclosporina A, molécula inibidora da via do NFAT1 (0,001 a 10 µg/ml). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. (*): estatisticamente significativo em comparação com as células estimuladas com anti-CD3. $p<0,01$ (Teste ANOVA e TUKEY). **(B)** Um milhão de células DO11.10 foram estimuladas por 2h com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença de 1 µM Ciclosporina A (CsA) ou 10^{-7} M PGE_2. Após este período, as células foram lisadas, obtendo-se o conteúdo protéico total. A análise das formas fosforiladas e não-fosforiladas foi feita através da técnica de *Western Blot*, utilizando-se anticorpos anti-NFAT1 (clone 67.1). Gráfico representativo de três experimentos.

Para confirmar os resultados encontrados e dando continuidade à investigação sobre os possíveis efeitos da PGE_2 na via dependente de NFAT1, foi investigado o passo seguinte da ativação deste fator de transcrição, que é sua migração para o núcleo, onde pode interagir com diferentes promotores, modulando a expressão de diversos genes.

Para analisar a migração do NFAT1, fez-se uso da técnica de microscopia por imunofluorescência. Nesta técnica, as células são aderidas a lamínulas, sofrem os diferentes estímulos, são fixadas com paraformaldeído e posteriormente marcadas com o uso de anticorpos específicos conjugados com fluorocromos. Para a realização deste experimento, surgiu a dificuldade de se aderir as células à lamínula, já que as células DO11.10 são pouco aderentes. Para sanar este problema, as lamínulas foram pré-tratadas com gelatina a 2% para formar uma película mais aderente a esta linhagem celular, o que se mostrou bastante eficiente. Porém, com o uso da película de gelatina, a adsorção dos anticorpos anti-CD3 ficou prejudicada, o que causou outro problema: um estímulo insuficiente para causar a ativação do NFAT e, conseqüentemente, a morte das células (dados não mostrados). Foi tentado o uso de anti-CD3 solúvel e também a combinação de anti-CD3 solúvel com anti-IgG (para fazer o *crosslink*). Porém, em nenhum destes casos, houve um aumento considerável da morte e também da ativação do NFAT (dados não mostrados).

Em substituição ao estímulo por anticorpos anti-CD3, é comum o uso da ionomicina combinada com o PMA, já que ambos os estímulos ativam as mesmas vias bioquímicas, entre elas o influxo de cálcio, a PKC e a via das MAPK (Anel *et al.*, 1994; Li-Weber e Krammer, 2003). Para se confirmar que, especificamente nas células DO11.10, o PMA mais ionomicina exerciam o mesmo efeito que a estimulação por anti-CD3 e a PGE_2 também exercia função inibidora, hibridomas DO11.10 foram incubados por 18h com 1 µM ionomicina e 10 ng/ml PMA na presença ou não de PGE_2. O PMA combinado com a ionomicina induziu apoptose, sendo que PGE_2 inibiu a morte destas células, gerando um perfil gráfico muito semelhante ao obtido com a indução por anti-CD3 (dados não mostrados). Sendo assim, é possível utilizar estes compostos como bons substitutos ao anti-CD3 em ocasiões em que o uso do anticorpo seja inviável.

No caso específico do experimento para o estudo da migração do NFAT1 para o núcleo, descartou-se o uso do PMA, pois o composto que induz o fluxo de cálcio intracelular com a conseqüente ativação do NFAT é a ionomicina e não o PMA (Loh *et al.*, 1996). Hibridomas DO11.10 foram então aderidos a uma película de gelatina e estimuladas com ionomicina na presença ou não de PGE_2. Como controle da inibição de migração foi utilizada

a CsA. A marcação dos núcleos foi feita com o corante vital DAPI e o NFAT1 foi marcado com anticorpos anti-NFAT1 conjugados a ficoeritrina (PE), sendo que as imagens foram captadas com a ajuda de um microscópio de fluorescência acoplado a um computador. Na figura 33 pode-se ver na primeira coluna a marcação com anti-NFAT1.PE, na segunda a marcação específica para a região nuclear e na terceira coluna uma sobreposição das duas imagens anteriores.

Como esperado, a presença da ionomicina causou uma forte migração do NFAT1 para o núcleo, que foi inibida pela adição de CsA. Diferentemente da CsA, a PGE_2 não foi capaz de impedir a migração do NFAT1 induzida pela ionomicina (Figura 33).

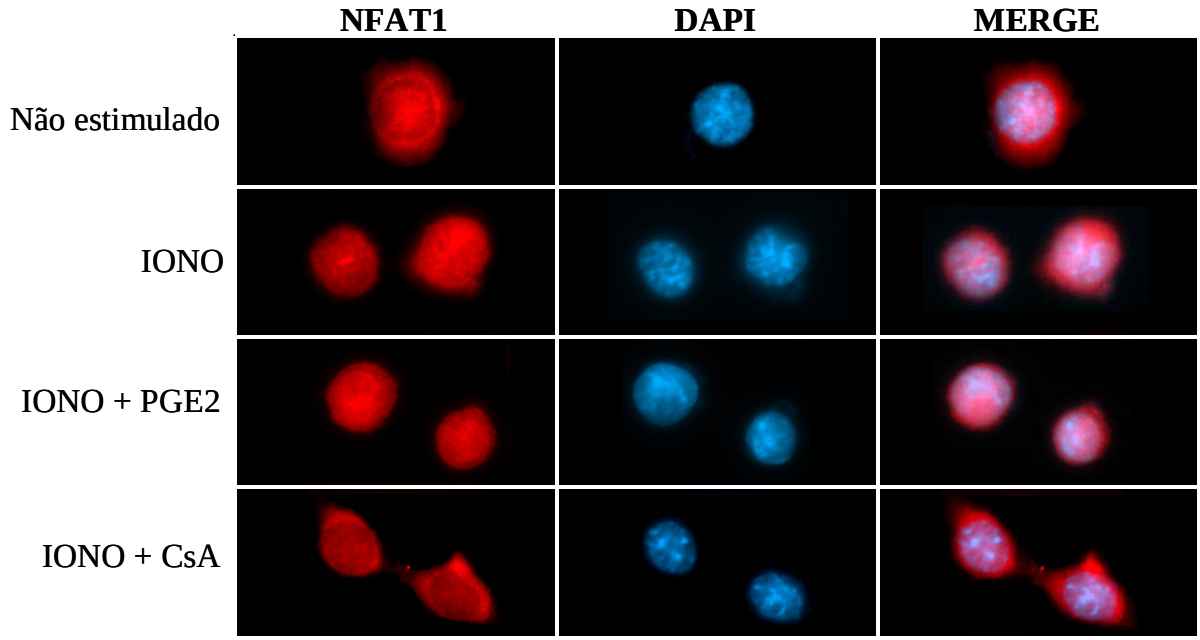

Figura 33. *Efeito da PGE_2 na translocação nuclear do NFAT1 após estimulação com ionomicina.* 40 mil células DO11.10 por amostra foram aderidas a lamínulas através de uma película de gelatina 2%. Em seguida, foram administrados os diferentes estímulos por 15min, sendo eles combinações de ionomicina com 10^{-7} M PGE_2 ou 1 μM CsA. Após 15 min, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos anti-NFAT1.PE (clone 67.1) e DAPI. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de fluorescência acoplado a um computador. MERGE: sobreposição das imagens obtidas com o filtro azul para DAPI e o filtro vermelho, que capta a fluorescência do anticorpo.

Apesar da PGE_2 não impedir a desfosforilação e migração do NFAT1 (Figuras 32 e 33), havia ainda a possibilidade da PGE_2 agir em um ponto posterior à sua migração nuclear, mais especificamente na interação do NFAT1 com a região promotora do CD95L. Para abordar esta questão, utilizou-se ensaios de transativação de promotor usando plasmídeos

repórteres de luciferase, por ser uma das técnicas mais apropriadas para analisar a interação de um fator de transcrição e as seqüências-consenso que existem em determinado promotor. De forma breve, esta metodologia consiste em transfectar nas células plasmídeos com o gene da luciferase sob o controle de uma seqüencia promotora que responda somente ao fator de transcrição em questão, no caso o NFAT1. Caso haja a ativação do NFAT1 e a interação bem-sucedida entre ele e o promotor, ocorre a transcrição da luciferase, uma enzima que cliva a luciferina, emitindo luz que pode ser quantificada através de um luminômetro. A emissão de luz desta reação é diretamente proporcional à atividade do promotor e, portanto, da ativação do NFAT.

Inicialmente, foram feitos inúmeros experimentos nas células DO11.10 na tentativa de se padronizar as condições ideais para a execução desta metodologia. Porém, nenhuma das variações feitas nos diversos parâmetros analisados foi capaz de gerar dados confiáveis, sendo que o principal problema residiu na impossibilidade de atingir um grau mínimo de transfecção nestas células (dados não mostrados).

Para tentar contornar este problema, foi utilizada uma segunda linhagem de linfócitos T denominada Jurkat, cuja experiência prévia apontava para uma maior facilidade de transfecção. Esta linhagem de linfócitos T humanos também sofre AICD quando estimuladas com PMA+ionomicina (dados não mostrados) ou com anticorpos anti-CD3 (clone OKT3) (Lee *et al.*, 2002; Oyaizu *et al.*, 1995).

Dois grupos experimentais com células Jurkat foram delineados, sendo que cada grupo recebeu um conjunto de três diferentes plasmídeos. Ambos os grupos receberam 2 µg do plasmídeo repórter 3xNFAT.Luciferase, um plasmídeo repórter que possui o gene da *Firefly* luciferase sob uma seqüência promotora que contém somente três sítios de ligação a NFAT e um sítio de ligação de AP-1. Esta construção foi originalmente extraída do promotor de IL-2 murino e a ligação somente de AP-1 não é capaz de induzir a transativação deste promotor, sendo perfeito para estudar a ativação do fator de transcrição NFAT (Macian *et al.*, 2000). Ambos os grupos também receberam 0,2 µg do plasmídeo pRL.TK.Renilla, um plasmídeo que codifica para a *Renilla* luciferase sob o promotor TK. Este plasmídeo é utilizado para normalização dos níveis de transfecção entre as amostras, já que o promotor TK é um promotor constitutivamente ativo.

A diferença entre os dois grupos ficou por conta da presença de um plasmídeo de superexpressão de NFAT1. Enquanto o primeiro grupo recebeu 20 µg do plasmídeo vetor (pCDNA5.Vetor), o segundo grupo recebeu 20 µg do plasmídeo para superexpressão de

NFAT1 (pCDNA5.NFAT1). A diferença, portanto, entre os dois grupos experimentais é que as células transfectadas com o segundo grupo possuem expressão exógena de NFAT1 e o primeiro grupo não.

Após 24h da eletroporação ambos os grupos foram estimulados por 6h com 100 nM PMA e 1 μM ionomicina na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2 ou 1 μM Ciclosporina A e o resultado analisado quanto à expressão relativa de luz. Nas células co-transfectadas com o vetor vazio, após 6h de ativação com PMA e ionomicina, houve um aumento na atividade do promotor 3xNFAT.Luciferase, indicando que este estímulo causa a transativação do NFAT. Conforme esperado, este aumento foi bloqueado pelo pré-tratamento destas células com CsA. Porém, o tratamento com PGE_2 não inibiu a transativação do NFAT (Figura 34).

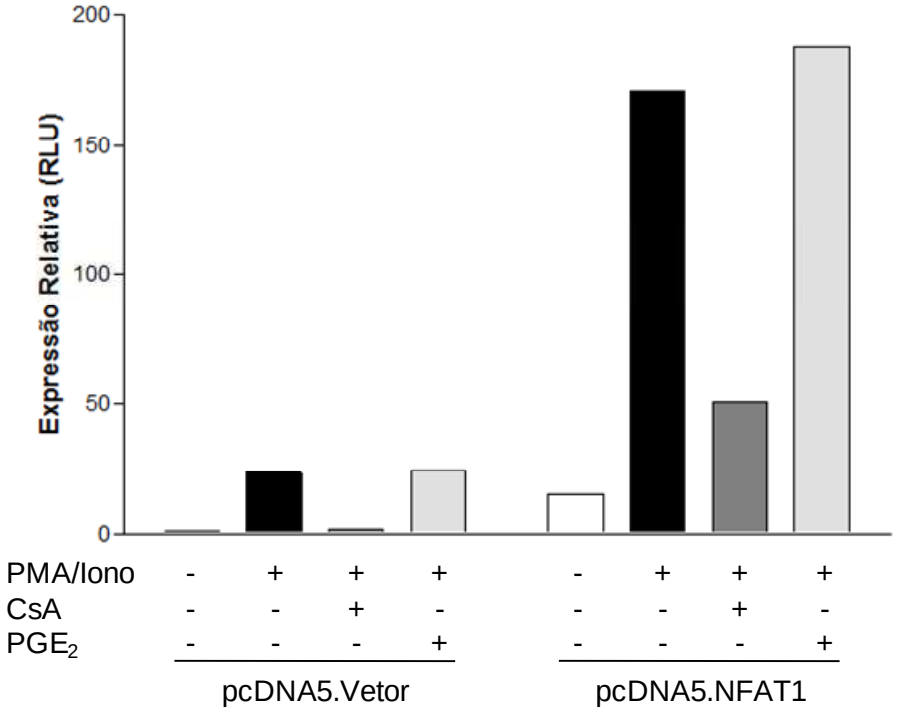

Figura 34. *PGE_2 não inibe a atividade do promotores repórter 3xNFAT.Luciferase, co-transfectado ou não com NFAT1*. Células Jurkat foram transfectadas com diferentes combinações de três plasmídeos. Em todas as transfecções foram utilizados três plasmídeos: um plasmídeo para controle de transfecção pRL.TK.Renilla (0,2 μg), um plasmídeo de superexpressão (20 μg) - pcDNA5.Vetor ou pcDNA5.NFAT1 - e um plasmídeo repórter com o promotor 3xNFAT (2 μg). Após 24h de eletroporação, as células foram pré-tratadas por 15min com Ciclosporina A (1 μM) ou PGE_2 (10^{-7} M) e então estimuladas com PMA (100 nM) e Ionomicina (1 μM) por 6h. Após este período, a quantificação da produção de luciferase foi feita através de luminômetro automático. Os dados para cada amostra representa a razão entre o valor da luciferase e o valor da renila-luciferase e estão normalizados em relação à expressão na amostra controle não estimulada (primeira coluna). Gráficos representativos de quatro experimentos.

O mesmo perfil foi observado com o grupo que superexpressava NFAT1 (Figura 34). Neste caso, a presença do NFAT1 exógeno aumentou significativamente a atividade do

promotor (quase 10x), efeito que também foi bloqueado por CsA mas não pela adição de PGE_2.

Em resumo, a PGE_2 é incapaz de inibir a desfosforilação do NFAT1, sua migração para o núcleo e sua interação com as seqüências consenso no DNA, seja o NFAT1 de origem endógena, seja derivado de superexpressão plasmidial. Portanto, conjuntamente, estes dados comprovam que o mecanismo de inibição da expressão de CD95L pela PGE_2 não envolve a via dependente do NFAT1. Como também não houve sequer uma redução parcial da atividade do promotor com a adição de PGE_2, é improvável que haja o envolvimento do AP-1, fator de transcrição que potencializa os efeitos do NFAT1 neste promotor.

O segundo fator de transcrição mais descrito na ativação da transcrição de CD95L é o NF-κB. Uma das vias de ativação do NF-κB ocorre pela geração de espécies reativas de oxigênio após a estimulação do complexo TCR/CD3 (Devadas *et al.*, 2002). Estes radicais livres ativam este fator de transcrição, que está relacionado à regulação transcripcional do CD95L (Devadas *et al.*, 2002). Estas observações estão baseadas principalmente no fato que compostos antioxidantes bloqueiam a expressão de CD95L e apoptose através da inibição do NF-κB (Bauer *et al.*, 1998).

Para investigar se esta via de indução de CD95, e conseqüentemente AICD, era importante em hibridomas DO11.10, duas diferentes abordagens foram realizadas. A primeira delas foi avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas pela estimulação do complexo TCR/CD3. Para tanto, as células foram tratadas previamente à estimulação por anti-CD3 com diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH) ou dihidroetídeo (DHE). Estes corantes somente fluorescem após oxidação dos mesmos por espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. O aumento da fluorescência do DCFH indica a oxidação por peróxido de hidrogênio ou por outras espécies reativas, enquanto DHE é seletivamente oxidado pelo ânion superóxido. Contudo, não foi possível detectar qualquer produção de espécies reativas de oxigênio, mesmo através dos métodos mais sensíveis existentes e até mesmo cultivando-se estas células em meio rico de triptofano, o que facilitaria a produção de ROS (dados não mostrados).

Estas evidências de que os hibridomas DO11.10 não produzem espécies reativas de oxigênio enfraquecem a possibilidade da via de indução de CD95L ser mediada principalmente por NF-κB ativado por ROS. Porém, vários outros mecanismos levam à ativação deste fator de transcrição, como a ativação de receptores acoplados a proteínas G (Minneman *et al.*, 2000).

Uma segunda abordagem utilizada foi o uso de um inibidor de proteassomo chamado lactacistina. A lactacistina impede a ativação do NF-κB por bloquear a degradação da molécula IκB pelo proteassomo, mantendo o NF-κB preso a esta molécula inibitória(Malek *et al.*, 2001). Quando os hibridomas DO11.10 foram induzidos à morte por anti-CD3 na presença de diversas concentrações de lactacistina, não houve qualquer alteração nos níveis de apoptose, sugerindo que esta via não é essencial para a indução de morte por AICD (figura 35A).

Mesmo assim, a ativação do NF-κB em hibridomas DO11.10 por anti-CD3 foi analisada de duas diferentes maneiras. A primeira foi feita em períodos bem iniciais da estimulação por anti-CD3 e de forma indireta, através da visualização da degradação da molécula inibidora IκB por *western blot.* Como pode ser observado na figura 35B, a estimulação por anti-CD3 não causou qualquer alteração nos níveis de IκB, indicando que não houve ativação de NF-κB nestes períodos.

