

Julia Cortina Campopiano

**INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS VIA
RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs) NA PRODUÇÃO
DE FATORES MODULADORES DA SOBREVIVÊNCIA
DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Julia Cortina Campopiano

**INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS VIA
RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs) NA PRODUÇÃO
DE FATORES MODULADORES DA SOBREVIVÊNCIA
DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

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

São Paulo

2010

*Aos meus pais e irmãos,
pela confiança, incentivo
e apoio constantes*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu querido chefinho, Prof. Gustavo Amarante-Mendes. Muito obrigada por ter me aceito em seu laboratório e permitido que eu fizesse parte de um grupo (de pesquisa e de pessoas) tão maravilhoso. Muito obrigada por toda a paciência que você sempre teve comigo, por me motivar nos momentos de desânimo, pelas broncas acertadas e principalmente por proporcionar um ambiente de trabalho prazeroso. É muito gratificante ter um orientador que sabe reconhecer o seu esforço e trabalho e é por isso que teremos mais alguns aninhos juntos, né. Espero que os próximos anos de trabalho conjunto rendam muitos frutos e alegrias....

Muito obrigada a todo pessoal do departamento de imuno. A excelente convivência entre todos os alunos e funcionários é, sem dúvida, muito importante para criar um clima gostoso de trabalho. Afinal, os momentos de descontração, cafezinhos, congressos, festinhas e conversas, sobre ciência ou sobre futilidades, tornam o nosso dia-a-dia muito mais feliz.

Obrigada aos meus amigos do departamento. Algumas pessoas não poderiam deixar de serem citadas aqui. Carininha, Theteus, Thaís, Jackie, Wel e Estherita, vocês são simplesmente demais. Espero ter vocês sempre por perto!!!

Ao pessoal do laboratório e aos que já passaram por ele. Maíra, Dani, Jackie, Thiago, Lu Medina, Lu Concep, Maria Emília, Aninha, Moki, Clau, Crau, Janine, Marcita, André, Bruninha, Flávia, Inaê, Mari e Tainá. Obrigada pela ótima convivência e apoio.

Um OBRIGADA todo especial ao meu querido Camps. Meu guia desde o início me pegou pela mão e me ensinou a pensar. Você faz muita falta.

Finalmente, agradeço aos meus pais, Isabel e Heitor. Muito obrigada por sempre acreditarem em mim e confiarem nas minhas opções. Mãe, obrigada por aguentar os meus dias de fúria e sempre ter um conselho perfeito para me dar. Pai, obrigada por estar sempre disposto a fazer o possível e o impossível. Eu sei que independente do caminho que eu escolher seguir, vocês SEMPRE estarão por perto.

*“A viagem da descoberta
consiste não em olhar novas
paisagens, mas em ver com
novos olhos”*

Marcel Proust

*“A experiência nunca falha,
apenas as nossas opiniões
falham ao esperar da
experiência aquilo que ela não é
capaz de oferecer”*

Leonardo DaVinci

RESUMO

Campopiano JC. Influência da ativação de macrófagos via receptores do tipo Toll (TLRs) na produção de fatores moduladores da sobrevivência de linfócitos T [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A interação entre a imunidade inata e adaptativa acontece durante todo o processo da resposta imune, ocorrendo através do contato célula-célula e pela secreção de fatores solúveis, tais com mediadores lipídicos e citocinas. Os *Toll-like receptors* (TLRs) presentes nas células da imunidade inata, tem importante papel na ativação de macrófagos e células dendríticas e, conseqüentemente, no conjunto de moléculas secretadas por estas células. Sabe-se que estas substâncias são importantes na modulação dos processos de ativação, diferenciação e proliferação de linfócitos T. Porém, pouco se sabe sobre o seu papel no processo de contração da população de células T ativadas (*Activation-induced cell death* - AICD). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se macrófagos estimulados com diferentes agonistas de TLRs poderiam produzir fatores solúveis com capacidade modulatória da morte por AICD. Primeiramente, demonstramos por RT-PCR em tempo real, que tanto a linhagem macrofágica J774, quanto os macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) expressam todos os TLRs, com excessão do TLR11. Comprovamos que estas proteínas são funcionais, uma vez que o estímulo com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS, Flagelina, Imiquimod e CpG, agonistas de TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9, respectivamente, é capaz de ativar o fator de transcrição NF-κB nestes macrófagos. Com relação aos mecanismos de morte celular (AICD), constatamos que todos os sobrenadantes gerados pelas J774 são capazes de proteger as células DO11.10 da AICD mediada por anticorpos anti-CD3. Por outro lado, apenas sobrenadantes de BMDMs estimuladas com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS e Imiquimod tiveram o mesmo efeito protetor. Comprovamos que este fenômeno é parcialmente mediado por PGE₂, uma vez que este mediador lipídico foi detectado, através de ensaio imunoenzimático, em sobrenadantes gerados por células J774. Mostramos, ainda, que a inibição da morte ocorre através da regulação negativa da expressão de FasL nas células DO11.10. Finalmente, demonstramos que este fenômeno não é restrito ao hibridoma de linfócitos T, mas também ocorre em blastos de linfócitos T CD4⁺ primários, gerados *ex vivo*. Em conjunto, estes resultados indicam que as APCs podem modular a expressão de FasL, em resposta aos agonistas de TLRs, evitando a morte dos linfócitos T.

Palavras-chave: Apoptose. Fas/FasL. Receptores do tipo Toll (TLRs). AICD. Linfócitos T. PAMPs.

ABSTRACT

Campopiano JC. Effect of soluble factors produced by TLR-activated macrophages on T lymphocytes survival [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The interaction between innate and adaptative immunity occurs in several phases of the immune response, taking place by cell to cell contact and by secretion of soluble factors such as cytokines. The Toll-like receptors (TLRs) are expressed by cells involved in the innate immunity and have an important role in the activation of macrophages and dendritic cells, directly acting on the molecules secreted by these cells. It's known that these soluble factors are able to modulate the activation, differentiation and proliferation of T lymphocytes however, little is known about the role of these secreted molecules on the survival control of activated T lymphocytes (Activation-induced cell death - AICD). Therefore, the aim of the present work was to evaluate the effects of soluble factors produced by macrophages activated with several TLRs agonists, on the survival of T lymphocytes. First we sought the expression of TRLs on both bone marrow-derived and J774 macrophage cell line and we could see that both cells express all TLRs, except for TLR 11. The stimulation of both cells with TLRs agonists leads to the expression of NF- κ B and the stimulation of BMDMs stimulated with Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS and Imiquimod led to the production of soluble factors that protected DO11.10 T lymphocyte cell line from AICD induced by α CD3. Next we determined the partial involvement of PGE₂ in this process by evaluating the production of PGE₂ by ELISA on the supernatants of TLR-stimulated J774 macrophages. Furthermore we showed that the protection of DO11.10 lymphocytes from AICD occurs via down regulation of FasL. We also showed that this protection is not characteristic of the DO11.10 T cell line, being observed in CD4⁺ T lymphocytes expanded *ex vivo*. Altogether this data indicate that APCs, in response to TLR agonists, are able to modulate the expression of FasL by T lymphocytes preventing from death by AICD.

Keywords: Apoptosis. Fas/FasL. Toll-like receptors (TLRs). AICD. T Lymphocytes. PAMPs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Vias de Sinalização dos Toll-like Receptors (TLRs)</i>	24
Figura 2. <i>Via de sinalização de apoptose induzida pela ligação de Fas/FasL</i>	28
Figura 3. <i>Caracterização fenotípica dos macrófagos derivados de medula óssea</i>	40
Figura 4. <i>Análise da presença de micoplasma sp nas linhagens celulares L929, J774 e em BMDM</i>	45
Figura 5. <i>Ilustração do mecanismo do RT-PCR em tempo real</i>	48
Figura 6. <i>Expressão basal de TLRs na linhagem macrófágica J774 (A) e em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) (B)</i>	52
Figura 7. <i>Comparação da expressão TLRs em J774 e BMDM</i>	53
Figura 8. <i>Ativação de NF-kB em J774 e BMDMs estimuladas com agonistas de TLRs</i>	55
Figura 9. <i>Efeito dos agonistas de TLRs em J774 e BMMO</i>	57
Figura 12. <i>Ação dos sobrenadantes de cultura de J774 e BMDM no hibridoma DO11.10</i>	59
Figura 10. <i>Ação dos sobrenadantes de cultura de J774 na AICD do hibridoma DO11.10</i>	60
Figura 11. <i>Ação dos sobrenadantes de cultura de BMDM na AICD do hibridoma DO11.10</i>	63
Figura 13. <i>Efeito direto dos agonistas de TLRs na AICD do hibridoma DO11.10</i> 65	
Figura 14. <i>Expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) em J774 e BMDM estimuladas com agonistas de TLRs</i>	67
Figura 15. <i>Avaliação da presença de PGE2 nos diferentes sobrenadantes de macrófagos estimulados com agonistas de TLRs</i>	68
Figura 16. <i>Influência dos sobrenadantes derivados de J774 na expressão gênica de FasL, Fas e FLIP durante a AICD do hibridoma DO11.10</i>	70
Figura 17. <i>Influência dos sobrenadantes derivados de BMDM na expressão gênica de FasL, Fas e FLIP durante a AICD do hibridoma DO11.10</i>	71
Figura 18. <i>Influência dos sobrenadantes derivados de J774 e BMDM na expressão gênica de TNF durante a AICD do hibridoma DO11.10</i>	73

Figura 19. <i>Caracterização fenotípica dos blastos de linfócitos T e indução de AICD.....</i>	75
Figura 20. <i>Efeito dos sobrenadantes de J774 e BMDM na expressão de FasL em linfócitos T CD4+ primários</i>	77
Figura 21. <i>Efeito dos sobrenadantes de J774 e BMDM na morte de linfócitos T CD4+ primários</i>	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - <i>TLRs e seus respectivos agonistas</i>	39
Quadro 2 - <i>Seqüência do par de oligonucleotídeos utilizados para detecção de micoplasma</i>	46
Quadro 3 - <i>Seqüência do par de oligonucleotídeos utilizados para detecção de β-actina</i>	48
Quadro 4 - <i>Número de catálogo dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR (Taqman)</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

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

AP-1 – *activator protein-1*

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

BMDM – *Bone Marrow Derived Macrophage* – Macrófago Derivado de Medula Óssea

cFLIP – *cellular FLICE inhibitory protein*

Cox-2 – Ciclooxygenase-2

DD – *death domain* – domínio de morte

DED – *death effector domain* – domínio efetor de morte

DISC – *death inducing signalling complex* – complexo sinalizador indutor de apoptose

Egr – *early growth response genes*

FADD – *Fas associated DD* – domínio de morte associado à Fas

FKHRL1 – *Forkhead transcription factor 1*

Fli – Flagelina

ICER – *Inducible cAMP early repressor* – repressor de indução de cAMP

Imiq – Imiquimod

IRAK-1 – *IL-1R-associated Kinase* – quinase associada à receptor de IL-1

IRFs – *interferon regulatory factors* – fatores regulatórios de interferons

LBP – *LPS binding protein* – Proteína ligadora de LPS

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – *leucine-rich repeat* – Repetições ricas em leucina

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

MyD88 – *myeloid differentiation factor 88* – fator de diferenciação mielóide 88

NF- κ B – *nuclear factor kappa B* – fator nuclear kappa B

NFAT – *nuclear factor of activated T cell* – fator nuclear de células T ativadas

Pam – Pam₃CSK₄

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

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PI – Propidium Iodide – Iodeto de Propídeo

Poly(I:C) – ácido poliinosinedeoxicitidílico

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

RT-PCR – *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

SP-1 – *secretory protein 1* – proteína secretória 1

TAK1 – TGF β -activated kinase 1 – quinase 1 ativada por TGF β

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

TIR – *Toll/interleukin-1 receptor*

TIRAP/MAL – *TIR-associated protein / MyD88 adaptor-like*

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

TRAF6 – *TNFR-associated factor 6*

TRAM – *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF – *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações Gerais.....	18
1.2 Ativação de macrófagos e células dendríticas e a interação com linfócitos T	19
1.3 Receptores do tipo Toll (TLRs)	20
1.4 Vias de Sinalização dos TLRs	23
1.5 Subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺	25
1.6 Morte Celular Induzida por Ativação	27
1.7 Regulação do FasL	32
1.8 Prostaglandina E ₂	34
1.9 Considerações Finais	35
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Metas específicas.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Células.....	37
3.2 Camundongos	37
3.3 Reagentes	38
3.4 Cultivo de Células	38
3.5 Produção de sobrenadante de células L929.....	39
3.6 Obtenção de macrófagos derivados de células da medula óssea (BMDMs).....	40

3.7	Tratamentos realizados durante a obtenção dos sobrenadantes dos macrófagos	40
3.8	Obtenção de linfócitos T primários	41
3.9	Geração de blastos de linfócitos T CD4⁺	41
3.10	Estimulação dos linfócitos T com anticorpo anti-CD3 (Indução de AICD)	42
3.11	Ensaio com linfócitos T utilizando diferentes sobrenadantes	42
3.12	Análise de apoptose via fragmentação de DNA	43
3.13	Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina	43
3.14	Eletroforese de Proteínas e <i>Western-blot</i>	44
3.15	Deteção de micoplasma por RT-PCR	45
3.16	Extração de RNA	46
3.17	Síntese de cDNA	47
3.18	RT-PCR em tempo real (qPCR)	47
3.19	Cálculo da expressão gênica relativa	49
3.20	Análises estatísticas	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Expressão basal dos TLRs em macrófagos	51
4.2	Comparação da expressão relativa dos TLRs entre J774 e BMDM	51
4.3	Agonistas de TLR e ativação de NF-κB	54
4.4	Efeito dos agonistas de TLRs sobre J774 e BMDM	56
4.5	Efeito dos sobrenadantes de macrófagos em hibridomas de linfócitos T DO11.10	58
4.6	Envolvimento de Prostaglandina E2 (PGE2) no efeito protetor dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com agonistas de TLRs	66

4.7 Efeito dos sobrenadantes derivados de macrófagos na expressão gênica de FasL, Fas e FLIP.....	69
4.8 Efeito dos sobrenadantes derivados de macrófagos na expressão gênica de TNF.....	72
4.9 Geração de linfócitos T primários e indução de AICD.....	74
5 DISCUSSÃO	82
5.1 Considerações Iniciais.....	82
5.2 Caracterização do Modelo Experimental.....	83
5.3 Efeito dos sobrenadantes de macrófagos na AICD do hibridoma de linfócitos T DO11.10.....	86
5.4 Efeito do sobrenadantes de macrófagos na expressão de FasL e AICD de linfócitos T primários.....	92
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Funcionando como primeira linha de defesa, o sistema imune inato reconhece estruturas conservadas evolutivamente, presentes em diferentes patógenos. O mecanismo de reconhecimento do sistema imune adaptativo, em contraste, é baseado na expressão clonal de receptores de antígeno e na geração de um diverso repertório de linfócitos. Após a iniciação da resposta imune, os linfócitos proliferam e se diferenciam em células efetoras. Esta é a chamada “fase de expansão”, aonde é gerado um número suficiente de células T efetoras, específicas para determinados patógenos.

Com a resolução da infecção, os linfócitos ativados gerados durante a resposta imune precisam ser eliminados. A alta capacidade proliferativa dos linfócitos ativados exige um controle efetivo de sua vida, a fim de manter a homeostasia do organismo. A morte por apoptose permite a redução do número de linfócitos durante a fase de contração de uma resposta imune. Têm sido bastante discutidos dois conceitos de indução de morte das células T durante o encerramento da resposta imune: AICD (*Activation-Induced Cell Death*) e ACAD (*Activated T Cell Autonomus Death*). A AICD é descrita como a morte das células T ativadas por re-estimulação de seus receptores (TCR). Durante a fase de expansão da resposta imune, as células T possuem um fenótipo de resistência à AICD, que vai gradualmente mudando para um estado de sensibilidade, conforme a resposta caminha para a fase de contração (Khammer, 2000). A principal via de AICD é dependente da interação de FasL (CD95L) ao seu receptor cognato Fas (CD95). Em contraste com a AICD, a morte por ACAD durante a fase de contração da resposta imune não requer a re-estimulação do TCR, pelo contrário, ocorre pela ausência de estimulação via o TCR. ACAD não é mediada por receptores de morte, sendo depende de uma via intrínseca de morte mediada pelo membro pró-apoptótico da família Bcl-2 denominado Bim e, portanto, envolve a mitocôndria na sua cascata de sinalização (Strasser e Pellegrini, 2004).

O mais provável é que os processos de AICD e ACAD cooperem durante o encerramento da resposta imune. Enquanto a morte por ACAD contribui mais fortemente com a redução dos números de células T durante a fase de contração (Hildeman *et al.*, 2002), a AICD parece ser importante para a eliminação de células T cronicamente ativadas e potencialmente auto-reativas (Stranges *et al.*, 2007), e será discutida mais profundamente no decorrer do presente trabalho.

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

Os linfócitos T CD4⁺, também chamados linfócitos T auxiliares ou Th (T “helper”) são as células centrais do sistema imunológico adaptativo, responsáveis pela orquestração da resposta imune. A ativação adequada dos linfócitos T virgens é um evento essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz no combate aos patógenos e tumores, e importante para evitar o aparecimento de doenças auto-imunes. Este processo acontece nos órgãos linfóides periféricos, que fornecem um microambiente apropriado para uma interação afinada entre diversos tipos celulares e moléculas do sistema imune (Huang e Germain, 2004). Nestes locais, a ativação, proliferação clonal e diferenciação dos linfócitos T em células efetoras somente ocorrem quando estas células reconhecem antígenos através da interação do seu TCR com fragmentos peptídicos apresentados por moléculas do MHC (*major histocompatibility complex*). Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos antigênicos associados a moléculas do MHC classe II, presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas e linfócitos B, enquanto que os linfócitos T CD8⁺ reconhecem antígenos associados a moléculas de MHC classe I, presentes em todas as células nucleadas do organismo. Porém, para que haja a completa ativação dos linfócitos T CD4⁺, estas células precisam de sinais co-estimuladores provenientes das APCs durante o reconhecimento antigênico. Se o primeiro sinal ocorrer e não for acompanhado pelo segundo sinal, as células adquirem

um estado anérgico (irresponsável), levando-as, em alguns casos, à morte (Gimmi *et al.*, 1993)

O sinal co-estimulador, ou segundo sinal melhor descrito até hoje é a interação entre CD28 presente constitutivamente em linfócitos T, e o CD80/CD86 de expressão indutível na superfície das APCs. A expressão de CD80 e CD86 é positiva e rapidamente modulada após a estimulação com ligantes de TLRs (Ghosh *et al.*, 1998). Além da interação entre estas moléculas, os sinais co-estimuladores também podem ser transduzidos pela interação entre CD40L/CD40, CD2/LFA3 e TIM1/TIM4 (Armitage *et al.*, 1993; Selvaraj *et al.*, 1987; Meyers *et al.*, 2005).

A completa maturação dos macrófagos e DCs são fundamentais para aumentar a sua capacidade de apresentação dos antígenos, expressão de moléculas co-estimuladoras e para alterar o perfil de produção e secreção de moléculas solúveis. Um dos sinais mais importantes para a maturação das APCs ocorre através da estimulação de receptores denominados PRRs (*Pattern-recognition receptors*) (Ghosh *et al.*, 1998; Iwasaki e Medzhitov, 2004), que reconhecem padrões moleculares que são frequentemente associados aos patógenos (*Pathogen associated molecular pattern - PAMPs*) (Kopp e Medzhitov, 2003).

Macrófagos e células dendríticas atuam como uma ponte entre o sistema imune inato e adaptativo, funcionando como sensores de produtos microbianos e sinais de perigo e realizando sua apresentação para o sistema imune adquirido. Como comentado anteriormente, a ótima ativação de células T virgens requer a sinalização através do TCR e da molécula CD28 (Lenschow *et al.*, 1996; Liu e Janeway, 1992). Estas exigências são cumpridas apenas por DCs maduras expostas à ligantes de TLRs, que sinalizam para o aumento na expressão de moléculas do MHC e de moléculas co-estimuladoras (Banchereau e Steinman, 1998). A migração das APCs para o linfonodo drenante e subsequente ativação das células T virgens garante que a resposta imune seja montada somente contra antígenos derivados de patógenos, sendo que a interação entre DCs imaturas e células T virgens gera um estado de tolerância ou indução de células T reguladoras (Steinman *et al.*, 2003)

1.3 Receptores do Tipo Toll (TLRs)

Como dito acima, a ativação das APCs pelos patógenos ocorre por diversos mecanismos, podendo envolver diferentes receptores denominados PRRs (*Patter-recognition receptors*).

Dentre os PRRs citosólicos encontram-se os RLRs (*Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors*) e os NLRs (*Nucleotide binding domain and leucine-rich repeat-containing receptors*) (Pichlmair e Reis e Sousa, 2007). Os RLRs RIG-1 e MDA-5 (*melanoma differentiation factor 5*) são sensores para ácidos nucleicos, sendo importantes para o reconhecimento de RNA viral. Os NLRs representam uma grande família de sensores intracelulares que podem detectar patógenos e sinais de stress (Martinon *et al.*, 2009). Os PRRs transmembrânicos incluem a família das lectinas tipo C, como Dectin-1 e Dectin-2, que atuam durante infecções fúngicas, detectando β -glucana e manana (Robinson *et al.*, 2009; Brown, 2006), respectivamente, e os TLRs (*Toll-like receptors*) que compõe a mais bem caracterizada classe de PRRs (Takeda e Akira, 2005; Iwasaki e Medzhitov, 2004).

O envolvimento do Toll na imunidade inata foi primeiramente descrito na mosca *Drosophila melanogaster*. O gene para o receptor Toll foi descoberto em meados dos anos 80 por Eric Wieschaus e Christiane Nüsslein-Volhard, que ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1995. Eles descreveram o Toll como um receptor transmembrânico necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral correta e desenvolvimento embrionário adequado do inseto. Em 1996, Lemaitre e Hoffman observaram que moscas com mutações neste receptor eram susceptíveis à infecção pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, uma vez que mutações no gene Toll bloqueavam a indução do peptídeo anti-microbiano Drosomicina, em resposta à infecção fungica (Lemaitre *et al.*, 1996). Mais tarde, Charles Janeway e Ruslan Medzhitov identificaram a presença de receptores homólogos ao Toll no genoma humano que foram denominados *Toll-like receptors* (TLRs). Esses receptores foram descritos primeiramente em componentes celulares da imunidade inata, que quando estimulados pelos seus respectivos ligantes, induziam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de

augmentar a expressão de moléculas co-estimuladoras por essas células (Medzhitov *et al.*, 1997).

Sabe-se hoje que, tanto camundongos quanto seres humanos possuem receptores semelhantes à Toll (TLR), cada um aparentemente envolvido no reconhecimento de um padrão molecular associado à patógenos (PAMPs)

Atualmente 12 membros da família TLR foram identificados em mamíferos, sendo que camundongos não possuem TLR8 e TLR10 e o genoma humano não apresenta TLR11 e TLR12 (Beutler, 2009; Medzhitov, 2007). Os TLRs são glicoproteínas transmembrânicas, caracterizadas estruturalmente pela presença de um domínio extracelular N-terminal rico em repetições leucina (*leucine-rich repeat* - LRR), que está envolvido diretamente ou através de moléculas acessórias, no reconhecimento dos ligantes. Um domínio transmembrânico de passagem única e um domínio intracitoplasmático de sinalização, homólogo ao receptor da interleucina-1 (*Toll/interleukin-1 receptor* – TIR), que é necessário para a interação com moléculas adaptadoras e para a sinalização intracelular (Takeda *et al.*, 2003).

Acredita-se que a maioria dos TLRs atue em forma de multímeros, sendo que alguns formam heterodímeros e outros se associam à moléculas que não fazem parte da família dos TLRs (Beutler 2009).

O TLR4 foi o primeiro membro da família a ser isolado e, juntamente com componentes acessórios na superfície celular como MD-2 e CD14, reconhece uma enorme variedade de PAMPs, como lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias gram-negativas (Shimazu *et al.*, 1999), glicoinusitolfosfolípidos (GIPLs) de *Trypanossoma Cruzi* (Gazzinelli *et al.*, 2004), manana de *Candida albicans* (Netea *et al.*, 2004) e envelopes virais glicoprotéicos (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Animais com deficiência nesse receptor são excepcionalmente susceptíveis à infecção por bactérias gram-negativas (Werts *et al.*, 2006). O TLR2 pode formar heterodímeros com TLR1 e TLR6 para reconhecer lipídios, incluindo peptídeoglicano, lipopeptídeos e lipoproteínas de bactérias Gram positivas (Lien *et al.*, 1999), lipopetídeos de micoplasma e zimozan de fungos (Netea *et al.*, 2004). Em particular, TLR1/2 e TLR2/6 podem discriminar entre diacil e triacil-lipopeptídeos, respectivamente. Em adição, TLR10 parece se heterodimerizar com TLR2 e TLR1, embora o

ligante deste heterodímero ainda não esteja bem estabelecido (Zhang *et al.*, 2004). A flagelina, maior constituinte do flagelo de bactérias, como *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis*, é reconhecida pelo TLR5 (Yonekura *et al.*, 2003). Interessantemente, os receptores associados ao reconhecimento viral, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em vesículas endocíticas e compartimentos lisossômicos e transitam para estes locais a partir do retículo endoplasmático (ER) com o auxílio da proteína UNC93B (Beutler 2009). RNA de fita dupla (dsRNA) produzido durante a replicação viral e seu análogo sintético, ácido poliinosinedeoxicitidílico (poly(I:C)) são reconhecidos pelo TLR3 (Alexopoulou *et al.*, 2001). Os genes do TLR7 e TLR8 possuem grande homologia, sendo que o TLR7 murino e o TLR8 humano reconhecem componentes sintéticos de imidazoquinolinas (Imiquimod, por exemplo), análogos da guanossina (como a loxorribina) e fita simples de RNA (ssRNA) (Hemmi *et al.*, 2000). TLR9 reconhece seqüências CpG não-metiladas presentes no DNA bacteriano e em alguns vírus de DNA, como o citomegalovírus murino (MCMV) (Krug *et al.*, 2001). Finalmente, bactérias uropatogênicas e profilina de *Toxoplasma gondii* são reconhecidas pelo TLR11, embora não seja conhecido o componente exato responsável por essa ativação.

Recentemente, componentes não associados a patógenos, inclusive moléculas endógenas, estão sendo descritos como ligantes de TLRs, porém a relevância fisiológica deste reconhecimento ainda não foi bem estabelecida.

1.4 Vias de Sinalização dos TLRs

A ligação dos TLRs aos componentes microbianos leva a ativação de cascatas de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e membros da família IRF (*IFN-regulatory factor*), com conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , IFN- α e IFN- β , além da expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas do MHC, entre outras necessárias para proteger a célula do hospedeiro contra patógenos (Kopp e Medzhitov 1999).