Em seguida, foi feita uma cinética de estimulação de células DO11.10 com anti-CD3, nos períodos de 30 min a 4h, na presença ou não de PGE_2. O lisado protéico total foi analisado através de *western blot*, com os anticorpos anti-NF-κB, que marca a concentração total deste fator de transcrição e anti-fosfo-NF-κB que marca somente as moléculas que foram fosforiladas, ou seja, que estão na sua forma ativa. Como se pode ver, não houve qualquer aumento da forma fosforilada de NF-κB (Figura 35C). Estes resultados indicam que não há ativação significativa em nenhum dos tratamentos nos períodos analisados, ao final dos quais já há o aparecimento da expressão de CD95L.

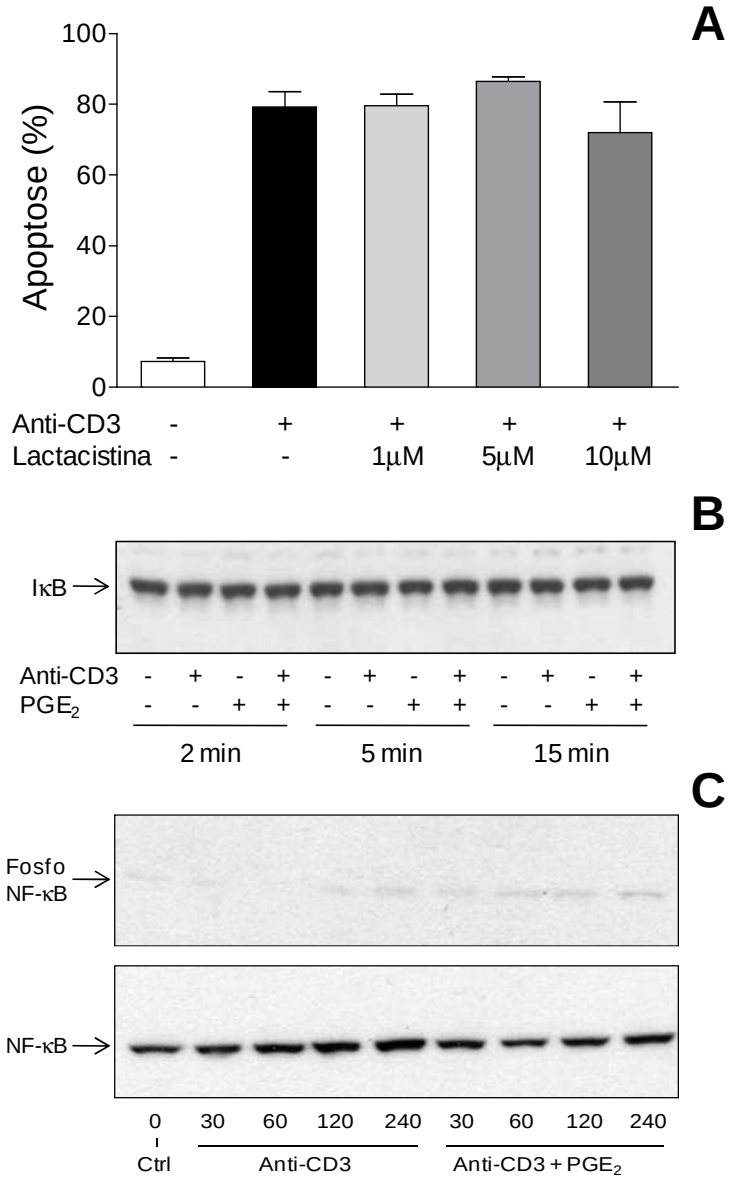

Figura 35. Estimulação por anticorpos anti-CD3 e/ou *PGE_2 não ativam NF-κB, fator de transcrição não essencial para a AICD de hibridomas de linfócitos T DO11.10.* **(A)** Duzentas mil células DO11.10 foram estimuladas durante 18h por 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 96 poços na presença de diferentes concentrações de lactacistina, molécula inibidora da ativação do NF-κB (1,0, 5,0 e 10 μM). A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios-padrão. **(B-C)** Um milhão de células DO11.10 foram estimuladas por diferentes períodos com 1 μg/ml de anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. Após este período, as células foram lisadas, obtendo-se o conteúdo protéico total. **(B)** A análise da degradação de IκB foi feita em tempos curtos (2, 5 e 15 min). **(C)**. A análise das formas fosforiladas e não-fosforiladas foi feita em períodos maiores (20, 60, 120 e 240 min) através da técnica de *Western Blot*, utilizando-se anticorpos anti-NF-κB e anti-fosfo-NF-κB. Gráfico representativo de três experimentos.

Sabendo-se, portanto, que os principais fatores de transcrição NF-AT, NK-κB e AP-1 aparentemente não estão sendo modulados negativamente pela PGE_2 durante a inibição da expressão de CD95L, outros alvos passaram a ser investigados.

O ICER (*Inducible cAMP Early Repressor*) é membro da família de proteínas CREB (*CRE-Binding Proteins*), sendo composto basicamente só do zíper de leucina (Molina *et al.*, 1993), funcionando como um repressor transcripcional (Bodor *et al.*, 1996; Foulkes *et al.*, 1991). Sua expressão pode ser induzida pelo aumento do AMPc, seu padrão de expressão é semelhante aos genes de resposta rápida (*early response gene*) (Bodor *et al.*, 2001) e já foi envolvido na inibição de CD95L por forskolina (Bodor *et al.*, 2002). Por todas estas características, o ICER é um excelente candidato a ser investigado como mediador da inibição da AICD induzida por PGE_2.

Sendo assim, experimentos-piloto foram realizados para averiguar se o ICER era induzido por PGE_2 em hibridomas DO1.10. Para tanto, as células foram tratadas ou não com 10^{-7} M PGE_2 por 1 h e a expressão de ICER foi analisada por RT-PCR. Como pode ser visualizado na figura 36A, a expressão de ICER foi significativamente maior nas amostras onde foi adicionado a PGE_2, o que abre a possibilidade deste repressor transcripcional participar da inibição da transcrição do CD95.

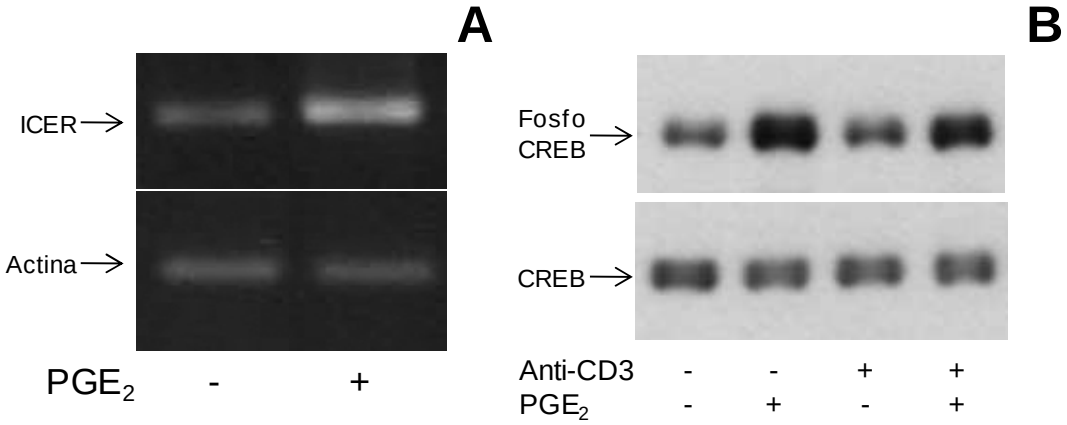

Figura 36. Efeito da estimulação por anticorpos anti-CD3 e/ou *PGE_2 na expressão de ICER e ativação de CREB em hibridomas de linfócitos T DO11.10.* **(A)** Um milhão de células DO11.10 foram estimuladas ou não por 1 h com 10^{-7} M PGE_2. As amplificações da molécula de ICER foi feitas com temperatura de anelamento (TA) de 60 ^{o}C e 28 ciclos. Seguiu-se o protocolo descrito na seção "materiais e métodos". **(B)** Um milhão de células DO11.10 foram estimuladas por 15 min com 1 µg/ml de anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. Após este período, as células foram lisadas, obtendo-se o conteúdo protéico total. A análise das formas fosforiladas e não-fosforiladas foi feita através da técnica de *Western Blot*, utilizando-se anticorpos anti-CREB e anti-fosfo-CREB. Gráfico representativo de dois experimentos.

O ICER é fruto do uso de um promotor alternativo do gene CREM (Molina *et al.*, 1993), sendo que sua expressão é induzida pelo aumento do AMPc e é dependente da ativação de CREB (Bodor *et al.*, 2001; Della Fazia *et al.*, 1997). Portanto, para testar se a PGE_2

aumenta os níveis de ativação de CREB, hibridomas DO11.10 foram estimulados com anti-CD3 na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2 por 15 min e a fosforilação de CREB (forma ativa) foi analisada por *western blot*. A adição de PGE_2 aumentou significativamente a ativação de CREB (forma fosforilada), efeito que não foi bloqueado pelo estímulo por anti-CD3 (Figura 36B). O mesmo perfil foi encontrado quando o estímulo foi dado por 30 ou 60 min (dados não mostrados).

4.7 Efeito da PGE_2 na expressão de CD95L e AICD de linfócitos T primários

Até este ponto do trabalho, todos os experimentos foram feitos utilizando-se hibridomas de linfócitos T DO11.10. A maioria dos experimentos também foi feita em uma segunda linhagem de hibridoma de linfócito T denominada de BY155.6, que apresentou resultados muito semelhantes aos previamente encontrados (dados não mostrados). Porém, como ambas as linhagens utilizadas são hibridomas derivados da fusão de linfócitos T com células de timoma, havia a necessidade de validar os resultados num modelo que utilizasse células primárias, extraídas diretamente de baços ou linfonodos de camundongos.

Sendo assim, baços de camundongos transgênicos DO11.10, cujos linfócitos T possuem TCR transgênico que reconhecem um peptídeo da ovalbumina (OVA323-339) apresentado em um contexto MHC classe II I-A^d, foram usados como fonte primária de linfócitos T $CD4^+$. As células do baço foram submetidas a ensaio de adesão por 2h para eliminação das células aderentes e as células restantes foram utilizadas nos experimentos de investigação de AICD e expressão de CD95L. Para tanto, as células não aderentes foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. Após 12h de estímulo, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.FITC e anti-CD95L.PE e analisadas por citometria de fluxo.

A estimulação das células recém-extraídas do baço com anticorpos anti-CD3 não induziu morte, sendo que a porcentagem das células viáveis não variou entre os diversos tratamentos (Figura 37A). A análise da porcentagem das células positivas para CD4 também se manteve estável entre os diversos tratamentos, sendo aproximadamente 34% da população total (Figura 37B). A janela de células positivas para CD4 foi usada para delimitar os linfócitos T $CD4^+$ (Figura 37B) e a expressão de CD95L foi analisada neste grupo de células (Figura 37C). A expressão de CD95L nas células não estimuladas é praticamente ausente,

sendo que a estimulação por anti-CD3 aumentou significativamente a porcentagem de células positivas, efeito que foi reduzido pela adição de PGE_2.

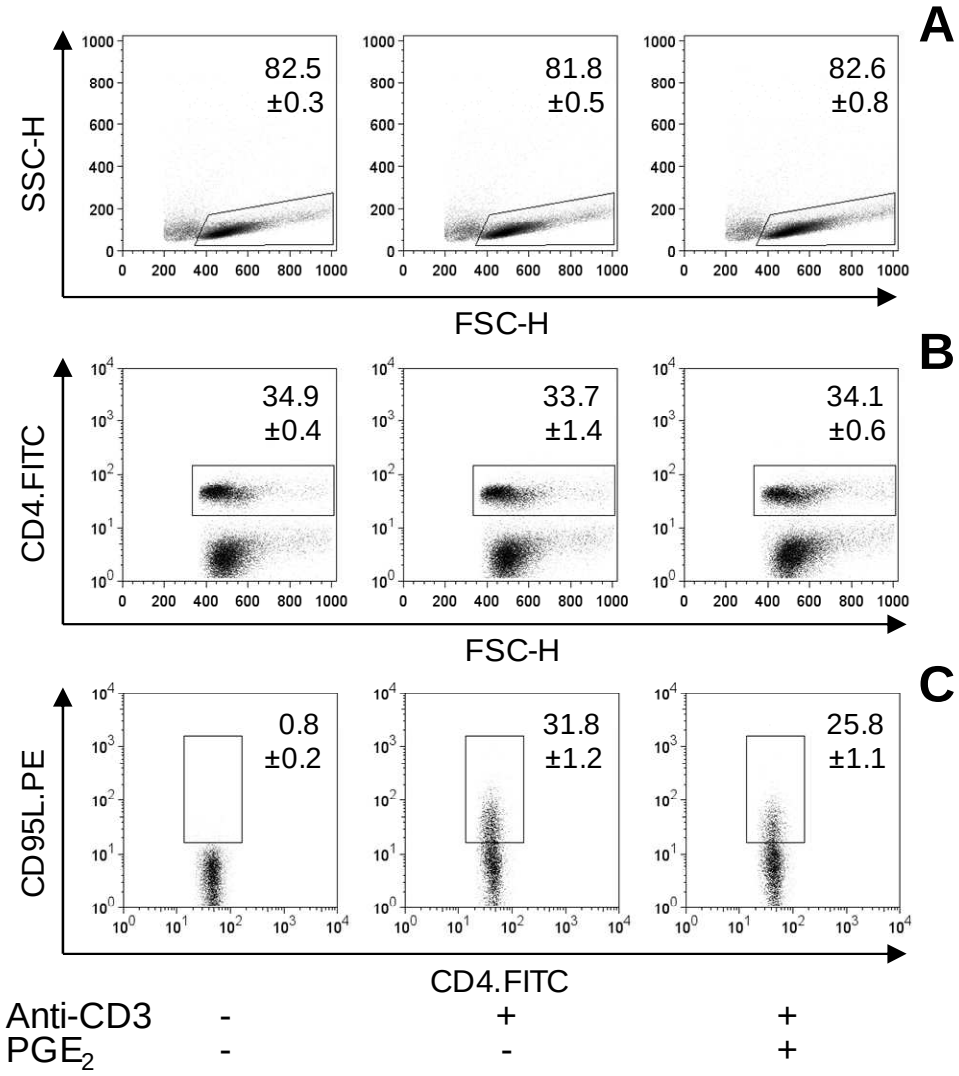

Figura 37. *PGE_2 inibe a expressão de CD95L induzida por anticorpos anti-CD3 em linfócitos T $CD4^+$ primários.* Células do baço de camundongos transgênicos BALB/c DO11.10 foram tratadas com cloreto de amônio para lise de eritrócitos e submetidas a ensaio de adesão por 2h para eliminação das células aderentes. As células restantes foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. Após 12h de estímulo, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.FITC e anti-CD95L.PE e analisadas por citometria de fluxo. Os linfócitos T $CD4^+$ foram discriminados utilizando-se os parâmetros FSCxSSC **(A)** combinados com FSCxCD4 **(B)** e analisados quanto à expressão de CD95L **(C)**. Os números representam a média e o desvio padrão de cada região mostrada.

Na seqüência, células não-aderentes recém-extraídas de baços de camundongos transgênicos DO11.10 foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 por 12h na presença de diferentes compostos. A análise da expressão do CD95L foi feita na população positiva para CD4 da mesma forma que no experimento anterior. Em nenhum dos casos, houve alteração da porcentagem de células viáveis e da proporção de células $CD4^+$ (dados não mostrados).

No primeiro caso, as células foram incubadas ou não com sobrenadantes de cultura de PECs estimuladas com LPS. Os sobrenadantes inibiram sensivelmente a expressão de CD95L induzida por anti-CD3 (Figura 38A). Em seguida, diferentes concentrações de PGE_2 foram usadas (10^{-8} e 10^{-7} M), e ambas as concentrações foram capazes de reduzir a expressão de CD95L, de forma dose-dependente (Figura 38B). Por fim, forskolina ou 6-BNZ foi adicionado às células estimuladas por anti-CD3 e, em ambos os casos, houve redução significativa da expressão de CD95L.

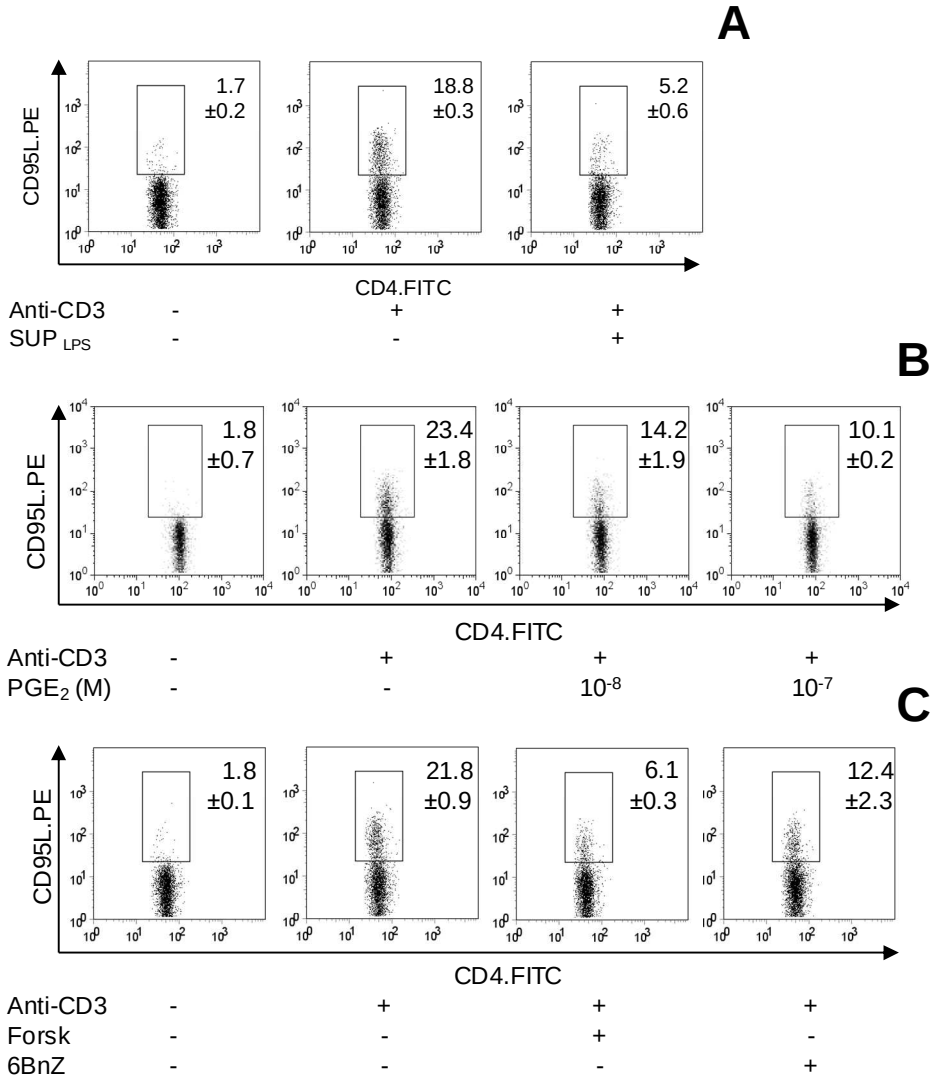

Figura 38. *Sobrenadantes de PEC (A), PGE_2 (B), Forskolina e 6-Bnz-cAMP (C) inibem a expressão de CD95L induzido por anticorpos anti-CD3 em linfócitos T $CD4^+$ primários.* Células do baço de camundongos transgênicos BALB/c DO11.10 foram tratadas com cloreto de amônio para lise de eritrócitos e submetidas a ensaio de adesão por 2h para eliminação das células aderentes. As células restantes foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença de **(A)** sobrenadantes de PEC estimulados com 1 µg/ml LPS, **(B)** 10^{-8} a 10^{-7} M PGE_2 ou **(C)** 10 µM forskolina ou 125 µM 6-Bnz-cAMP. Após 12h de estímulo, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.FITC e anti-CD95L.PE e analisadas por citometria de fluxo. Os linfócitos T $CD4^+$ foram segregados do resto da população utilizando-se os parâmetros FSCxSSC e FSCxCD4 e analisados quanto à expressão de CD95L. Os números representam a média e o desvio padrão de cada região mostrada. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

Os mesmos experimentos acima foram realizados com células de linfonodo de camundongos BALB/c DO11.10 e também com células de baço e linfonodo de camundongos BALB/c selvagens. Em todos os casos o padrão de resultados foi o mesmo, ou seja, a adição de PGE_2 (ou compostos que induzam esta via) inibiu a expressão de CD95L (dados não mostrados).

Porém, como já esperado, as células recém-extraídas tanto de baço quanto de linfonodo não morrem por estímulo via TCR/CD3. Para que os linfócitos T se tornem sensíveis à AICD, as células devem ser ativadas e sofrer alguns ciclos de proliferação na presença de IL-2 (Refaeli *et al.*, 1998). Sendo assim, blastos de células T $CD4^+$ foram gerados para avaliar se, neste caso, a PGE_2 seria capaz de inibir a expressão de CD95L e, conseqüentemente, a AICD. A geração destes blastos foi feita a partir de células não-aderentes de baço de camundongos BALB/c DO11.10, que foram estimuladas por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 por 48h, seguidas de mais quatro dias na presença de 100 U/ml IL-2. Ao final deste período, mais de 95% das células eram positivas para CD3 e CD4 e foram consideradas blastos de linfócitos T $CD4^+$ (dados não mostrados). Estas células foram, então, estimuladas com anticorpos anti-CD3 na presença ou não de PGE_2 e a expressão de CD95L e AICD analisadas. A figura 39 mostra que a PGE_2 foi capaz de reduzir significativamente a expressão de CD95L induzida por anti-CD3, bem como os índices de morte destas células. O mesmo ocorreu quando, ao invés de PGE_2, foi adicionada a forskolina.

Tomados em conjunto, os dados obtidos demonstram que a proteção conferida pela PGE_2 contra a AICD através da inibição da expressão de CD95L não funciona somente em hibridomas de linfócitos T, mas também ocorre tanto em linfócitos T $CD4^+$ recém-extraídos de baço ou linfonodo como em blastos de linfócitos T $CD4^+$ gerados *in vitro*.

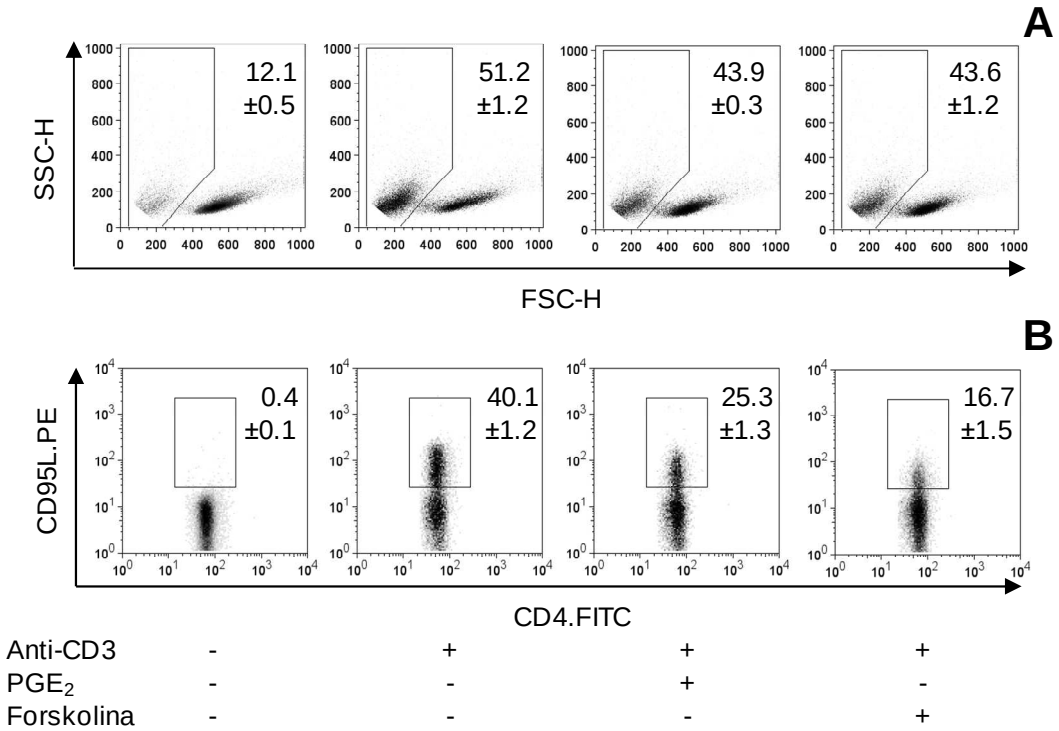

Figura 39. *PGE_2 e forskolina inibem a expressão de CD95L e a morte induzida por anticorpos anti-CD3 em blastos de linfócitos T $CD4^+$.* Blastos de linfócitos T derivados de baço de camundongos transgênicos BALB/c DO11.10 (ver seção de Materiais e Métodos) foram estimulados por anticorpos anti-CD3 na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2 ou 10 µM forskolina. Após 18h, a quantificação das taxas de morte foi feita através da migração da população nos parâmetros FSCxSSC **(A)**. Alternativamente, após 8h de estímulo, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.FITC e anti-CD95L.PE e analisadas por citometria de fluxo, sendo que a análise da expressão de CD95L foi feita na população positiva para CD4 **(B)**. Os números representam a média e o desvio padrão de cada região mostrada. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

Para investigar se a inibição da expressão de CD95L nos linfócitos T $CD4^+$ pela PGE_2 também impede os linfócitos de matarem as células apresentadoras de antígeno, possíveis alvos da expressão aumentada de CD95L nos linfócitos T, foi feita uma co-cultura de blastos de linfócitos T $CD4^+$ com células J774. Sendo assim, a co-cultura foi realizada incubando-se os blastos derivados de BALB/c DO11.10 com células J774 na proporção de três blastos para cada macrófago. As células J774 foram coradas com CFSE com o intuito de facilitar a análise das diferentes populações. A separação por intensidade de fluorescência (figura 40A, painel superior) evidenciou que as populações também se distinguiam quanto aos parâmetros FSC e SSC, ocupando diferentes posições no gráfico FSCxSSC (Figura 40A, painel inferior).

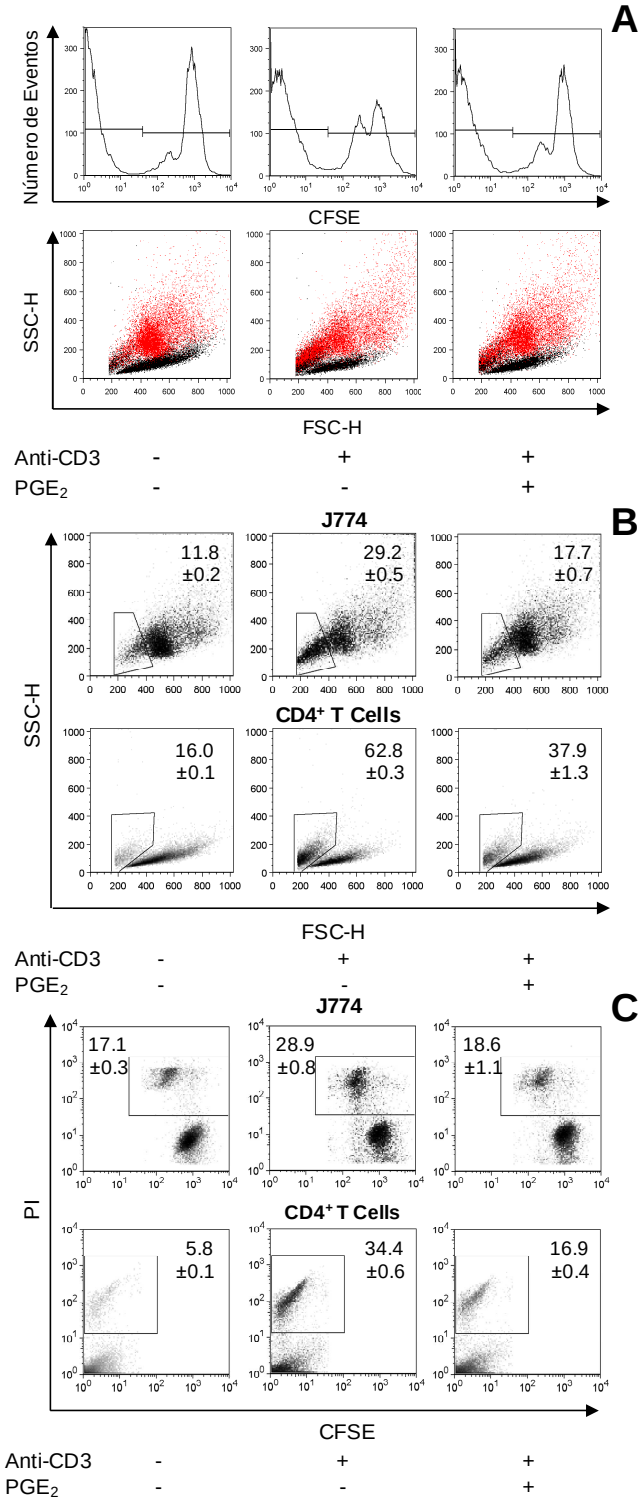

Figura 40. *PGE_2 inibe a morte induzida por anticorpos anti-CD3 em ambas as populações de uma co-cultura de J774 e esplenócitos não-aderentes.* As células J774 foram coradas com CFSE e co-cultivadas com células não aderentes derivadas de baço de camundongos transgênicos BALB/c DO11.10 na proporção de 3 esplenócitos para cada macrófago. As culturas foram estimuladas ou não por 24h com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placas na presença ou não de 10^{-7} M PGE_2. **(A)** A discriminação entre as duas populações celulares foi feita pela diferença na marcação com CFSE (painel superior), sendo que também ocupam diferentes regiões no gráfico FSCxSSC (painel inferior) **(B)** Quantificação das taxas de morte nas diferentes populações celulares, através da migração nos parâmetros de FSCxSSC. **(C)** Quantificação das taxas de morte nas diferentes populações celulares, através da incorporação de iodeto de propídeo. Os gráficos referentes às células J774 estão apresentados no painel superior e os referentes aos esplenócitos estão apresentados no painel inferior.

Estas células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 na presença ou não de PGE_2 e a análise da taxa de morte foi feita por dois diferentes parâmetros, tanto por diminuição de tamanho e ganho de granulosidade (FSCxSSC; Figura 40B) quanto por incorporação de iodeto de propídeo (Figura 40C). Nas duas análises, é possível perceber que houve a indução de AICD após estimulação dos linfócitos T $CD4^+$ com anticorpos anti-CD3 (Figura 40B-C, painéis inferiores) e esta ativação, que leva à expressão de CD95L (Figura 39B), também causa um aumento de morte das células J774 (Figura 40B-C, painéis superiores). A PGE_2 não só inibiu a AICD dos blastos de linfócitos T $CD4^+$ mas também reduziu significativamente a morte das células J774.

Sendo assim, a PGE_2 parece ser importante tanto para impedir os linfócitos T $CD4^+$ de morrer enquanto há a percepção da presença de patógenos pelas células apresentadoras de antígeno (via TLRs), como também para bloquear a morte das células que tem como função estimular a resposta adaptativa.

5 Discussão

5.1 Considerações iniciais

A maior parte dos resultados apresentados na sessão anterior foi recentemente aceito para publicação na revista *Cell Death and Differentiation*, da Editora *Nature Publishing Group*, cujo fator de impacto do ano passado foi avaliado em 8,12. A versão para correção (*galley proof*) do artigo aceito está anexada a esta tese (Anexo 1).

Este projeto teve início com uma pergunta simples, que acabou por direcionar todo o trabalho realizado durante este doutorado. A pergunta era se as células apresentadoras de antígeno poderiam modular a morte induzida por ativação de linfócitos T $CD4^+$ através dos fatores solúveis produzidos por elas. A relevância da pergunta à época de sua formulação consistia no fato de entender se as APCs poderiam, de algum modo, atrasar a morte dos linfócitos T ativados enquanto a fonte da ativação do sistema imune não fosse controlada ou eliminada. Como na grande parte dos casos, a ativação dos linfócitos T $CD4^+$ se dá pela apresentação via MHC classe II de peptídeos derivados de patógenos ou de antígenos considerados estranhos ao organismo, a morte precoce dos linfócitos expandidos justamente para controlar a infecção poderia ser prejudicial para o bom desfecho da resposta imune. Por outro lado, a ativação e manutenção de linfócitos T auto-reativos no organismo poderia gerar distúrbios para a homeostasia do sistema, causando, em casos mais extremos, síndromes auto-imunes. Sendo assim, foi aventada a hipótese de que as células apresentadoras de antígenos poderiam produzir fatores solúveis para inibir a morte dos linfócitos T ativados enquanto houvesse a percepção da presença de patógenos no sistema. Uma vez diminuída a carga patogênica, as células apresentadoras de antígeno não mais seriam capazes de bloquear a AICD e a população de linfócitos T $CD4^+$ seria reduzida, como necessário e desejado. No caso dos linfócitos T auto-imunes, a percepção do auto-antígeno não viria acompanhada de percepção de perigo e assim, as células apresentadoras de antígeno não produziriam fatores solúveis capazes de inibir a morte destas células.

Sendo assim, o projeto foi iniciado com o estabelecimento de um modelo simples e facilmente reprodutível de indução de AICD em linfócitos T $CD4^+$, no qual seria testado o efeito dos fatores solúveis produzidos pelas APCs. O modelo escolhido e padronizado foi a indução de hibridomas de linfócitos T $CD4^+$ à morte por anticorpos anti-CD3 agonistas adsorvidos à placa de cultura. A linhagem celular utilizada inicialmente foi a linhagem murina

DO11.10, que foi obtida pela fusão entre linfócitos T $CD4^+$ com TCR transgênico que reconhece o peptídeo 323-339 da ovalbumina apresentado em um contexto de MHC classe II $I\text{-}A^d$ e células de timoma nocautes para o TCRβ denominada de BW5147. As células foram selecionadas para a alta produção de IL-2 quando estimuladas pelo complexo MHC+antígeno ou concavalina A (Kappler *et al.*, 1981) e posteriormente descritas como células sensíveis à AICD induzida por anticorpos anti-CD3 ou pela combinação de PMA e ionomicina (Brunner *et al.*, 1995). A grande vantagem deste modelo é que a AICD nestas células ocorre já ao primeiro estímulo, não necessitando de um estímulo prévio e descanso por alguns dias (Figura 1) (Brunner *et al.*, 1995).

5.2 Efeito de sobrenadantes de APCs em hibridomas de linfócitos T DO11.10

Após a padronização do modelo experimental, o primeiro passo foi testar a premissa básica da tese, que era investigar se os sobrenadantes de culturas de células apresentadoras de antígeno eram capazes de inibir a morte dos hibridomas DO11.10. Para tanto, sobrenadantes de cultura de células J774 (Figura 2), células de exsudato peritoneal (Figura 6) ou células dendríticas (Figuras 6 e 7) foram adicionados aos hibridomas DO11.10 durante o estímulo indutor de AICD e, em todos os casos, houve uma redução da morte dos hibridomas, demonstrando que as APCs possuem a capacidade de secretar fatores solúveis inibidores da morte de linfócitos T.