Após a ligação aos seus respectivos agonistas, os TLRs dimerizam e sofrem mudanças conformacionais necessárias para o recrutamento de um conjunto de moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR, incluindo MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP/MAL (TIR-associated protein / MyD88 adaptor-like), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (Takeda *et al.*, 2003). MyD88 e TRIF são responsáveis pela ativação de distintas vias de sinalização, que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFNs) tipo I, respectivamente.

Como é demonstrado na Figura 1, a molécula adaptadora MyD88 é essencial para a sinalização de todos TLRs, com exceção do TLR3 (Carty *et al.*, 2006). Após estimulação, MyD88 se associa, através de seu domínio TIR, com a porção citoplasmática do receptor, permitindo o recrutamento da quinase IRAK-4 (*IL-1R-associated Kinase-4*), que se ativa e fosforila IRAK-1. Uma vez fosforilada, IRAK-1 torna-se ativa, dissocia-se de MyD88 e fosforila TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*), ativando esta proteína adaptadora. TRAF6 fosforila TAK1 (TGF β -activated kinase 1) e a sua ativação culmina na ativação das quinases IKK α e IKK β , que juntamente com a subunidade reguladora IKK γ (NEMO), formam o complexo trimérico IKK. Este complexo cataliza a fosforilação de I κ B, uma proteína citoplasmática que é retentora do fator de transcrição NF- κ B. Essa fosforilação é necessária para degradação de I κ B e liberação de NF- κ B, com sua subsequente translocação para o núcleo. No caso de TLR2 e TLR4, a proteína MyD88 necessita da molécula adaptadora TIRAP (MAL) para interagir com o domínio TIR destes receptores (Muzio *et al.*, 1997).

Camundongos MyD88-deficientes apresentam falha na ativação de NF- κ B, MAPK e na produção de citocinas inflamatórias em resposta aos ligantes específicos de TLR2, 5, 7 e 9. Embora macrófagos deficientes de MyD88 também apresentem falha na produção de citocinas inflamatórias em resposta ao LPS (TLR4), eles parecem ativar NF- κ B e MAPK, porém apresentando uma cinética retardada. Além disso, tratamento com ligantes de TLR3 e TLR4 em camundongos MyD88-deficientes, leva à ativação normal de IRF3 e subsequente indução de IFN- β (Kawai *et al.*, 2001). Essas observações sugeriram fortemente a presença de uma via independente de MyD88 na

sinalização por TLR3 e TLR4. Neste caso, portanto, TRIF é recrutado como molécula adaptadora e interage diretamente com o domínio TIR do TLR3. TRIF pode recrutar TRAF-6 e dar continuação a uma cascata de sinalização semelhante à via dependente de MyD88, com subsequente ativação de NF-κB ou pode se ligar à TBK1 que medeia a ativação do fator de transcrição IRF-3 e expressão de IFN-β. Quando esta via é sinalizada por TLR4, mas não por TLR3, a molécula co-adaptadora TRAM é recrutada e TRIF interage indiretamente com o domínio TIR de TLR4. (Yamamoto *et al.*, 2002)

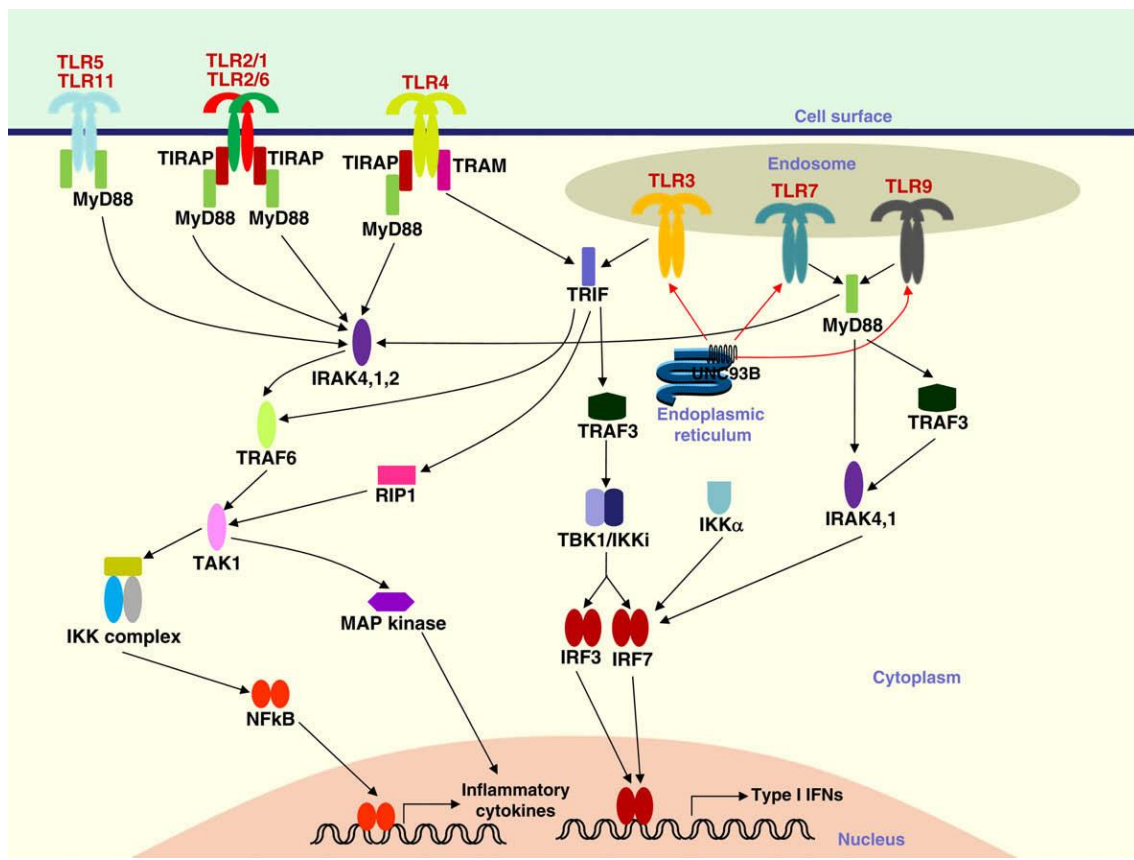


Figura 1. Vias de Sinalização dos Toll-like Receptors (TLRs)
 Fonte: Kumar *et al.*, 2009.

1.5 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 diferentes subpopulações.

A diferenciação destas células nas várias subpopulações depende, sobretudo, das citocinas presentes no microambiente. Estas diferentes citocinas são produzidas pelas APCs de acordo com o tipo de ligante que elas reconhecem através dos TLRs (entre outros PRRs), mostrando que estes receptores são fundamentais para o início e para o direcionamento adequado da resposta imune adaptativa (Iwamoto *et al.*, 2007; Moser e Murphy, 2000). Isto é comprovado pelo fato de células T de camundongos deficientes da proteína adaptadora MyD88 não apresentarem proliferação em resposta ao antígeno ou produção de níveis detectáveis de IFN- γ em resposta à estimulação antigênica (Schnare *et al.*, 2001).

Após a interação apropriada com o antígeno apresentado na superfície de moléculas do MHC classe II pelas APCs, as células T CD4⁺ são ativadas e proliferam. Estas células podem se diferenciar nas subpopulações efetoras, incluindo as clássicas Th1 e Th2, a mais recentemente descrita Th17 e as células T reguladoras induzidas (iTreg). A diferenciação destas células é coordenada predominantemente pelas citocinas presentes no microambiente e, em certo ponto, pela força da interação do receptor de antígeno das células T com o antígeno na fenda da molécula de MHC das APCs (Boyton e Altmann, 2002). A polarização para um perfil Th1 ocorre principalmente em altas concentrações de IL-12 e/ou IFN- γ , estas células são caracterizadas pela produção de IFN- γ e estão envolvidas na resposta imune contra microorganismos intracelulares. A polarização para o perfil Th2 acontece na presença de altos níveis de IL-4, estas células, por sua vez, produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e são importantes durante a imunidade humoral, no controle de infecções helmínticas e de outros patógenos extracelulares. A diferenciação em TH17 (em camundongos) ocorre na presença de IL-6 e TGF- β . Estas células são responsáveis pela produção de IL-17 e IL-22 e possuem um importante papel na eliminação de infecções por fungos, especialmente em superfícies mucosas. As células Treg, por sua vez, são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e podem ser divididas em duas categorias: as células Treg naturais (nTreg) que surgem no timo, e as células Treg induzidas (iTreg), produzidas na periferia na presença de TGF- β (Chen *et al.*, 2007).

Além dos mecanismos que regem a diferenciação e polarização dos linfócitos T CD4⁺, a retração destas diferentes subpopulações efetoras tem um grande impacto no estabelecimento de uma resposta imune focada e eficiente na eliminação dos patógenos e também na 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 a fase efetora da resposta imune é denominada AICD. Originalmente descrita em hibridomas de linfócitos T (Bunner *et al.*, 1995), esta via de apoptose logo foi encontrada em células Th1, Th2 (Ramsdell *et al.*, 1994) e mais recentemente em populações de células Th17 (Zhang *et al.*, 2008).

1.6 Morte Celular Induzida por Ativação

A morte celular induzida por ativação (AICD) é um processo de apoptose de linfócitos T desencadeado pela re-estimulação via TCR/CD3, sendo inicialmente descrita em hibridomas de Linfócitos T e posteriormente em linfócitos T maduros pré-ativados e em sub-populações de linfócitos T CD4⁺.

O mecanismo molecular da AICD depende da interação do receptor de morte Fas (CD95) com seu ligante cognato, FasL (CD95L) (Ju *et al.*, 1995; Van Parijs *et al.*, 1996). O receptor Fas é uma proteína transmembrana, membro da superfamília dos receptores de TNF. É constitutivamente expresso em uma variedade de células, incluindo células B e T e pode ainda ter sua expressão aumentada após a ativação celular (Nagata e Golstein, 1995).

Em contraste, FasL é sintetizado como uma proteína transmembrana, cuja expressão é limitada a poucos tipos celulares e pode ser altamente induzida em linfócitos T após a estimulação do TCR (Alderson *et al.*, 1995, Dhein *et al.*, 1995). Sua porção extracelular pode ser clivada da membrana por metaloproteases para se tornar secretada, sendo que a forma solúvel de FasL, parece ser em grande parte inerte como um ligante indutor de apoptose (Tanaka *et al.*, 1998). No entanto, é evidente que na maioria dos casos a ligação de Fas com FasL associado à membrana, seja de maneira autócrina, como parácrina, induz rapidamente uma cascata proteolítica, que resulta na

morte celular por apoptose (Ishiwatari-Hayasaka *et al.*, 1997; Oshimi *et al.*, 1996)

Muitos estudos recentes têm demonstrado o papel crítico dos *lipid rafts* na sinalização celular, por meio da organização de proteínas sinalizadoras, moléculas adaptadoras e receptores de superfície em um mesmo ponto da membrana celular. Tem-se mostrado também, que a redistribuição dos receptores de morte para os *lipid rafts* aumenta a susceptibilidade das células à apoptose, sendo que a estimulação do TCR de células T CD4⁺ resulta em redistribuição das moléculas de Fas para dentro dos *lipids rafts*. Sendo assim, os *lipids rafts* tem sido apontados como importantes reguladores da apoptose mediada por Fas, uma vez que podem controlar a eficiência dos eventos iniciais da sinalização via Fas/FasL (Dykstra *et al.*, 2003; Muppidi e siegel 2004).

A ativação do receptor ocorre pela trimerização de moléculas de Fas, induzida pelo ligante, aproximando as porções intracitoplasmáticas. Com isso, há o recrutamento de moléculas adaptadoras FADD (*Fas associated DD*), que se ligam ao Fas por uma interação homodimérica (DD-DD) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). A molécula FADD possui outro domínio, o domínio efetor de morte (DED - *death effector domain*), que interage com o mesmo domínio DED presente na procaspase-8, recrutando-a. Este complexo multimolecular é nomeado DISC (*death inducing signalling complex*). A procaspase-8 sofre ativação autocatalítica, desliga-se do DISC e ativa caspases efetoras, como caspase-3, 6 e 7 (Tschopp *et al.*, 1998). Estas caspases ativadas podem então clivar uma variedade de substratos, como enzimas reparadoras de DNA, proteínas estruturais, endonucleases e muitos outros constituintes celulares, promovendo a apoptose da célula (Nagata e Suda, 1995; Rosen e Casciola, 1997; Cohen, 1997).

Entretanto, em alguns casos, a produção de caspase-8 no DISC pode não ser suficiente para ativar a quantidade de caspase-3 necessária para a execução da apoptose. Nessas condições, caspase-8 pode clivar Bid (Luo X. *et al.*, 1998), um membro da família Bcl-2, gerando um fragmento pro-apoptótico chamado tBid (Bid truncado), que cliva Bax ou Bak (Korsmeyer *et al.*, 2000) e promove a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. O citocromo c liga-se a APAF-1 (*apoptotic-protease-activating factor-1*), que por

sua vez recruta a pró-caspase-9 formando um complexo de proteínas chamado apoptossomo. Este complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9, iniciando uma cascata de ativação de caspases, que culmina na caspase-3, molécula responsável pela indução dos principais fenótipos apoptóticos (Li P. *et al.*, 1997). A Figura 2 apresenta um esquema simplificado das duas vias iniciadas pela ativação do receptor Fas.

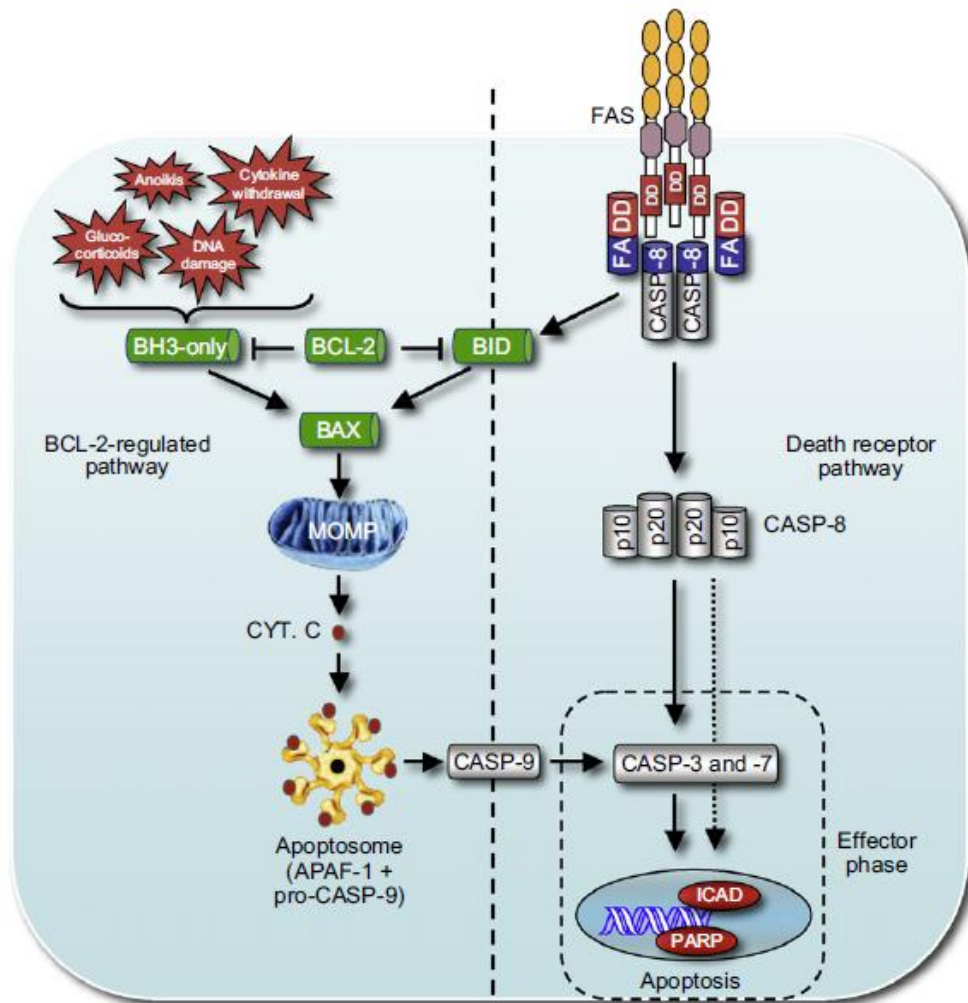


Figura 2. Via de sinalização de apoptose induzida pela ligação de Fas/FasL.
 Fonte: Strasser *et al.*, 2009.

A proteína celular c-FLIP (*FLICE-inhibitory protein*) é uma potente inibidora da ativação de caspases no DISC (Thome e Tschopp, 2001). c-FLIP é uma molécula que apresenta alta homologia com a pró-caspase 8, possui um domínio de morte, porém com domínio catalítico inativo. Quando recrutada

pelo receptor, impede a ligação da caspase-8 com este, bloqueando a formação do DISC e a sinalização pró-apoptótica, sendo que a relação entre os níveis de c-FLIP e das caspases no DISC é crucial para determinar se a apoptose será iniciada ou não (Bentele *et al.*, 2004). Após a ativação inicial das células T, os níveis de c-FLIP são fortemente aumentados (Kirchhoff *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2003), correlacionando-se com a resistência das células T recém ativadas à apoptose induzida via a ligação Fas / FasL. Em populações de células T expandidas, susceptíveis à AICD, por outro lado, os níveis de c-FLIP encontram-se diminuídos, sugerindo que c-FLIP possa ser uma molécula chave na regulação da morte por AICD (Fas *et al.*, 2006).

A importância da via de sinalização mediada por Fas/FasL pode ser facilmente observada em camundongos MRL/lpr e MRL/gld, que possuem deficiência na expressão de Fas e FasL, respectivamente. Estes animais apresentam linfadenopatia e esplenomegalia causada pelo acúmulo de linfócitos ativados (Andrews *et al.*, 1978; Roths *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1991), além de alta incidência de doenças auto-imunes em múltiplos órgãos, indicando que o acúmulo de células T ativadas não é apenas um problema de aumento dos órgãos linfóides, mas trata-se de um distúrbio grave nos processos de tolerância periférica (Nagata e Suda, 1995). De maneira semelhante, em seres humanos, a ALPS (*autoimmune lymphoproliferative syndrome*) é uma doença linfoproliferativa, com alta incidência de linfomas, causada por deficiências na expressão de Fas e/ou FasL ou em moléculas da sua via de sinalização, como caspase-8 e caspase-10 (Poppema *et al.*, 2004, Rieux-Laucat *et al.*, 1995). Estas características fenotípicas encontradas nos animais deficientes em Fas e/ou FasL e nos pacientes com ALPS suportam fortemente a idéia que o mecanismo de AICD é fundamental para a manutenção da homeostasia dos linfócitos T e da auto-tolerância.

Hildeman e colaboradores mostraram com o desenvolvimento de um camundongo nocaute para Bim, uma molécula pró-apoptótica da família Bcl-2, que a deleção de linfócitos T periféricos parece ser mais dependente de Bim do que da via dependente de Fas. O Bim é um gatilho da via de apoptose mediada pela mitocôndria e desempenha um papel central na morte de linfócitos T causada pela deprivação de citocinas (ACAD). 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 (Hildeman *et al.*, 2002).

Recentemente, publicações utilizando camundongos duplo-nocaute para Fas e Bim mostraram que ambas as vias são complementares e sinérgicas, tanto para combater o aparecimento de síndromes auto-imunes como na contração de populações expandidas. Hutcheson e colaboradores demonstraram que estes camundongos desenvolvem uma severa síndrome, semelhante ao Lupus eritematoso sistêmico (SLE), já na 16ª semana de vida, e possuem APCs com alto grau de ativação (Hutcheson *et al.*, 2008). Hughes e colaboradores mostraram diferenças de respostas entre dois tipos de infecções. A contração da população expandida em resposta a uma infecção aguda (vírus HSV-1KOS) era totalmente dependente da via do Bim, enquanto que durante uma infecção crônica (Vírus MHV-68) a morte dos linfócitos T expandidos era dependente das duas vias (Hughes *et al.*, 2008). Weant e colaboradores, entretanto, mostraram que outra infecção relativamente aguda (vírus LCMV Armstrong), levava a uma contração dependente tanto de Bim como de Fas (Weant *et al.*, 2008).

Dessa maneira, a teoria mais aceita atualmente sobre a participação de Fas e Bim na contração de populações de linfócitos T expandidas considera a forma e a duração da apresentação dos antígenos patogênicos. Se a infecção é rapidamente eliminada e a função das APCs fica rapidamente restringida, a concentração de fatores de sobrevivência se torna limitante e a via preferencial de morte é a via mediada por Bim. Quando o antígeno é persistente devido a uma infecção crônica, os linfócitos T recebem estímulos contínuos, evitando assim, a ativação da via dependente de Bim. Nesta situação, o estímulo crônico pelo antígeno leva a expressão de FasL que pode matar a própria célula por AICD. A expressão de FasL pelos linfócitos T também pode matar as APCs, o que limitaria a estimulação pelo antígeno, diminuindo a quantidade de sinais de sobrevivência, desencadeando nos linfócitos T uma morte dependente da via de Bim (Green, 2008).

1.7 Regulação do FasL

Por ser um evento central na regulação de vida e morte de diversos tipos celulares, inclusive linfócitos T maduros, a modulação da expressão do FasL foi extensamente estudada. Vários sítios de ligação consenso para diferentes fatores de transcrição foram descritos e posteriormente validados. Dentre os fatores de transcrição envolvidos neste processo, destacam-se: NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), Egr (*early growth response genes*), IRFs (*interferon regulatory factors*), AP-1 (*activator protein-1*), c-Myc, FKHRL1 (*Forkhead transcription factor 1*) e SP-1 (*secretory protein1*).

NFAT é ativado pela estimulação do complexo TCR/CD3 e parece ser o regulador chave da expressão de FasL. Camundongos mutantes para NFAT apresentam expressão deficiente de FasL e em alguns modelos desenvolvem doenças linfoproliferativas (Hodge *et al.*, 1996; Latinis *et al.*, 1997). A indução de FasL por NFAT requer a cooperação com AP-1 e pode ser potencializada por SP-1 (Peterson *et al.*, 1996).

NF- κ B corresponde a outro fator de transcrição envolvido na expressão de FasL. Apesar do promotor de FasL apresentar um único sítio de ligação com este fator, o NF- κ B parece mediar diversos estímulos apoptóticos que usam a via de Fas/FasL (Baldwin, 1996; Kasibhatla *et al.*, 1999). Através da ação de PKC- θ (*Protein Kinase C theta*), a estimulação do TCR leva à ativação de NF- κ B que pode sinergizar com NFAT na indução de FasL (Villalba *et al.*, 1999; Villunger *et al.*, 1999).

No promotor do FasL existem ainda sítios de ligação consenso para Egr, membros da família IRF, AP-1, c-Myc, FKHRL1 e SP-1. A família dos fatores de transcrição Egr é induzida por NFAT e se liga a um domínio no promotor de FasL que, em conjunto com o sítio de ligação com o NFAT, é necessário para a correta expressão de FasL em células T ativadas (Norian *et al.*, 1998; Dzialo-Hatton *et al.*, 2001). IRFs, uma família de fatores de transcrição que induz a expressão de Interferons em resposta às infecções virais, pode cooperar com outros fatores de transcrição para maximizar a indução de FasL frente a estimulação do TCR (Chow *et al.*, 2000). Homólogos dos IRFs, provenientes do

herpevírus humano 8 (HHV8), interferem na ligação de IRF-1 e regulam negativamente a expressão de FasL, podendo representar um escape das células T infectadas contra a apoptose mediada por FasL (Kirchhoff *et al.*, 2002). AP-1, o qual é ativado pela sinalização de MAP kinases, também participa na expressão de FasL (Matsui *et al.*, 2000). Interessantemente, indutores de óxido nítrico (NO) inibem a expressão de FasL por bloquearem a atividade de AP-1 (Melino *et al.*, 2000). Além disso, a expressão ectópica do dominante-negativo de AP1 diminui drasticamente a expressão de FasL durante o estímulo de AICD (Baumann *et al.*, 2003). c-Myc se liga a um sítio separado no promotor de FasL e parece ser importante para sua indução, uma vez que 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; Brunner *et al.*, 2000). FKHRL1 é mantido fosforilado e, portanto, inativo pela ação da quinase AKT, Assim, quando há ausência da atividade desta quinase, FKHRL1 é desfosforilado, dirige-se ao núcleo e participa na expressão de FasL. Ainda, SP-1 trabalha em colaboração com NFAT durante a transcrição de IL-2 dependente de FasL, em resposta à estimulação de linfócitos T via CD3 (Suhara *et al.*, 2002).

A expressão de FasL, induzida pela estimulação do TCR, pode ainda ser negativamente regulada através de diversos mecanismos. Um deles é o GILZ (Glucocorticóis-induced leucine-zipper), um gene regulado por glicocorticóides, capaz de bloquear o aumento de FasL em hibridomas, interferindo com o processo de apoptose por AICD (D'adamio *et al.*, 1997). O repressor transcripcional ICER (*Inducible cAMP early repressor*) é induzido rápida e fortemente pelo aumento nos níveis de AMPc e pode ocupar sítios de ligação consenso que são utilizados por diversos fatores de transcrição, impedindo a correta transcrição gênica mediada por estes fatores transcripcionais (Molina *et al.*, 1993). O fator de transcrição CIITA (*MHC class II transactivator*), bem como o ácido retinóico, podem bloquear a função de NFAT e inibir a transcrição de FasL (Gourley e Chang 2001; Lee *et al.*, 2002). Finalmente, TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*) pode igualmente inibir a expressão de FasL via re-estimulação do TCR, através da modulação negativa da expressão de c-Myc (Genestier *et al.*, 1999).

Em resumo, a expressão de FasL 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. 8 Prostaglandina E₂

Prostaglandinas (PG) são moléculas derivadas de lipídios geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico pela ação de ciclooxigenases e prostaglandina-sintases. O ácido araquidônico é um ácido graxo insaturado presente em membranas celulares. Após sua liberação da membrana pela ação de fosfolipase A₂, entra em um ciclo oxidativo, que culmina na produção de PGH₂ (Smith *et al.*, 2000). Esta prostaglandina inicial é bastante instável e é rapidamente convertida nas cinco principais prostaglandinas com efeitos fisiológico relevantes. São elas: PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ 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 de 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 PGs, exercendo funções de homeostase fisiológica (Dubois *et al.*, 1998). Já a expressão de Cox-2 é indutível por diversos mecanismos, especialmente pelas citocinas e estímulos pró-inflamatórios (Martin *et al.*, 1994).