Sinais de perigo, tais como padrões moleculares associados a patógenos (LPS, entre outros) ou mediadores inflamatórios são reconhecidamente necessários para induzir a expansão e diferenciação de linfócitos T antígeno-específicos em células efetoras capazes de conferir imunidade, além de aumentar sua sobrevida (Pasare e Medzhitov, 2005). Na ausência de tais sinais, mesmo que o linfócito T reconheça o antígeno complexado ao MHC, seu destino normalmente é a anergia e possível morte ao invés de expansão e ativação (Schwartz, 2003; Zheng *et al.*, 2008). Parte da decisão entre anergia seguida de morte ou ativação e expansão dos linfócitos ocorre pela interação entre moléculas de superfície dos linfócitos T e das APCS, tais como CD28/B7, CTLA-4/B7, CD40L/CD40, CD2/LFA-3, PD-1/PD-L1 e TIM-1/TIM-4, entre outras, que têm suas expressões moduladas pelos sinais de perigo e inflamação (Chambers e Allison, 1999; Rodriguez-Manzanet *et al.*, 2008). Porém, existem ainda poucos relatos na literatura sobre a participação dos fatores solúveis secretados por

APCs quando estimuladas por sinais de perigo na decisão sobre vida e morte de linfócitos T $CD4^+$.

Como demonstrado nas figuras 2, 3 e 6, a adição de LPS durante a cultura de células de exsudato peritoneal, que são basicamente macrófagos, potencializou a secreção de um fator inibidor da AICD de hibridomas DO11.10, reduzindo drasticamente os níveis de morte induzida por anti-CD3. Este fenômeno é independente do *background* genético das células, já que os macrófagos peritoneais de diversas linhagens de camundongos, tais como 129, BALB/c, C57Bl/6 e C3H.HePas responderam da mesma forma ao LPS, produzindo sobrenadantes mais potentes contra a AICD. Foi descartado um possível efeito protetor direto do LPS nos hibridomas (Figura 4), bem como a redução da AICD pela exaustão do meio de cultura (Figura 5).

Além de sobrenadantes de macrófagos peritoneais e linhagens macrofágicas, foram feitos experimentos utilizando-se sobrenadantes de cultura de células dendríticas derivadas de medula óssea. Dois protocolos distintos são normalmente usados para a geração de DCs a partir de medula óssea, sendo que a diferença entre eles é a adição ou não de IL-4 à cultura destas células com GM-CSF. O fenótipo final das duas células é muito semelhante entre os dois protocolos, resultando em algumas diferenças sutis na expressão de MHC de classe II, secreção de citocinas e na morfologia dos endossomos, sendo que ambos os protocolos geram DCs imaturas, que são células altamente endocíticas, expressando baixos níveis de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias, tais como B7.1 e B7.2 (Cella *et al.*, 1997; Chapuis *et al.*, 1997; Sallusto e Lanzavecchia, 1994; Zhou e Tedder, 1996). A maturação das DCs por LPS, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, causa redução na capacidade endocítica, aumento de MHC classe II e moléculas co-estimulatórias, induz sua migração para órgãos linfóides secundários, além de alterar o padrão de moléculas secretadas, tais como um aumento de IL-12 e PGE_2 (Cella *et al.*, 1997; De Smedt *et al.*, 1996). Quando os sobrenadantes de DCs imaturas e maduras foram comparados quanto ao seu efeito protetor contra a AICD, observou-se que os sobrenadantes de células maduras eram muito mais potentes que os das células imaturas (Figura 6), independentemente se as DCs foram geradas com GM-CSF ou GM-CSF + IL-4 (Figura 7A) e do *background* genético dos camundongos doadores da medula óssea (dados não mostrados). Em conjunto, estes dados demonstram que as células dendríticas maturadas por LPS aumentam a produção de fatores solúveis que são capazes de inibir a AICD de hibridomas DO11.10, da mesma forma que ocorre com os macrófagos peritoneais quando estimulados com LPS.

Sendo assim, estes resultados demonstram que sinais de perigo, tais como o LPS, não são só importantes para aumentar moléculas co-estimuladoras na superfície das APCs e mediar a ativação e expansão de linfócitos T, mas também são capazes de alterar os fatores solúveis produzidos por essas células, alterando o microambiente no qual os linfócitos T irão reconhecer o antígeno, com profundos impactos na sobrevida destas células.

Um dos principais fatores solúveis produzidos pelas células dendríticas quando maduras é a IL-12, que age em linfócitos T virgens, polarizando-os para a subpopulação Th1 (D'Andrea *et al.*, 1992; Macatonia *et al.*, 1995). As células dendríticas não só produzem IL-12, mas também respondem a esta citocina, que potencializa sua ativação e maturação principamente via indução da produção de IFN-γ (Bastos *et al.*, 2004; Puddu *et al.*, 1997). Por sua vez, o IFN-γ, tanto o produzido pelas próprias APCs quanto os derivados de linfócitos T, ativam as APCs e aumentam sua capacidade de apresentação de antígenos, tornando-se assim, uma alça de estímulo positivo (Frucht *et al.*, 2001). Já foi também demonstrado que o próprio estímulo de LPS pode induzir a produção de IFN-γ em células apresentadoras de antígeno (Fultz *et al.*, 1993). Para investigar a participação destas duas citocinas na produção do fator inibidor da AICD fez-se uso de camundongos nocautes para IL-12, IFN-γ ou para ambas as citocinas. A figura 7B mostra que não houve qualquer alteração nos níveis de proteção conferidos pelos sobrenadantes de células dendríticas nocautes estimuladas por LPS, se comparados com os resultados obtidos com as DCs selvagens. Sendo assim, as citocinas IL-12 e IFN-γ não são essenciais para a produção do fator inibidor, nem são, *per se*, o fator de inibição.

5.3 Participação dos TLRs na produção do fator de inibição da AICD

Como mencionado anteriormente, os macrófagos e células dendríticas possuem um conjunto de receptores denominados de TLR (*Toll-Like Receptors*), que percebem padrões associados a patógenos. Dentre eles, o que responde majoritariamente ao estímulo por LPS é o TLR4 (Chow *et al.*, 1999), enquanto que o TLR2 é conhecido por se ligar a LPS atípicos (Hirschfeld *et al.*, 2001). A associação do TLR4 ao LPS é favorecida pela molécula CD14, uma proteína presente na superfície dos macrófagos que confere maior afinidade entre o LPS e o TLR4 (Jiang *et al.*, 2000).

No intuito de analisar a participação das vias mediadas por TLR4 e TLR2 na produção do fator inibidor da AICD induzido por LPS, foram usados PECs de camundongos deficientes para cada um dos receptores, sendo que os resultados confirmaram que este mecanismo é dependente de TLR4 (Figura 8) e independente de TLR2 (Figura 9). Como o LPS utilizado é derivado de *E. coli*, e não de bactérias atípicas, os resultados que demonstram que a sinalização é via TLR4 e não TLR2 está de acordo com a literatura (Hoshino *et al.*, 1999).

Porém, quando foram usados PECs de camundongos nocautes para CD14, não houve qualquer alteração nos níveis de proteção induzidos por LPS, demonstrando que, neste modelo, o CD14 é dispensável para a potencialização do efeito dos sobrenadantes induzida por LPS. Esperava-se que a deficiência de CD14 fosse reduzir a capacidade dos PECs em responder ao LPS, já que o CD14 facilita a interação entre o TLR4 e o lipopolissacarídeo. Duas hipóteses poderiam explicar este fato. A primeira é que a concentração de LPS ministrada seria alta o bastante para que os receptores TLR4 fossem rapidamente ativados, não permitindo a diferenciação entre a presença e ausência de moléculas auxiliares. A outra possibilidade é que a mínima estimulação do receptor já seria suficiente para que a indução da produção deste fator inibidor fosse máxima. Neste sentido, existem diversos relatos na literatura de sinalização de LPS independente de CD14, principalmente em altas concentrações de LPS (Gangloff *et al.*, 1999; Lynn *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 2000).

O engajamento do TLR4 com o LPS desencadeia duas vias de sinalização distintas, sendo que uma delas é dependente da molécula adaptadora MyD88 enquanto a outra é independente de MyD88 e dependente de TRIF/TRAM (Kawai e Akira, 2006). A via mediada por MyD88 controla as respostas inflamatórias induzidas por LPS, sendo que os principais alvos de ativação desta via são o fator de transcrição NF-κB, a Cox-2 e as quinases p38 e JNK (Takeuchi *et al.*, 2000). Células deficientes de MyD88 estimuladas com LPS perdem, portanto, a capacidade de secretar diversas citocinas e mediadores lipídicos, tais como a IL-1β, a IL-6, o TNF-α e a PGE_2 (Kawai *et al.*, 1999; Rhee e Hwang, 2000). Já a via independente de MyD88 ativa o fator de transcrição IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*), que controla a expressão de um outro subgrupo de moléculas, tais como os interferons do tipo I e quimiocinas (Kawai *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003).

Os dados resultantes da utilização dos sobrenadantes de PECs deficientes em MyD88 demonstraram que o aumento induzido por LPS na produção do fator inibidor da AICD é totalmente dependente da via controlada por esta molécula adaptadora, já que não há diferença entre os sobrenadantes gerados em células estimuladas por LPS e células não

estimuladas (Figura 10). Isto demonstra que, dentre as duas vias iniciadas por TLR4, é a via dependente de MyD88 que medeia a sinalização para a produção do fator de inibição da AICD.

Outra observação que pode ser feita é que os sobrenadantes de PECs deficientes em MyD88 não-estimuladas por LPS perdem completamente sua capacidade protetora (Figura 10), fenômeno que não ocorre com os sobrenadantes derivados de PECs deficientes em TLR4 (Figura 8). Em conjunto, estes dados indicam que o MyD88 participa de uma outra via de indução da produção deste fator inibidor, que é independente da sinalização via TLR4. Como a via do MyD88 é central na sinalização de quase todos os TLRs (Kawai e Akira, 2006) é possível que a produção basal do fator inibidor não seja uma atividade intrínseca da célula, mas que esteja ligada à presença de algum ligante de TLR, seja ele um ligante endógeno ou um ligante advindo de fontes exógenas (apesar de todos os experimentos seguirem as mais restritas condições de higiene e boa prática científica, é virtualmente impossível eliminar a hipótese da presença de baixíssimos níveis de contaminantes, sejam eles advindos do material usado, sejam eles advindos da própria flora do animal). Uma outra possibilidade é que a própria cultura das células *in vitro* já seja capaz de ativar basalmente uma das vias mediadas por MyD88, independentemente da presença de ligantes de TLR. Esta hipótese se baseia no fato que a molécula MyD88 faz parte da sinalização não só dos TLRs, mas também do receptor de IL-1, e que o espraiamento das células na placa de cultura induz a expressão e secreção de IL-1 (Medzhitov *et al.*, 1998; Wesche *et al.*, 1997). De qualquer modo, o resultado da completa dependência da via do MyD88 para a produção do fator de inibição da AICD abre a possibilidade de que outros ligantes de TLR, que iniciam a via mediada por MyD88, também podem induzir uma maior proteção dos linfócitos T que estão interagindo com as células apresentadoras de antígeno num contexto de infecção. Atualmente, esta linha de pesquisa está sendo alvo de estudo do nosso grupo.

5.4 Caracterização do fator de inibição da AICD presente nos sobrenadantes

Os experimentos realizados demonstraram que, apesar da síntese do fator ser dependente de síntese protéica (Figura 11), este fator, em si, não era uma proteína, já que nem o tratamento com calor nem com proteinase K reduziu os níveis de proteção conferidos

pelos sobrenadantes (dados não mostrados). Sendo assim, as atenções se voltaram aos mediadores não-protéicos, tais como os mediadores lipídicos.

Dentre as principais moléculas induzidas pela via iniciada pelo TLR4 e mediada por MyD88 destaca-se a ciclooxigenase-2 (Cox-2) (Hwang, 2001). Esta proteína participa do metabolismo do ácido araquidônico, convertendo-o em prostaglandinas e, diferentemente da Cox-1, é indutível, sendo responsável pelos picos de produção de prostaglandinas em sítios inflamatórios (Feng *et al.*, 1993). A prostaglandina E_2 (PGE_2), a mais abundante entre as prostaglandinas, é um conhecido mediador negativo de processos inflamatórios (Yarovinsky e Hunninghake, 2001) e também já foi descrita como inibidora da morte em diversos modelos experimentais (Bowolaksono *et al.*, 2008; Casado *et al.*, 2007; George *et al.*, 2007; Leone *et al.*, 2007), inclusive em linfoblastos (Goetzl *et al.*, 1995) e linfócitos T (Porter e Malek, 1999). Portanto, por apresentar as características de não ser uma proteína, ter sua produção dependente de uma proteína induzível por LPS e já ter sido envolvida com proteção contra morte, a PGE_2 era uma forte candidata a ser o ou um dos fatores presentes nos sobrenadantes das APCs responsáveis por inibir a AICD dos linfócitos T.

Primeiramente, foi encontrado um aumento da expressão de Cox-2 em células estimuladas com LPS (Figura 12A), com um aumento correspondente de PGE_2 nos sobrenadantes destas células (Figura 12B), o que está de acordo com a literatura.

Porém, vale ressaltar que, nestas células, foi encontrada uma expressão basal da Cox-2 com a conseqüente produção basal de PGE_2, indicando que, mesmo na ausência da adição do LPS, há a indução (menor) da expressão de Cox-2. Estes dados reforçam a hipótese que ligantes endógenos ou contaminantes de TLR ou mesmo o espraiamento celular ativem a via dependente de MyD88 para a produção de PGE_2. Infelizmente, devido à falta de fornecimento de animais nocautes para MyD88, a quantificação de PGE_2 nos sobrenadantes destes animais não pôde ser realizada.

Para entender se este aumento na expressão de Cox-2 e maior secreção de PGE_2 induzidos por LPS eram responsáveis pela potencialização dos efeitos dos sobrenadantes, foram usados três diferentes inibidores da via de síntese da PGE_2. Nos três casos, houve uma forte redução na concentração de PGE_2 nos sobrenadantes das células tratadas (Figura 13A), impactando na capacidade dos sobrenadantes em impedir a AICD (Figura 13B).

Além disso, a adição de PGE_2 sintética mimetiza a ação dos sobrenadantes, ou seja, reduz a AICD dos hibridomas DO11.10, de forma dose-dependente (Figura 14 e 15). Convertendo-se a concentração dosada por ELISA nos sobrenadantes de células estimuladas,

que é dada por pg/ml, em molaridade, a maioria dos sobrenadantes das células estimuladas por LPS apresentou uma concentração de PGE_2 entre 10^{-7} e 10^{-6}M (Figuras 12B, 13A e dados não mostrados). Portanto, os valores para a PGE_2 encontrada nos sobrenadantes foram similares às concentrações de prostaglandina E_2 exógena que apresentaram efeito na inibição da morte de hibridomas DO11.10 por AICD. Sendo assim, os níveis de PGE_2 podem ser diretamente correlacionados com os níveis de proteção conferidos pelos sobrenadantes estimulados ou não com LPS.

É interessante ressaltar que os inibidores da ciclooxigenase, tais como a aspirina® (ácido acetil-salicílico) e os coxibs (celecoxib, rofecoxib, lumiracoxib, entre outros), são vastamente utilizados como fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, sendo em alguns casos utilizados de forma crônica, como no tratamento de osteoartrose, artrite reumatóide e espondilite anquilosante (Bodor e Habener, 1998; Poddubnyy *et al.*, 2008). Os resultados aqui apresentados mostram que a PGE_2 possui papel não só na inflamação, mas também na sobrevida de células da resposta imune adaptativa. Sendo assim, estudos sobre o aumento de incidência de infecções em pacientes com uso crônico destes medicamentos seriam de grande importância para analisar se o uso contínuo destes medicamentos não favorece a morte precoce dos linfócitos T ativados e o aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas.

5.5 Efeito da PGE_2 e dos sobrenadantes na via mediada por CD95/CD95L

Após identificar a PGE_2 como o fator protetor presente nos sobrenadantes de APCs estimuladas com LPS, o próximo passo foi entender como este mediador lipídico inibe a morte em linfócitos T. A primeira possibilidade é que a PGE_2 atuaria neste processo de forma indireta, inibindo a proliferação. Como já foi demonstrado que a susceptibilidade a AICD é, em alguns casos, dependente de proliferação (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999; Fotedar *et al.*, 1995) e do estágio do ciclo celular (Li *et al.*, 2000; Lissy *et al.*, 1998) era importante descartar esta hipótese para começar a investigar a possível influência direta da PGE_2 nas vias de indução de morte por AICD. Em diversos artigos científicos, a PGE_2 é relatada como supressora de ciclo celular por inibir a secreção de IL-2 (Chouaib *et al.*, 1985), por aumentar o p27Kip1 (inibidor de cdk4) (Chemnitz *et al.*, 2006) ou por inibir a expressão de D2, D3 e cdk4 (Ward *et al.*, 1996). Por outro lado, existem artigos mostrando que a PGE_2 pode exibir

efeito contrário, aumentando a proliferação celular (Andreis *et al.*, 1981; Gupta e Dubois, 2001; Skouteris *et al.*, 1988), por potencializar a via do EGFR (Daub *et al.*, 1996) ou por ativar vias mitogênicas, tais como a PI3K e a ERK1/2 (Dajani *et al.*, 2008).

Os resultados apresentados na figura 16 demonstram que, em hibridomas DO11.10, a PGE_2 não altera o ciclo celular tanto quando adicionada sozinha como também quando combinada com a estimulação por anticorpos anti-CD3 , indicando que o efeito supressor da AICD não é via inibição da proliferação. Sendo assim, a etapa seguinte foi investigar se a PGE_2 modulava as vias que participam diretamente dos mecanismos de indução e execução da morte dos linfócitos T.

Como já mostrado anteriormente, a principal via descrita de execução da morte por AICD em linfócitos T é dependente da interação da molécula CD95L com seu receptor correspondente CD95 (Brunner *et al.*, 1995). Quando isso ocorre, os receptores CD95 são aglutinados, recrutando a molécula adaptadora FADD, que recruta caspase-8 ou caspase-10, ativando-as. Segue-se uma cascata de ativação de caspases que leva a célula a morrer por apoptose (Peter e Krammer, 1998). O FLIP, uma molécula com alta homologia com caspase-8, porém sem atividade catalítica, pode ser recrutado para o FADD durante a aglutinação de CD95, competindo com a caspase-8/-10 pelos domínios de interação com o FADD, tornando-se inibidora do processo de ativação da cascata apoptótica (Irmler *et al.*, 1997).

Portanto, para que esta via resulte em morte, o recrutamento de FLIP para o complexo contendo CD95 e FADD, denominado DISC, deve ser sensivelmente menor do que a caspase-8/-10. Este balanço entre FLIP e caspase-8/-10 ocorre principalmente com alterações nos níveis de expressão de FLIP, sendo que a susceptibilidade dos linfócitos T a AICD está intimamente ligada aos níveis reduzidos desta molécula (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999; Irmler *et al.*, 1997; Refaeli *et al.*, 1998). Por exemplo, os linfócitos T de pacientes lúpicos resistem à morte por AICD e anergia por aumentar a expressão de Cox-2. A inibição desta enzima, com a conseqüente diminuição da produção de PGE_2, leva estas células à morte por reduzir drasticamente os níveis de FLIP (Xu *et al.*, 2004).

Porém, o tratamento com sobrenadantes de APCs ou PGE_2 sintética não alterou significativamente os níveis de FLIP nos hibridomas DO11.10 (Figuras 17 a 19), indicando que, neste modelo, a resistência à AICD não é pelo aumento do FLIP. Como a redução do FLIP ocorre em linfócitos T durante os ciclos de proliferação pós-ativação (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999), o efeito da PGE_2 pode estar ligado à manutenção dos níveis de FLIP e não em um aumento de sua expressão quando adicionada de forma exógena.

Além da susceptibilidade ou resistência conferida pelos níveis de FLIP, o principal ponto de modulação da AICD é a expressão da molécula de CD95L, que é regulada majoritariamente a nível transcripcional (Refaeli *et al.*, 1998). Diversos grupos demonstraram que a interação dos anticorpos anti-CD3 com o complexo TCR/CD3 na superfície dos linfócitos T desencadeia diversas vias de sinalização, que culminam no aumento da expressão da molécula CD95L (Alderson *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995).

Nos hibridomas DO11.10, a expressão de CD95L induzida por estimulação via TCR/CD3 foi fortemente inibida na presença dos sobrenadantes de células dendríticas ou PECs estimulados com LPS (Figuras 17 e 18). A adição de PGE_2 sintética resultou no mesmo efeito, ou seja, a inibição da transcrição de CD95L (Figura 19).

Interessantemente, a PGE_2 já foi descrita como indutora da expressão de CD95L em diversos modelos (Jones *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; O'Callaghan *et al.*, 2008), sendo que um dos mecanismos identificados para a apoptose induzida por PGE_2 é justamente o aumento de expressão de CD95L (Jones *et al.*, 2004). Por outro lado, em acordo com os dados encontrados com DO11.10, a AICD de hibridomas de linfócito T 2B4.11.13 foi bloqueada por PGE_2 através da inibição de CD95L (Porter e Malek, 1999). Curiosamente, a PGE_2 derivada de fibroblastos pulmonares bloqueia a AICD de linfócitos T de forma CD95L-independente (Yarovinsky e Hunninghake, 2001). Esta diferença de resultados pode ser devido à expressão diferencial dos receptores de PGE_2 na superfície das células. Enquanto o aumento do CD95L parece ser mediado pelo receptor EP1 (Kim *et al.*, 2007; O'Callaghan *et al.*, 2008), a redução da expressão deste ligante parece ser via receptores EP2 e EP4 (Figuras 25 e 26) (Porter e Malek, 1999).

A análise da expressão protéica de CD95L (Figura 20) permite duas observações: primeiramente, ela corrobora os resultados obtidos por PCR, já que tanto a PGE_2 quanto os sobrenadantes de APCs inibiram fortemente a expressão de CD95L na superfície celular. Em segundo lugar, através deste tipo de técnica experimental, é possível individualizar a análise, que mostra que nem todas as células passaram a expressar maiores quantidades de CD95L, sendo que parte da população continuou com baixa expressão de CD95L. Vale lembrar que somente parte da população das células estimuladas por anticorpos anti-CD3 morre por este estímulo. Portanto, uma explicação plausível para esta resistência parcial seria a expressão diferencial de CD95L nestas células.

Levando-se em conta que: a) os sobrenadantes de APCs e PECs estimuladas por LPS possuem forte efeito protetor contra a AICD; b) o LPS induz a expressão de Cox-2 e a subseqüente síntese de PGE_2 por PECs e APCs; c) inibidores da Cox-2, tais como a indometacina e o NS398, inibem o aparecimento do fator protetor nos sobrenadantes de células tratadas com LPS; d) PGE_2 sintética mimetiza todos os efeitos dos sobrenadantes, inclusive a inibição transcripcional de CD95L; e e) moléculas Fas.Fc bloqueiam a AICD de hibridomas DO11.10 (Figura 1) é possível concluir que a proteção pelos sobrenadantes de APCs estimuladas com LPS contra a AICD de linfócitos T é, em grande parte, induzida pela PGE_2. Estas observações estão de acordo com dados da literatura que mostram que a sobrevida prolongada de linfócitos T $CD45RO^+$ nos espaços pleurais inflamados ocorre por concentrações elevadas de PGE_2 (Pace *et al.*, 2007) e que linfoblastos $CD4^+$ e $CD8^+$ podem ser resgatados da morte por ConA ou fitohemaglutinina por PGE_2 (Goetzl *et al.*, 1995).

Para confirmar os resultados acima e também investigar se a PGE_2 poderia ter um efeito posterior ao acoplamento do CD95L com o receptor CD95, foram realizados experimentos nos quais a indução de morte foi feita através de anticorpos anti-CD95 agonistas. Surpreendentemente, os sobrenadantes de PECs, estimulados ou não com LPS, potencializaram a apoptose induzida por estimulação do receptor CD95L (Figura 21). Mais surpreendente ainda foi observar que a PGE_2 também era a responsável por este efeito, já que a adição de PGE_2 sintética mimetizou os efeitos potencializadores dos sobrenadantes (Figura 22).

A primeira observação que deve ser feita é que a concentração do mediador lipídico para exercer este efeito foi significativamente menor do que o necessário para proteger os hibridomas DO11.10 da AICD induzida por anticorpos anti-CD3, tanto que concentrações mínimas, tais como 10^{-10}M, já possuem forte efeito potencializador da morte por anti-CD95, mas são inócuas contra a AICD.

Apesar de não ter sido feito nenhum experimento para se investigar os mecanismos que regulam este fenômeno, existem dados na literatura que permitem, ao menos, levantar algumas hipóteses. Uma delas, que é a inibição da expressão de FLIP, que permitiria um maior recrutamento das caspases iniciadoras ao receptor CD95, pôde ser prontamente descartada, já que nem a PGE_2 nem os sobrenadantes de DCs ou PECs alteraram a expressão de FLIP (Figuras 17 a 19).

A outra hipótese parte da observação que o receptor CD95 normalmente está ausente dos *lipid rafts* em células do tipo II e concentrado neles em células do tipo I, onde já

estão pré-associados (Muppidi e Siegel, 2004). *Lipid rafts* são estruturas ricas em receptores e moléculas de diversas vias de sinalização e, por se agregarem em estruturas maiores, estão envolvidos no controle da intensidade e eficiência na resposta a diversos estímulos celulares, tais como estimulação via TCR, BCR e FcεR (Dykstra *et al.*, 2003).

Após estimulação de ambos os tipos celulares, o CD95 é recrutado para os *lipid* rafts, potencializando o estímulo apoptótico. Agentes desorganizadores dos *lipid rafts* inibem a morte mediada por CD95 em células do tipo I (Muppidi e Siegel, 2004) e a distribuição forçada de CD95 para dentro dos *lipid rafts* em células do tipo II potencializa a morte mediada por este receptor (Legembre *et al.*, 2005). Linfócitos T são considerados células do tipo II e, portanto, possuem grande parte das moléculas de CD95 fora dos microdomínios lipídicos (Legembre *et al.*, 2006). Antes resistentes à morte por anticorpos anti-CD95, o recrutamento do receptor para os *lipid rafts* torna estas células muito mais sensíveis a este tipo de indução de morte (Muppidi e Siegel, 2004).

Entre os diversos mecanismos de recrutamento de moléculas para os *lipid rafts* vale ressaltar a fosforilação da ezrina, uma proteína associada ao citoesqueleto de actina (Barnhart *et al.*, 2003). Em linfócitos T $CD4^+$, a ezrina se co-localiza com o CD95 em células ativadas por longo período (susceptíveis à morte induzida por CD95L), mas não em células virgens ou recém-ativadas (refratárias à morte induzida por CD95L) (Barnhart *et al.*, 2003). A ligação da ezrina com o CD95 ocorre somente após sua fosforilação pela PKA no resíduo Ser^{66} (Zhou *et al.*, 2003) ou pela PKC em resíduos de treonina (Ng *et al.*, 2001). Após serem ativadas por fosforilação, as ezrinas também passam a ser pontes de aproximação entre as quinases PKA e PKC e seus substratos (Ruppelt *et al.*, 2007).

Portanto, sabendo-se que: a) PGE_2 ativa PKA via aumento de AMPc (Rubin *et al.*, 1991); b) a fosforilação de receptores pode causar sua translocação para os *lipid rafts*; c) ezrina é essencial na morte mediada por CD95; d) ezrina interage tanto com PKA e com CD95, podendo fazer uma ponte de interação entre estas duas moléculas; é possível supor que um dos mecanismos da sensibilização por PGE_2 da morte mediada por CD95 é a ação da PGE_2 na distribuição do CD95 para dentro dos *lipid rafts* e sua internalização em vesículas endossomais.

A possível sensibilização mediada por PGE_2 de células tipo II, tais como linfócitos T $CD4^+$ ativados, que são resistentes à indução de morte por CD95L, pode ser uma forma de eliminar essas células sem a necessidade de uma segunda estimulação via TCR, tanto durante a eliminação de clones ativados em regiões de imunoprivilégio (a retina, por

exemplo, produz PGE_2) como preservar tecidos cronicamente inflamados, já que nestes locais há um aumento tanto de CD95L como de PGE_2 (Bingham, 2002; Bodmer *et al.*, 2002; Bonfoco *et al.*, 1998; Seibert *et al.*, 1997). Adicionalmente, a potencialização da morte de linfócitos T por PGE_2 pode ser um mecanismo de escape de patógenos. Como ilustração desta hipótese, macrófagos infectados por HIV aumentam a sua expressão de Cox-2 (Alvarez *et al.*, 2008; Barreto-de-Souza *et al.*, 2006) e a estimulação de linfócitos T $CD4^+$ com gp120, uma proteína do vírus HIV é capaz de fosforilar a ezrina, aumentando a translocação de CD95 para os *lipid rafts,* sensibilizando os linfócitos T $CD4^+$ virgens à morte por mediada por CD95 (Luciani *et al.*, 2004).

Como não há ainda qualquer relato sobre a ação potencializadora da PGE_2 na via do CD95 na literatura e este mecanismo pode estar envolvido na preservação de sítios imunoprivilegiados (sejam eles constitutivos ou induzidos por inflamação) e também pode ser um importante mecanismo de escape viral, foi delineado um projeto de pesquisa que irá investigar as vias de sinalização envolvidas bem como o real significado deste aumento da sensibilidade de linfócitos T à morte por estimulação do receptor CD95.

5.6 Vias de sinalização induzidas pela PGE_2

Sabendo-se que a PGE_2 é o principal fator inibidor da AICD produzido por células apresentadoras de antígeno após estímulo com LPS e age em linfócitos T inibindo a expressão de CD95L, a etapa seguinte era entender qual era a via de sinalização utilizada pela PGE_2 para exercer este efeito anti-apoptótico.

Como já comentado anteriormente, já foram descritos quatro diferentes receptores para PGE_2, denominados EP1-4, que são um subgrupo da família de receptores acoplados a proteínas G (GCPR) (Narumiya *et al.*, 1999). A função exercida por cada receptor varia principalmente de acordo com a proteína G acoplada, fazendo com que a PGE_2 possa exercer efeitos diversos, e em alguns, até mesmo antagônicos (Sugimoto e Narumiya, 2007).

Nos hibridomas DO11.10, com exceção do EP1, todos os outros receptores estão expressos (Figura 23). Sendo assim, foi possível descartar a participação do influxo de cálcio na supressão de CD95L, já que é o EP1, por estar associado à proteína Gq, que medeia este efeito (Breyer *et al.*, 2001). Na verdade, o aumento do influxo de cálcio normalmente está associado ao aumento da expressão de CD95L, já que um dos seus efeitos é ativar o NFAT,

um dos principais fatores de transcrição envolvido na transcrição de CD95L (Latinis *et al.*, 1997; Loh *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1995). Foi demonstrado, inclusive, que a sinalização via EP1 aumenta os níveis de CD95L em tumores de cólon (O'Callaghan *et al.*, 2008) e também que esta via está associada a uma maior expressão de CD95L e apoptose em enterócitos infectados por *Clostridium difficile* (Kim *et al.*, 2007).

Nenhum dos receptores sofreu modulação através da estimulação com anticorpos anti-CD3 (Figura 23), o que significa que em ambas as condições experimentais os hibridomas DO11.10 percebem o sinal da PGE_2 através dos mesmos receptores e, provavelmente, com a mesma intensidade, ativando as mesmas vias de sinalização.

Como todos os outros receptores de PGE_2 estão envolvidos com a regulação dos níveis de AMPc, seja aumentando sua produção (EP2 e EP4), seja bloqueando sua síntese (EP3) (Sugimoto e Narumiya, 2007), o passo seguinte foi analisar qual das duas possibilidades era a responsável pela inibição da AICD de hibridomas DO11.10. Para tanto, foi usada a forskolina, um ativador da adenilato ciclase, que aumenta os níveis intracelulares de AMPc de forma independente aos EPs (Huang *et al.*, 1982). Os resultados obtidos com a forskolina indicam que os receptores EP2 e EP4 são os responsáveis pela proteção conferida por PGE_2, já que o aumento dos níveis de cAMP por forskolina inibiu a AICD (Figura 24). Estes dados são reforçados pelos encontrados pelo grupo do Dr. Ivanov, que mostra que a forskolina foi capaz de inibir a expressão de CD95L e apoptose em hibridomas de linfócitos T 2B4 induzidos por anti-CD3 (Ivanov *et al.*, 1997). Por outro lado, o grupo do Prof. Leon mostrou que a forskolina protege as células PC12 da morte por H_2O_2, porém sem inibir a expressão de CD95L ou CD95 (Facchinetti *et al.*, 2002).

Para comprovar a participação e estudar os efeitos específicos dos receptores EP2 e EP4 e na proteção contra a AICD, foram utilizados agonistas e antagonistas específicos para cada um dos receptores. Para o EP2 foram utilizados o agonista butaprost e o antagonista AH6809, enquanto que para o EP4 foram usados o agonista ONO-AE1-329 e o antagonista ONO-AE3-208. Inicialmente foram padronizadas as concentrações máximas de uso que não causassem morte nas células tratadas e que continuassem específicas para o receptor utilizado. Para tanto foram seguidas as recomendações dos fornecedores para as concentrações-limite de especificidade, além da realização de curvas dose-resposta para cada um dos compostos (Figuras 25 e dados não mostrados). Como mostrado na figura 27, os antagonistas reverteram a proteção conferida somente pelo agonista respectivo, ou seja, o AH6809 somente inibiu o efeito do butaprost e o ONO-208 só bloqueou a ação do ONO-

329, indicando que, nas concentrações utilizadas, os antagonistas agem de forma específica. Porém, como pode ser observado na própria figura 27, os antagonistas não foram capazes de reverter completamente a ação dos próprios agonistas. Este problema é recorrente entre os inibidores e agonistas das vias de síntese de prostaglandinas e leucotrienos (Peters-Golden, comunicação pessoal), sendo que é possível ver esta reversão parcial em diversos artigos científicos (Clarke *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2006; Norel *et al.*, 1999).

De qualquer modo, foi possível demonstrar que tanto o EP2 como o EP4 podem mediar o efeito protetor da PGE_2, de forma dose-dependente (Figura 25) e que, se estimulados em conjunto, agem de forma sinérgica (Figura 26). Este efeito sinérgico não é usualmente relatado, sendo que normalmente estes receptores possuem atividades redundantes. Uma possível explicação para esta ação sinérgica é que, apesar da principal via ativada pelos dois receptores causar o aumento de AMPc, existem vias secundárias que são preferencialmente iniciadas por somente um dos receptores. Por exemplo, somente o EP4 é capaz de ativar a via da PI3K, aumentando a resistência de células Jurkat contra a morte induzida por camptotecina (George *et al.*, 2007). Por outro lado, o EP2 pode transativar o receptor de EGF (EGFR), aumentando a proliferação do carcinoma de células escamosas (Donnini *et al.*, 2007).

A confirmação que ambos os receptores EP2 e EP4 são importantes na proteção induzida por PGE_2 foi obtida pela demonstração que os antagonistas de EP2 e EP4 (AH6809 e ONO-AE3-208, respectivamente) reduziram o efeito anti-apoptótico tanto da PGE_2 sintética como dos sobrenadantes de células estimuladas com LPS (Figura 28). O efeito combinado dos antagonistas foi maior do que quando utilizados sozinhos (Figura 29), indicando que a PGE_2 realmente sinaliza pelos dois receptores, que agem simultaneamente na sinalização da ação protetora contra a AICD.