A prostaglandina E₂ 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 PGE₂. Porém, após estímulo com LPS, a razão entre estes dois prostanóides é invertida e os macrófagos passam a produzir grandes quantidades de PGE₂ (Tiilley *et al.*, 2001). Sua influência no sistema imune é complexa, tendo ação em diversos tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, agindo de forma tanto anti- como pró-inflamatória. A diversidade destes

efeitos é devida, em parte, à existência de quatro receptores do subtipo EP capazes de interagir com PGE₂. A sinalização destes receptores é mediada pelas diferentes proteínas G acopladas, sendo que cada uma delas tem a capacidade de ativar diferentes vias bioquímicas (Kobayashi e Narumiya, 2002).

A PGE₂ pode atuar em diferentes momentos da vida dos linfócitos T, desde o desenvolvimento, maturação e até durante a realização de suas funções efetoras. Por 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 PGE₂ (Chemnitz *et al.*, 2006). Por fim, nosso grupo demonstrou o envolvimento de EP2 e EP4 na proteção de linfócitos T contra a morte induzida por anticorpos anti-CD3 (Weinlich *et al.*, 2008).

1.9 Considerações Finais

A interação entre a imunidade inata e adaptativa acontece durante todo o processo da resposta imune, incluindo a maturação, a polarização e a expansão dos linfócitos T, ocorrendo pelo contato célula-célula e pela secreção de fatores solúveis como as citocinas.

Sendo assim, resta saber se as APCs 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 sobrevivência destas células durante e após uma resposta imune.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ação dos agonistas de *Toll-like receptors* (TLRs) na geração de fatores moduladores da morte celular induzida por ativação (AICD), em linfócitos T CD4⁺, pela linhagem macrófágica J774 e por macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs).

2.2 Metas específicas

- Verificar a expressão de mRNA (RT-PCR em tempo real) dos diversos TLRs e de moléculas adaptadoras, como MyD88 e TRIF, em células J774 e em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs).
- Testar a funcionalidade destes receptores através da avaliação de resposta biológica após estimulação.
- Estimular os macrófagos com agonistas de TLRs e averiguar o impacto dos seus sobrenadantes na AICD do hibridoma DO11.10.
- Investigar a presença de PGE₂ ou de outros fatores solúveis produzidos pelos macrófagos estimulados com agonistas de TLRs, que poderiam modular o processo de AICD do hibridoma DO11.10.
- Analisar se há modulação da expressão gênica e protéica dos receptores de morte Fas, do TNF- α , do ligante FasL ou da molécula inibidora da AICD c-FLIP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células

Hibridoma DO11.10 derivado de linfócitos T CD4⁺ extraídos de camundongos Balb/c Tgn (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. Este hibridoma foi originalmente cedido pelo Dr. Douglas Green (La Jolla Institute for Allergy & Immunology, San Diego, CA).

Linhagem celular J774A1 (J774) de origem macrofágica, estabelecida a partir de uma ascite em camundongo Balb/c fêmea (Ralph *et al.*, 1976) foi obtida da ATCC (TIB-67)

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57Bl/6.

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 8 semanas de idade. As linhagens utilizadas foram BALB/c Tg (DO11.10) e C57Bl/6.

3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados para cultura de células, reações de PCR, para a extração de RNA e conversão para cDNA bem como os oligonucleotídeos foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Os *primers* utilizados para reações de Real-time PCR foram comprados na *Taqman*. Os anticorpos anti-F4.80 (FITC), anti-CD11b (PerCP), anti-CD19 (PE), anti-CD3 (Cy5), anti-CD19 (APC), anti-CD4 (APC.Cy7), anti-CD3 (FITC), anti-CD8 (Alexa-700) e anti-FasL (PE) utilizados para citometria de fluxo foram obtidos da BD PharMingen. Os anticorpos utilizados para marcação dos *western blots* anti-IkB α e anti-actina foram obtidos da Cell Signaling Technology e o anti-COX-2 foi adquirido da Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, EUA). O *kit* de ELISA para dosagem de PGE₂ e a Indometacina foram adquiridas da Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, EUA). Para a estimulação de cada receptor TLR utilizamos o seu principal agonista, como mostra o Quadro 1. A Flagelina de *Bacillus subtilis* foi gentilmente cedida pelo Dr. Luis Carlos Ferreira. Os outros agonistas foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ruslan Medzhitov, sendo o Pam₃CSK₄ e o Imiquimod da Invivogen, o LPS (lipopolissacarídeo) e o Poly(I:C) da Sigma e o CpG DNA da Universidade de Yale.

Quadro 1- TLRs e seus respectivos agonistas

Receptor	Agonista
TLR1/2	Triacil lipopeptídeo (Pam ₃ CSK ₄)
TLR3	dsRNA (Poly I:C)
TLR4	Lipopolissacarídeo E. Coli
TLR5	Flagelina
TLR7	Imiquimod
TLR9	CpG DNA

3.4 Cultivo de Células

O cultivo do hibridoma DO11.10 e da linhagem celular L929 foi feito em garrafas de 25 ou 75cm². A linhagem macrofágica J774 foi cultivada em placas

de cultura de 6 poços e os BMDMs foram cultivados em placas de 100 mm². O meio de cultura utilizado para estas células foi o RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2mM glutamina e antibiótico (100U/L penicilina + 100 µg/L estreptomicina). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. O repique foi realizado, em média, três vezes por semana.

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, 100U/L penicilina, 100 µg/L estreptomicina em placas de 100 mm², mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

O uso das células para experimentos foi condicionado ao mínimo de 95% de viabilidade verificada por exclusão a Azul de Tripán 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 Produção de sobrenadante de células L929

Para a derivação de células de medula óssea em macrófagos é necessária a adição de M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*). Desta forma, usamos o sobrenadante da linhagem celular L929, de origem fibroblástica, estabelecida a partir de tecidos conectivos subcutâneos em camundongo C3H/An, que produz altas concentrações de M-CSF. A linhagem celular L929 foi cultivada em garrafas de 175 cm², em meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 2mM glutamina e antibiótico (100U/L penicilina + 100µg/L estreptomicina). Quando se atingiu a confluência, o meio foi retirado e 100mL de meio novo foi adicionado. Após 7 dias o sobrenadante foi retirado, centrifugado a 10000g por 10 minutos e filtrado para remoção dos contaminantes celulares.

3.6 Obtenção de macrófagos derivados de células da medula óssea (BMDMs)

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 300g por 10 minutos, foram cultivadas por sete dias em placas de petri (não tratadas para cultura celular) na concentração de 4×10^5 células/ml em um volume total de 10 ml de meio RPMI suplementado contendo 30% do sobrenadante da cultura de células L929. No quarto dia, mais 10 ml do meio de cultura foi adicionado à placa de cultura. Após este período de incubação, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas à placa foram recolhidas. A confirmação foi feita por imunofenotipagem através de citometria de fluxo, como pode ser visto na Figura 3, sendo aproximadamente 95% das células isoladas $F4.80^+CD11b^+CD19^-CD3^-$.

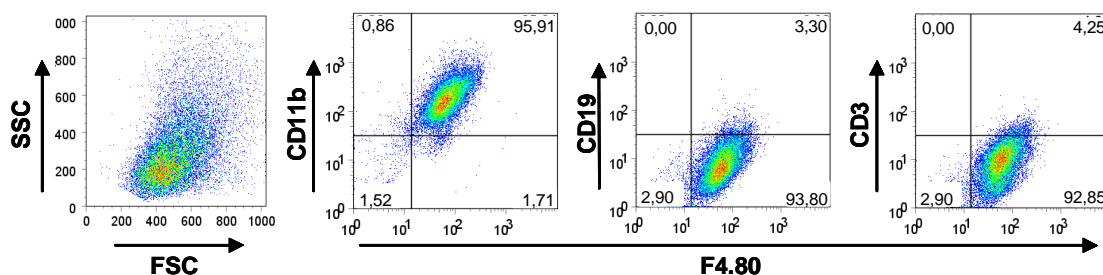


Figura 3. Caracterização fenotípica dos macrófagos derivados de medula óssea. 4×10^6 células extraídas da medula óssea do camundongo C57BL/6 foram incubadas com 30% de sobrenadante de cultura de L929 e após 7 dias de derivação celular foram analisadas por citometria de fluxo com anticorpos específicos para F4.80 (FITC), CD11b (PerCP), CD19 (PE) e CD3 (Cy5).

3.7 Tratamentos realizados durante a obtenção dos sobrenadantes dos macrófagos

Um milhão de macrófagos em um volume final de 1 mL foram adicionados por poço à placa de 24 poços. Após 24 horas de incubação em estufa, a cultura foi centrifugada a 700g por 5 minutos e os sobrenadantes

(livres de células), transferidos para novos tubos, que foram armazenados a -20°C até o uso.

Em diversos experimentos, os macrófagos foram submetidos a tratamentos, possivelmente alterando a composição do sobrenadante. Todos os estímulos foram ministrados durante 24 horas de produção de sobrenadante. Os estímulos utilizados foram Pam₃CSK₄ (5, 1, 0,2µg/mL), Poly(I:C) (5, 1, 0,2µg/mL), LPS (1, 0,2, 0,04µg/mL), Flagelina (3, 1, 0,3µg/mL), Imiquimod (10, 2, 0,4µg/mL) ou CpG DNA (10, 2, 0,4µM). Para inibição da via do metabolismo do ácido aracdônico foi utilizada Indometacina (10µg/mL; inibidor de Cox-1 e Cox-2)

3.8 Obtenção de linfócitos T primários

Baços de camundongos Balb/c Tg DO11.10 foram removidos e por esmerilhagem com lâminas foscas, as células foram liberadas de 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 três vezes, contadas e plaqueadas de acordo com o protocolo envolvido.

3.9 Geração de blastos de linfócitos T CD4⁺

Para a geração de blastos de linfócitos T, 6x10⁶ células foram plaqueadas em poços de placa de 12 na presença de 5µg/ml de concanavalina A (ConA) em volume final de 2 ml/poço. Após 48 horas as células foram lavadas para retirada do ConA e replaqueadas na presença de 250U/ml de IL-2 recombinante em volume final de 2 ml. Após 48 horas mais 250U/ml de IL-2 foram adicionados às células e cultivadas por mais quatro dias. Na sequência, as células mortas e debris celulares foram eliminados por gradiente de Ficoll-Hypaque (GE HealthCare), lavadas três vezes, contadas e plaqueadas conforme os protocolos envolvidos. Por fenotipagem via citometria de fluxo

utilizando anticorpos anti-CD19, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 confirmou-se que mais de 95% das células eram CD3⁺CD4⁺.

3.10 Estimulação dos linfócitos T com anticorpo anti-CD3 (Indução de AICD)

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 foi necessário primeiramente imobilizá-lo na placa de cultura. Para tanto, o anticorpo foi diluído em tampão Tris 50mM pH9,0 na concentração de 1µg/mL e 100µl desta solução foram plaqueados em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo reto. A placa foi incubada em estufa à 37 °C por duas horas ou à 4 °C por 18 horas e, em seguida, o líquido da placa foi retirado, lavando uma vez com o tampão correspondente. Após este procedimento, 1,5x10⁵ células DO11.10 ou 3x10⁵ linfócito T primários foram plaqueados num volume final de 100µl e incubados a 37 °C e 5% de CO₂ pelos períodos desejados.

3.11 Ensaios com linfócitos T utilizando diferentes sobrenadantes

Os linfócitos T foram submetidos a diversos tratamentos em combinação ou não com o estímulo por anti-CD3. Os ensaios foram realizados sempre em triplicatas em placas de 96 poços com 1,5x10⁵ células DO11.10 ou 3x10⁵ linfócitos T primários. Os compostos utilizados foram sobrenadantes obtidos de J774 e BMDM estimulados com ou não com diversos agonistas de TLRs na presença ou ausência de Indometacina, que corresponderam à 90% do volume de cada poço.

3.12 Análise de apoptose via fragmentação de DNA

Após 16 horas de estímulo com anti-CD3, o conteúdo de cada poço, derivado dos tratamentos realizados, foi centrifugado a 240g por 5min a 4 °C. O precipitado foi ressuscitado em 300µl de tampão hipotônico HFS (*Hypotonic Fluorescent Solution*), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 50µg/ml de iodeto de propídeo (PI). As células foram analisadas imediatamente por citometria de fluxo num citômetro FacScalibur (Beckton & Dickinson). O conteúdo de DNA produz um perfil gráfico dependente da fase do ciclo celular em que estas se encontram. Foram considerados eventos apoptóticos os núcleos hipodiplóides, que no gráfico aparecem à esquerda do pico G0-G1. Foram analisados, por replicata, 5000 eventos. Foi feito um *gate* utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) para a exclusão dos *debris*.

3.13 Quantificação da externalização de resíduos de fosfatidilserina

Para quantificação dos resíduos de fosfatidilserina realizamos a marcação das células com Anexina V-FITC. Após 12 horas de estímulo com anti-CD3, o conteúdo de cada poço, derivado dos tratamentos realizados, foi centrifugado a 240g por 5min a 4 °C. O precipitado foi lavado uma vez em tampão HEPES (10 mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂ e 1,8mM CaCl₂). Em seguida, as células foram ressuscitadas em 100µL de tampão HEPES, contendo quantidade apropriada de anexina V-FITC, e incubadas por 20min no escuro em temperatura ambiente. Adicionou-se, posteriormente, 350µl de tampão HEPES e 50 µl de uma solução de iodeto de propídeo a 100 µg/ml em tampão HEPES. A análise por citometria de fluxo foi realizada imediatamente.

3.14 Eletroforese de Proteínas e *Western-blot*

Para obtenção das amostras, utilizamos o extrato protéico obtido de 1×10^6 células. As células foram centrifugadas 240g por 5min a 4 °C e ressuspendidas em 100µl de tampão de amostra contendo SDS-*Sodium Dodecyl Sulphate* (50 mM Tris-HCL, pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de 2-mercaptoetanol). Na seqüência, foram aquecidas a 100 °C por 5min e rapidamente resfriadas em gelo. O estoque destas amostras foi mantido a -20° C e foram aplicados 20µl da amostra por poço do gel. A análise das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida redutor na concentração de 12%. 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. Enquanto as amostras estavam no gel de empacotamento a voltagem aplicada foi de 80V, sendo que quando as amostras passaram para o gel de corrida, aumentou-se a voltagem para 100V. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de 0,45µm de PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) com auxílio do sistema da Bio-Rad de 4 horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 3 h em temperatura ambiente com uma solução de bloqueio para impedir marcações inespecíficas dos anticorpos à membrana. Para a marcação dos anticorpos utilizados no decorrer do projeto, o bloqueio foi feito com uma solução de 5% BSA (*Bovine Serum Albumin*) em TBS-Tween, 0,1% Azida. A marcação das membranas com os anticorpos foi feita durante 18 horas com anticorpo primário desejado a 4 °C. Após esse processo a membrana foi lavada 3 vezes em TBS Tween e incubada por 1 hora no anticorpo secundário conjugado à peroxidase apropriado à temperatura ambiente. Após essa marcação a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS Tween. A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência ECL (Amersham) e subsequente exposição a um filme auto-radiográfico (Kodak co.). O tempo de exposição das membranas ao filme dependeu da intensidade da marcação e variou de 10 segundos a 10 minutos.

3.15 Detecção de micoplasma por RT-PCR

Um milhão de células foram centrifugadas a 18000g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensado em 100µl de PBS. Centrifugou-se novamente a 18000g por 5 min (repetiu-se este passo 2 vezes), adicionou-se ao precipitado restante 20µl de PBS e incubou-se a 100° C, por 10 min, em bloco térmico. Em seguida, as células foram centrifugadas a 18000g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e estocado a -20 °C para posterior uso.

O par de oligonucleotídeos utilizados para a detecção do rRNA 16S, que encontra-se discriminado no Quadro 2, foi desenhado a partir de uma sequência bastante conservada e cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Rui Curi.

Quadro 2- Seqüência do par de oligonucleotídeos utilizados para detecção de micoplasma.

Fragmento	Primer Foward	Primer Reverse	Produto
rRNA 16S	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	270pb

Sendo assim, a reação permitiu amplificar o DNA das espécies mais comuns de micoplasma. Cada reação foi composta por 2,5µl de tampão de PCR 10X, 0,5µl de dNTP “mix” 10mM, 0,75µl de MgCl₂ 50mM, 0,4µl de cada *primer* (15pmoles/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase, 0,5µl de DNA (amostra) e 25µl de H₂O DNase, RNase-free, totalizando um volume final de 29,75µl. O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 94 °C/45s + 40 ciclos (94 °C/30s, 5 °C /30s, 72 °C/30s) + 72 °C/300s. O produto resultante da reação de PCR é um fragmento de 270pb.

Como demonstrado na Figura 4, a linhagem celular L929, cujo sobrenadante é utilizado para a geração de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), bem como os próprios BMDM e a linhagem celular macrofágica J774, foram certificados como livres da contaminação por *micoplasma sp.* Como controle positivo da reação foi utilizada a linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda, THP1

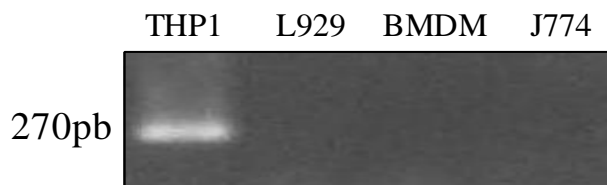


Figura 4. Análise da presença de micoplasma sp nas linhagens celulares L929, J774 e em BMDM. Um milhão de células foram lavadas com PBS e incubadas a 100°C, por 10 minutos, em bloco térmico. Em seguida, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado na reação da RT-PCR. A linhagem celular THP1 foi utilizada como controle positivo da reação. Em cada poço do gel de agarose foram aplicados 10µl do produto da reação da RT-PCR.

3.16 Extração de RNA

Três milhões de células foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a 420g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 0,5ml de TRISOL agitando em vortex lento. Após 10min de incubação em temperatura ambiente adicionou-se 100µl de clorofórmio, seguido de nova incubação por 3 min. Centrifugou-se a 12.000g por 15min a 4 °C separando-se a solução em fases aquosa e orgânica. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo. Foi então adicionado 1 volume de isopropanol (0,25ml) seguido por uma incubação a temperatura ambiente por 1 hora. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500µl de Etanol 75% e centrifugou-se a 7500g por 5min a 4 °C. O precipitado foi seco e ressuspensão em 20µl de H₂O destilada, livre de DNase e RNase. Para avaliar a integridade do RNA, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, coradas em brometo de etídeo e visualizadas através de um transiluminador de UV. Em amostras de RNA íntegro foi possível visualizar duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18S e 28S. A quantificação e análise da pureza foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro (NanoDrop 1000) com comprimento de onda de 260/280nm.

3.17 Síntese de cDNA

Três microgramas de RNA foram diluídos em 11µl de H₂O destilada livre de DNases e RNases. Adicionou-se 1µl de 500µg/ml de oligo dT e 1µl de dNTP 10mM seguido de aquecimento a 65°C por 5min e rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se 6µl do mix Superscript (4µl de Tampão 5x; 1µl de DTT 0,1M e 1,0µl Superscript III 200U/µl) e incubou-se a 50 °C por 50min. A enzima foi inativada incubando-se a 70 °C por 15min seguidos por 5min a 4 °C. Para avaliar a integridade do cDNA foi realizada reação de RT-PCR para o gene da β-actina. A reação foi composta por 5µl de tampão 10X, 1µl de 10mM DNTPs, 1,5µl de MgCl₂, 1µl de cada primer (15pmoles/µl), 0,5µl de Taq DNA polimerase e 2µl da amostra de cDNA, em um volume final de 50µl. O ciclo de amplificação utilizado foi: 95 °C/300s + 23(95 °C/45s, 68 °C /60s, 72 °C/45s) + 72 °C/120s. As amostras resultantes foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, coradas em brometo de etídeo 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. A sequência dos primers utilizados para a amplificação do gene da β-actina encontra-se discriminada no Quadro 3.

Quadro 3- Seqüência do par de oligonucleotídeos utilizados para detecção de β-actina.

Fragmento	Primer Foward	Primer Reverse	Produto
β-actina	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	349pb

3.18 RT-PCR em tempo real (qPCR)

A reação de qPCR avalia o acúmulo do produto da reação de amplificação em sua fase logarítmica, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação. Para as reações de qPCR foi utilizado o kit Taqman (Applied Biosystem).

Além dos primers específicos para o gene de interesse, a tecnologia Taqman inclui uma sonda, que é uma seqüência de DNA específica e

complementar ao gene de interesse. Esta sonda possui em uma das pontas um fluoróforo (R – repórter) e na outra um quencher (Q), que absorve a fluorescência do repórter (R), impedindo a emissão de luz (Figura 5). Com a atividade da Taq polymerase balizada pelos primers, há a degradação da sonda ligada ao gene, separando o fluoróforo do quencher, que agora é incapaz de absorver a fluorescência daquele. A luz emitida é quantificada por um programa de computador específico, e é proporcional ao número de cópias sendo amplificadas.

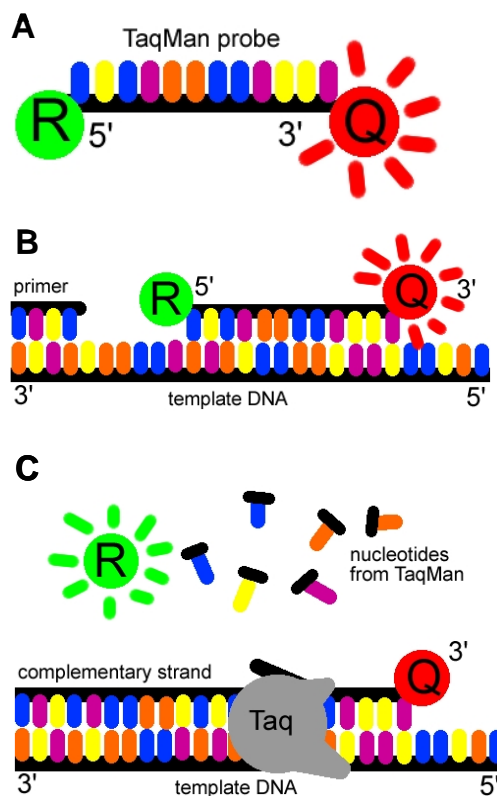


Figura 5. Ilustração do mecanismo do RT-PCR em tempo real. (A) Sonda TaqMan. Em verde está o *reporter* (R) e em vermelho o *quencher* (Q). (B) Após a etapa de desnaturação, a sonda Taqman encontra a seqüência de DNA específica e se liga juntamente com o primer a ela. (C) Quando a *Taq* polymerase adiciona os nucleotídeos, o R é separado do Q e emite fluorescência. Fonte: www.bio.davidson.edu/.../Pierce/realtimepcr.htm

Cada reação foi composta por 6 μ L de master mix, 3,4 μ L de H₂O destilada livre de RNase e DNase, 0,6 μ L da sonda TaqMan e 2 μ L da amostra de cDNA diluída 10 vezes. O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 50 °C/2min + 95 °C/10min + 50(95 °C/15s, 60 °C/1min). O número de catálogo de cada *primer/sonda* está especificado no Quadro 4.

Quadro 4- Número de catálogo dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR (Taqman)

Fragmento Gênico	Nº de Catálogo
TLR1	Mm00446095_m1
TLR2	Mm00442346_m1
TLR3	Mm01207404_m1
TLR4	Mm00445274_m1
TLR5	Mm00546288_s1
TLR6	Mm02529782_s1
TLR7	Mm00446590_m1
TLR8	Mm01157262_m1
TLR9	Mm00446193_m1
TLR11	Mm01701924_s1
FasL	Mm00438854_m1
Fas	Mm01204974_m1
FLIP	Mm01255578_m1
TNF	Mm99999068_m1
GAPDH	Mm99999915_g1

3.19 Cálculo da expressão gênica relativa

Duas análises podem ser utilizadas para quantificar a expressão gênica, a quantificação absoluta e quantificação relativa. Os métodos de comparação de Ct (quantificação relativa) foram utilizados neste trabalho para comparar a expressão relativa dos genes estudados. Para os cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi levado em consideração que durante a reação de qPCR, a fluorescência aumenta a cada ciclo e atinge um limiar (“threshold”) no qual as amostras podem ser comparadas. Quanto maior o número inicial de fitas molde, mais cedo a fluorescência poderá ser observada. O valor de “threshold cycle” (Ct) de cada amostra, obtido na fase exponencial da reação, foi analisado para os genes de interesse assim como para um controle interno com expressão que não

apresente variação frente aos estímulos (*housekeeping*), no caso o *gapdh*. A diferença entre os valores dos Ct (ΔCt) foi calculada para cada gene e a normalização foi realizada subtraindo-se o valor de Ct do *gapdh* do valor do Ct do gene em questão. O $\Delta\Delta Ct$ foi obtido subtraindo-se o valor de ΔCt da amostra controle do valor de ΔCt das outras amostras. Finalmente o valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é calculado para a obtenção da relação entre cada célula e sua respectiva amostra de referência. Esse valor representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído (Livak *et al.*, 2001).

3.20 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um *software* computacional chamado *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 3.02. 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 $p < 0,05$ à $p < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão basal dos TLRs em macrófagos

Dentre os objetivos específicos do presente projeto de pesquisa, estava a avaliação da expressão basal de TLR nos macrófagos escolhidos para o estudo (a linhagem macrofágica J774 e macrófagos derivados de medula óssea – BMDMs) e a análise comparativa da expressão dos diferentes TLRs nestas células. Para tanto, optamos por iniciar o trabalho avaliando os níveis de mRNA de cada TLR, utilizando uma técnica bastante sensível de detecção, o PCR em tempo real (qPCR), com a utilização de *primers* e sondas Taqman.

A reação de qPCR para cada gene foi realizada utilizando-se cDNA dos macrófagos não estimulados, nos fornecendo assim, a expressão basal de cada gene. Para calcular a expressão de cada receptor, utilizamos como calibrador o gene do TLR4 (expressão = 1) e os valores obtidos para os outros TLRs foram relativos ao mesmo. Nestas condições, a linhagem J774 apresentou a expressão de todos TLRs, com exceção do TLR11. A expressão deste gene ficou abaixo dos limites detectáveis em ambos os macrófagos utilizados. Dentre os TLRs expressos na J774, o TLR2 foi o receptor que apresentou maior expressão, seguido do TLR7 e dos TLRs 1, 3, 4, 5 e 6 que não apresentaram diferença estatística de expressão. O TLR8 e TLR9 foram os menos expressos nesta linhagem celular (Figura 6A). O perfil de expressão gênica destes receptores obtido em BMDMs foi bastante diferente do adquirido com a linhagem celular J774. O TLR mais expresso em BMDMs é o TLR7, seguido dos TLRs1, 2, 4, 6 e 8 que são estatisticamente semelhantes. O TLR3 e TLR5 apresentaram menor expressão nestes macrófagos (Figura 6B).

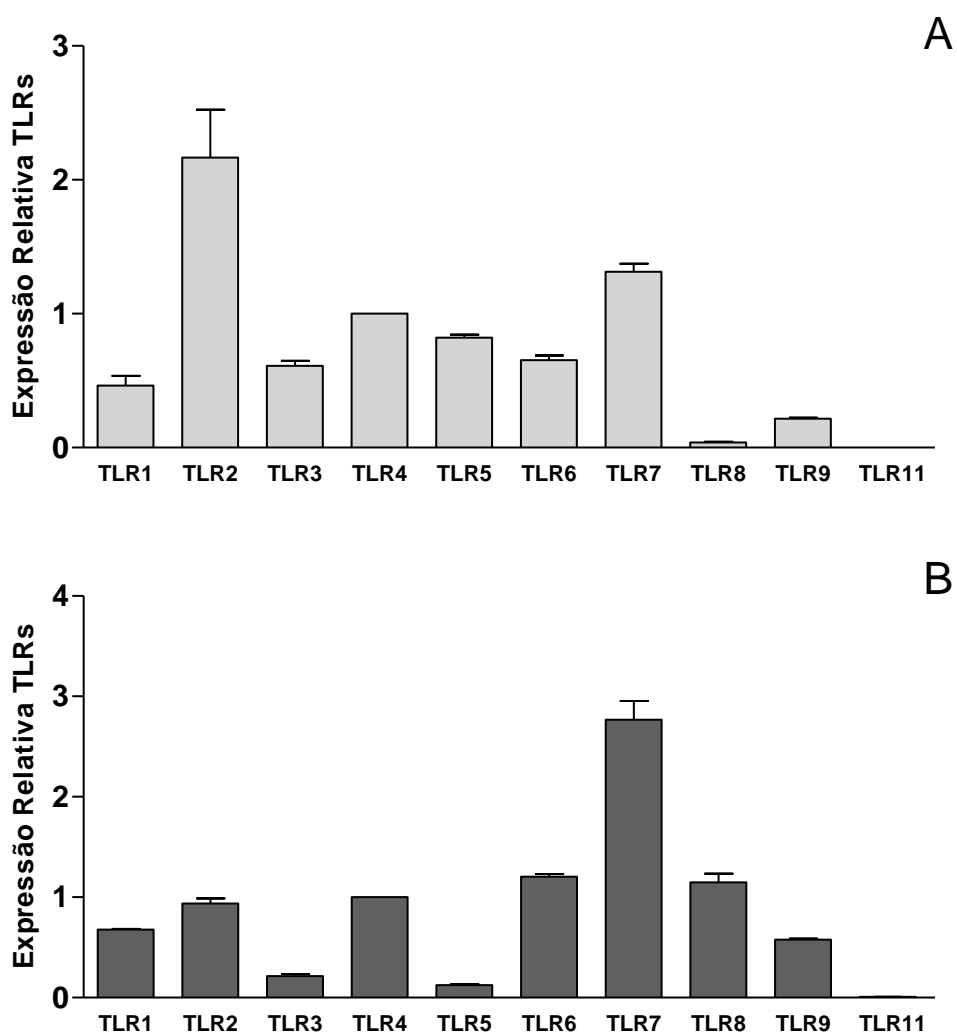


Figura 6. Expressão basal de TLRs na linhagem macrófágica J774 (A) e em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) (B). Dois milhões de células foram lisadas em trizol para obtenção do RNA, convertidas em cDNA através do uso de Superscript III e posteriormente analisadas por qPCR. A condição de amplificação foi a mesma para todos os genes uma vez que utilizamos *primers* Taqman. Para calcular a expressão basal de TLR nas linhagens celulares utilizamos como calibrador o gene do TLR4 e os valores obtidos para os outros TLRs são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle interno de reação foi utilizado o gene *gapdh*. As barras representam a média de três experimentos.

4.2 Comparação da expressão relativa dos TLRs entre J774 e BMDM

Uma vez que sabíamos a diferença de expressão relativa dos TLRs dentro de uma mesma célula, resolvemos montar um painel de expressão de cada TLR entre as duas células utilizadas (linhagens macrófágicas J774 e BMDMs) (Figura 7).

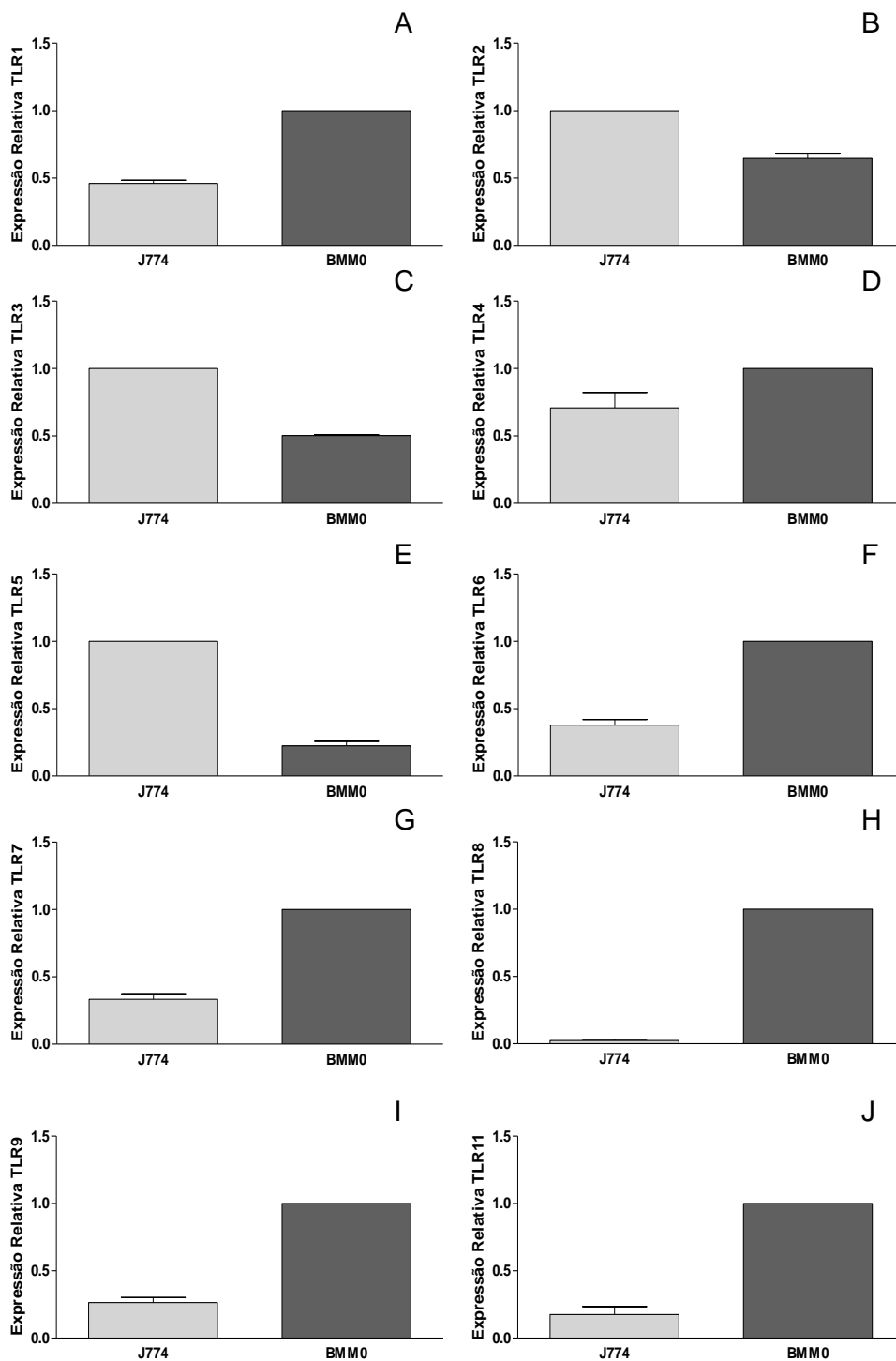


Figura 7. Comparação da expressão TLRs em J774 e BMDM. Dois milhões de células foram lisadas em trizol para obtenção do RNA, convertidas em cDNA através do uso de Superscript III e posteriormente analisadas por qPCR. A condição de amplificação foi a mesma para todos os genes uma vez que utilizamos *primers* Taqman. Para comparar a expressão de cada TLR entre os macrófagos, utilizamos como calibrador a célula que apresentou maior expressão daquele TLR. Para TLR1, 4, 6, 7, 8, 9, e 11 utilizamos como calibrador o BMDM e para TLR2, 3 e 5 utilizamos J774. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle interno de reação foi utilizado o gene *gapdh*. As barras representam a média de três experimentos.

Para calcular a expressão destes receptores utilizamos como calibrador a célula com maior Ct (*Cycle Threshold*) para cada TLR (expressão = 1) e o valor obtido para a outra célula é relativo ao mesmo. Como controle interno da reação foi utilizado o gene “*houseKeeping*” *gapdh*. Nesta análise observamos que os TLRs 2, 3 e 5 são mais expressos na linhagem celular J774, enquanto que os TLRs 1, 4, 6, 7, 8, 9 e 11 têm sua maior expressão nos BMDM (Figura 7).

4.3 Agonistas de TLR e ativação de NF-κB

Após avaliarmos a expressão dos TLRs, mensurada pela expressão de seus mRNA nos macrófagos, o passo seguinte foi verificar se a tradução das proteínas igualmente estaria ocorrendo e se essa expressão seria funcional. Sendo assim, resolvemos verificar se a estimulação dos macrófagos com agonistas de TLRs resultaria em uma resposta biológica dessas células. Uma vez que todas as vias de sinalização relacionadas aos TLRs culminam na ativação de NF-κB (*Nuclear factor kappa enhancer binding protein*) (Kawai e Akira, 2007), optamos por analisar sua ativação por *western blot* através da marcação da proteína IκBα frente ao estímulo das células com os diversos agonistas de TLR. A diminuição da banda referente ao IκBα indica a degradação dessa proteína e liberação do NF-κB com conseqüente migração desse fator de transcrição para o núcleo da célula, onde ativará uma série de genes envolvidos na resposta inflamatória do hospedeiro (Rasmussen *et al.*, 2009). Para tanto, a linhagem macrofágica J774 e BMDMs, foram estimuladas com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS, Flagelina, Imiquimod ou CpG DNA, agonistas de TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 respectivamente, por diferentes intervalos de tempo e o desaparecimento da banda correspondente à IκBα foi observado.

Corroborando o que é descrito na literatura, a estimulação de todos TLRs com seus respectivos ligantes, tanto em J774 (Figura 8A), quanto em BMDM (Figura 8B), foi capaz de induzir ativação de NF-κB, após até 30 minutos de incubação das células com os agonistas.

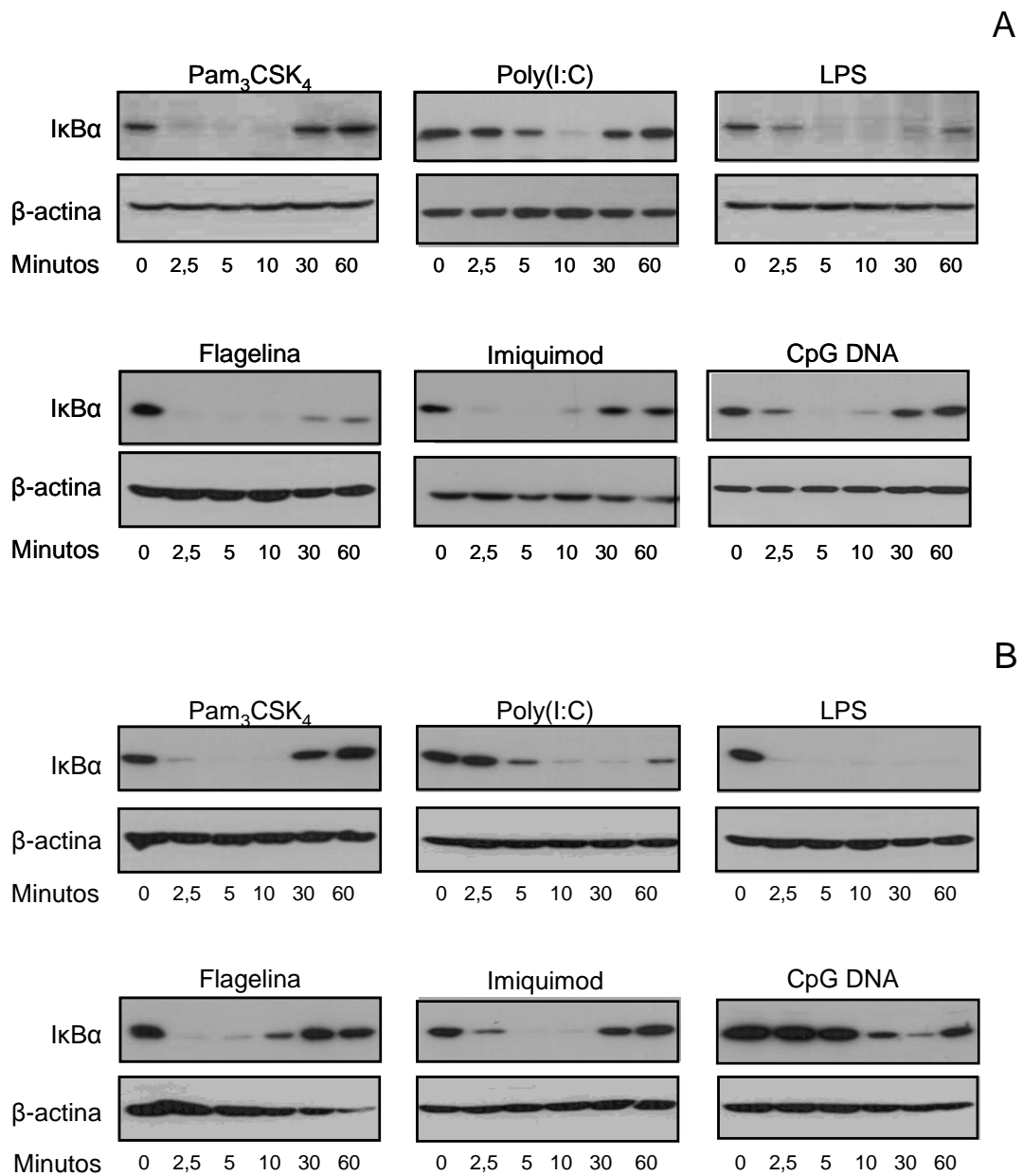


Figura 8. Ativação de *NF-κB* em *J774* e *BMDMs* estimuladas com agonistas de *TLRs*. Um milhão de macrófagos *J774* (A) ou *BMDM* (B) foram estimulados com Pam₃CSK₄ (5µg/mL), Poly(I:C) (10µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (3µg/mL), Imiquimod (10µg/mL) ou CpG DNA (10µM) durante os minutos indicados. Em cada tempo 1x10⁶ células foram coletadas, lisadas e analisadas por *western Blot* utilizando-se anticorpo específico para a forma total e fosforilada de IκBα (45 KDa) e anticorpo anti-β-actina (41 KDa) como controle da quantidade de proteína carregada no gel. Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.4 Efeito dos agonistas de TLRs sobre J774 e BMDM

Uma vez que o modelo de indução de AICD já estava padronizado em nosso laboratório, foi dado início à próxima etapa, que consistia em estudar o efeito dos sobrenadantes dos macrófagos e, portanto, a influência de moléculas solúveis produzidas e liberadas por estas células, sobre a AICD de linfócitos T. Porém, para estudar a ação destes sobrenadantes, primeiramente era necessário saber se os estímulos não teriam efeito citotóxico sobre os macrófagos, levando-os à morte. Para isso, um milhão de células (J774 e BMMO), foram incubadas durante 24h com diferentes concentrações de cada agonista de TLR e analisadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem de apoptose (núcleos hipodiplóides).

Pudemos constatar que nenhum dos tratamentos, independente da dose utilizada, foi capaz de induzir uma porcentagem estatisticamente significativa de morte na linhagem J774 (Figura 9A) ou BMDM (Figura 9B). Uma vez que foi comprovado que o número e a viabilidade das células foram mantidos, foi possível dar continuidade aos experimentos, garantindo que a quantidade de células secretando as diversas substâncias seria o mesmo sob qualquer tipo de estímulo.

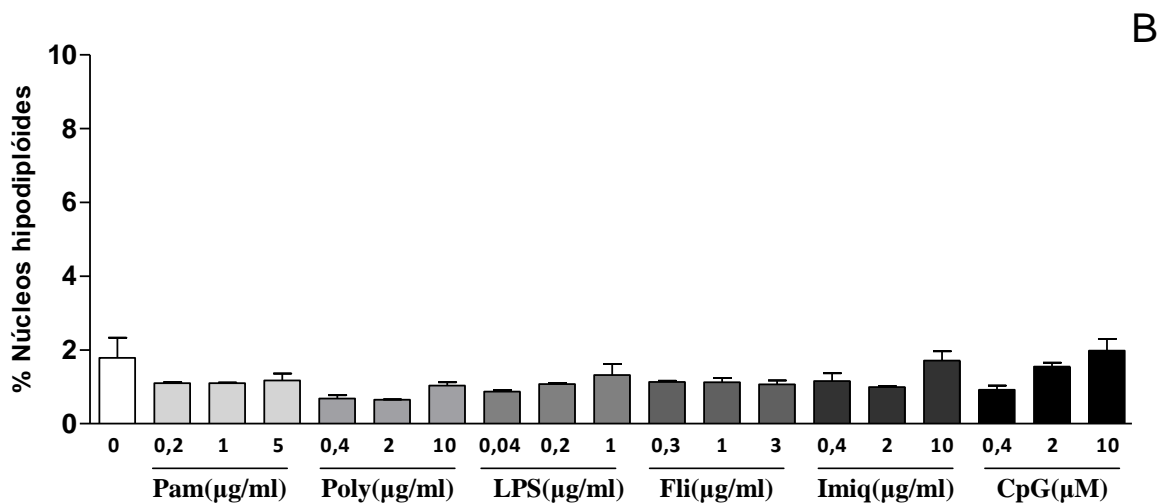
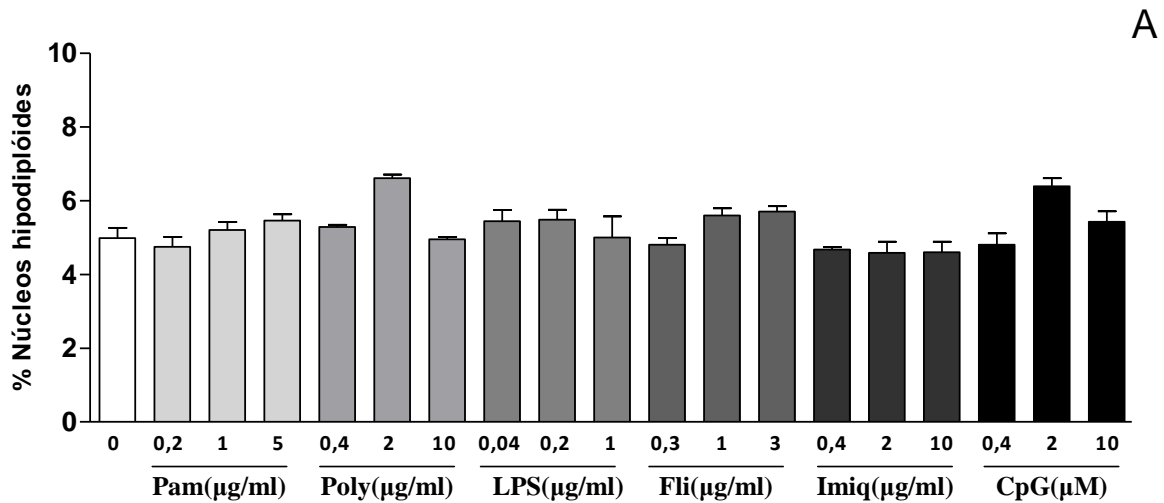
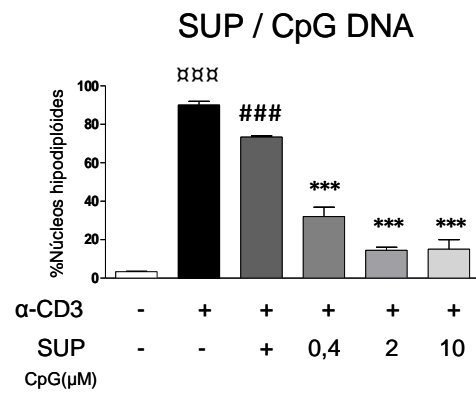
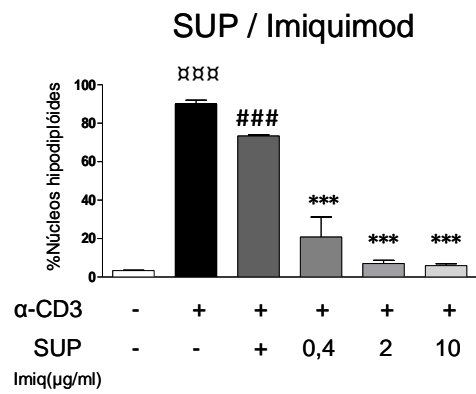
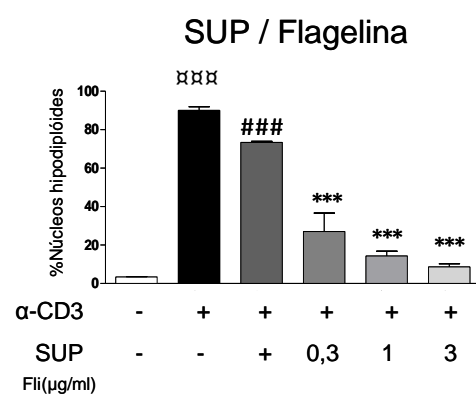
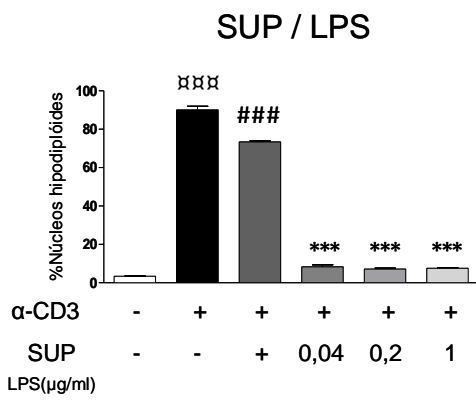
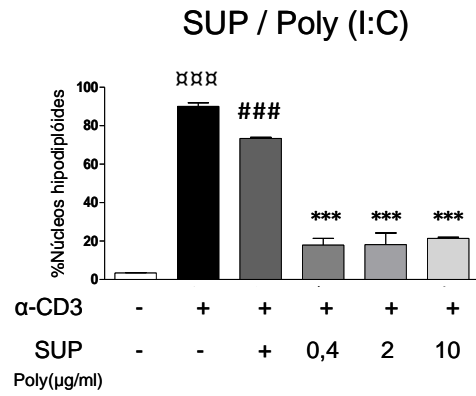
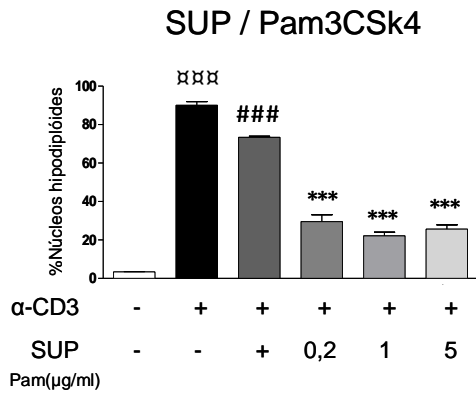


Figura 9. Efeito dos agonistas de TLRs em J774 e BMDM. Um milhão de macrófagos J774 (A) e BMDM (B) foram estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (Pam), Poly(I:C), LPS, Flagelina (Fli), Imiquimod (Imiq) ou CpG DNA nas concentrações indicadas em placas de 24 poços durante 24h. A porcentagem de células mortas foi analisada através de citometria de fluxo por fragmentação de DNA (HFS). As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento. Nenhum resultado estatístico foi encontrado (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.5 Efeito dos sobrenadantes de macrófagos em hibridomas de linfócitos T DO11.10

Uma vez comprovado que os estímulos não induziam J774 e BMDM à morte, foi possível gerar sobrenadantes destas células. Para isso os macrófagos foram mantidos em cultura em placa de 24 poços durante 24h e estimulados com 3 concentrações de cada agonista: Pam₃CSK₄ (0,2, 1 e 5µg/mL), Poly(I:C) (0,1, 5 e 10µg/mL), LPS (0,04, 0,2 e 1µg/mL), Flagelina (0,3, 1 e 3µg/mL), Imiquimod (0,4, 2 e 10µg/mL) ou CpG DNA (0,4, 2 e 10µM). O hibridoma de linfócito T DO11.10 foi incubado com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa, mimetizando o processo de AICD. Ao hibridoma foram adicionados os sobrenadantes na concentração de 90% e a taxa de apoptose foi analisada (Figuras 10 e 11). Para garantir a consistência dos resultados, a análise da morte foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se duas abordagens diferentes (Kroemer *et al.*, 2009): A incorporação de iodeto de propídeo (PI) em tampão HFS, metodologia utilizada no experimento anterior, que nos forneceu a porcentagem de células hipodiplóides, pois apresentaram parte de seu material gênico fragmentado. A fragmentação do DNA é uma característica de células apoptóticas, uma vez que é dependente da ação de DNAses ativadas pelas caspases efetoras. Foram considerados eventos apoptóticos os núcleos hipodiplóides, que no gráfico apareceram à esquerda do pico G0-G1. Por outro lado, a marcação das células com Anexina V-FITC nos permitiu quantificar a externalização de resíduos de fosfatidilserina que foram expostos quando a célula entrou em apoptose. Como controle de que os sobrenadantes gerados pelos macrófagos não seriam tóxicos às células DO11.10, os sobrenadantes estimulados com a maior dose de cada agonista foram adicionados às culturas do hibridoma de linfócito T, sem o estímulo destas com anti-CD3, e a apoptose foi analisada por incorporação de iodeto de propídeo (PI) em tampão HFS (Figura 12).

A



Continua

Conclusão

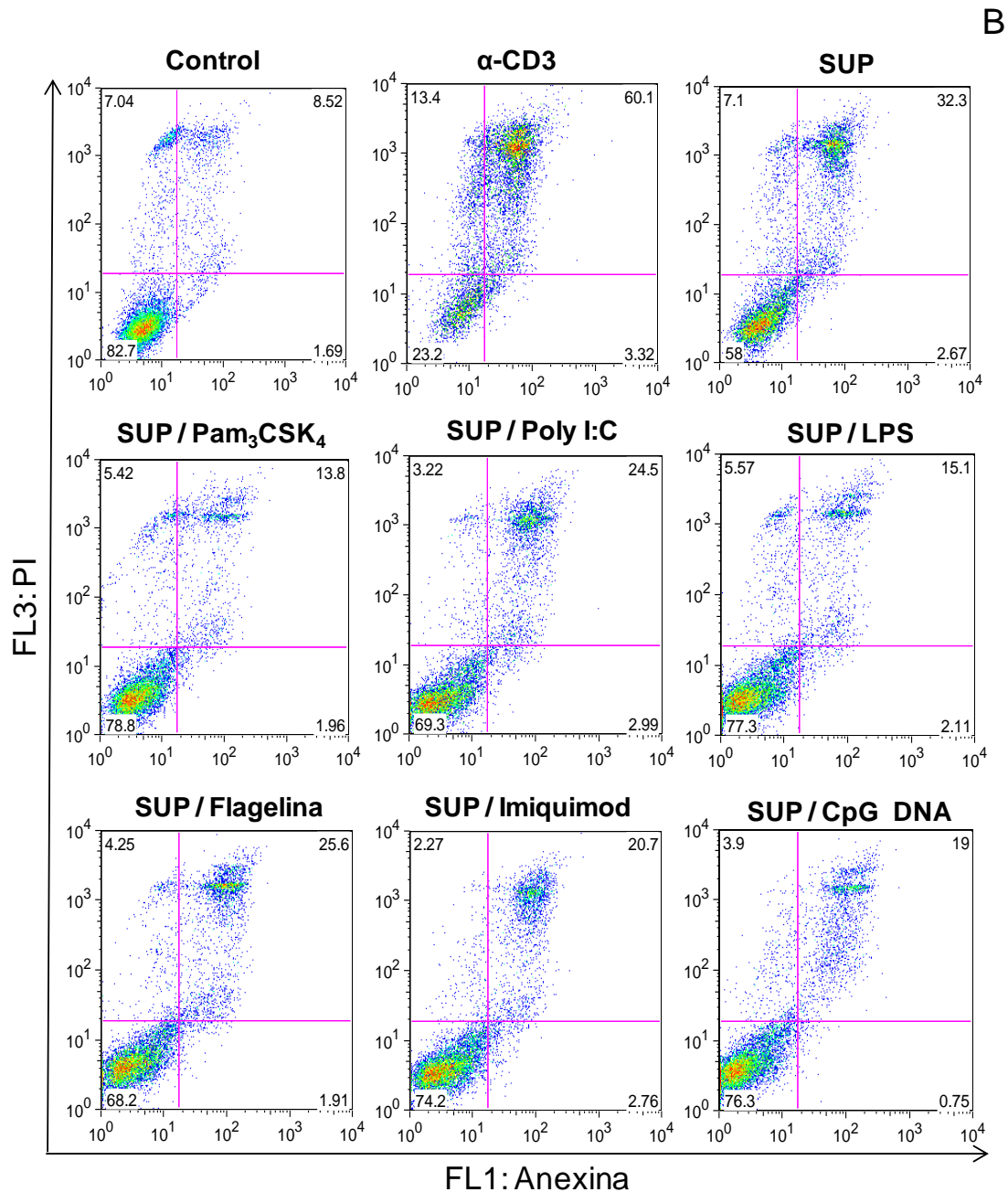
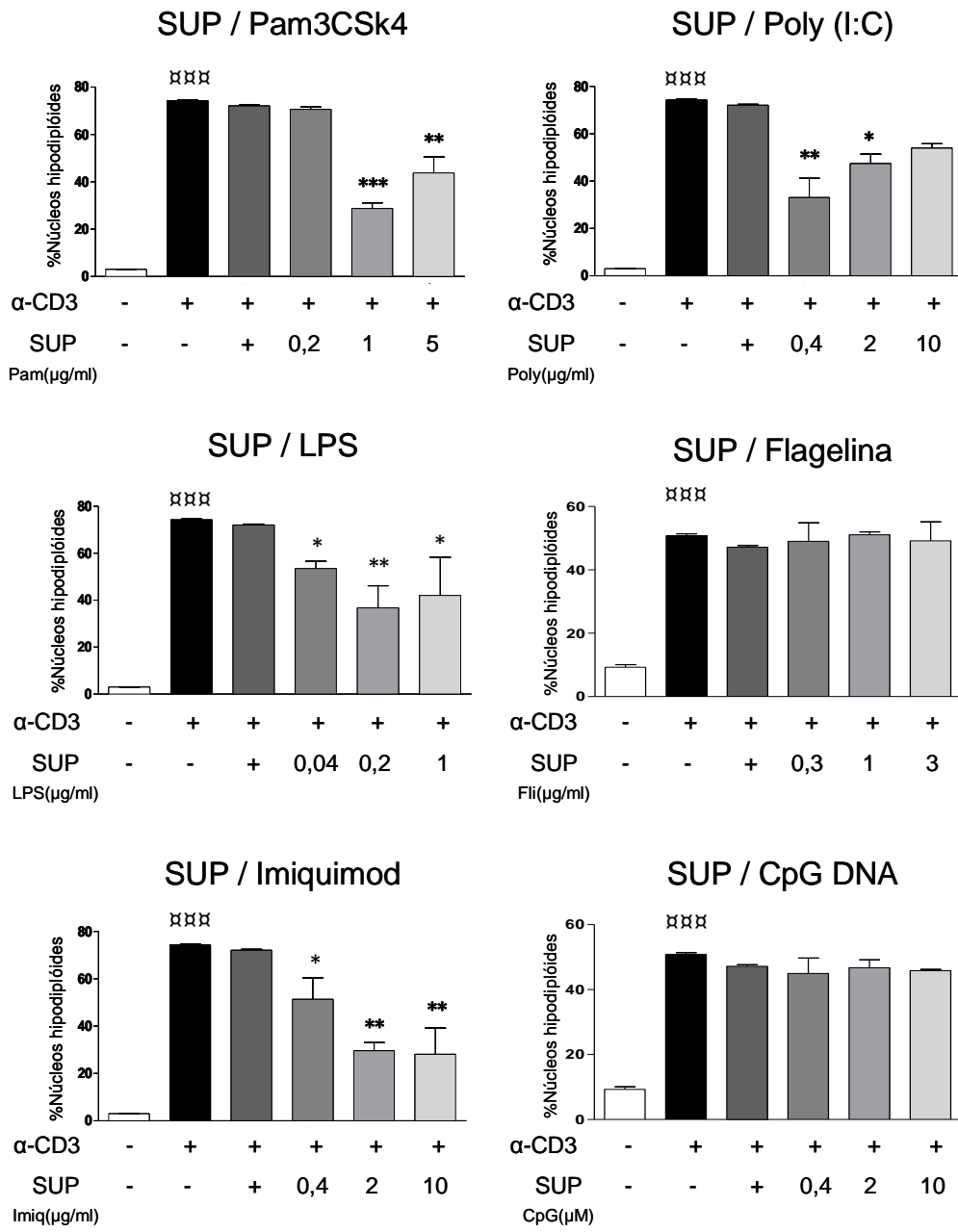


Figura 10. Ação dos sobrenadantes de cultura de J774 na AICD do hibridoma DO11.10. Cento e cinquenta mil células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 aderidos em placa na presença de diferentes sobrenadantes (SUP) e a porcentagem de células mortas foi analisada através de citometria de fluxo. Os SUPs foram obtidos após a cultura por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (Pam), Poly(I:C), LPS, Flagelina (Fli), Imiquimod (Imiq) ou CpG DNA, em placas de 24 poços. (A) Após 16 horas de incubação a morte foi avaliada por fragmentação de DNA (HFS). (B) Após 12 horas de incubação a morte foi avaliada por marcação com anexina V/PI. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios padrão. (#): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3. (*): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3 + SUP. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de três experimentos independ

A



Continua

Conclusão

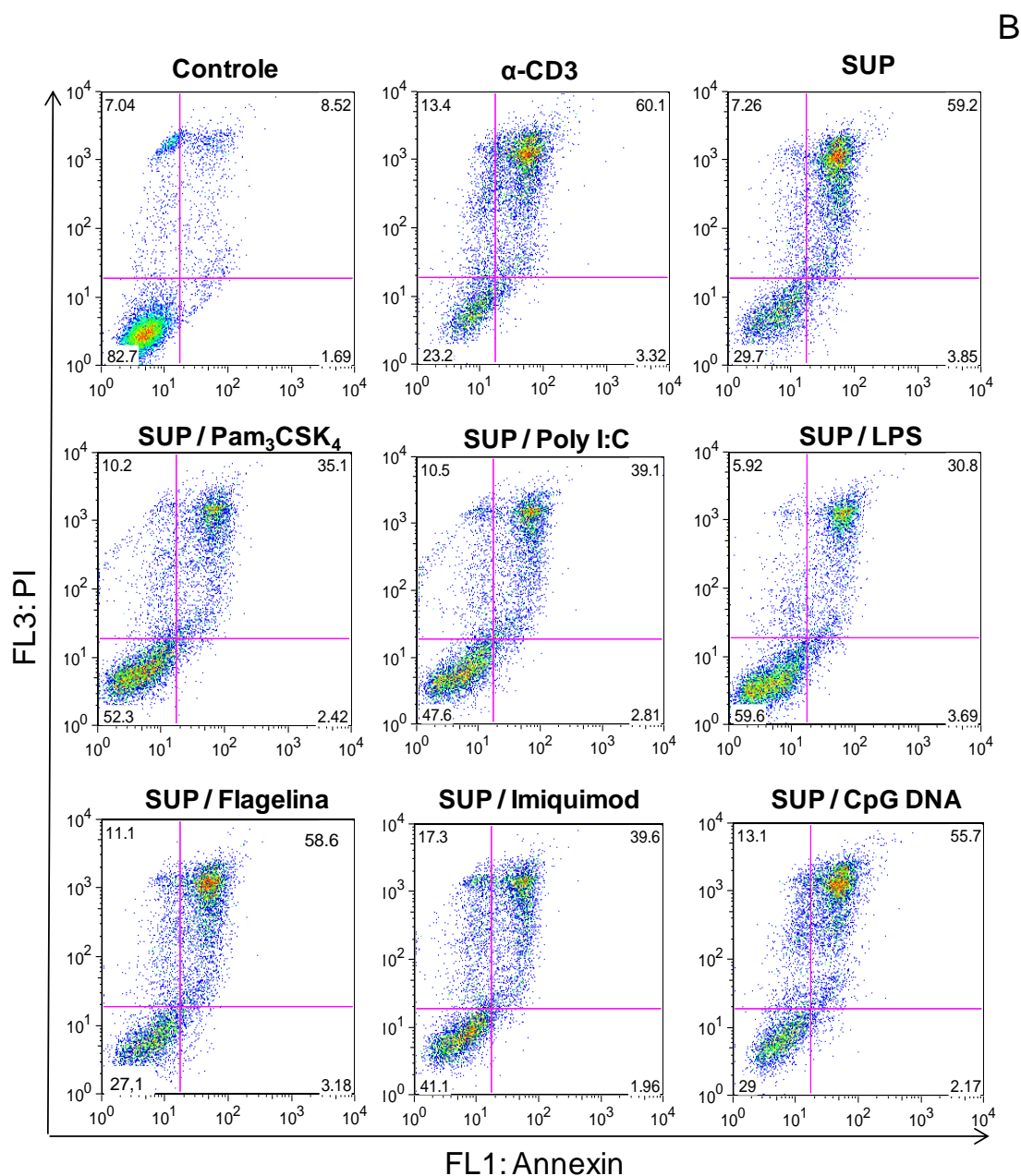


Figura 11. Ação dos sobrenadantes de cultura de BMDM na AICD do hibridoma DO11.10. Cento e cinquenta mil células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 aderidos em placa na presença de diferentes sobrenadantes (SUP) e a porcentagem de células mortas foi analisada através de citometria de fluxo. Os SUPs foram obtidos após a cultura por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (Pam), Poly(I:C), LPS, Flagelina (Fli), Imiquimod (Imiq) ou CpG DNA, em placas de 24 poços. (A) Após 16 horas de incubação a morte foi avaliada por fragmentação de DNA (HFS). (B) Após 12 horas de incubação a morte foi avaliada por marcação com anexina V/PI. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios padrão. (#): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3. (*): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3 + SUP. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de três experimentos independentes

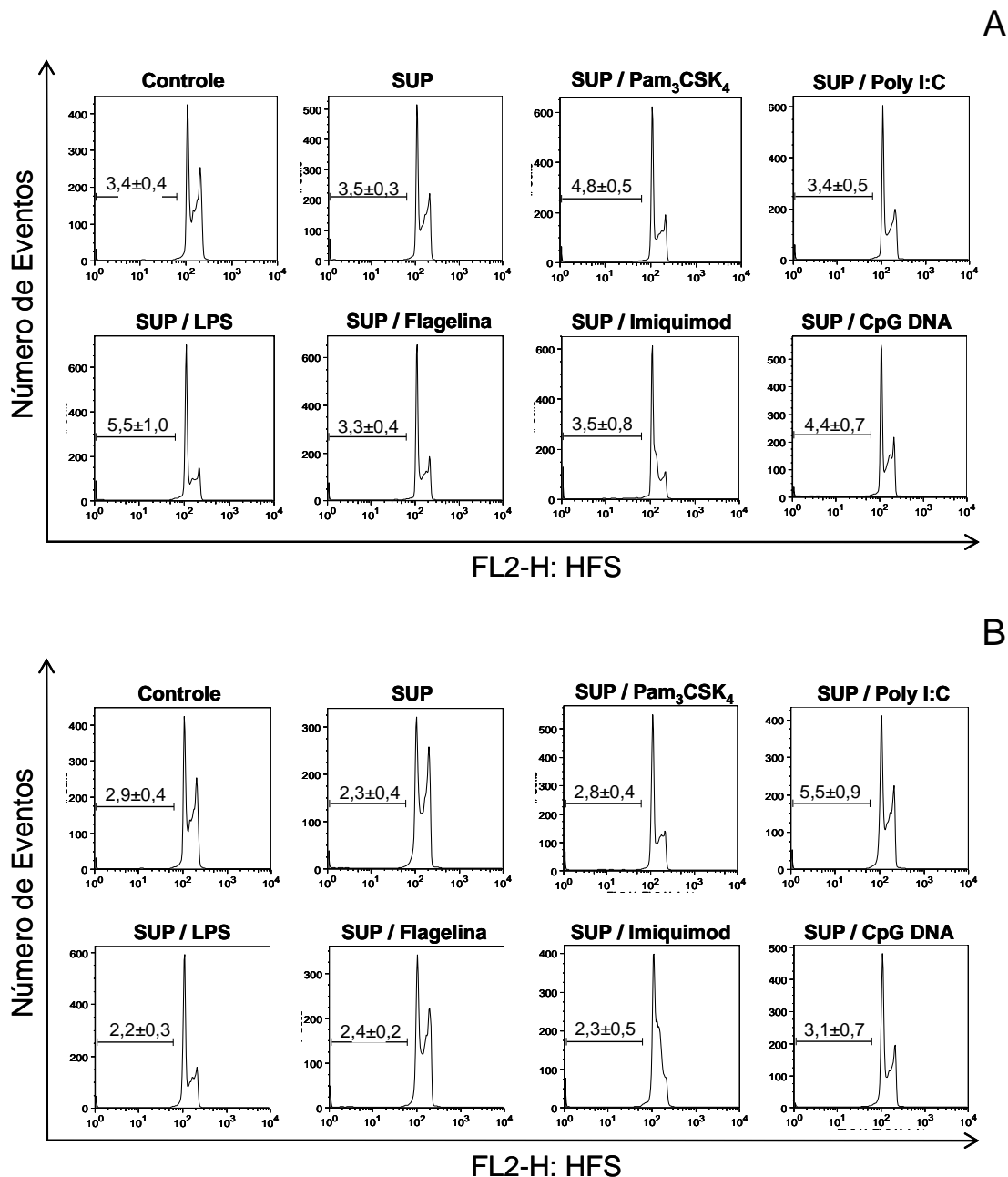


Figura 12. Ação dos sobrenadantes de cultura de J774 e BMDM no hibridoma DO11.10. Cento e cinquenta mil células DO11.10 foram incubadas na presença de diferentes sobrenadantes (SUP) de J774 (A) ou BMDM (B) durante 18 horas. Os SUPs foram obtidos a partir de uma cultura por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (5µg/mL), Poly(I:C) (10µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (3µg/mL), Imiquimod (10µg/mL) ou CpG DNA(10uM) em placas de 24 poços. A porcentagem de células mortas foi analisada através de citometria de fluxo por fragmentação de DNA (HFS). Os gráficos ilustram os resultados obtidos para cada tratamento, com média e desvio padrão. Nenhum resultado estatístico foi encontrado (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de três experimentos independentes.

Como visto nas Figuras 12A e 12B, os sobrenadantes de células J774 ou BMDMs, respectivamente, são inócuos quando adicionados às células DO11.10 não estimuladas, não alterando a porcentagem de células vivas. Por outro lado, quando as células DO11.10 são induzidas à morte por anticorpos anti-CD3, os mesmos sobrenadantes adquirem intensa capacidade inibitória, ou seja, reduzem a taxa de AICD (Figuras 10 e 11).

Na Figura 10A, as barras representam a porcentagem de apoptose obtida após cada tratamento, analisada através da marcação dos núcleos celulares com tampão HFS, após 16 h de estímulo das células com anticorpos anti-CD3. Na Figura 10B, confirmamos o resultado obtido através da marcação com HFS, verificando a porcentagem de células que expressa fosfatidilcerina em sua superfície.

O sobrenadante da cultura de células J774 gerado sem estímulo leva a uma inibição basal da AICD, aumentando a porcentagem de células vivas. Este efeito é fortemente potencializado quando agonistas de TLRs são acrescentados à cultura de J774. Este resultado é obtido independente do estímulo, e da dose utilizada, sendo que a inibição da morte já é máxima mesmo quando utilizado o sobrenadante de macrófagos estimulados com a menor concentração de cada agonista.

O sobrenadante produzido por BMDMs não estimuladas, diferentemente do observado em J774, não foi capaz de proteger o hibridoma DO11.10 da morte (Figura 11). Porém, a adição de certos agonistas de TLRs à cultura de BMMO pode promover inibição da AICD por estes sobrenadantes. Os sobrenadantes produzidos por BMDMs estimuladas com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS e Imiquimod foram capazes de reverter a AICD de células DO11.10. A incubação de BMDM com flagelina e CpG DNA, por outro lado, não foi capaz de gerar um sobrenadante que interferisse na morte do hibridoma. Este resultado pode ser observado tanto através da marcação dos núcleos celulares com tampão HFS (Figura 11A), quanto por meio da marcação das células com Anexina V/PI (Figura 11B).

Uma das hipóteses sobre a ação protetora dos agonistas poderia ser de que eles agiriam diretamente nos hibridomas de linfócitos T DO11.10, sendo carregados pelos sobrenadantes. Para eliminar esta possibilidade, células DO11.10 foram incubadas diretamente com os agonistas de TLRs nas concentrações máximas utilizadas e em condições experimentais iguais ao experimento anterior (Figura 13).

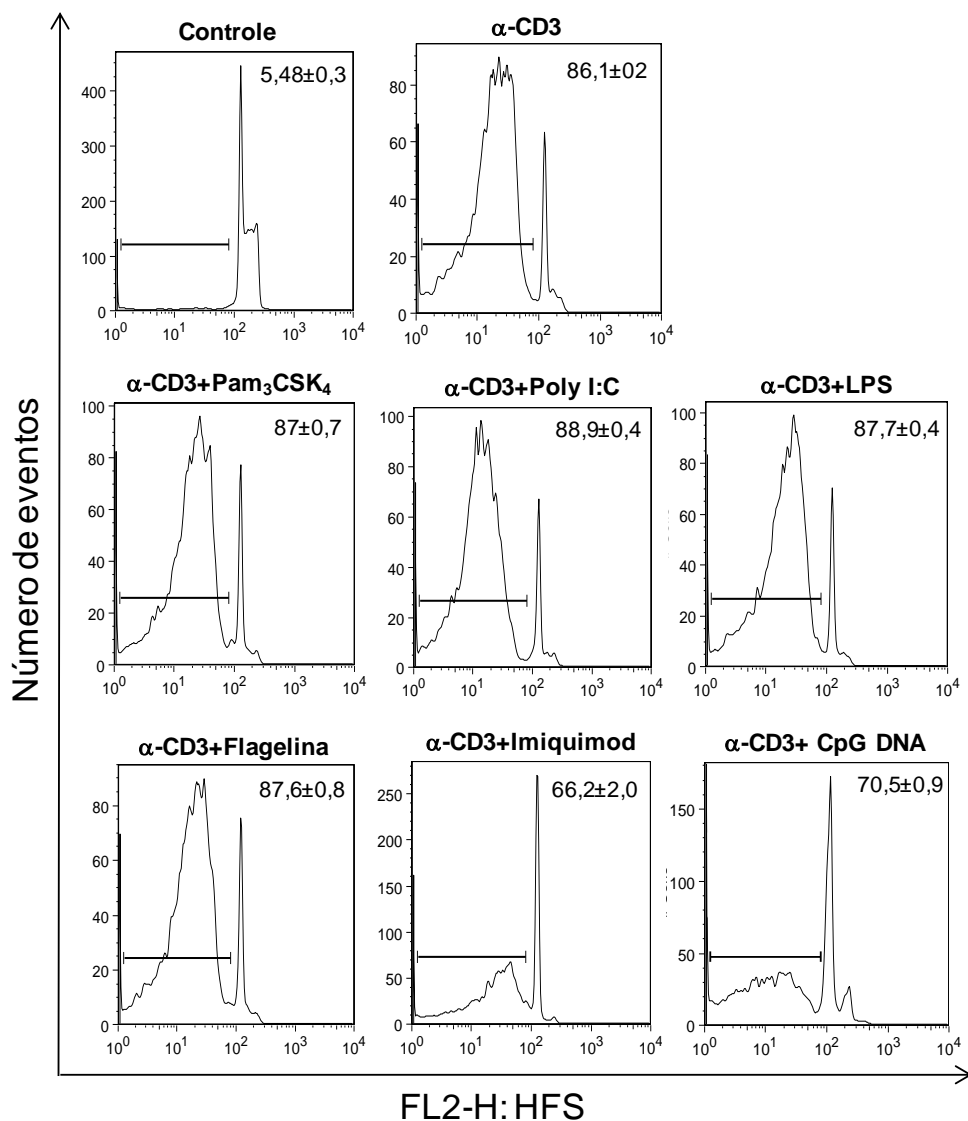


Figura 13. Efeito direto dos agonistas de TLRs na AICD do hibridoma DO11.10. Cento e cinquenta mil células DO11.10 foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 imobilizados em placa por 18 horas na presença ou não de Pam₃CSK₄ (5µg/mL), Poly(I:C) (10µg/mL), LPS (1µg/mL), flagelina (3µg/mL) ou imiquimod (10µg/mL). A análise da apoptose 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 média e desvios padrão no canto superior direito. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

A Figura 13 foi gentilmente cedida por uma aluna de mestrado de nosso grupo de pesquisa, que desenvolveu um projeto onde analisou o efeito direto de agonistas de TLRs na AICD de linfócitos T. Ela mostrou que os estímulos Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS e Flagelina diretamente no hibridoma DO11.10, não promovem qualquer alteração na taxa de apoptose destas células, indicando que, mesmo que os estímulos sejam carregados, suas ações inibidoras não ocorrem diretamente sobre os hibridomas. Células DO11.10 estimuladas com imiquimod ou CpG DNA, por outro lado, tem uma redução significativa na taxa de apoptose induzida por anticorpo anti-CD3, indicando que estes agonistas de TLR7 e TLR9, respectivamente, podem ser reconhecidos diretamente pelo hibridoma de linfócitos T DO11.10.

4.6 Envolvimento de Prostaglandina E₂ (PGE₂) no efeito protetor dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com agonistas de TLRs

Os sobrenadantes produzidos por células J774 e BMDMs estimuladas com agonistas de TLRs foram capazes de reduzir a morte por AICD do hibridoma DO11.10, e portanto, estes sobrenadantes possuem algum fator solúvel responsável por esta habilidade. Nosso grupo (Weinlich *et al.*, 2008) demonstrou que a estimulação de TLR4/MyD88 via LPS ativa a expressão de COX-2, dependente de NF-κB, e subsequente síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂), a qual previne a morte por AICD dos linfócitos T. Dessa maneira, nós fomos investigar o envolvimento da PGE₂ na inibição da morte promovida pelos nossos sobrenadantes.

Para tanto, duas abordagens foram utilizadas. Na primeira avaliamos a expressão de COX-2 através de *western-blot*. Para isso, 1x10⁶ macrófagos foram estimulados com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS, Flagelina, Imiquimod ou CpG DNA durante os intervalos de tempo demonstrados e então as células foram processadas e analisadas.

Quando células J774 foram estimuladas com LPS, foi possível enxergar a ativação de COX-2 após 6 horas de incubação, com forte aumento na expressão de COX-2 após 24 horas de estímulo. O mesmo perfil, embora levemente mais sutil, foi observado em J774 estimuladas com Imiquimod. Foi

possível visualizar ativação de COX-2 nas J774 estimuladas Pam₃CSK₄ e CpG após 12h de estímulo com aumento na expressão após 24h. Diferentemente, o estímulo com Poly (I:C) levou a um pico de ativação de COX-2 após 12h, com diminuição após 24h. Finalmente, o estímulo de J774 com flagelina, agonista de TLR5, pareceu ser bastante fraco na indução de COX-2, sendo possível observar apenas uma fraca banda após 24 horas de incubação (Figura 14A).

Surpreendentemente, não foi possível observar ativação de COX-2 nas BMDMs, independente do tempo e do estímulo utilizado, indicando outro mecanismo na proteção das células DO11.10 contra a AICD (Figura 14B).

A segunda abordagem utilizada para se analisar o envolvimento de PGE₂ no efeito protetor dos SUPs foi realizar sua dosagem diretamente nos sobrenadantes produzidos pelos macrófagos, através da técnica de ELISA. Portanto, realizamos a dosagem deste mediador lipídico em sobrenadantes de 24h de cultura dos macrófagos estimulados com ligantes de TLRs (Figura15).

Pudemos verificar que o sobrenadante de J774 estimuladas com todos agonistas de TLRs contêm altas concentrações de PGE₂, resultado esperado, uma vez que foi observada ativação de COX-2 nesta célula após os estímulos. Entretanto, no sobrenadante de células BMDM não foi possível detectar níveis de PGE₂ (resultados não mostrados).