Como já apontado anteriormente, o aumento do AMPc através da ativação de EP2 e EP4 causa principalmente a ativação de duas vias, sendo uma delas dependente da PKA e a outra, mais recentemente descoberta, independente de PKA e dependente de EPAC (Birukova *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). O desenvolvimento de fármacos análogos ao AMPc, porém específicos para a ativação das vias de PKA ou EPAC (6BNZ e 8-pCPT, respectivamente) (Christensen *et al.*, 2003), permitiu a melhor compreensão das moléculas-alvo de cada via, bem como a sua participação nos efeitos induzidos pelo aumento de AMPc (Kassel *et al.*, 2008; Stafford e Marnett, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008).

A utilização destes análogos de AMPc durante a indução de AICD demonstrou que o efeito protetor da PGE_2 é majoritariamente mediado pela via da PKA (Figura 30). Porém, apesar da estimulação da via de EPAC ser inócua quando realizada sozinha, ela é capaz de potencializar o efeito da PKA, aumentando a proteção conferida pelo 6BNZ contra a AICD em hibridomas DO11.10 (Figura 31).

O EPAC é um fator de troca de guanina, que ativa o RAP1 e RAP2, que por sua vez, ativam diversas proteínas *scaffolds*, tais como RhoGAP, AF6, RapL e Riam, que atuam no remodelamento de actina, na adesão célula-célula e também na exocitose (Bos, 2006). Não há nada descrito sobre a atuação desta via na transcrição de CD95L, nem sobre sua participação na resistência à AICD. De fato, as únicas referências sobre EPAC e receptores de morte descrevem que a resistência ao TNF-α por AMPc é independente da via da EPAC (Krakstad *et al.*, 2004; Stafford e Marnett, 2008).

Por outro lado, a atividade de PKA está bastante associada à proteção contra a apoptose. Por exemplo, fenilefrina induz a fosforilação de Bad através da PKA, protegendo cardiomiócitos da morte por 2-deoxi-D-glicose (Valks *et al.*, 2002); PGE_2, através da ativação da PKA protege neutrófilos humanos da morte induzida por TNF-α (Krakstad *et al.*, 2004); células alveolares são protegidas contra a morte durante estresse oxidativo através da fosforilação de CREB (*cAMP response element-binding*) mediada por PKA (Barlow *et al.*, 2008). Em relação aos linfócitos T, a ativação da PKA já foi associada à redução do CD95L e proteção contra a AICD através da ativação de CREB e indução de um repressor transcripcional chamado ICER (*inducible cAMP early repressor*) (Bodor *et al.*, 2002).

Sendo assim, os resultados encontrados mostrando que a via de PKA é a principal mediadora da inibição da morte de hibridomas DO11.10 está em acordo com a literatura. Porém, o efeito da via do EPAC em potencializar os efeitos protetores da PKA é inédito e requer futuras investigações para ser melhor esclarecido.

5.7 Efeito da PGE_2 na ativação de fatores de transcrição

Outra abordagem para perscrutar como a PGE_2 age para inibir a morte induzida por ativação do complexo TCR/CD3 é estudar a influência da PGE_2 na ativação dos fatores de transcrição responsáveis pela expressão do CD95L, mecanismo já demonstrado como sendo central na inibição da AICD por PGE_2 (Figuras 17 a 20).

Como já frisado anteriormente, há uma grande variabilidade de fatores de transcrição que podem estar envolvidos com a expressão de CD95L, que varia de acordo com a natureza do estímulo e do tipo celular (Latinis *et al.*, 1997; McClure *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999). Porém, um fator de transcrição que está sempre associado à transcrição desta molécula é o NFAT (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998). O fator de transcrição NFAT é, na verdade, uma família de fatores de transcrição que possui cinco membros denominados de NFAT1 a NFAT5, sendo que, com exceção do NFAT5, que é ativado por choque osmótico, todos os NFAT são ativados pela via da calcineurina iniciada pela mobilização de cálcio intracelular (Lee e Park, 2006). O NFAT1, também conhecido como NFATp ou NFATc2, foi escolhido como alvo de investigação por ter, entre os cinco membros, a associação mais forte com a expressão de CD95L e AICD (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002).

A inibição completa da AICD em hibridomas DO11.10 pela adição da ciclosporina A, uma droga supressora da calcineurina e, portanto, da via de ativação de NFAT, demonstrou que a participação do NFAT é essencial para a morte induzida por anti-CD3 em DO11.10 (Figura 32A). Os experimentos realizados na seqüência mostraram que a ativação por anticorpos anti-CD3 desfosforila o NFAT1 (Figura 32B), que migra para o núcleo (Figura 33) e interage com seqüências-consenso no DNA, transativando promotores que contêm seqüências específicas para NFAT1 (Figura 34). A PGE_2 foi incapaz de inibir qualquer uma destas etapas, indicando que o mecanismo de inibição do CD95L não é feito por um bloqueio direto na ativação do NFAT ou na transativação dos promotores respondedores a este fator de transcrição.

Curiosamente, existem poucos relatos na literatura que mostram a inibição da ativação de NFAT por PGE_2. No primeiro deles, não há qualquer menção ao mecanismo, a não ser pela indicação que é dependente do aumento de AMPc (Li e Handschumacher, 1996). Em dois artigos, há a sugestão de que a PGE_2 bloqueia a produção da IL-2 por suprimir a ligação do NFAT e do AP-1 no promotor desta citocina (Choudhry *et al.*, 2002). Por fim, um artigo mostra que a PGE_2 poderia impedir a dissociação da CSK do complexo Cbp/PAG, bloqueando a transdução do sinal do TCR para a ativação do NFAT (Vang *et al.*, 2003).

Existe, porém, uma possibilidade não abordada pelos experimentos realizados que abriria espaço para um efeito supressor da PGE_2 na atividade do NFAT. Isso se daria pela presença de repressores transcripcionais que se ligariam a regiões adjacentes ao sítio de ligação do NFAT ao DNA, impedindo que este interaja com o promotor e monte corretamente a maquinaria de transcrição para a transcrição do CD95L. Esta hipótese

encontra fundamento nos resultados apresentados pelo grupo do Prof. Gress, que mostrou a indução pelo aumento de AMPc de um repressor transcripcional denominado ICER, que se liga justamente a regiões adjacentes ao sítio proximal de interação entre o NFAT e o promotor de CD95L (Bodor *et al.*, 2002). Como o plasmídeo repórter 3xNFAT.Luciferase é derivado do promotor de IL-2 e não do promotor de CD95L, é possível que, ao se usar um plasmídeo repórter contendo o promotor de CD95L, a PGE_2 iniba a transativação por impedir a ligação do NFAT a ele via ICER. Foram realizados experimentos com um plasmídeo contendo exatamente este construto. Todavia, a expressão de luciferase induzida através de estimulação por anticorpos anti-CD3 ou PMA+ionomicina foi muito baixa, impedindo a análise com segurança dos efeitos da PGE_2 neste modelo (dados não mostrados).

Quanto à participação do AP-1, é possível inferir através dos resultados obtidos com os ensaios de promotor repórter (Figura 34), que é improvável a ação da PGE_2 no bloqueio da atividade deste fator de transcrição. Os sítios de interação no promotor repórter 3xNFAT.Luciferase são sítios compostos para NFAT e AP-1 (Macian *et al.*, 2000), que agem de forma sinérgica. Sendo assim, a inibição do AP-1 levaria a uma menor produção de luciferase por NFAT, o que não foi observado quando a PGE_2 foi adicionada às células (Figura 34).

Em diversos modelos experimentais, foi observado que a PGE_2 pode bloquear a expressão gênica dependente de NF-κB. Em queratinócitos, a PGE_2 suprimiu a produção de CCL27 por inibir a ativação do NF-κB através dos receptores EP2 e EP3 (Kanda *et al.*, 2004). Em monócitos, a PGE_2 inibiu a produção de IL-8 e TNF-α induzida por LPS através da inibição da degradação de IκB (Farmer e Pugin, 2000). Em linfócitos T ativados, a PGE_2 inibiu a secreção de IL-5 por impedir a ligação do NF-κB ao DNA (Borger *et al.*, 1998), sendo que o bloqueio da ligação pode ocorrer através do aumento dos níveis de AMPc intracelulares (Min *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1994). Porém, em alguns casos, a PGE_2 pode exibir efeito oposto, tanto aumentando os níveis de NF-κB (Nusing *et al.*, 1996) como promovendo sua ligação às seqüências-consenso específicas (Muroi e Suzuki, 1993).

Sabendo-se, portanto, que o NF-κB pode ser modulado por PGE_2 e está fortemente associado à expressão de CD95L (Baldwin, 1996; Harwood *et al.*, 2000; Kasibhatla *et al.*, 1999), foi avaliado se, durante a AICD em DO11.10, a PGE_2 poderia modular a ação deste fator de transcrição. Porém, nestas células, o estímulo via TCR/CD3 não gerou ativação do NF-κB, que foi evidenciada pela falta de geração de espécies reativas de oxigênio (dados não mostrados), manutenção dos níveis da molécula repressora IκB, ausência de fosforilação do

NF-κB e a ausência de proteção contra a AICD quando usada a lactacistina, uma droga que inibe a ativação da via do NF-κB (Figura 35). Portanto, como nestas células a ativação do NF-κB não é essencial para a expressão de CD95L e AICD, a ação da PGE_2 sobre esta via não pode ser analisada. Porém, estes dados evidenciam que a PGE_2 tem que agir em uma via distinta à via do NF-κB para inibir a expressão de CD95L e, conseqüentemente, a AICD nos hibridomas DO11.10.

Como já discutido anteriormente, um forte candidato a mediar os efeitos da PGE_2 na inibição da AICD é o ICER. Este fator de transcrição, pertencente à família CREB/CREM, possui essencialmente um sítio de ligação ao DNA *(leucine zipper)* e é gerado a partir do uso de um promotor alternativo intrônico do gene que codifica para CREM (Molina *et al.*, 1993). A indução do ICER, único membro desta família regulado transcripcionalmente, ocorre após diversos estímulos que levam ao aumento dos níveis de AMPc, ativando a PKA, entre eles a forskolina (Monaco e Sassone-Corsi, 1997; Thommesen *et al.*, 2000; Tinti *et al.*, 1996). Quando expresso, o ICER se liga às seqüências de DNA CRE (cAMP-responsive elements), competindo com CREB e CREM por estes sítios de ligação, deslocando o cofator CBP/p300 e, portanto, impedindo os estágios iniciais da formação da maquinaria transcripcional (Bodor *et al.*, 2000).

Portanto, como: 1) o efeito de inibição da AICD por PGE_2 é mediado por AMPc e PKA; 2) ICER é induzido por PGE_2 via AMPc e PKA; 3) no promotor de CD95L foi mapeado um sítio de ligação para ICER ao lado do sítio proximal de ligação do NFAT (Bodor *et al.*, 2002); 4) ICER impede a correta formação da maquinaria trancripcional e 5) a expressão de ICER pode inibir a expressão de CD95L (Bodor *et al.*, 2002), a indução de ICER por PGE_2 foi avaliada em hibridomas DO11.10.

A figura 36A mostra que a PGE_2 foi capaz de induzir ICER após 2h de tratamento, o que é anterior à expressão de CD95L. Como a transcrição de ICER depende da ativação de CREB via AMPc/PKA (Della Fazia *et al.*, 1997), a fosforilação de CREB foi analisada e os resultados apresentados na figura 36B demonstram que o CREB é ativado rapidamente após a adição de PGE_2. Apesar de serem frutos de experimentos iniciais, os dados apresentados permitem levantar a hipótese que o mecanismo de inibição da AICD em hibridomas DO11.10 por PGE_2 depende da expressão de ICER. Futuros experimentos com RNA de interferência para ICER irão comprovar se esta hipótese é correta.

5.8 Efeito da PGE_2 na expressão de CD95L e AICD de linfócitos T primários

Para validar os dados encontrados em hibridomas de linfócitos T DO11.10, os principais experimentos foram realizados em células de camundongos derivadas tanto de baço como de linfonodos. Os dados encontrados com os linfócitos T primários foram muito similares aos encontrados com os hibridomas, reforçando a tese de que a PGE_2 é capaz de inibir a morte de linfócitos T $CD4^+$ através do aumento dos níveis intracelulares de AMPc e ativação de PKA (Figuras 37 a 40 e dados não mostrados). Mesmo nos linfócitos T $CD4^+$ recém-extraídos de camundongos, que ainda são insensíveis à morte mediada por CD95L, a via da PGE_2 foi capaz de impedir a expressão deste ligante de morte (Figura 37 e 38). A modulação da expressão do CD95L nesta fase da vida dos linfócitos T pode ser importante para sua possível ação indutora de morte em células-alvo.

O experimento de co-cultura celular entre blastos de linfócitos T $CD4^+$ e células J774 mostrou que os linfócitos T $CD4^+$ ativados por anticorpos anti-CD3 são capazes de matar os macrófagos-alvo, provavelmente pela expressão de CD95L, e que a PGE_2 é capaz de bloquear a morte destas células (Figura 40). Se o mesmo fenômeno ocorre *in vivo* durante o início da resposta imune, a indução de morte das APCs pelos linfócitos T ativados via CD95L pode impedir a correta apresentação de antígenos e, conseqüentemente, a indução de imunidade protetora adequada. A PGE_2, portanto, teria um papel importante neste cenário, evitando o aumento da expressão de CD95L nas células que estão sendo ativadas pelo reconhecimento do antígeno e, assim, prevenindo a morte prematura das APCs.

5.9 Considerações finais

Levando em conta os resultados apresentados, conjuntamente com os dados encontrados na literatura, é possível propor um novo mecanismo mediado por células apresentadoras de antígeno que contribui para distinguir a ativação de linfócitos T antígeno-específico em condições infecciosas e em condições assépticas. Esta distinção seria realizada pela percepção da presença de patógenos ou sinais de perigo pelas células apresentadoras de antígeno através dos receptores do tipo Toll, que resultaria numa maior expressão de PGE_2. Em respostas a infecções, a produção aumentada deste mediador lipídico ajudaria a prolongar a vida dos linfócitos T $CD4^+$ específicos durante a persistência do patógeno e seus

padrões moleculares associados. As próprias células apresentadoras de antígeno estariam protegidas da morte por ataque das células que estão reconhecendo o antígeno via MHC/TCR, já que a expressão de CD95L nos linfócitos T está suprimida. Sendo assim, níveis elevados de PGE_2 durante um processo infeccioso deveriam ser associados a uma melhor imunidade. Neste sentido, o grupo do Prof. Weinberg mostrou uma correlação inversa entre níveis de PGE_2/Cox-2 e a gravidade da malária em crianças (Perkins *et al.*, 2001).

Por outro lado, a ausência da percepção de sinais de perigo durante o reconhecimento de auto-antígenos favoreceria a morte precoce tanto dos linfócitos T quanto das APCs, ajudando a manter a tolerância ao próprio. Esta hipótese prevê que níveis cronicamente elevados de PGE_2 poderiam ser associados a processos auto-imunes. Camundongos diabéticos não obesos (NOD), um modelo de doença auto-imune mediada por linfócitos T bem estabelecido, apresentam níveis aumentados de PGE_2 circulantes (Ganapathy *et al.*, 2000), níveis reduzidos de CD95L (Decallonne *et al.*, 2003) e fenótipo de resistência à AICD (Arreaza *et al.*, 2003). Níveis elevados de expressão de Cox-2 e de PGE_2 circulante, além de AICD deficiente, já foram correlacionados à diabetes auto-imune em humanos (Chase *et al.*, 1979; Litherland *et al.*, 2003; Litherland *et al.*, 1999). A artrite reumatóide, outra doença auto-imune, também é associada a altos níveis de PGE_2, tanto em modelos animais como em pacientes humanos (McCoy *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 1979).

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho e os dados existentes na literatura sugerem que a manipulação farmacológica da síntese de PGE_2 pode ser útil para melhorar a imunidade contra infecções e também para controlar processos auto-imunes.

6 Conclusões

- Os sobrenadantes de cultura de macrófagos ou células dendríticas possuem capacidade de inibir a morte de hibridomas de linfócitos T DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3;

- A adição de LPS na cultura de células apresentadoras de antígeno aumenta a produção do fator inibidor, potencializando os efeitos dos sobrenadantes sobre a AICD em hibridomas DO11.10;

- O efeito potencializador do LPS é mediado pelos receptores TLR4 e pela molécula adaptadora MyD88 e é independente de TLR2 e CD14. A produção basal do fator inibidor também é dependente de MyD88;

- A PGE_2 é o principal componente nos sobrenadantes de macrófagos ou células dendríticas estimuladas com LPS responsável pela inibição da AICD de hibridomas DO11.10;

- A PGE_2, seja sintética ou derivada de APCs, não altera significativamente os níveis de expressão de CD95 e FLIP, porém inibe transcripcionalmente a expressão de CD95L, reduzindo os níveis de RNAm e também os níveis protéicos de CD95L na superfície celular;

- A PGE_2 não só não reprime a via iniciada por CD95, o que indica que a inibição da AICD é anterior ao estímulo do receptor CD95, como potencializa a morte induzida por anticorpos anti-CD95 agonistas;

- O efeito da PGE_2 é mediado pela ação sinergística de EP2 e EP4 que, através da ativação da adenilato ciclase, aumenta os níveis de AMPc intracelular, levando à ativação da PKA, que tem seu efeito potencializado pela via do EPAC.

- A PGE_2 não bloqueia a ativação do NFAT, AP-1 e NF-κB, três dos principais fatores de transcrição envolvidos com a expressão de CD95L. Experimentos iniciais mostraram que PGE_2 aumenta a expressão de ICER, um repressor transcripcional, envolvido com a inibição do CD95L;

- Em linfócitos T primários, tanto recém-extraídos de baço ou linfonodos, como blastos gerados por 6 dias de cultura, a via de sinalização induzida por PGE_2 é capaz de inibir a expressão de CD95L induzida por anticorpos anti-CD3. Nos blastos de linfócitos T $CD4^+$, a inibição da expressão de CD95L reflete numa menor taxa de apoptose; e

- Em co-culturas de blastos de linfócitos T $CD4^+$ e células J774, a PGE_2, além de bloquear a AICD dos blastos, também bloqueia a morte das células J774 induzida pelos linfócitos T $CD4^+$ estimulados por anticorpos anti-CD3.