Este resultado confirma o anterior, demonstrando o forte envolvimento de PGE₂ no sobrenadante de macrófagos J774 e sugerindo fortemente a presença de outros fatores nos sobrenadantes de BMDMs, responsáveis pelo fenômeno de inibição da AICD.

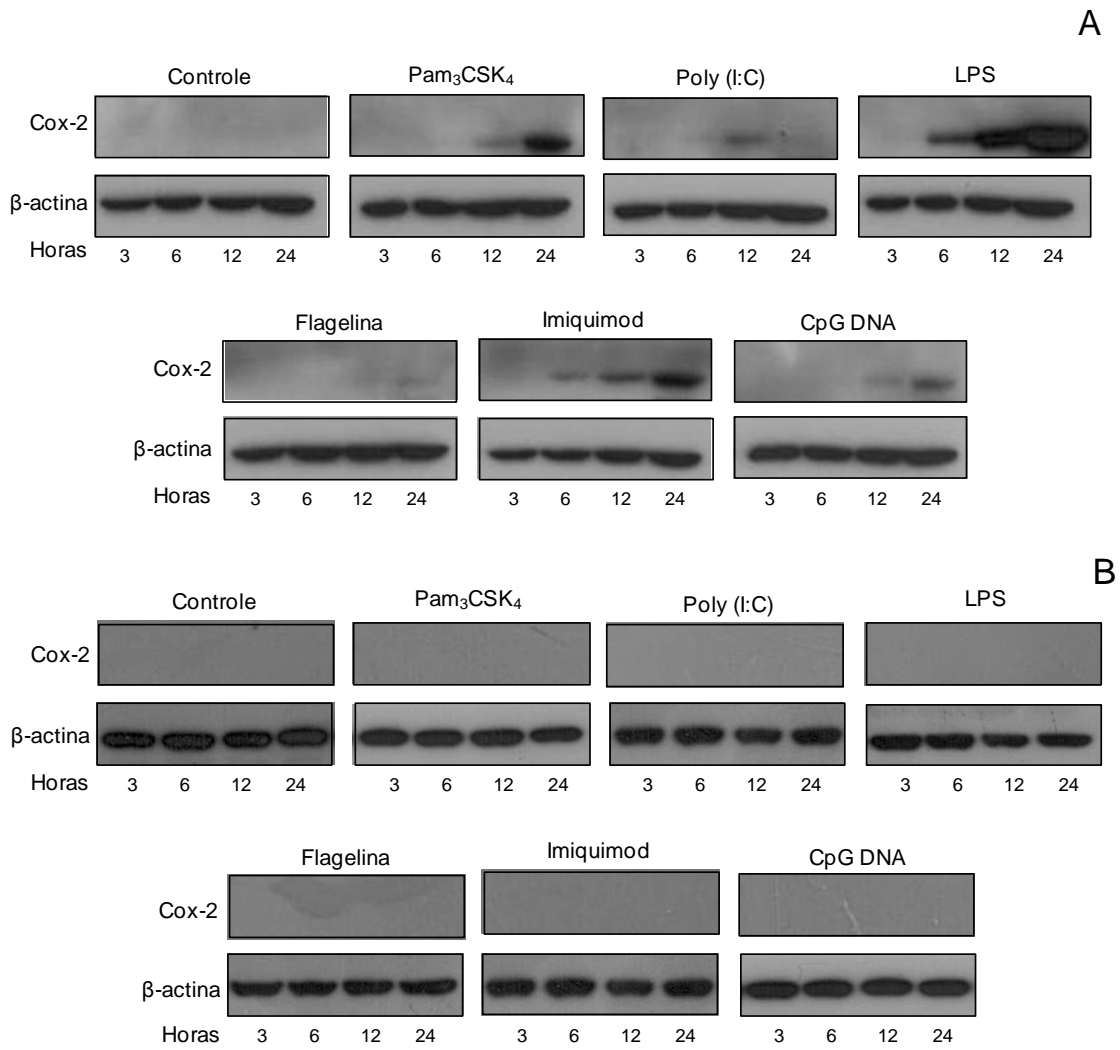


Figura 14. Expressão de *ciclooxigenase-2* (COX-2) em J774 e BMDM estimuladas com agonistas de TLRs. Um milhão de macrófagos (A) J774 e (B) BMDM foram estimulados com Pam₃CSK₄ (5µg/mL), Poly (I:C) (10µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (3µg/mL), Imiquimod (10µg/mL) ou CpG DNA (10µM) em placa de 24 poços. Após 24 horas as células foram coletadas, lisadas e analisadas por *western blot* utilizando-se anticorpo específico anti-COX-2 (70 KDa) e anticorpo anti-β-actina (41 KDa) como controle da quantidade de proteína carregada no gel. Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

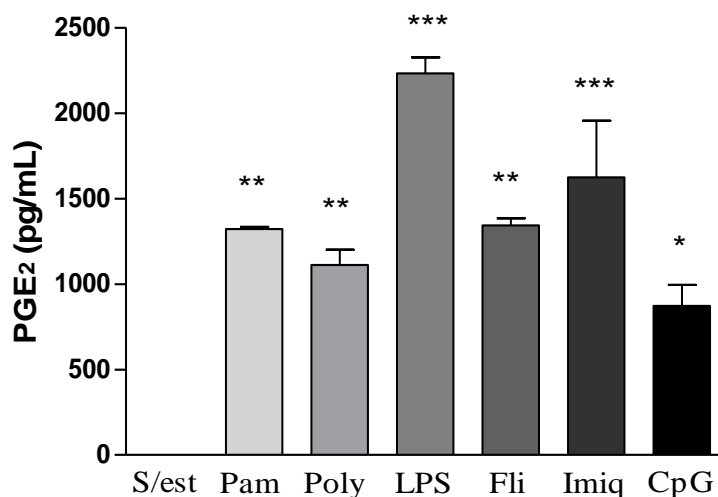


Figura 15. Avaliação da presença de PGE₂ em sobrenadantes de J774 estimuladas com agonistas de TLRs. Um milhão de macrófagos foram cultivados na presença de Pam₃CSK₄ (5µg/mL), Poly(I:C), (10µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (3µg/mL), Imiquimod (10µg/mL) ou CpG DNA(10uM) em placas de 24 poços. Após 24 horas os sobrenadantes foram recolhidos e a PGE₂ foi dosada por ELISA através de kit comercial, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios padrão. (*): estatisticamente significativo em relação ao s/ est (sem estímulo). (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de três experimentos independentes.

4.7 Efeito dos sobrenadantes derivados de macrófagos na expressão gênica de FasL, Fas e FLIP

O passo seguinte foi entender como os sobrenadantes de culturas de J774 ou BMDMs agiriam para evitar a morte de células DO11.10 por estimulação via anticorpos anti-CD3. Uma possibilidade seria a ação na expressão gênica de moléculas associadas aos eventos iniciais da AICD, tais como o FasL, Fas e FLIP. Sendo assim, a expressão destas moléculas foi analisada através da técnica de *real-time* PCR. Para tanto as células foram incubadas durante quatro horas com anticorpo anti-CD3 adsorvido em placa juntamente com os diversos sobrenadantes de culturas celulares. Em seguida o RNA destas amostras foi extraído e convertido em cDNA para análise da expressão gênica.

Inicialmente, foram utilizados os sobrenadantes da linhagem celular J774 estimulada ou não com os agonistas de TLRs (Figura 16).

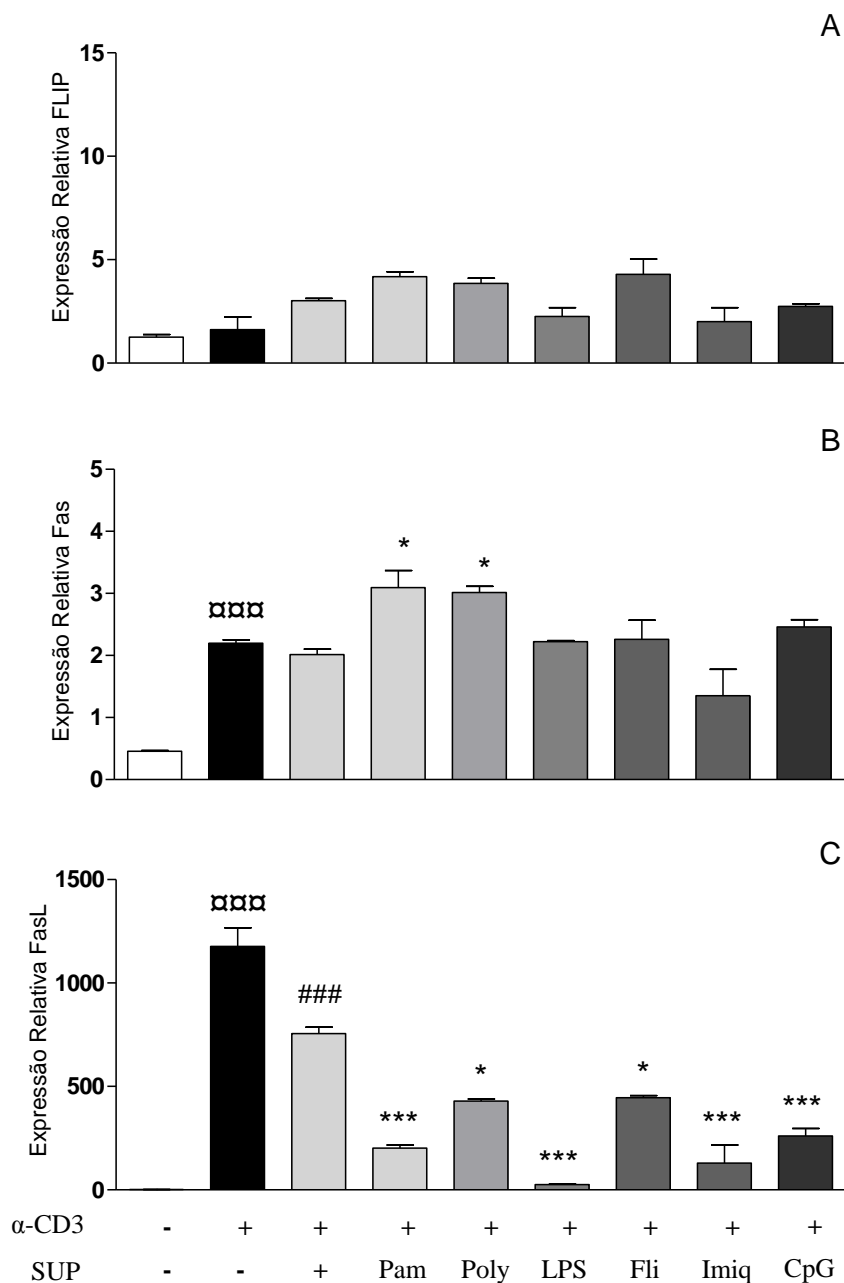


Figura 16. Influência dos sobrenadantes derivados de J774 na expressão gênica de FasL, Fas e FLIP durante a AICD do hibridoma DO11.10. Um milhão de células DO11.10 foram incubadas por 4h com sobrenadantes (SUP) de macrófagos na presença ou não de 1µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 12 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (Pam) (5µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (Fli) (3µg/mL) ou Imiquimod (Imiq) (10µg/mL). As células foram lisadas em trizol e analisadas posteriormente por qPCR utilizando primers Taqman. A amostra controle (sem α-CD3 ou SUP) foi utilizada como calibrador e os valores da expressão de FasL (A), Fas (B) e FLIP (C) para os outros tratamentos são relativos à mesma. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. (α): estatisticamente significativo em relação ao controle. (#): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3. (*): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3 + SUP. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

A expressão do receptor Fas, presente constitutivamente na superfície de linfócitos T, foi levemente aumentada por anticorpos anti-CD3. Porém, não houve redução estatisticamente significativa desta expressão após a incubação de células DO11.10 com os diferentes sobrenadantes gerados por J774, descartando a modulação transcripcional de Fas como sendo o mecanismo de inibição da morte.

A molécula FLIP tampouco variou de forma a explicar a inibição da morte por sobrenadantes de J774, uma vez que nenhuma diferença estatística foi observada entre os diferentes tratamentos.

O padrão de expressão gênica encontrado para a molécula FasL foi mais condizente com os níveis de AICD observados na célula DO11.10 após incubação com os diferentes sobrenadantes. Esta molécula, ausente na condição controle, foi fortemente induzida pelo estímulo com anticorpos anti-CD3. Porém, na presença de SUP de J774 não estimulada ou de SUPs de culturas celular estimuladas com os agonistas de TLRs, os níveis de expressão de FasL foram drasticamente reduzidos.

Em seguida, os mesmos experimentos foram realizados utilizando-se os sobrenadantes produzidos por BMDMs estimuladas ou não com os ligantes de TLRs. O padrão de resultados foi muito similar aos obtidos com os sobrenadantes de J774, ou seja, Fas e FLIP não exibem redução significativa pelos diferentes tratamentos, enquanto que o FasL é induzido fortemente pelo anti-CD3, que tem efeito antagonizado pela presença de SUPs de BMDMs (Figura 17).

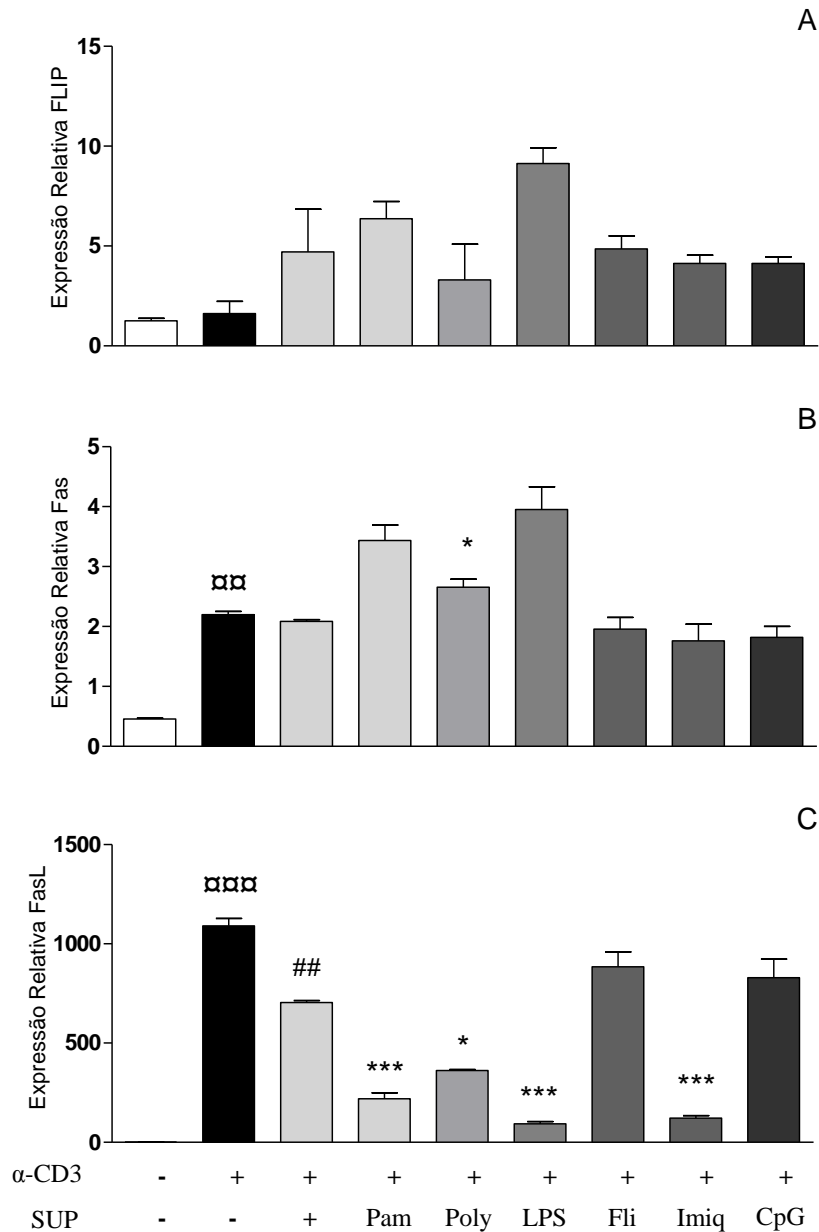


Figura 17. Influência dos sobrenadantes derivados de BMDM na expressão gênica de FasL, Fas e FLIP durante a AICD do hibridoma DO11.10. Um milhão de células DO11.10 foram incubadas por 4h com sobrenadantes (SUP) de macrófagos na presença ou não de 1µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 12 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (Pam) (5µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (Fli) (3µg/mL) ou Imiquimod (Imiq) (10µg/mL). As células foram lisadas em trizol e analisadas posteriormente por qPCR utilizando primers Taqman. A amostra controle (sem α-CD3 ou SUP) foi utilizada como calibrador e os valores da expressão de FasL (A), Fas (B) e FLIP (C) para os outros tratamentos são relativos à mesma. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. (α): estatisticamente significativo em relação ao controle. (#): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3. (*): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3 + SUP. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de quatro experimentos independentes.

4.8 Efeito dos sobrenadantes derivados de macrófagos na expressão gênica de TNF

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a estimulação do hibridoma de linfócitos T mediada por anticorpos anti-CD3 não só modula positivamente a expressão de FasL, como também age regulando a expressão de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*), uma citocina que pode estar envolvida na morte por apoptose. Estas células, além de possuírem aumento na expressão destas moléculas, apresentam maior porcentagem de apoptose. Conjuntamente, estes dados sugerem que a morte por apoptose destas células poderia estar sendo mediada por TNF- α , além de FasL.

Dados preliminares de nosso grupo de pesquisa indicam que a PGE₂ também tem função inibidora da expressão de TNF- α em células DO11.10 em AICD. Uma vez demonstrado que a PGE₂ pode estar presente em nossos sobrenadantes, resolvemos investigar se ocorre uma regulação negativa da expressão de TNF- α em DO11.10 estimuladas com anticorpos anti-CD3 quando incubadas com os diferentes SUPs produzidos pelos macrófagos.

Como esperado, a incubação do hibridoma de linfócitos T com anti-CD3 aumentou cerca de oito vezes a expressão gênica de TNF- α (Figura 18). A incubação conjunta com os sobrenadantes derivados de células J774 não estimuladas, estimuladas com LPS, flagelina (Fli) ou imiquimod (Imiq) foi capaz de reverter em grande parte esta expressão. Por outro lado, o sobrenadante produzido por BMDMs somente apresenta capacidade moduladora da expressão de TNF- α , quando os macrófagos são estimulados com Pam₃CSK₄ (Pam) ou LPS.

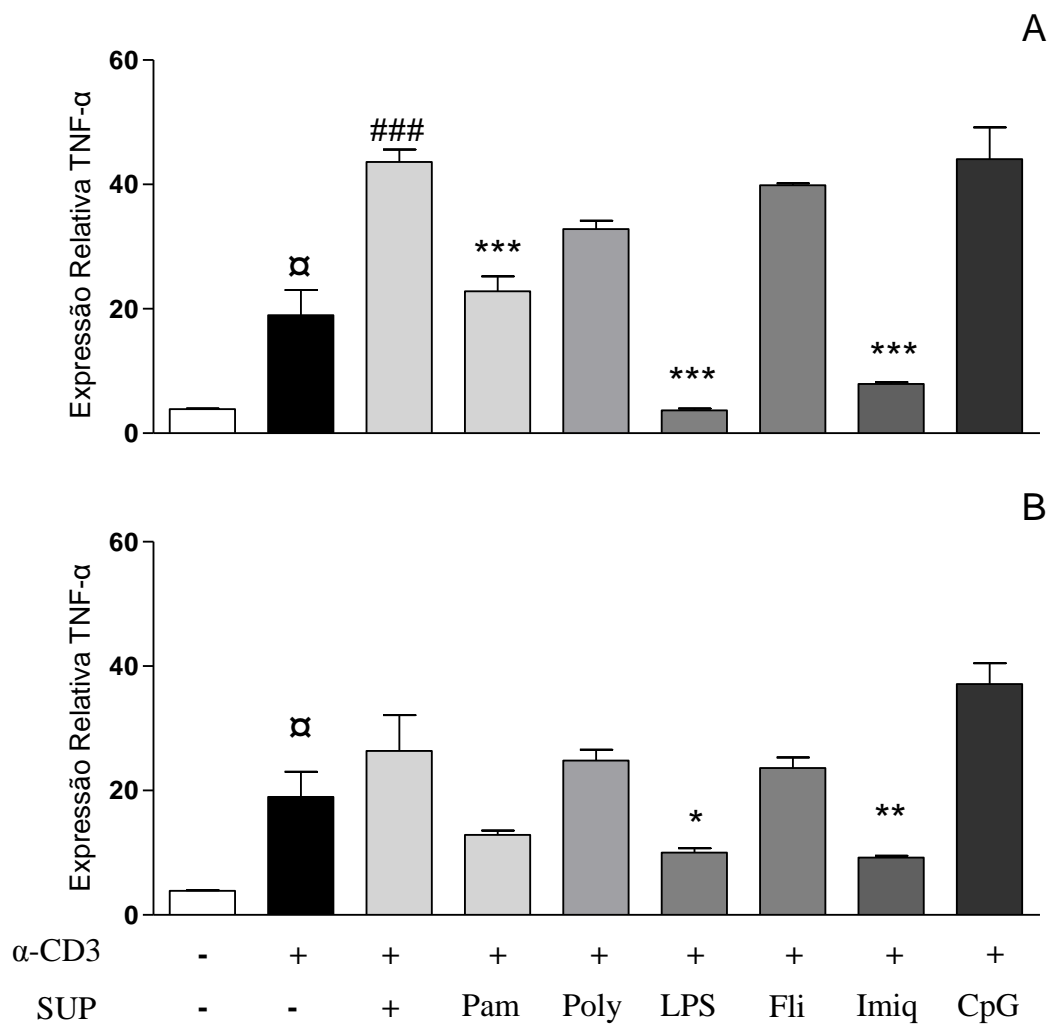


Figura 18. Influência dos sobrenadantes derivados de J774 e BMDM na expressão gênica de TNF durante a AICD do hibridoma DO11.10. Um milhão de células DO11.10 foram incubadas por 4h com sobrenadantes (SUP) de macrófagos J774 (A) ou BMDM (B) na presença ou não de 1µg/ml de anticorpos anti-CD3 imobilizados em placas de 12 poços. Os sobrenadantes foram obtidos após a cultura em placas de 24 poços por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam₃CSK₄ (Pam) (5µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (Fli) (3µg/mL) ou Imiquimod (Imiq) (10µg/mL). As células foram lisadas em trizol e analisadas posteriormente por qPCR utilizando primers Taqman. A amostra controle (sem α-CD3 ou SUP) foi utilizada como calibrador e os valores da expressão de TNF para os outros tratamentos são relativos à mesma. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH. As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão os respectivos desvios padrão. (α): estatisticamente significativo em relação ao controle. (#): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3. (*): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3 + SUP. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Experimento realizado uma vez.

4.9 Geração de linfócitos T primários e indução de AICD

Até este ponto do trabalho, todos os experimentos foram realizados utilizando-se o hibridoma de linfócitos T CD4⁺, DO11.10. Por se tratar de uma linhagem gerada a partir da fusão de linfócitos T com células de timoma, houve a necessidade de validar os resultados em um modelo que utilizasse células primárias, extraídas diretamente de baços ou linfonodos de camundongos.

Dessa forma, baços de camundongos Balb/C transgênicos DO11.10, cujos linfócitos T possuem TCR transgênico que reconhecem um peptídeo da ovalbumina (OVA 323-339) 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 adesão por 2 h para eliminação das células aderentes e as células restantes foram utilizadas na padronização de um protocolo eficiente de geração de blastos de linfócitos T CD4⁺.

Células recém-extraídas tanto de baço, quanto de linfonodos de animais não experimentados 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 (Rafaeli *et al.*, 1998). Sendo assim, realizamos uma série de experimentos, combinando diferentes doses de Concanavalina A (ConA), que possui ação mitógena, com o fator de crescimento interleucina 2 (IL-2) e variados períodos de incubação. As principais preocupações durante a formulação deste protocolo foram com a obtenção de uma população suficientemente pura de linfócitos T CD4⁺ e vulneráveis ao processo de indução de AICD. Os resultados descritos a seguir são referentes ao protocolo escolhido para geração de blastos de linfócitos T CD4⁺ e apresentam a análise da pureza, caracterização fenotípica das células obtidas e análise da apoptose destas células (Figura 19).

Esta população foi examinada quanto à expressão das moléculas de superfície CD3, CD4, CD8 e CD19. Pudemos verificar que aproximadamente 95% da população de células vivas foram positivas para CD4 e então consideradas blastos de linfócitos T CD4⁺ (Figura 19A).

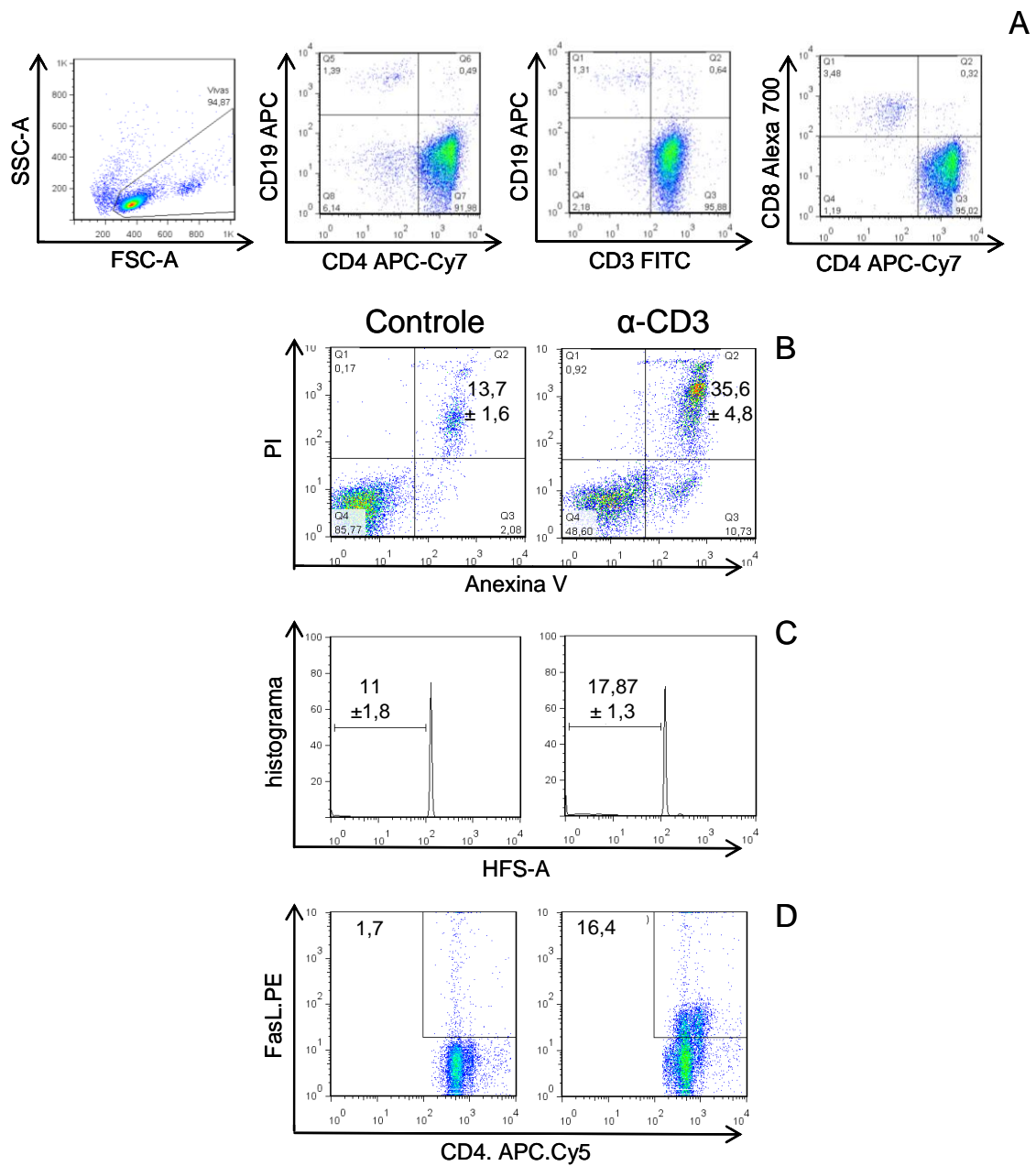


Figura 19. Caracterização fenotípica dos blastos de linfócitos T e indução de AICD. Células do baço de camundongo transgênico DO11.10 foram tratadas com cloreto de amônio para lise de eritrócitos e submetidas a ensaio de adesão por 2h para eliminação de células aderentes. As células restantes foram incubadas com ConA (10µg/ml) durante 48h e então lavadas e replaqueadas na presença de 250U/ml de rIL-2 por 48h. Após este período mais 250U/ml de rIL-2 foram adicionados à cultura e incubados durante 96h. (A) Trezentas mil células foram marcadas com anticorpos anti-CD3.FITC, anti-CD4.APC-Cy7, anti-CD8.Alexa 700 e anti-CD19.APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células mortas foi analisada através de citometria de fluxo por fragmentação de DNA (HFS) (B), marcação com anexina V/PI (C) e marcadas com anticorpos anti-CD4.APC-Cy7 e FasL.PE (D). Resultado representativo de três experimentos independentes.

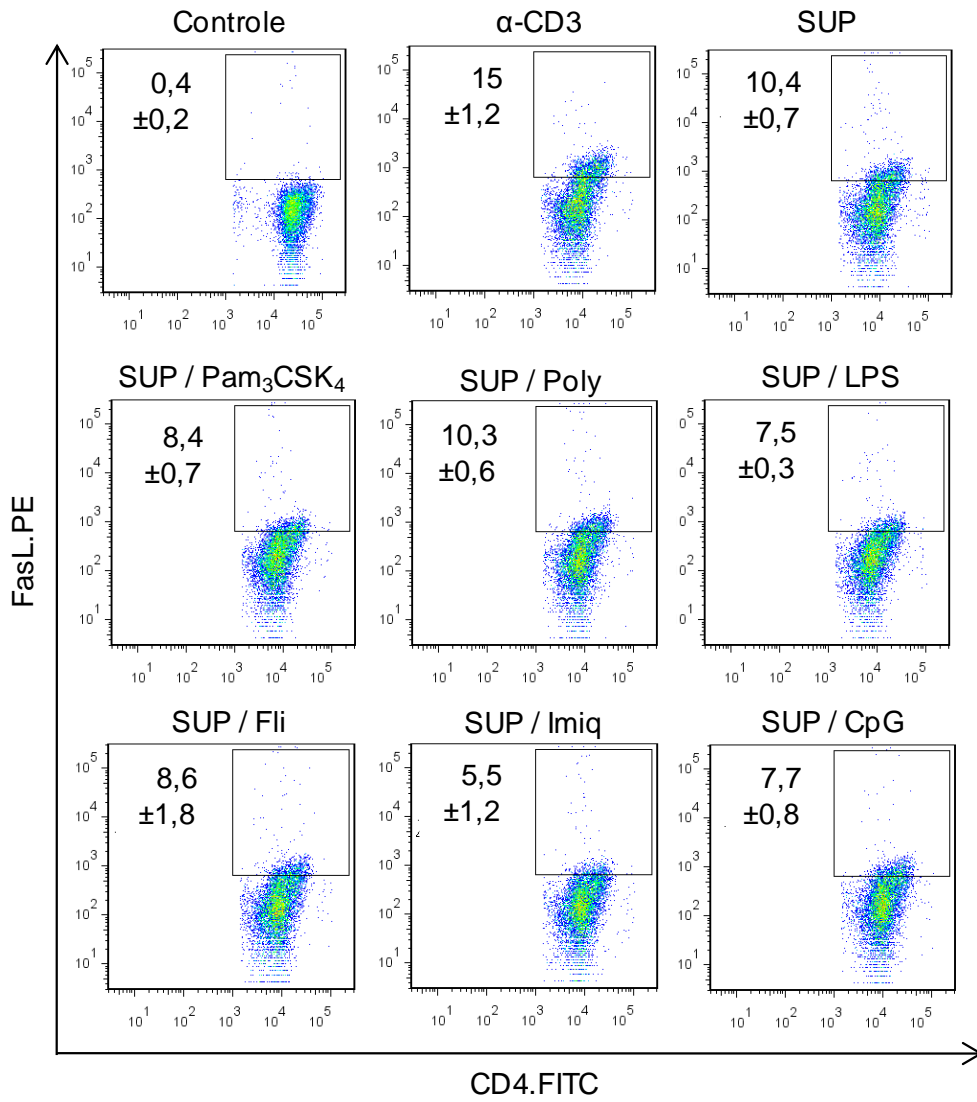
Para verificação da AICD as células foram estimuladas durante 8h com anticorpos anti-CD3. Quando analisada a apoptose através da marcação com Anexina V/PI foi possível perceber um claro aumento na porcentagem de células mortas, que passou de 16% (condição controle) para 46% quando estimuladas com anticorpos anti-CD3. O mesmo perfil de resultado, embora mais sutil, pôde ser visualizado quando a morte foi avaliada através da incorporação de iodeto de propídeo em tampão HFS . Resultado esperado uma vez que a clivagem do DNA é um evento mais tardio em relação à exposição de fosfatidilserina.

Para análise da expressão de FasL, as células vivas foram segregadas utilizando-se os parâmetros FSCxSSC. Constatamos um aumento de aproximadamente dez vezes na expressão de FasL nas células estimuladas com anti-CD3.

4.9 Efeito dos SUPs de macrófagos estimulados com agonistas de TLRs na expressão de FasL e AICD de linfócitos T primários

Uma vez que conseguimos induzir a expressão de FasL nos linfócitos T CD4+ primários e comprovamos que o aumento desta expressão refletia-se na porcentagem de células mortas, o passo seguinte foi avaliar o poder dos sobrenadantes derivados de macrófagos estimulados com ligantes de TLRs na modulação destes efeitos. Para tanto, blastos de linfócitos T foram estimulados com anticorpos anti-CD3 durante 8h na presença ou não de sobrenadantes derivados de macrófagos estimuladas com os agonistas de TLRs, e a expressão de FasL foi analisada. A Figura 20A mostra que o sobrenadante de J774 não estimuladas possui capacidade de reduzir significativamente a expressão de FasL, resultado que é potencializado quando o sobrenadante é gerado na presença de qualquer um dos agonistas de TLRs utilizados. O sobrenadante de BMDMs não estimuladas, por outro lado, não foi hábil em modular a expressão de FasL, porém, a adição de ligantes de TLRs à cultura destas células foi capaz de alterar o perfil encontrado, adicionando a estes sobrenadantes um poder na redução da expressão de FasL (Figura 20B).

A



Continua

Conclusão

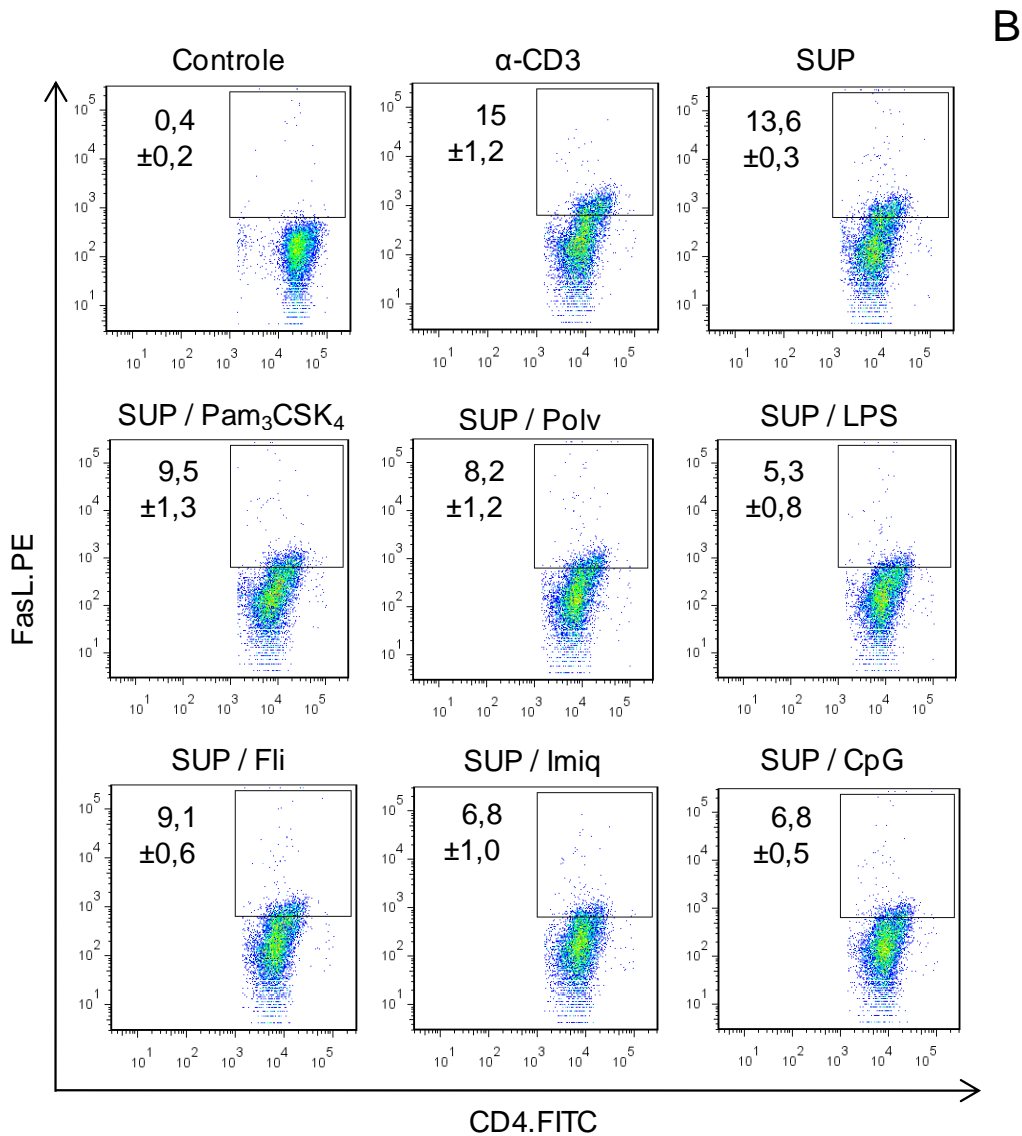
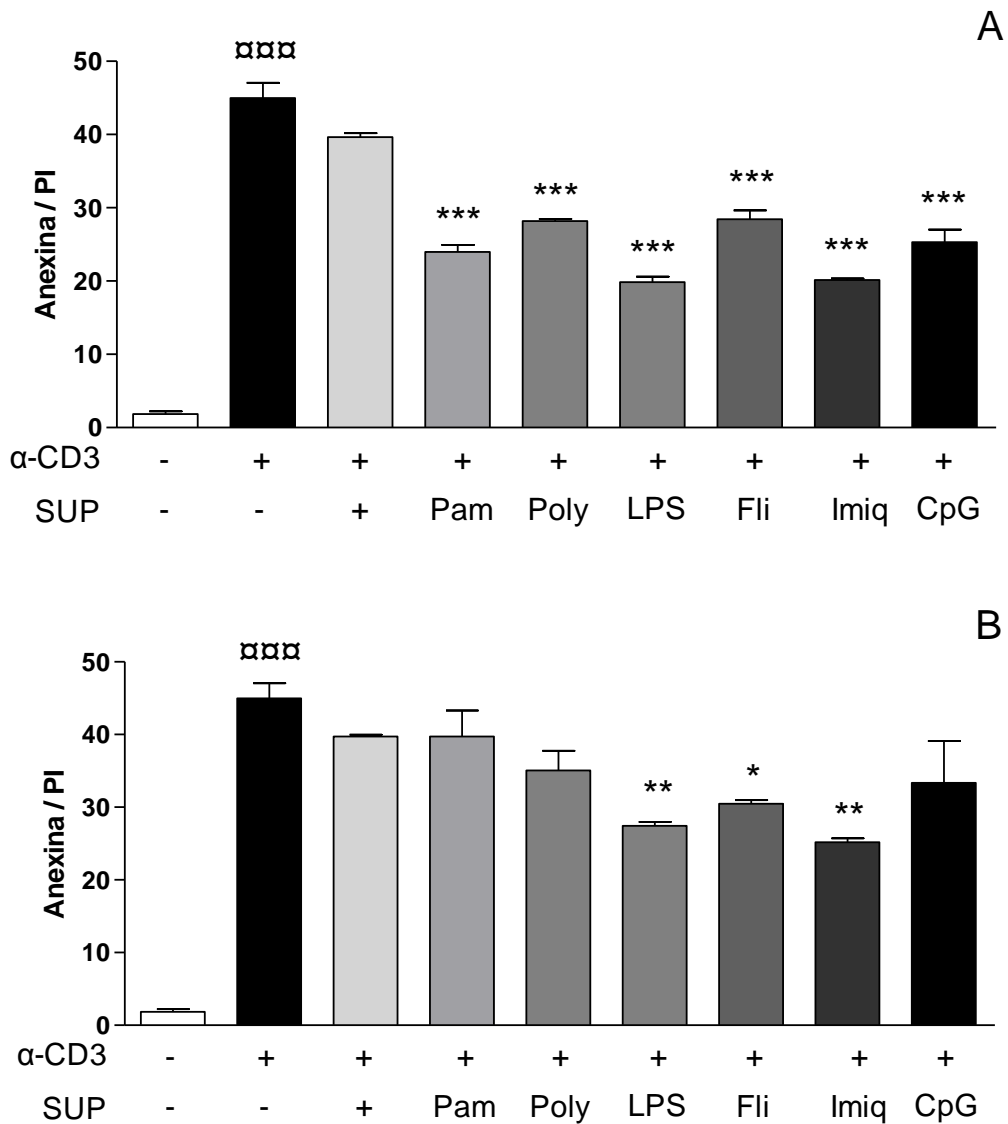


Figura 20. Efeito dos sobrenadantes de J774 e BMDM na expressão de FasL em linfócitos T CD4⁺ primários. Células do baço de camundongo transgênico DO11.10 foram tratadas com cloreto de amônio para lise de eritrócitos e submetidas a ensaio de adesão por 2h para eliminação de células aderentes. As células restantes foram incubadas com ConA (10µg/ml) durante 48h e então lavadas e replaqueadas na presença de 250U/ml de rIL-2 por 48h. Após este período mais 250U/ml de rIL-2 foram adicionados à cultura e incubados durante 96h. Trezentas mil células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença de sobrenadantes de J774 (A) ou BMDMs (B). Os SUPs foram obtidos após a cultura por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam3CSK4 (5µg/mL), Poly I:C (10µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (3µg/mL), Imiquimod (10µg/mL) ou CpG DNA(10uM) em placas de 24 poços. Após 8 horas de estímulos, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4.APC-Cy7 e anti-FasL.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 FasL. Os números representam a média e o desvio padrão de cada região mostrada. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Figura 21. *Efeito dos sobrenadantes de J774 e BMDM na morte de linfócitos T CD4+ primários.* Células do baço de camundongo transgênico DO11.10 foram tratadas com cloreto de amônio para lise de eritrócitos e submetidas a ensaio de adesão por 2h para eliminação de células aderentes. As células restantes foram incubadas com ConA (10µg/ml) durante 48h e então lavadas e replaqueadas na presença de 250U/ml de rIL-2 por 48h. Após este período mais 250U/ml de rIL-2 foram adicionados à cultura e incubados durante 96h. Trezentas mil células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 adsorvidos em placa na presença de sobrenadantes de J774 (A) ou BMDMs (B). Os SUPs foram obtidos após a cultura por 24h de um milhão de macrófagos estimulados ou não com Pam3CSK4 (5µg/mL), Poly I:C (10µg/mL), LPS (1µg/mL), Flagelina (3µg/mL), Imiquimod (10µg/mL) ou CpG DNA(10uM) em placas de 24 poços. Após 12 horas de estímulos, a porcentagem de células mortas foi analisada através de citometria de fluxo por fragmentação de DNA . As barras representam a média das triplicatas realizadas para cada tratamento e, acima destas, estão representados os respectivos desvios padrão. (▣): estatisticamente significativo em relação ao controle. (*): estatisticamente significativo em relação ao anti-CD3 + SUP. (Teste ANOVA e pós-teste TUKEY). Resultado representativo de três experimentos independentes.

Em seguida averiguamos os índices de morte dos linfócitos T CD4+ primários, através da marcação das células com anexinaV / PI. O estímulo com anti-CD3 elevou a porcentagem de células mortas para aproximadamente 45%. Apesar do sobrenadante das células J774 sem estímulo não reduzir significativamente a taxa de morte, a adição de todos os agonistas de TLRs foi capaz de diminuir a morte destas células (Figura 18A). Diferentemente, ao incubarmos os linfócitos primários com os sobrenadantes produzidos por BMDMs, só foi possível observar modulação nos níveis de morte quando os sobrenadantes foram gerados na presença de LPS, Flagelina ou Imiquimod.



Tomados em conjunto, os resultados obtidos demonstram que a proteção conferida pelos sobrenadantes derivados de J774 e BMDMs, estimuladas com ligantes de TLRs, contra a AICD através da inibição de FasL não funciona somente em hibridomas de linfócitos T, mas também ocorre em blastos de linfócitos TCD4 gerados *ex vivo*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações Iniciais

Este projeto teve início com uma pergunta simples, que acabou por direcionar todo o trabalho realizado durante este mestrado. A pergunta surgiu em uma tentativa de complementar resultados recentes de nosso grupo de pesquisa, que demonstraram que APCs (células aderentes do exudato peritoneal – PEC; células dendríticas derivadas da medula óssea – BMDC; e a linhagem monocítica J774) estimuladas com LPS via TLR4/MyD88, liberavam prostaglandina E₂ (PGE₂), que inibe a morte celular induzida por anticorpos anti-CD3 (AICD), através da supressão gênica de FasL. Tal fenômeno foi observado tanto em hibridomas de linfócitos T quanto em linfócitos T primários extraídos de baço ou linfonodo de camundongos, evidenciando um efeito indireto de TLRs na regulação da sobrevivência de linfócitos T (Weinlich *et al.*, 2008).

Dessa forma, o presente projeto partiu da hipótese de que fatores solúveis liberados por APCs em resposta aos diversos agonistas dos Toll-like receptors poderiam fornecer sinais de sobrevivência para células TCD4⁺ recorrentemente estimuladas por antígenos. A relevância da pergunta 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⁺ ocorre pela apresentação via MHC classe II de peptídeos derivados de patógenos ou 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.

Sendo assim, o projeto foi iniciado em um modelo já estabelecido no laboratório, 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 utilizado foi a indução de hibridomas de linfócitos T CD4⁺ à morte por anticorpos anti-CD3 agonistas adsorvidos em placa. A linhagem celular utilizada inicialmente foi o hibridoma murino de linfócitos T CD4⁺, DO11.10. 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 (Brunner *et al.*, 1995). Posteriormente, realizamos os mesmos experimentos em linfócitos T CD4⁺ primários gerados a partir de baços de camundongos. Utilizamos como células apresentadoras de antígenos a linhagem macrófágica J774 e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs), estimuladas com diferentes agonistas de TLRs para geração de sobrenadantes.

5.2 Caracterização do modelo experimental

As linhagens celulares representam uma importante e valiosa ferramenta para a pesquisa experimental, mas a contaminação dessas culturas com diferentes espécies de micoplasma permanece um problema com difícil solução. Os micoplasmas podem produzir uma ilimitada variedade de efeitos nas culturas celulares infectadas, apesar destes efeitos não afetarem todas as células da mesma maneira, sendo que muitas espécies de micoplasma produzem ação citopática, enquanto outras não se mostram citopáticos. Estes efeitos podem ser quantitativa e qualitativamente diferentes dentro de um mesmo parâmetro, dependendo da espécie de micoplasma, das condições de cultura, do tipo celular, da intensidade e duração da infecção e da presença de infecções adicionais nas células, como vírus e bactérias. Assim, contaminações podem interferir com virtualmente todos os parâmetros medidos em culturas celulares durante o cultivo rotineiro ou em condições experimentais (Drexler e Uphoff, 2002). Com a descrição do TLR2, juntamente com o TLR1 ou com o TLR6 (Takeuchi *et al.*, 2000; Okusawa *et al.*, 2004), como o receptor responsável pelo reconhecimento de diferentes espécies de micoplasma, o trabalho com culturas celulares livres de contaminação por este microorganismo tornou-se ainda mais importante. (Shimizu *et al.*, 2007) demonstraram que Lipoproteínas derivadas do *Mycoplasma pneumoniae* são capazes de ativar o fator de transcrição NF- κ B em células 293T através de uma via dependente de TLR1 e TLR2, levando ao aumento na produção e secreção de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Portanto, tornou-se indispensável a certificação destas células como livres de contaminação por

micoplasma. Realizamos então, uma PCR específica para micoplasma utilizando primers complementares a sequências bastante conservadas no rRNA de diferentes espécies, garantindo que o maior número de espécies de micoplasma pudesse ser detectada. Na Figura 4 foi demonstrado que as linhagens celulares L929 e J774, e macrófagos derivados de medula óssea estavam livres da contaminação por micoplasma, possibilitando prosseguir com os experimentos. A ausência de contaminação por este microorganismo nas culturas celulares foi analisada uma vez por mês, certificando o uso das células nos experimentos.

O passo seguinte foi avaliar a existência ou não de receptores do tipo Toll e realizar uma análise comparativa da expressão dos diferentes TLRs nos macrófagos escolhidos para estudo: a linhagem de macrófagos J774 e os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). Para tanto, optamos por realizar reações de PCR em tempo real (qPCR) utilizando *primers* e sondas Taqman, uma tecnologia moderna e muito precisa (ver materiais e métodos). A utilização desses *primers* apresenta muitas vantagens, uma vez que além de já serem testados e validados, apresentam todos a mesma temperatura de anelamento, ou seja, genes diferentes podem ser detectados na mesma reação. Utilizamos, para a reação de qPCR, cDNA dos macrófagos J774 e BMDM não estimulados, para obtermos assim, a expressão basal de cada gene. Os resultados confirmaram a expressão de todos os TLRs tanto em J774 como em BMDM (Figura 6), sendo que no primeiro caso os TLRs mais expressos foram os TLR2, TLR4, TLR7 e TLR5, enquanto que em BMDM o TLR mais expresso é o TLR7, seguido pelos TLR8, TLR4 e TLR6. Como a exposição dos resultados desta maneira não é suficiente para conseguirmos entender a diferença de expressão dos TLRs entre os dois macrófagos utilizados, resolvemos montar um painel onde este resultado pudesse ficar claro. Para isso usamos como calibrador a célula com maior Ct (*Cycle Threshold*) para cada TLR (expressão=1) e comparamos este valor com o valor de Ct obtido para a outra célula. Na Figura 7 pudemos observar que os TLRs 2, 3, 4, 5, 6 e 11 são mais expressos na linhagem celular J774, enquanto que os TLRs 1, 7, 8 e 9 têm sua maior expressão nas BMDM.

Embora os TLRs tenham sido identificados primeiramente em componentes celulares da imunidade inata, sabe-se hoje que os receptores do

tipo Toll estão presentes também em células da imunidade adaptativa incluindo linfócitos B (Peng, 2005), subtipos de linfócitos T (Sutmuller *et al.*, 2006) e diversos tipos de células não imunes, como células epiteliais (Ritter *et al.*, 2005). Mas a sua expressão não é conservada entre os tipos celulares, variando de acordo com cada sub-população celular, com o grau de ativação de uma mesma célula e em camundongos, entre as diferentes linhagens. Por este motivo, realizar a análise da expressão de RNAm para cada TLR nos macrófagos utilizados tornou-se de grande importância e a diferença de expressão encontrada poderá ser levada em consideração para explicar resultados futuros.

Nosso próximo passo foi avaliar a funcionalidade desses receptores. A atividade funcional dos TLRs é em grande parte avaliada pela capacidade de seus agonistas em promover a ativação de NF- κ B (Gelman *et al.*, 2004), uma vez que todos agonistas de TLRs induzem a ativação deste fator de transcrição em APCs (Kawai e Akira, 2007). Este fator de transcrição fica retido no citoplasma da célula pela ação de uma proteína chamada I κ B- α . Após a ligação do agonista ao seu respectivo TLR, uma cascata de sinalização é ativada e culmina na ativação do complexo protéico I κ B kinase (IKK). Este complexo ativado fosforila I κ B- α , levando à sua ubiquitinação e degradação no proteossoma, permitindo a translocação de NF- κ B para o núcleo, onde regulará a transcrição de diversos genes alvos responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias (Moynagh, 2005; Skaug *et al.*, 2009). Esta ativação acontece em todos TLRs, com exceção do TLR3, a partir de uma cascata de sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88. No caso de TLR3 e TLR4 (além de MyD88) a ativação de NF- κ B ocorre por uma via independente de MyD88 e dependente da molécula TRIF e parece ser retardada em relação ativação dependente de MyD88 (Kawai *et al.* 2001). Corroborando o que é descrito pela literatura, nossos resultados demonstraram que a estimulação de todos TLRs pelos seus respectivos agonistas, leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B, o que pode ser visualizado na Figura 5 pelo desaparecimento da banda correspondente à proteína I κ B- α .

5.3 Efeito dos sobrenadantes de macrófagos na AICD do hibridoma de linfócitos T DO11.10

Após constatarmos que os TLRs estavam sendo expressos de maneira funcional nas células J774 e BMDM, a próxima etapa foi testar a premissa básica do presente projeto, que é avaliar a influência do sobrenadante de macrófagos estimulados com agonistas de TLRs na AICD do hibridoma DO11.10.

Sinais de perigo, tais com padrões moleculares associados à patógenos ou mediadores inflamatórios são reconhecidamente necessários para induzir a expansão clonal e diferenciação de linfócitos T antígeno-específicos em células efectoras capazes de conferir imunidade ao indivíduo. Essa participação ocorre, uma vez que APCs estimuladas por patógenos via receptores do tipo Toll, aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras em sua superfície e produzem fatores solúveis, como citocinas e quimiocinas, que são importantes na ativação, supressão e polarização de linfócitos T (Pasare e Medzhitov, 2005).

O papel dos TLRs na sobrevivência de células do sistema imune tem sido motivo de grandes discussões na literatura. A sinalização via TLRs, além de promover a ativação de diversos genes pró-inflamatórios, pode ainda aumentar a expressão de genes envolvidos no aumento da sobrevivência das células estimuladas (Doyle e O'Neill, 2006). De outra maneira, TRIF, uma molécula adaptadora envolvida na sinalização de TLR3 e TLR4 parece ter um papel crítico na apoptose de macrófagos infectados (Ruckdeschel *et al.*, 2004). Ainda, a estimulação de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) com LPS e CpG induz tanto o aumento da molécula pró-apoptótica Bim, quanto de proteínas pró-apoptóticas com Bcl-xl e Mcl-1, sugerindo uma interação entre a ativação dos TLRs e a morte celular programada (Chen, *et al.*, 2007). Finalmente, Gelman *et al* (2004) demonstraram o efeito direto dos TLRs, uma vez que ligantes de TLR3 e TLR9 podem agir diretamente em células T CD4 aumentando sua sobrevivência. Em suma, a literatura mostra o envolvimento de receptores do tipo toll na morte das próprias células que estão sendo estimuladas, não fazendo grandes relações entre o estímulo destes receptores e a sobrevivência de outras células do sistema imune.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou a ação indireta de TLR na sobrevivência de linfócitos T, através da secreção de um fator solúvel liberado por APCs estimuladas com LPS, a prostaglandina E₂. Esse fator mostrou ter ação protetora sobre linfócitos T CD4⁺ que foram induzidos a morrer por AICD, uma vez que modula negativamente a expressão de FasL (Weinlich *et al.*, 2008).

Assim, nós fomos avaliar se outros ligantes de TLRs poderiam também modular a morte por apoptose de linfócitos DO11.10 estimulados com anticorpo anti-CD3. Para tanto, sobrenadantes de cultura de células J774 ou de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) estimulados com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS, Flagelina, Imiquimod ou CpG, agonistas de TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9, respectivamente, foram adicionados à cultura do hibridoma DO11.10 durante o estímulo indutor de AICD e a morte foi avaliada. Nós verificamos que o sobrenadante da cultura de células J774 não estimuladas é capaz de inibir a morte do hibridoma de linfócito T CD4 de maneira basal, resultado que é altamente potencializado quando o hibridoma é incubado com o sobrenadante de J774 estimulada com todos agonistas utilizados (Figura 10). O sobrenadante produzido por BMDM, por outro lado, só é hábil em inibir a AICD de células DO11.10, quando os macrófagos são estimulados com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS e Imiquimod, enquanto que a incubação com flagelina e CpG DNA não conseguiu gerar um sobrenadante que modulasse a morte do hibridoma (Figura 11). Em 2009, foi publicada uma revisão que apontou a importância em se usar mais de uma metodologia para mensurar a morte ou apoptose das células (Kroemer *et al.*, 2009), sendo assim, optamos por utilizar duas diferentes técnicas bastante usadas na análise da apoptose das células DO11.10. A primeira técnica foi realizada após 16 horas do estímulo com anti-CD3 e apresenta como resultado a percentagem de núcleos hipodiplóides, após a lise da célula e coloração do DNA com uma solução hipotônica fluorescente (HFS). A segunda metodologia foi realizada através da marcação das células com AnexinaV,/PI após 12h de estímulo indutor da AICD. A anexina se liga a resíduos de fosfatidilserina expostos após a célula entrar em apoptose, enquanto que o PI se intercala no DNA de células que já sofreram lise da membrana celular, portanto, células que morreram por necrose ou que se encontram em um estado de necrose secundária.

É importante comentar que como controle foi analisado a morte dos macrófagos após a incubação com os agonistas e constatado que nenhum dos tratamentos, independente da dose utilizada, foi capaz de induzir morte na linhagem J774 ou em BMDM. Este controle garantiu que o número de células vivas secretando as diversas substâncias era o mesmo sob qualquer tipo de estímulo (Figura 9).

Para garantir que a proteção obtida não se dava pela ação direta dos agonistas de TLRs em células DO11.10, que poderiam estar sendo carregados pelo sobrenadante dos macrófagos estimulados, o hibridoma foi incubado diretamente com os agonistas e a morte foi avaliada. Os estímulos com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS e Flagelina não promoveram alteração na taxa de apoptose do hibridoma DO11.10, enquanto que o estímulo com imiquimod promoveu uma redução significativa na taxa de apoptose destas células (Figura 13). Uma vez que o sobrenadante de macrófagos estimulados com imiquimod é capaz de inibir de forma muito mais potente a AICD de células DO11.10 do que quando incubado diretamente com o hibridoma, acreditamos que, se o estímulo estiver realmente sendo carregado, a proteção da morte obtida com o sobrenadante de macrófagos é resultado, portanto, da soma do efeito direto e indireto de imiquimod sobre a AICD do hibridoma DO11.10.

Sendo assim, estes resultados demonstraram que sinais de perigo reconhecidos por TLRs, como LPS, entre outros, não são importantes somente para aumentar moléculas co-estimulatórias 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 sobrevivência destas células.

Weinlich *et al.*, (2008) demonstraram que, a estimulação de TLR4/MyD88 via LPS ativa a expressão de COX-2, controlada pela ativação de NF-κB, e subsequente síntese de PGE₂, que previne a morte por AICD dos linfócitos T. Dessa maneira, é importante lembrar que foi constatada a ativação de NF-κB em J774 e BMDM estimuladas com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS, Flagelina, Imiquimod e CpG DNA (Figura 8) e que esta ativação é, portanto, de extrema importância para a produção de um fator capaz de inibir a morte. O fato de todos agonistas ativarem NF-κB abriu a possibilidade de que a PGE₂

poderia ser a responsável pela redução da AICD, e portanto, o próximo passo foi avaliar esta hipótese. Para isso verificamos se os agonistas utilizados induziam a expressão de ciclooxygenase-2 (COX-2), proteína que participa do metabolismo do ácido araquidônico, convertendo-o em prostaglandinas e, diferentemente da COX-1, é induzível, sendo responsável pelos picos de produção de prostaglandinas nos sítios inflamatórios (Feng *et al.*, 1993).

Na literatura é possível encontrar resultados positivos de expressão de COX-2 em diversos tipos celulares após 3 à 24h de estímulos (Eun *et al.*, 2009; Eun *et al.*, 2010; You *et al.*, 2010). Dessa forma, realizamos uma cinética de incubação dos macrófagos com os diferentes estímulos, coletamos amostras de células após 4, 8, 12 e 24h e avaliamos a expressão de COX-2 por *western blot*. No caso da J774, foi possível visualizar uma intensa ativação de COX-2 nas células estimuladas com LPS após 6h de incubação, com forte aumento na expressão de COX-2 após 24h de estímulo. O mesmo perfil, embora mais sutil, foi observado após o estímulo com imiquimod. Foi possível visualizar ativação de COX-2 nas J774 estimuladas Pam₃CSK₄ e CpG após 12h de estímulo com aumento na expressão após 24h. Diferentemente, o estímulo com Poly(I:C) levou a um pico de ativação de COX-2 após 12h, com diminuição após 24h. Finalmente, o estímulo de J774 com flagelina, agonista de TLR5, pareceu ser bastante fraco na indução de COX-2, sendo possível observar apenas uma fraca banda após 24h de incubação (Figura 14A).

Surpreendentemente, não observamos o mesmo resultado em BMDM estimuladas com ligantes de TLRs (Figura 14B). Apesar de comprovarmos a ativação de NF-κB após o estímulo destes macrófagos com todos agonistas utilizados, e de verificarmos que o seu sobrenadante, dependendo do estímulo utilizado, possui capacidade de inibir a morte por AICD do hibridoma DO11.10, a expressão de COX-2 após o estímulo de BMDMs com qualquer um dos ligantes não foi observada.

Estes resultados foram confirmados através da dosagem de PGE₂ no sobrenadante dos macrófagos estimulados com ligantes de TLRs. Nos sobrenadantes de J774 estimulados com todos agonistas foi possível detectar níveis de PGE₂, resultado esperado, uma vez que verificamos a atividade de COX-2 que nestas células. Nos sobrenadantes de BMDMs, entretanto, não foi possível detectar este mediador lipídico. Este resultado sugere fortemente o

envolvimento de outra molécula, que não a PGE₂ na proteção das células DO11.10 contra a AICD induzida por anticorpos anti-CD3.

O próximo passo foi entender o mecanismo envolvido na inibição da morte dos linfócitos T. Como comentado anteriormente, a principal via descrita de execução de morte por AICD em linfócitos T é dependente da interação da molécula FasL com seu receptor Fas (Brunner *et al.*, 1995). Quando isso ocorre, os receptores Fas 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 c-FLIP, uma molécula com alta homologia a caspase-8, porém sem atividade catalítica pode ser recrutado para o FADD durante a aglutinação de Fas, tornando-se inibidora do processo de ativação da cascata apoptótica (Irmiler *et al.*, 1997).

Portanto para que esta via resulte em morte, o recrutamento de c-FLIP para o complexo contendo Fas e FADD, denominado DISC, deve ser sensivelmente menor do que a caspase-8/-10. Após a ativação inicial das células T, os níveis de c-FLIP são fortemente aumentados (Kirchhoff *et al.*, 2000, Schmitz *et al.*, 2003), correlacionando-se com a resistência das células T recém ativadas à apoptose induzida via a ligação Fas/FasL. Em populações de células T expandidas, susceptíveis à AICD, por outro lado, os níveis de c-FLIP encontram-se diminuídos, sugerindo que c-FLIP possa ser uma molécula chave na regulação da morte por AICD (Fas *et al.*, 2006).

Como pode ser visto nas Figuras 16A e 17A, o estímulo das células DO11.10 com anti-CD3 não gerou nenhuma alteração nos níveis de c-FLIP. Tampouco a incubação do hibridoma estimulado com anti-CD3 com os sobrenadantes de J774 ou BMDM foi capaz de modular a expressão de c-FLIP, indicando que, neste modelo, a resistência à AICD não se dá pelo aumento de c-FLIP. Apesar de constitutivamente presente, foi possível enxergar um ligeiro aumento na expressão da molécula Fas após o estímulo das células DO11.10 com anti-CD3. Porém, não houve redução estatisticamente significativa desta expressão após a incubação do hibridoma com os diferentes sobrenadantes gerados por J774 ou BMDM, descartando a modulação transcricional de Fas como sendo o mecanismo de inibição da morte (Figura 16B e 17B).

Além da susceptibilidade ou resistência conferida pelos níveis de c-FLIP, o principal ponto de modulação da AICD é a expressão de FasL, que é regulada majoritariamente a nível transcripcional (Rafaeli *et al.*, 1998). Diversos grupos demonstraram que a interação dos anticorpos anti-CD3 com o complexo TCR/CD3 na superfície dos linfócitos T desencadeia vias de sinalização, que culminam na expressão de FasL (Alderson *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995).

A expressão de FasL foi fortemente induzida nos hibridomas DO11.10 após estimulação do TCR/CD3. O sobrenadante de ambos macrófagos não estimuladas foi capaz de reduzir parcialmente esta expressão. Em J774 este efeito foi bastante potencializado quando os diferentes agonistas de TLRs foram adicionados à cultura durante a geração do sobrenadante (Figura 16C). Entretanto, os sobrenadantes de BMDM só tiveram efeito inibidor da expressão de FasL quando os agonistas adicionados a cultura foram Pam3CSK4, Poly(I:C), LPS e Imiquimod (Figura 17C).

Estes resultados vem ao encontro do observado em relação a morte das células DO11.10, onde todos os sobrenadantes de J774 tem efeito protetor, enquanto que os sobrenadantes de BMDM estimuladas com Flagelina ou CpG não desempenham qualquer função na regulação da apoptose do hibridoma de linfócitos T. Logo, podemos sugerir que a regulação transcripcional de FasL é um dos mecanismos envolvidos na inibição da morte do hibridoma DO11.10.

Dados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a estimulação via TCR/CD3 de diversos hibridomas de linfócito T CD4⁺, não só modula positivamente a expressão de FasL, como também pode induzir a expressão de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*), uma citocina que desempenha importante papel na inflamação, apoptose e durante diversos processos biológicos (Tracey J, *et al.*, 1993). Esta citocina pode se ligar a dois diferentes receptores, denominados TNFR1 (*TNF Receptor Type 1*) e TNFR2 (*TNF Receptor Type 2*). Enquanto a ligação de TNF- α ao TNFR2 transduz um sinal pró-inflamatório e anti-apoptótico, a ligação ao TNFR1 pode igualmente gerar uma sinalização pró-inflamatória ou pode ativar uma cascata de sinalização, através do recrutamento de FADD, que culmina na ativação de caspase-8 e na morte da célula por apoptose (Idriss H e Naismith J, 2000). Uma vez que os hibridomas estimulados com anti-CD3, além de possuírem aumento na expressão de TNF-

α , apresentam maior porcentagem de apoptose, é possível que a morte destas células pudesse estar sendo mediada por TNF- α , além de FasL.

Desta forma, resolvemos investigar se ocorre uma regulação negativa da expressão de TNF- α em DO11.10 estimuladas com anticorpos anti-CD3 quando incubadas com os diferentes sobrenadantes produzidos pelos macrófagos. Como esperado, a incubação do hibridoma de linfócitos T com anti-CD3 aumentou a expressão gênica de TNF- α . Estranhamente, a adição do sobrenadante de J774 sem estímulo aumentou ainda mais esta expressão. Por outro lado, a incubação com os sobrenadantes derivados de células J774 ou BMDMs estimuladas somente com LPS e Imiquimod foi capaz de reverter levemente esta expressão (Figura 18). Uma vez que os sobrenadantes produzidos na presença de LPS e imiquimod são os que demonstram maior capacidade de inibir a AICD das células DO11.10, e já que estes mesmos sobrenadantes mostraram capacidade de reduzir a expressão de TNF- α , podemos sugerir uma participação conjunta das moléculas FasL e TNF- α na morte de células DO11.10 e a sua regulação como um dos meios envolvidos na regulação da apoptose destas células.

5.4 Efeito do sobrenadantes de macrófagos na expressão de FasL e AICD de linfócitos T primários

Para validar os dados encontrados com o hibridoma de linfócitos T DO11.10, os principais experimentos foram realizados em células obtidas de baços de camundongos.

Assim, os primeiros resultados obtidos com células primárias apresentam a padronização de um protocolo ótimo para a geração de blastos de linfócitos T CD4⁺, demonstrando a análise da pureza e a caracterização fenotípica das células obtidas, além dos resultados de indução de AICD e expressão de FasL nestas células.

Verificamos que aproximadamente 95% da população de células vivas foram positivas para CD4 e então consideradas blastos de linfócitos T CD4⁺ (Figura 19A). Para indução de AICD, as células foram estimuladas durante 8h com anticorpos anti-CD3. A apoptose foi avaliada através da marcação com

AnexinaV/PI e HFS, sendo que as duas técnicas apontaram para um aumento na porcentagem de células mortas, quando comparadas com as células controle, acompanhado pelo aumento na expressão de FasL nestas células.

No que diz respeito ao efeito dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com agonistas de TLRs, os dados encontrados em linfócitos T primários foram um pouco diferentes. Apesar do sobrenadante de macrófagos J774 não estimulados não reduzir a expressão de FasL nos linfócitos T primários, a adição de todos os agonistas de TLRs tornou o sobrenadante hábil em reduzir a porcentagem de células expressando FasL, quando comparadas com as células somente estimuladas com anti-CD3 (Figura 20A). O mesmo resultado foi refletido na análise da morte dos linfócitos T primários, analisada por marcação com AnexinaV/PI (Figura 21A). No gráfico em barras foram plotadas as porcentagens de células simples positivas (marcadas somente com AnexinaV) somadas às células duplo positivas (marcadas com AnexinaV e PI).

Os sobrenadantes de BMDM, por outro lado, agiram diferentemente nos linfócitos T primários, quando comparamos sua ação no hibridoma de linfócitos T. Apesar dos sobrenadantes de BMDM estimulados com Flagelina e CpG não desempenharem função reguladora da AICD no hibridoma DO11.10, eles adquirem capacidade de modular a expressão de FasL nos linfócitos T primários, bem como os sobrenadantes gerados após o estímulo com Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS e Imiquimod (Figura 20B). Porém, ao analisarmos a morte destas células, verificamos que somente os sobrenadantes produzidos na presença de LPS, Flagelina e Imiquimod foram capazes de reduzir a porcentagem de células AnexinaV/PI positivas (Figura 21B).

Levando em consideração os resultados apresentados, juntamente com os dados descritos na literatura, é possível propor um novo mecanismo mediado por células apresentadoras de antígenos que contribui para diferenciar entre a ativação de linfócitos T antígeno-específico em condições infecciosas e em condições assépticas. Esta distinção seria realizada pela percepção dos patógenos ou sinais de perigo pelas APCs através dos TLRs. Este reconhecimento resultaria, através da produção de fatores solúveis, no prolongamento da vida dos linfócitos T CD4⁺ específicos durante a persistência do patógeno. De outra forma, a ausência dos sinais de perigo durante o reconhecimento de auto-antígenos implicaria na morte precoce tanto dos

linfócitos T, quanto das APCs, ajudando a manter a tolerância ao próprio.

6 CONCLUSÕES

- A linhagem macrófagica J774 expressa RNAm de todos os Toll-like receptors, com excessão do TLR11, sendo que TLR2 foi o receptor que apresentou maior expressão, seguido do TLR7 e dos TLRs 1, 3, 4, 5 e 6
- Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) expressam RNAm de todos os Toll-like receptors, com excessão do TLR11, sendo que TLR7 é o mais expresso, seguido dos TLRs1, 2, 4, 6 e 8 que são estatisticamente semelhantes.
- A linhagem macrófagica J774 e os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) expressam as proteínas TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 funcionalmente, uma vez que NF- κ B é ativado quando os macrófagos são estimulados por agonistas de TLRs;
- O sobrenadante de cultura da linhagem macrófagica J774 possui capacidade de inibir a morte de hibridomas DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3;
- A adição de Pam₃CSK₄, Poly(I:C), LPS, flagelina, imiquimod e CpG DNA na cultura de J774 aumenta a produção do fator inibidor, potencializando os efeitos dos sobrenadantes sobre a AICD em hibridomas DO11.10;
- O sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) estimulados com Pam₃CSK₄, Poly I:C, LPS e imiquimod possui capacidade de inibir a morte de hibridomas DO11.10 induzida por anticorpos anti-CD3;
- A prostaglandina E₂ é um dos fatores relacionados com a inibição da morte conferida pelo sobrenadante de J774 estimuladas com agonistas de TLRs.

- Outros fatores solúveis estão presentes no sobrenadante de BMDM, e possivelmente no de J774, estimuladas com ligantes de TLRs, uma vez que a PGE₂ não foi detectada em cultura de BMDMs.
- Os sobrenadantes de J774 estimuladas com todos agonistas de TLRs e BMDMs estimuladas com Pam₃CSK₄, Poly I:C, LPS e imiquimod não alteram significativamente os níveis de expressão de FLIP e Fas, porém inibem transcripcionalmente a expressão de FasL.
- Os sobrenadantes de J774 e BMDMs estimuladas com LPS e Imiquimod também desempenham efeito regulador da expressão dos níveis de RNAm de TNF.
- Os sobrenadantes de J774 e BMDMs estimuladas com todos agonistas de TLRs reduzem significativamente a expressão protéica de FasL em linfócitos T CD4⁺ primários estimulados com anticorpos anti-CD3.

REFERÊNCIAS*

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, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. 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.

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

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

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

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

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

Bentele M, Lavrik I, Ulrich M, Stösser S, Heermann DW, Kalthoff H, Krammer PH, Eils R. Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2004 Sep 13;166(6):839-51.

Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009 Feb 12;113(7):1399-407.
Boyton RJ, Altmann DM. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):526-9.

Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jan;6(1):33-43.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, 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.

Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol.* 2006 Oct;7(10):1074-81.

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

Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4360-7.

Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):400-8.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995 May 19;81(4):505-12.

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.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 Aug 15;326 (1):1-16.

D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C. 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.

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

Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1102-13.

Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002 Jul;39(2):75-90.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. 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.

Dzialo-Hatton R, Milbrandt J, Hockett RD Jr, Weaver CT. Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. *J Immunol.* 2001 Apr 1;166(7):4534-42.

Fas SC, Baumann S, Krueger A, Frey CR, Schulze-Bergkamen H, Brenner D, Stumpf C, Kappes K, Krammer PH. In vitro generated human memory-like T cells are CD95 type II cells and resistant towards CD95-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 2006 Nov;36(11):2894-903.

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

Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:9-25.

Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):6065-73.

Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):231-9.

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.

Gourley TS, Chang CH. Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol.* 2001 Mar 1;166(5):2917-21.

Han EH, Kim JY, Kim HG, Choi JH, Im JH, Woo ER, Jeong HG. Dihydro-N-caffeoyltyramine down-regulates cyclooxygenase-2 expression by inhibiting the activities of C/EBP and AP-1 transcription factors. *Food Chem Toxicol.* 2010 Feb;48(2):579-86.

Han EH, Park JH, Kang KW, Jeong TC, Kim HS, Jeong HG. Risk assessment of tetrabromobisphenol A on cyclooxygenase-2 expression via MAP kinase/NF-kappaB/AP-1 signaling pathways in murine macrophages. *J Toxicol Environ Health A.* 2009;72(21-22):1431-8.

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.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 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, Marrack P. 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.

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.

Huang AY, 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.

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, Davis LS, Mohan C, Perlman H. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):206-17.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Ishiwatari-Hayasaka H, Kawashima H, Osawa T, Nagata S, Miyasaka M. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors. *Int Immunol*. 1997 Apr;9(4):627-35.

Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, Masunaga A, Ogawa Y, Oguchi K, Miyazaki A. 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.

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

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

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, 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.

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

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. 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.

Kirchhoff S, Müller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6293-300.

Kirchhoff S, Sebens T, Baumann S, Krueger A, Zawatzky R, Li-Weber M, Meinel E, Neipel F, Fleckenstein B, Krammer PH. Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1226-34.

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

Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003 Aug;15(4):396-401.

Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999 Feb;11(1):13-8.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000 Dec;7(12):1166-73.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):789-95.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.

Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001 Jul;31(7):2154-63.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 30;388(4):621-5. Epub 2009 Aug 15.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):398-401.

Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J Immunol.* 1997 May 15;158(10):4602-11.

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.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996 Sep 20;86(6):973-83.

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.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):479-89.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 1999 Nov 19;274(47):33419-25.

Liu Y, Janeway CA Jr. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3845-9.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):481-90.

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.

Matsui K, Xiao S, Fine A, Ju ST. Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine *fasl* promoter. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3002-8.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):819-26.

Melino G, Bernassola F, Catani MV, Rossi A, Corazzari M, Sabatini S, Vilbois F, Green DR. Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9):2377-83.

Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, Strom TB, Kuchroo VK. 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.

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.

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

Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*. 2005 Sep;26(9):469-76.

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.

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997 Nov 28;278(5343):1612-5.

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

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1449-56.

Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;23(9):672-6.

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.

Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun*. 2004 Mar;72(3):1657-65.

Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol*. 1996 Oct 1;157(7):2909-15.

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

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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13671-6.

Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):370-83.

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.

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.

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

Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)*. 2005 Nov 29;2:16.

Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):2037-51.

Rosen A, Casciola-Rosen L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem*. 1997 Jan;64(1):50-4.

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.

Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Häcker G, Holzmann B, Heesemann J. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not

MyD88, in bacteria-infected murine macrophages *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3320-8.

Schmitz I, Krueger A, Baumann S, Schulze-Bergkamen H, Krammer PH, Kirchhoff S. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol.* 2003 Sep 15;171(6):2930-6.

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001 Oct;2(10):947-50.

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.

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.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999 Jun 7;189(11):1777-82.

Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor-kappaB through toll-like receptors 1 and 2. *Immunology.* 2007 Aug;121(4):473-83.

Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:769-96.

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

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.

Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, Choisy-Rossi CM, Stonebraker AC, Beighton RA, Hartig H, Sundberg JP, Servick S, Kaufmann G, Fink PJ, Chervonsky AV. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity.* 2007 May;26(5):629-41.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009 Feb 20;30(2):180-92.

Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):610-5.

Suhara T, Kim HS, Kirshenbaum LA, Walsh K. Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol.* 2002 Jan;22(2):680-91.

Sutmuller RP, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* 2006 Aug;27(8):387-93.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76. Epub 2001 Dec 19.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005 Jan;17(1):1-14.

Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S. 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.

Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* 1998 Jan;4(1):31-6.

Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):50-8.

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.

Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol.* 1998 Oct;10(5):552-8.

Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* 1996 Mar;4(3):321-8.

Villalba M, Kasibhatla S, Genestier L, Mahboubi A, Green DR, Altman A. Protein kinase ctheta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):5813-9.

Villunger A, Ghaffari-Tabrizi N, Tinhofer I, Krumböck N, Bauer B, Schneider T, Kasibhatla S, Greil R, Baier-Bitterlich G, Uberall F, Green DR, Baier G. Synergistic action of protein kinase C theta and calcineurin is sufficient for Fas ligand expression and induction of a crmA-sensitive apoptosis pathway in Jurkat T cells. *Eur J Immunol.* 1999 Nov;29(11):3549-61.

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

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.

Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, Russo M, Amarante-Mendes GP. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ*. 2008 Dec;15(12):1901-9.

Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):798-815.

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 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.

Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*. 2003 Aug 7;424(6949):643-50.

Lee YJ, Park SY, Kim SG, Park da J, Kang JS, Lee SJ, Yoon S, Kim YH, Bae YS, Choi YW. Identification of a novel compound that inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages from *Schisandra chinensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 22;391(4):1687-92.

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.

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1522-6.

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](#)