Referências Bibliográficas

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA*, et al.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J Exp Med. 1995 Jan 1;181(1):71-7.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 2001 Oct 18;413(6857):732-8.

Algeciras-Schimnich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J Immunol. 1999 May 1;162(9):5205-11.

Alvarez S, Blanco A, Kern F, Fresno M, Munoz-Fernandez MA. HIV-2 induces NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression in human astroglial cells. Virology. 2008 Aug 26.

Amarante-Mendes GP,Green DR. The regulation of apoptotic cell death. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al. 1999 Sep;32(9):1053-61.

Andreis PG, Whitfield JF, Armato U. Stimulation of DNA synthesis and mitosis of hepatocytes in primary cultures of neonatal rat liver by arachidonic acid and prostaglandins. Exp Cell Res. 1981 Aug;134(2):265-72.

Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ*, et al.* Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. J Exp Med. 1978 Nov 1;148(5):1198-215.

Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Golstein P. T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. Eur J Immunol. 1994 Oct;24(10):2469-76.

Appleman LJ,Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. Immunol Rev. 2003 Apr;192:161-80.

Armitage RJ, Tough TW, Macduff BM, Fanslow WC, Spriggs MK, Ramsdell F*, et al.* CD40 ligand is a T cell growth factor. Eur J Immunol. 1993 Sep;23(9):2326-31.

Arreaza G, Salojin K, Yang W, Zhang J, Gill B, Mi QS*, et al.* Deficient activation and resistance to activation-induced apoptosis of CD8+ T cells is associated with defective peripheral tolerance in nonobese diabetic mice. Clinical immunology (Orlando, Fla. 2003 May;107(2):103-15.

Ashwell JD, Cunningham RE, Noguchi PD, Hernandez D. Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen. J Exp Med. 1987 Jan 1;165(1):173-94.

Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function*. Annu Rev Immunol. 2000;18:309-45.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 1996;14:649-83.

Barlow CA, Kitiphongspattana K, Siddiqui N, Roe MW, Mossman BT, Lounsbury KM. Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells. Apoptosis. 2008 May;13(5):681-92.

Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. Semin Immunol. 2003 Jun;15(3):185-93.

Barreto-de-Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM*, et al.* Increased Leishmania replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. The Journal of infectious diseases. 2006 Sep 15;194(6):846-54.

Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? Microbes Infect. 2004 May;6(6):630-6.

Bauer MK, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. J Biol Chem. 1998 Apr 3;273(14):8048-55.

Bauman GP, Bartik MM, Brooks WH, Roszman TL. Induction of cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity in T cells after stimulation of the prostaglandin E2 or the beta-adrenergic receptors: relationship between PKA activity and inhibition of anti-CD3 monoclonal antibody-induced T cell proliferation. Cell Immunol. 1994 Oct 1;158(1):182-94.

Baumann S, Hess J, Eichhorst ST, Krueger A, Angel P, Krammer PH*, et al.* An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. Oncogene. 2003 Mar 6;22(9):1333-9.

Bidere N, Su HC, Lenardo MJ. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. Annu Rev Immunol. 2006;24:321-52.

Bingham CO, 3rd. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. The Journal of rheumatology. 2002 Sep;65:3-9.

Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, Alekseeva E, Chen W, Jacobson JR*, et al.* Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. Exp Cell Res. 2007 Jul 1;313(11):2504-20.

Bodmer D, Brors D, Pak K, Keithley EM, Mullen L, Ryan AF*, et al.* Inflammatory signals increase Fas ligand expression by inner ear cells. J Neuroimmunol. 2002 Aug;129(1-2):10-7.

Bodor J, Bodorova J, Bare C, Hodge DL, Young HA, Gress RE. Differential inducibility of the transcriptional repressor ICER and its role in modulation of Fas ligand expression in T and NK lymphocytes. Eur J Immunol. 2002 Jan;32(1):203-12.

Bodor J, Bodorova J, Gress RE. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. J Leukoc Biol. 2000 Jun;67(6):774-9.

Bodor J, Feigenbaum L, Bodorova J, Bare C, Reitz MS, Jr., Gress RE. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). J Leukoc Biol. 2001 Jun;69(6):1053-9.

Bodor J,Habener JF. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. J Biol Chem. 1998 Apr 17;273(16):9544-51.

Bodor J, Spetz AL, Strominger JL, Habener JF. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 16;93(8):3536-41.

Bonfoco E, Stuart PM, Brunner T, Lin T, Griffith TS, Gao Y*, et al.* Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. Immunity. 1998 Nov;9(5):711-20.

Borger P, Vellenga E, Gringhuis SI, Timmerman JA, Lummen C, Postma DS*, et al.* Prostaglandin E2 differentially modulates IL-5 gene expression in activated human T lymphocytes depending on the costimulatory signal. The Journal of allergy and clinical immunology. 1998 Feb;101(2 Pt 1):231-40.

Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. Trends Biochem Sci. 2006 Dec;31(12):680-6.

Bowie A,O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol. 2000 Apr;67(4):508-14.

Bowolaksono A, Nishimura R, Hojo T, Sakumoto R, Acosta TJ, Okuda K. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and F2alpha in bovine luteal steroidogenic cells. Biol Reprod. 2008 Aug;79(2):310-7.

Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:661-90.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F*, et al.* Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature. 1995 Feb 2;373(6513):441-4.

Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. Nature. 1996 Oct 3;383(6599):443-6.

Casado M, Molla B, Roy R, Fernandez-Martinez A, Cucarella C, Mayoral R*, et al.* Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. Hepatology (Baltimore, Md. 2007 Mar;45(3):631-8.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. Curr Opin Immunol. 1997 Feb;9(1):10-6.

Chambers CA,Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. Current opinion in cell biology. 1999 Apr;11(2):203-10.

Chapuis F, Rosenzwajg M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. Eur J Immunol. 1997 Feb;27(2):431-41.

Chase HP, Williams RL, Dupont J. Increased prostaglandin synthesis in childhood diabetes mellitus. The Journal of pediatrics. 1979 Feb;94(2):185-9.

Chemnitz JM, Driesen J, Classen S, Riley JL, Debey S, Beyer M*, et al.* Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of lck: implications in Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 2006 Jan 15;66(2):1114-22.

Chouaib S, Welte K, Mertelsmann R, Dupont B. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression. J Immunol. 1985 Aug;135(2):1172-9.

Choudhry MA, Mao H, Haque F, Khan M, Fazal N, Sayeed MM. Role of NFAT and AP-1 in PGE2-mediated T cell suppression in burn injury. Shock (Augusta, Ga. 2002 Sep;18(3):212-6.

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J Biol Chem. 1999 Apr 16;274(16):10689-92.

Chow WA, Fang JJ, Yee JK. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. J Immunol. 2000 Apr 1;164(7):3512-8.

Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK*, et al.* cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. J Biol Chem. 2003 Sep 12;278(37):35394-402.

Clarke DL, Belvisi MG, Catley MC, Yacoub MH, Newton R, Giembycz MA. Identification in human airways smooth muscle cells of the prostanoid receptor and signalling pathway through which PGE2 inhibits the release of GM-CSF. Br J Pharmacol. 2004 Apr;141(7):1141-50.

Cohen PL,Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. Annu Rev Immunol. 1991;9:243-69.

Cooke A. Th17 cells in inflammatory conditions. Rev Diabet Stud. 2006 Summer;3(2):72-5.

D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A*, et al.* A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. Immunity. 1997 Dec;7(6):803-12.

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M*, et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med. 1992 Nov 1;176(5):1387-98.

Dajani OF, Meisdalen K, Guren TK, Aasrum M, Tveteraas IH, Lilleby P*, et al.* Prostaglandin E2 upregulates EGF-stimulated signaling in mitogenic pathways involving Akt and ERK in hepatocytes. J Cell Physiol. 2008 Feb;214(2):371-80.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. Nature. 1996 Feb 8;379(6565):557-60.

Davis RJ, Murdoch CE, Ali M, Purbrick S, Ravid R, Baxter GS*, et al.* EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. Br J Pharmacol. 2004 Feb;141(4):580-5.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P*, et al.* Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. J Exp Med. 1996 Oct 1;184(4):1413-24.

de Souza NJ, Dohadwalla AN, Reden J. Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. Med Res Rev. 1983 Apr-Jun;3(2):201-19.

Decallonne B, van Etten E, Giulietti A, Casteels K, Overbergh L, Bouillon R*, et al.* Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes. Journal of autoimmunity. 2003 May;20(3):219-26.

Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. FEBS Lett. 1997 Jun 23;410(1):22-4.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J*, et al.* Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell. 2000 Oct 13;103(2):351-61.

Devadas S, Das J, Liu C, Zhang L, Roberts AI, Pan Z*, et al.* Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. Immunity. 2006 Aug;25(2):237-47.

Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. J Exp Med. 2002 Jan 7;195(1):59-70.

Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature. 1995 Feb 2;373(6513):438-41.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31.

Donnini S, Finetti F, Solito R, Terzuoli E, Sacchetti A, Morbidelli L*, et al.* EP2 prostanoid receptor promotes squamous cell carcinoma growth through epidermal growth factor receptor transactivation and iNOS and ERK1/2 pathways. Faseb J. 2007 Aug;21(10):2418-30.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB*, et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. Faseb J. 1998 Sep;12(12):1063-73.

Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. Annu Rev Immunol. 2003;21:457-81.

Facchinetti F, Furegato S, Terrazzino S, Leon A. H(2)O(2) induces upregulation of Fas and Fas ligand expression in NGF-differentiated PC12 cells: modulation by cAMP. J Neurosci Res. 2002 Jul 15;69(2):178-88.

Farmer P,Pugin J. beta-adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Oct;279(4):L675-82.

Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E*, et al.* Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. Arch Biochem Biophys. 1993 Dec;307(2):361-8.

Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G*, et al.* Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature. 2001 Sep 6;413(6851):78-83.

Fotedar R, Flatt J, Gupta S, Margolis RL, Fitzgerald P, Messier H*, et al.* Activation-induced T-cell death is cell cycle dependent and regulated by cyclin B. Mol Cell Biol. 1995 Feb;15(2):932-42.

Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. Cell. 1991 Feb 22;64(4):739-49.

Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. Trends Immunol. 2001 Oct;22(10):556-60.

Fukunaga M, Fujiwara Y, Ochi S, Yokoyama K, Shoji T, Fukuhara Y*, et al.* Mechanism of induction of prostaglandin E2 production by endothelin 1 in cultured rat mesangial cells. Exp Nephrol. 1996 Nov-Dec;4(6):340-9.

Fultz MJ, Barber SA, Dieffenbach CW, Vogel SN. Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. Int Immunol. 1993 Nov;5(11):1383-92.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. Prostaglandins. 1994 Jan;47(1):55-9.

Ganapathy V, Gurlo T, Jarstadmarken HO, von Grafenstein H. Regulation of TCR-induced IFN-gamma release from islet-reactive non-obese diabetic CD8(+) T cells by prostaglandin E(2) receptor signaling. Int Immunol. 2000 Jun;12(6):851-60.

Gangloff SC, Hijiya N, Haziot A, Goyert SM. Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. Clin Infect Dis. 1999 Mar;28(3):491-6.

Garcia-Rodriguez C,Rao A. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). J Exp Med. 1998 Jun 15;187(12):2031-6.

George RJ, Sturmoski MA, Anant S, Houchen CW. EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007 Feb;83(1-2):112-20.

Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 1;94(7):2927-32.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16:225-60.

Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6586-90.

Glode LM, Scher I, Osborne B, Rosenstreich DL. Cellular mechanism of endotoxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice. J Immunol. 1976 Feb;116(2):454-61.

Goetzl EJ, An S, Zeng L. Specific suppression by prostaglandin E2 of activation-induced apoptosis of human CD4+CD8+ T lymphoblasts. J Immunol. 1995 Feb 1;154(3):1041-7.

Green DR. Fas Bim boom! Immunity. 2008 Feb;28(2):141-3.

Gupta RA,Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nature reviews. 2001 Oct;1(1):11-21.

Harizi H, Grosset C, Gualde N. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. J Leukoc Biol. 2003 Jun;73(6):756-63.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM*, et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005 Nov;6(11):1123-32.

Harwood FG, Kasibhatla S, Petak I, Vernes R, Green DR, Houghton JA. Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells. J Biol Chem. 2000 Apr 7;275(14):10023-9.

Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. J Exp Med. 1983 Apr 1;157(4):1149-69.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR*, et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature. 2001 Apr 26;410(6832):1099-103.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H*, et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000 Dec 7;408(6813):740-5.

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J*, et al.* Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. Immunity. 2002 Jun;16(6):759-67.

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. Curr Opin Immunol. 2002 Jun;14(3):354-9.

Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC*, et al.* Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. Infect Immun. 2001 Mar;69(3):1477-82.

Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. Immunity. 1996 Apr;4(4):397-405.

Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV. Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. J Biol Chem. 1998 Feb 20;273(8):4416-23.

Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. Nature. 2002 Nov 21;420(6913):329-33.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y*, et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

Huang, Qi H, Germain RN. Illuminating the landscape of in vivo immunity: insights from dynamic in situ imaging of secondary lymphoid tissues. Immunity. 2004 Sep;21(3):331-9.

Huang RD, Smith MF, Zahler WL. Inhibition of forskolin-activated adenylate cyclase by ethanol and other solvents. Journal of cyclic nucleotide research. 1982;8(6):385-94.

Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A, Bouillet P. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. Immunity. 2008 Feb;28(2):197-205.

Hutcheson J, Scatizzi JC, Siddiqui AM, Haines GK, 3rd, Wu T, Li QZ*, et al.* Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. Immunity. 2008 Feb;28(2):206-17.

Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. Faseb J. 2001 Dec;15(14):2556-64.

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S*, et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med. 1992 Dec 1;176(6):1693-702.

Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V*, et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Ivanov VN, Krasilnikov M, Ronai Z. Regulation of Fas expression by STAT3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. J Biol Chem. 2002 Feb 15;277(7):4932-44.

Ivanov VN, Lee RK, Podack ER, Malek TR. Regulation of Fas-dependent activation-induced T cell apoptosis by cAMP signaling: a potential role for transcription factor NF-kappa B. Oncogene. 1997 May 22;14(20):2455-64.

Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M*, et al.* TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. J Immunol. 2007 Aug 1;179(3):1449-57.

Iwasaki A,Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol. 2004 Oct;5(10):987-95.

Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. J Immunol. 2000 Oct 1;165(7):3541-4.

Jing H, Yen JH, Ganea D. A novel signaling pathway mediates the inhibition of CCL3/4 expression by prostaglandin E2. J Biol Chem. 2004 Dec 31;279(53):55176-86.

Jones CP, Paula Neto HA, Assreuy J, Vargaftig BB, Gaspar Elsas MI, Elsas PX. Prostaglandin E2 and dexamethasone regulate eosinophil differentiation and survival through a nitric oxide- and CD95-dependent pathway. Nitric Oxide. 2004 Sep;11(2):184-93.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH*, et al.* Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature. 1995 Feb 2;373(6513):444-8.

Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. Nat Med. 2003 Jun;9(6):744-9.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F*, et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. J Exp Med. 2001 Sep 17;194(6):863-9.

Kanda N, Mitsui H, Watanabe S. Prostaglandin E(2) suppresses CCL27 production through EP2 and EP3 receptors in human keratinocytes. The Journal of allergy and clinical immunology. 2004 Dec;114(6):1403-9.

Kappler JW, Skidmore B, White J, Marrack P. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. J Exp Med. 1981 May 1;153(5):1198-214.

Kasibhatla S, Beere HM, Brunner T, Echeverri F, Green DR. A 'non-canonical' DNA-binding element mediates the response of the Fas-ligand promoter to c-Myc. Curr Biol. 2000 Oct 5;10(19):1205-8.

Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. J Biol Chem. 1999 Jan 8;274(2):987-92.

Kassel KM, Wyatt TA, Panettieri RA, Jr., Toews ML. Inhibition of human airway smooth muscle cell proliferation by beta 2-adrenergic receptors and cAMP is PKA independent: evidence for EPAC involvement. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Jan;294(1):L131-8.

Kaur K, Harris SG, Padilla J, Graf BA, Phipps RP. Prostaglandin E2 as a modulator of lymphocyte mediated inflammatory and humoral responses. Adv Exp Med Biol. 1999;469:409-12.

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity. 1999 Jul;11(1):115-22.

Kawai T,Akira S. TLR signaling. Cell Death Differ. 2006 May;13(5):816-25.

Kawai T,Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends in molecular medicine. 2007 Nov;13(11):460-9.

Kawai T,Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. 2007 Feb;19(1):24-32.

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S*, et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. J Immunol. 2001 Nov 15;167(10):5887-94.

Kay LJ, Yeo WW, Peachell PT. Prostaglandin E2 activates EP2 receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. Br J Pharmacol. 2006 Apr;147(7):707-13.

Kiermayer S, Biondi RM, Imig J, Plotz G, Haupenthal J, Zeuzem S*, et al.* Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. Mol Biol Cell. 2005 Dec;16(12):5639-48.

Kim H, Rhee SH, Pothoulakis C, Lamont JT. Inflammation and apoptosis in Clostridium difficile enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. Gastroenterology. 2007 Sep;133(3):875-86.

Klingemann HG, Tsoi MS, Storb R. Inhibition of prostaglandin E2 restores defective lymphocyte proliferation and cell-mediated lympholysis in recipients after allogeneic marrow grafting. Blood. 1986 Jul;68(1):102-7.

Kobayashi T,Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002 Aug;68-69:557-73.

Krakstad C, Christensen AE, Doskeland SO. cAMP protects neutrophils against TNF-alpha-induced apoptosis by activation of cAMP-dependent protein kinase, independently of exchange protein directly activated by cAMP (Epac). J Leukoc Biol. 2004 Sep;76(3):641-7.

Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. J Biol Chem. 1997 Dec 12;272(50):31427-34.

Lee M,Park J. Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. Mol Cells. 2006 Aug 31;22(1):1-7.

Lee MO, Kang HJ, Kim YM, Oum JH, Park J. Repression of FasL expression by retinoic acid involves a novel mechanism of inhibition of transactivation function of the nuclear factors of activated T-cells. Eur J Biochem. 2002 Feb;269(4):1162-70.

Legembre P, Daburon S, Moreau P, Ichas F, de Giorgi F, Moreau JF*, et al.* Amplification of Fas-mediated apoptosis in type II cells via microdomain recruitment. Mol Cell Biol. 2005 Aug;25(15):6811-20.

Legembre P, Daburon S, Moreau P, Moreau JF, Taupin JL. Modulation of Fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes. J Immunol. 2006 Jan 15;176(2):716-20.

Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. J Exp Med. 1996 Mar 1;183(3):721-4.

Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Mar;84(5):1374-8.

Leone V, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva F, Giannouli M, Di Prisco AM*, et al.* PGE2 inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. American journal of physiology. 2007 Oct;293(4):G673-81.

Li-Weber M,Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. Semin Immunol. 2003 Jun;15(3):145-57.

Li J, O'Connor KL, Cheng X, Mei FC, Uchida T, Townsend CM, Jr.*, et al.* Cyclic adenosine 5'-monophosphate-stimulated neurotensin secretion is mediated through Rap1 downstream of both Epac and protein kinase A signaling pathways. Mol Endocrinol. 2007 Jan;21(1):159-71.

Li QS, Tanaka S, Kisenge RR, Toyoda H, Azuma E, Komada Y. Activation-induced T cell death occurs at G1A phase of the cell cycle. Eur J Immunol. 2000 Nov;30(11):3329-37.

Li W,Handschumacher RE. Regulation of the nuclear factor of activated T cells in stably transfected Jurkat cell clones. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Feb 6;219(1):96-9.

Lissy NA, Van Dyk LF, Becker-Hapak M, Vocero-Akbani A, Mendler JH, Dowdy SF. TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point. Immunity. 1998 Jan;8(1):57-65.

Litherland SA, She JX, Schatz D, Fuller K, Hutson AD, Peng RH*, et al.* Aberrant monocyte prostaglandin synthase 2 (PGS2) expression in type 1 diabetes before and after disease onset. Pediatric diabetes. 2003 Mar;4(1):10-8.

Litherland SA, Xie XT, Hutson AD, Wasserfall C, Whittaker DS, She JX*, et al.* Aberrant prostaglandin synthase 2 expression defines an antigen-presenting cell defect for insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest. 1999 Aug;104(4):515-23.

Liu N, Wang Y, Ashton-Rickardt PG. Serine protease inhibitor 2A inhibits caspase-independent cell death. FEBS Lett. 2004 Jul 2;569(1-3):49-53.

Loh C, Carew JA, Kim J, Hogan PG, Rao A. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. Mol Cell Biol. 1996 Jul;16(7):3945-54.

Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA*, et al.* Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. J Biol Chem. 1996 May 3;271(18):10884-91.

Luciani F, Matarrese P, Giammarioli AM, Lugini L, Lozupone F, Federici C*, et al.* CD95/phosphorylated ezrin association underlies HIV-1 GP120/IL-2-induced susceptibility to CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis of human resting CD4(+)T lymphocytes. Cell Death Differ. 2004 May;11(5):574-82.

Lynn WA, Liu Y, Golenbock DT. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. Infect Immun. 1993 Oct;61(10):4452-61.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA*, et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. J Immunol. 1995 May 15;154(10):5071-9.

Macian F, Garcia-Rodriguez C, Rao A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. Embo J. 2000 Sep 1;19(17):4783-95.

Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):45225-35.

Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. Kidney Int. 1994 Jan;45(1):150-8.

Masquilier D,Sassone-Corsi P. Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. J Biol Chem. 1992 Nov 5;267(31):22460-6.

Mataki N, Kikuchi K, Kawai T, Higashiyama M, Okada Y, Kurihara C*, et al.* Expression of PD-1, PD-L1, and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases. The American journal of gastroenterology. 2007 Feb;102(2):302-12.

McClure RF, Heppelmann CJ, Paya CV. Constitutive Fas ligand gene transcription in Sertoli cells is regulated by Sp1. J Biol Chem. 1999 Mar 19;274(12):7756-62.

McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 2002 Sep;110(5):651-8.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S*, et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell. 1998 Aug;2(2):253-8.

Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE*, et al.* TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. Nat Immunol. 2005 May;6(5):455-64.

Min SY, Kim WU, Cho ML, Hwang SY, Park SH, Cho CS*, et al.* Prostaglandin E2 suppresses nuclear factor-kappaB mediated interleukin 15 production in rheumatoid synoviocytes. J Rheumatol. 2002 Jul;29(7):1366-76.

Minneman KP, Lee D, Zhong H, Berts A, Abbott KL, Murphy TJ. Transcriptional responses to growth factor and G protein-coupled receptors in PC12 cells: comparison of alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. J Neurochem. 2000 Jun;74(6):2392-400.

Mittelstadt PR,Ashwell JD. Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. Mol Cell Biol. 1998 Jul;18(7):3744-51.

Mittelstadt PR,Ashwell JD. Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. J Biol Chem. 1999 Jan 29;274(5):3222-7.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. Cell. 1993 Dec 3;75(5):875-86.

Monaco L,Sassone-Corsi P. Cross-talk in signal transduction: Ras-dependent induction of cAMP-responsive transcriptional repressor ICER by nerve growth factor. Oncogene. 1997 Nov 13;15(20):2493-500.

Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, Monks BG, Li R, Arnaout MA*, et al.* Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. J Immunol. 2000 Oct 15;165(8):4272-80.

Moser M,Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol. 2000 Sep;1(3):199-205.

Muppidi JR,Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. Nat Immunol. 2004 Feb;5(2):182-9.

Muroi M,Suzuki T. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. Cell Signal. 1993 May;5(3):289-98.

Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). J Exp Med. 1998 Jun 15;187(12):2097-101.

Nagata S,Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol Today. 1995 Jan;16(1):39-43.

Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. J Leukoc Biol. 2007 May;81(5):1258-68.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiological reviews. 1999 Oct;79(4):1193-226.

Ng T, Parsons M, Hughes WE, Monypenny J, Zicha D, Gautreau A*, et al.* Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. Embo J. 2001 Jun 1;20(11):2723-41.

Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. Mol Pharmacol. 1996 Oct;50(4):1031-7.

Norel X, Walch L, Labat C, Gascard JP, Dulmet E, Brink C. Prostanoid receptors involved in the relaxation of human bronchial preparations. Br J Pharmacol. 1999 Feb;126(4):867-72.

Norian LA, Latinis KM, Koretzky GA. A newly identified response element in the CD95 ligand promoter contributes to optimal inducibility in activated T lymphocytes. J Immunol. 1998 Aug 1;161(3):1078-82.

Nusing RM, Klein T, Pfeilschifter J, Ullrich V. Effect of cyclic AMP and prostaglandin E2 on the induction of nitric oxide- and prostanoid-forming pathways in cultured rat mesangial cells. Biochem J. 1996 Jan 15;313 (Pt 2):617-23.

O'Callaghan G, Kelly J, Shanahan F, Houston A. Prostaglandin E2 stimulates Fas ligand expression via the EP1 receptor in colon cancer cells. Br J Cancer. 2008 Aug 5;99(3):502-12.

O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S*, et al.* Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. Embo J. 1998 Jan 15;17(2):384-95.

Okano M, Sugata Y, Fujiwara T, Matsumoto R, Nishibori M, Shimizu K*, et al.* E prostanoid 2 (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T-cell responses by prostaglandin E2. Immunology. 2006 Jul;118(3):343-52.

Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. Nat Immunol. 2003 Feb;4(2):161-7.

Oyaizu N, Than S, McCloskey TW, Pahwa S. Requirement of p56lck in T-cell receptor/CD3-mediated apoptosis and Fas-ligand induction in Jurkat cells. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Aug 24;213(3):994-1001.

Pace E, Bruno TF, Berenger B, Mody CH, Melis M, Ferraro M*, et al.* Elevated expression of prostaglandin receptor and increased release of prostaglandin E2 maintain the survival of CD45RO+ T cells in the inflamed human pleural space. Immunology. 2007 Jul;121(3):427-36.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. Clinical immunology (Orlando, Fla. 2006 Jun;119(3):229-40.

Pasare C,Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. Adv Exp Med Biol. 2005;560:11-8.

Perkins DJ, Kremsner PG, Weinberg JB. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with Plasmodium falciparum malaria. The Journal of infectious diseases. 2001 Jan 1;183(1):113-8.

Peter ME,Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. Curr Opin Immunol. 1998 Oct;10(5):545-51.

Peterson BR, Sun LJ, Verdine GL. A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996 Nov 26;93(24):13671-6.

Pinkoski MJ,Green DR. Fas ligand, death gene. Cell Death Differ. 1999 Dec;6(12):1174-81.

Poddubnyy DA, Song IH, Sieper J. The safety of celecoxib in ankylosing spondylitis treatment. Expert opinion on drug safety. 2008 Jul;7(4):401-9.

Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. Leuk Lymphoma. 2004 Mar;45(3):423-31.

Porter BO,Malek TR. Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. Eur J Immunol. 1999 Jul;29(7):2360-5.

Puddu P, Fantuzzi L, Borghi P, Varano B, Rainaldi G, Guillemard E*, et al.* IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. J Immunol. 1997 Oct 1;159(7):3490-7.

Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. J Exp Med. 1976 Jun 1;143(6):1528-33.

Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. Int Immunol. 1994 Oct;6(10):1545-53.

Rathmell JC, Fournier S, Weintraub BC, Allison JP, Goodnow CC. Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4(+) T cells. J Exp Med. 1998 Aug 17;188(4):651-9.

Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. Immunity. 1998 May;8(5):615-23.

Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. Life Sci. 2003 Dec 5;74(2-3):143-53.

Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczek RA, Ashwell JD*, et al.* Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. Immunity. 2000 Mar;12(3):293-300.

Rhee SH,Hwang D. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. J Biol Chem. 2000 Nov 3;275(44):34035-40.

Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. Curr Opin Immunol. 2003 Jun;15(3):325-31.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A*, et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science. 1995 Jun 2;268(5215):1347-9.

Robinson DR, Dayer JM, Krane SM. Prostaglandins and their regulation in rheumatoid inflammation. Ann N Y Acad Sci. 1979;332:279-94.

Rodriguez-Manzanet R, Meyers JH, Balasubramanian S, Slavik J, Kassam N, Dardalhon V*, et al.* TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival. J Immunol. 2008 Apr 1;180(7):4706-13.

Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. J Exp Med. 1984 Jan 1;159(1):1-20.

Rubin JE, Titus L, Nanes MS. Prostaglandin E2 induction of monoblastic differentiation utilizes both cAMP and non-cAMP dependent signalling systems. Biochim Biophys Acta. 1991 Jan 10;1091(1):87-95.

Ruppelt A, Mosenden R, Gronholm M, Aandahl EM, Tobin D, Carlson CR*, et al.* Inhibition of T cell activation by cyclic adenosine 5'-monophosphate requires lipid raft targeting of protein kinase A type I by the A-kinase anchoring protein ezrin. J Immunol. 2007 Oct 15;179(8):5159-68.

Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Mar 15;88(6):2151-5.

Sallusto F,Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1994 Apr 1;179(4):1109-18.

Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H*, et al.* Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. J Immunol. 2003 Jul 1;171(1):417-25.

Schwartz RH. T cell anergy. Annu Rev Immunol. 2003;21:305-34.

Seder RA,Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. Annu Rev Immunol. 1994;12:635-73.

Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Isakson P. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. Adv Exp Med Biol. 1997;400A:167-70.

Selvaraj P, Plunkett ML, Dustin M, Sanders ME, Shaw S, Springer TA. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. Nature. 1987 Mar 26-Apr 1;326(6111):400-3.

Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J*, et al.* Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov 21;92(24):11205-9.

Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnette RP, Green DR. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. Science. 1992 Jul 10;257(5067):212-4.

Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. Nature. 1989 Jun 22;339(6226):625-6.

Skouteris GG, Ord MG, Stocken LA. Regulation of the proliferation of primary rat hepatocytes by eicosanoids. J Cell Physiol. 1988 Jun;135(3):516-20.

Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol. 2001 Sep 1;167(5):2887-94.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem. 2000;69:145-82.

Sporri R,Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. Nat Immunol. 2005 Feb;6(2):163-70.

Stafford JB,Marnett LJ. Prostaglandin E2 inhibits tumor necrosis factor-alpha RNA through PKA type I. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Feb 1;366(1):104-9.

Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med. 2007 Feb;13(2):139-45.

Sugimoto Y,Narumiya S. Prostaglandin E receptors. J Biol Chem. 2007 Apr 20;282(16):11613-7.

Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M*, et al.* Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol. 2000 Jan 15;164(2):554-7.

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A*, et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immunol. 2001 Jul;13(7):933-40.

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. Int Immunol. 2000 Jan;12(1):113-7.

Tavares IA,Bennett A. Acemetacin and indomethacin: differential inhibition of constitutive and inducible cyclo-oxygenases in human gastric mucosa and leucocytes. Int J Tissue React. 1993;15(2):49-53.

Theofilopoulos AN,Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. Advances in immunology. 1985;37:269-390.

Thommesen L, Norsett K, Sandvik AK, Hofsli E, Laegreid A. Regulation of inducible cAMP early repressor expression by gastrin and cholecystokinin in the pancreatic cell line AR42J. J Biol Chem. 2000 Feb 11;275(6):4244-50.

Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. J Clin Invest. 2001 Jul;108(1):15-23.

Tinti C, Conti B, Cubells JF, Kim KS, Baker H, Joh TH. Inducible cAMP early repressor can modulate tyrosine hydroxylase gene expression after stimulation of cAMP synthesis. J Biol Chem. 1996 Oct 11;271(41):25375-81.

Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD*, et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. Nat Immunol. 2007 Aug;8(8):825-34.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):15107-12.

Valks DM, Cook SA, Pham FH, Morrison PR, Clerk A, Sugden PH. Phenylephrine promotes phosphorylation of Bad in cardiac myocytes through the extracellular signal-regulated kinases 1/2 and protein kinase A. J Mol Cell Cardiol. 2002 Jul;34(7):749-63.

Van Parijs L, Peterson DA, Abbas AK. The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. Immunity. 1998 Feb;8(2):265-74.

Vang T, Abrahamsen H, Myklebust S, Horejsi V, Tasken K. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein kinase a inhibits T cell receptor signaling. J Biol Chem. 2003 May 16;278(20):17597-600.

Walch L, de Montpreville V, Brink C, Norel X. Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. Br J Pharmacol. 2001 Dec;134(8):1671-8.

Wan B, Nie H, Liu A, Feng G, He D, Xu R*, et al.* Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. J Immunol. 2006 Dec 15;177(12):8844-50.

Ward AC, Csar XF, Hoffmann BW, Hamilton JA. Cyclic AMP inhibits expression of D-type cyclins and cdk4 and induces p27Kip1 in G-CSF-treated NFS-60 cells. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Jul 5;224(1):10-6.

Watanabe S, Yssel H, Harada Y, Arai K. Effects of prostaglandin E2 on Th0-type human T cell clones: modulation of functions of nuclear proteins involved in cytokine production. Int Immunol. 1994 Apr;6(4):523-32.

Watanabe T, Sakai Y, Miyawaki S, Shimizu A, Koiwai O, Ohno K. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 19, including the lpr, Ly-44, and Tdt genes. Biochem Genet. 1991 Aug;29(7-8):325-35.

Watson ML, D'Eustachio P, Mock BA, Steinberg AD, Morse HC, 3rd, Oakey RJ*, et al.* A linkage map of mouse chromosome 1 using an interspecific cross segregating for the gld autoimmunity mutation. Mamm Genome. 1992;2(3):158-71.

Weant AE, Michalek RD, Khan IU, Holbrook BC, Willingham MC, Grayson JM. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. Immunity. 2008 Feb;28(2):218-30.

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. Immunity. 1997 Dec;7(6):837-47.

Xiao S, Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A, Widom RL*, et al.* FasL promoter activation by IL-2 through SP1 and NFAT but not Egr-2 and Egr-3. Eur J Immunol. 1999 Nov;29(11):3456-65.

Xu L, Zhang L, Yi Y, Kang HK, Datta SK. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. Nat Med. 2004 Apr;10(4):411-5.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H*, et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. Science. 2003 Aug 1;301(5633):640-3.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T*, et al.* Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature. 2002 Nov 21;420(6913):324-9.

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K*, et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. J Immunol. 2002 Dec 15;169(12):6668-72.

Yarovinsky TO,Hunninghake GW. Lung fibroblasts inhibit activation-induced death of T cells through PGE(2)-dependent mechanisms. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Nov;281(5):L1248-56.

Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M*, et al.* PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. J Biol Chem. 2008 Aug 11.

Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. Cellular & molecular immunology. 2004 Jun;1(3):186-92.

Zhang Y, Xu G, Zhang L, Roberts AI, Shi Y. Th17 cells undergo fas-mediated activation-induced cell death independent of IFN-gamma. J Immunol. 2008 Jul 1;181(1):190-6.

Zheng Y, Zha Y, Gajewski TF. Molecular regulation of T-cell anergy. EMBO reports. 2008 Jan;9(1):50-5.

Zhou LJ,Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Mar 19;93(6):2588-92.

Zhou R, Cao X, Watson C, Miao Y, Guo Z, Forte JG*, et al.* Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation. J Biol Chem. 2003 Sep 12;278(37):35651-9.

Zhou S, Ou R, Huang L, Moskophidis D. Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. J Virol. 2002 Jan;76(2):829-40.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo