

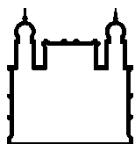
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Modulação da ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  por mediadores lipídicos:  
papel de leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> e lipoxina A<sub>4</sub>**

**CATARINA BASTOS TRIGO DE NEGREIROS**

**Rio de Janeiro  
Julho/2015**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**CATARINA BASTOS TRIGO DE NEGREIROS**

**Modulação da ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  por mediadores lipídicos:  
papel de leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> e lipoxina A<sub>4</sub>**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora:** Dra. Carmen Penido

**RIO DE JANEIRO**

**Julho/2015**

ii

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

N385 Negreiros, Catarina Bastos Trigo de

Modulação da ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  por mediadores lipídicos: papel de leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> e lipoxina A<sub>4</sub> / Catarina Bastos Trigo de Negreiros. – Rio de Janeiro, 2015.

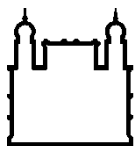
xvi, 90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 69-90

1. Linfócitos T  $\gamma\delta$ . 2. Mediadores lipídicos. 3. Câncer. 4. Inflamação.  
I. Título.

CDD 616.079



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*AUTOR: Catarina Bastos Trigo de Negreiros*

### **Modulação da ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ por mediadores lipídicos: papel de leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> e lipoxina A<sub>4</sub>**

**ORIENTADORA:** Dr<sup>a</sup>. Carmen Penido

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Andréa Henriques Pons (IOC) - **Presidente**

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (IOC)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Cláudio de Azevedo Cannetti (UFRJ)

**Prof. Dr.** Fausto Klabund Ferraris (INCQS) - **Revisor**

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Elaine Cruz Rosas (Farmanguinhos)

Rio de Janeiro, 3 de Julho de 2015

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me proporcionaram condições para que eu alcançasse meus objetivos, apoiando e incentivando meu trabalho. Obrigada pai e mãe, se hoje sou quem sou e cheguei até aqui foi graças a vocês.

Ao meu avô e minha avó, duas pessoas maravilhosas e generosas. Muito obrigada pela preocupação, incentivo e principalmente pelo carinho.

Ao meu irmão, que está diretamente envolvido na minha formação desde o início de nossas vidas, me ensinando a falar e a escrever e pelo ânimo nos momentos difíceis. À minha irmã, que me tem como exemplo, por mesmo de longe me incentivar, muitas vezes sem a consciência disso, me dando todo o seu carinho.

A quem hoje é o motivo da minha felicidade diária, Pedro De Leo Araujo, por me fazer feliz até nos momentos de maior desespero. Obrigada pelo companheirismo, carinho, força, pela tolerância e pela paciência de sempre. Obrigada por compartilhar todos os momentos, bons ou maus, ao meu lado, dedico grande parte dessa história a você.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Carmen Penido, obrigada pela confiança, pelas conversas, pelo aprendizado, pela atenção na correção de trabalhos, apresentações orais, discussão de resultados e artigos. Sou muito grata por tudo e devo meu crescimento acadêmico a você.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Maria Fernanda Costa Silva por tudo. Muito obrigada pelas dicas nos experimentos e por me ensinar tanta coisa.

Às Dr<sup>as</sup> Andrea Pons e Cíntia Cascabulho do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos pelo *kit* para realização do ensaio de dosagem de granzima B.

À Dr<sup>a</sup> Mariana Conceição de Souza do Laboratório de Farmacologia Aplicada pela doação da lipoxina A<sub>4</sub>.

Ao Msc Victor Ugarte Bornstein do *Icahn School of Medicine at Mount Sinai* pelo aprendizado e paciência durante o início da minha iniciação científica.

Ao Dr. Cláudio Canetti do Laboratório de Inflamação e Câncer da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela doação das células de linhagem tumoral de melanoma

B16F10 e pelo empréstimo do laboratório para realização dos experimentos *in vivo* com animais *knockouts* para 5-lipoxigenase

À Dr<sup>a</sup> Maria das Graças Henriques por me aceitar no seu laboratório e permitir que eu dê continuidade à minha formação.

À minha amiga irmã Mariana Martins Fernandes, por ser minha parceira de todas as horas e que mesmo distante consegue me fazer levantar e seguir em frente.

Ao meu amigo Kevin Sullivan, pela parceria quase diária. Obrigada por me ouvir, me apoiar, me aconselhar e por me fazer rir nos momentos mais difíceis. Seu apoio é muito importante para mim.

Às minhas amigas, Caroline Moutinho, Marcella Castello Branco, Sarah Galvão, Thatiana Maia e Maria La Croix por serem amigas inseparáveis que me apoiam em todos os momentos e em qualquer situação.

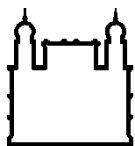
Ao MSc Thadeu Costa pelo importante auxílio em longos experimentos. Muito obrigada pela paciência e pela companhia.

À Luana Barbosa Correa pela ajuda mais que essencial na elaboração deste trabalho. Você foi um anjo que caiu do céu para me acalmar no momento mais difícil ao longo dessa jornada. Muito obrigada.

À Amanda Rotay e Layssa Zeitune pelo auxílio nos experimentos *in vivo*.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas do Laboratório de Farmacologia Aplicada que também fazem parte desse trabalho. Tatiana Almeida Pádua, Magaiver Andrade, Leonardo Seito, André Candéia, André Sales, Perla Villani, Fátima Vergara e à equipe do biotério, Suellen e André. Às parceiras de mestrado Katelim Hottz e Natália Torres. Muito obrigado por tudo, cada um de vocês contribuiu de alguma forma para o meu crescimento acadêmico.

Ao auxílio financeiro fornecido pela CAPES, CNPq e FAPERJ e FIOCRUZ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

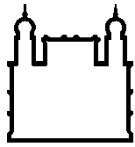
Modulação da ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  por mediadores lipídicos:  
papel do leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> e lipoxina A<sub>4</sub>

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Catarina Bastos Trigo de Negreiros

Os linfócitos T  $\gamma\delta$  constituem um subtipo de linfócitos T não convencional, capazes de reconhecer antígenos de forma independente de MHC, que apresentam uma importante atividade citotóxica. Os linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos são altamente ativados pelo reconhecimento direto de metabólitos fosforilados, tal como o isopentenil pirofosfato (IPP), produzidos por células tumorais e infectadas. Além disso, mediadores inflamatórios, como eicosanóides, são capazes de modular a resposta destes linfócitos. Dados prévios do nosso laboratório demonstram que o acúmulo tecidual de linfócitos T  $\gamma\delta$  em diferentes modelos experimentais murinos é coordenado pelo mediador lipídico leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), cuja produção aumenta no tecido durante a resposta inflamatória, o que ocorre em paralelo à expressão do seu contra-receptor BLT1 na membrana dos linfócitos T  $\gamma\delta$ . Em adição, dados da literatura demonstram que a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) inibe a atividade citotóxica de linfócitos T  $\gamma\delta$  contra tumores. Desta forma, considerando que LTB<sub>4</sub> é capaz de estimular linfócitos T, enquanto a PGE<sub>2</sub> e o mediador pró-resolutivo lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) são capazes de inibir a ativação de linfócitos, o objetivo deste projeto foi estudar o papel dos mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> na ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$ . Nós observamos que linfócitos T  $\gamma\delta$  expressam receptores BLT1, EP4 e FPR2/ALX funcionais e que têm sua expressão aumentada após estímulo com IPP. Além disso, o LTB<sub>4</sub> levou à ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  induzindo: *i*) a quimiotaxia *in vitro*, *ii*) reduzindo a expressão de L-selectina (CD62L) e *iii*) a polarização para a produção de IFN- $\gamma$  (aumento da população TCR  $\gamma\delta$ /CD27<sup>+</sup>). O estímulo com LTB<sub>4</sub> também potencializou a liberação de granzima B e expressão do marcador de degranulação CD107a induzido por IPP em linfócitos T  $\gamma\delta$ . Por outro lado, a PGE<sub>2</sub> inibiu o aumento da expressão de CD25 e a diminuição da expressão de L-selectina induzida por IPP, e induziu um aumento na população de linfócitos TCR  $\gamma\delta$ /CCR6<sup>+</sup> (produtores de IL-17). Ainda, o tratamento de linfócitos T  $\gamma\delta$  com PGE<sub>2</sub> foi capaz de inibir a degranulação destas células (liberação de granzima B e expressão de CD107a). Os efeitos induzidos pela LXA<sub>4</sub> sobre os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram tênues, sendo mais evidentes sobre a ativação induzida por LTB<sub>4</sub> (e não por IPP), incluindo a inibição da migração e da degranulação induzida pelo LTB<sub>4</sub>, assim como a expressão de CD25. De forma interessante, observamos que camundongos deficientes de 5-lipoxigenase (5-LO; que não produzem LXA<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub>) submetidos ao modelo de metástase tumoral induzida pela injeção intravenosa da linhagem tumoral de melanoma B16F10 apresentaram mais IL-17 e menos IFN- $\gamma$  nos pulmões metastáticos do que camundongos selvagens. Este fenômeno ocorreu em paralelo ao maior número de grânulos tumorais. Nossos dados indicam que o LTB<sub>4</sub> potencializa e a PGE<sub>2</sub> inibe a ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$ , sugerindo um papel destes mediadores na atividade destas células.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Modulation of $\gamma\delta$ T lymphocyte activation by lipid mediators: role of leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and lipoxin**

#### **ABSTRACT**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Catarina Bastos Trigo de Negreiros**

$\gamma\delta$  T lymphocytes constitute an unconventional subtype of T lymphocytes that are capable to recognize antigens independently of MHC and present an important cytotoxic activity. Human  $\gamma\delta$  T lymphocytes are highly activated by direct recognition of phosphorylated metabolites such as isopentenyl pyrophosphate (IPP) produced by tumors and infected cells. In addition, these lymphocytes can be modulated by inflammatory mediators, such as eicosanoids. Previous data from our laboratory show that, in different experimental models,  $\gamma\delta$  T cell accumulation in inflamed tissue is coordinated by the lipid mediator leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), which levels increase in parallel to the expression of its counter-receptor BLT1 by  $\gamma\delta$  T lymphocytes. In addition, published data show that prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) inhibits  $\gamma\delta$  T lymphocyte cytotoxic activity against tumor cells. Considering that LTB<sub>4</sub> is known to stimulate T lymphocyte functions, whereas PGE<sub>2</sub> and the pro-resolving lipid mediator lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) downmodulate T lymphocyte activation, the aim of the present study was to investigate the role of these lipid mediators on  $\gamma\delta$  T lymphocyte activation. We observed that  $\gamma\delta$  T lymphocyte express functional BLT1, EP4 and FPR2/ALX receptors, which in turn are upregulated by IPP stimulation. Furthermore, LTB<sub>4</sub> induced  $\gamma\delta$  T cell activation, by triggering *i*) *in vitro* chemotaxis, *ii*) downmodulation of L-selectin (CD62L) and *iii*) polarization of IFN- $\gamma$  production (increase of  $\gamma\delta$ /CD27<sup>+</sup> population). LTB<sub>4</sub> stimulation also enhanced IPP-induced release of granzyme B and expression of the degranulation marker CD107a by  $\gamma\delta$  T lymphocytes. Furthermore, PGE<sub>2</sub> inhibited IPP (and LTB<sub>4</sub>)-induced CD25 expression and L-selectin shedding, as well as increased of  $\gamma\delta$ /CCR6<sup>+</sup> population (IL-17 producers). Moreover, PGE<sub>2</sub> inhibited  $\gamma\delta$  T cell CD107a expression and release of granzyme B through degranulation. The effect of LXA<sub>4</sub> on  $\gamma\delta$  T lymphocyte activation was mild, being more prominent on LTB<sub>4</sub> (but not IPP)-induced activation. LXA<sub>4</sub> impaired LTB<sub>4</sub>-induced migration and degranulation, as well as CD25 expression. Interestingly, intravenous injection of the melanoma tumor cell line B16F10 in 5-lipoxygenase (5-LO) deficient mice (which do not produce LXA<sub>4</sub> and LTB<sub>4</sub>) induced higher levels of IL-17 and lower levels of IFN- $\gamma$  in metastatic lungs compared to wild type mice. This phenomenon occurred in tandem with the increased number of tumor granules. Our data indicate that LTB<sub>4</sub> enhances, whereas PGE<sub>2</sub> inhibits, the activation of  $\gamma\delta$  T cells, suggesting a role for these mediators in the modulation of their activity.



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| ABSTRACT  | VIII      |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Desenvolvimento e Distribuição dos linfócitos T <math>\gamma\delta</math></b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Subtipos de linfócitos T $\gamma\delta$   | 2         |
| <b>1.2 Reconhecimento de antígenos e atividade citotóxica de linfócitos T <math>\gamma\delta</math></b>                     | <b>5</b>  |
| <b>1.3 Linfócitos T <math>\gamma\delta</math> e a resposta inflamatória</b>   | <b>8</b>  |
| 1.3.1 Migração e ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ por mediadores<br>inflamatórios                                    | 9         |
| 1.3.2 Subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ : IL-17+ e IFN- $\gamma$ +   | 10        |
| <b>1.4 Leucotrieno B<sub>4</sub>, lipoxina A<sub>4</sub> e prostaglandina E<sub>2</sub>: sistema imune e<br/>    câncer</b> | <b>13</b> |
| 1.4.1 LTB <sub>4</sub>  | 15        |
| 1.4.2 LXA <sub>4</sub>  | 17        |
| 1.4.3 PGE <sub>2</sub>  | 19        |
| <b>2 OBJETIVOS</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.1 Objetivos específicos</b>  | <b>21</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.1 Expansão de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.2 Estímulo de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.3 Análise da viabilidade de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> <i>in vitro</i> por LDH</b>                         | <b>23</b> |
| <b>3.4 Animais</b>  | <b>23</b> |
| <b>3.5 Obtenção de células mononucleares murinas</b>  | <b>24</b> |
| <b>3.6 Isolamento magnético de linfócitos T <math>\gamma\delta</math></b>   | <b>24</b> |
| <b>3.7 Estímulo de linfócitos T murinos com anticorpo monoclonal <math>\alpha</math>-CD3</b>                                | <b>24</b> |
| <b>3.8 Imunofenotipagem e análise por citometria de fluxo</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.9 <i>Western blot</i></b>  | <b>25</b> |
| <b>3.10 Ensaio de influxo de cálcio</b>   | <b>26</b> |
| <b>3.11 Ensaio de quimiotaxia <i>in vitro</i></b>   | <b>26</b> |
| <b>3.12 Análise da atividade citotóxica de linfócitos T <math>\gamma\delta</math></b>                                       | <b>27</b> |
| <b>3.13 Cultura de células B16F10</b>   | <b>27</b> |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.14     | Ensaio de morte de células tumorais.....  | 28        |
| 3.15     | Modelo de metástase <i>in vivo</i> .....  | 28        |
| 3.16     | Obtenção das células do tecido pulmonar .....   | 29        |
| 3.17     | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....  | 30        |
| 3.18     | Análise Estatística.....  | 30        |
| 3.19     | Consideração sobre Aspectos Éticos .....  | 30        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>   | <b>31</b> |
| 4.1      | Padronização do protocolo de expansão de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos induzida por isopentenil pirofosfato (IPP) .....           | 31        |
| 4.1.1    | Efeito de diferentes concentrações de IPP.....  | 31        |
| 4.1.2    | Análise temporal.....   | 32        |
| 4.1.3    | Análise da viabilidade celular de linfócitos T $\gamma\delta$ após expansão .....   | 33        |
| 4.2      | Linfócitos T $\gamma\delta$ humanos expressam os receptores de mediadores lipídicos EP4, BLT1 e FPR2/ALX.....                           | 33        |
| 4.3      | LTB <sub>4</sub> , LXA <sub>4</sub> e PGE <sub>2</sub> não induzem morte de linfócitos T $\gamma\delta$ <i>in vitro</i> .....           | 35        |
| 4.4      | LTB <sub>4</sub> induz influxo de cálcio em linfócitos T $\gamma\delta$ <i>in vitro</i> .....   | 36        |
| 4.5      | LXA <sub>4</sub> induz influxo de cálcio em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos <i>in vitro</i> .....                                   | 38        |
| 4.6      | PGE <sub>2</sub> não induz influxo de cálcio em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos <i>in vitro</i> .....                               | 38        |
| 4.7      | PGE <sub>2</sub> e LXA <sub>4</sub> inibem a expressão de CD25 de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados com IPP.....             | 39        |
| 4.8      | LXA <sub>4</sub> modula a expressão de CD25 em linfócitos T $\gamma\delta$ murinos ativados com anticorpo $\alpha$ -CD3 .....           | 42        |
| 4.9      | PGE <sub>2</sub> mantém a expressão de L-selectina na superfície de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados.....                   | 43        |
| 4.10     | PGE <sub>2</sub> reverte à polarização para o perfil de produção de IFN- $\gamma$ em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados ..... | 46        |
| 4.11     | A expressão de EP4 aumenta de forma dose- e tempo-dependente em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados .....                      | 48        |
| 4.12     | A expressão de BLT1 aumenta em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos após ativação de forma dose- e tempo-dependente .....                | 50        |
| 4.13     | A expressão de BLT1 aumenta em linfócitos T $\gamma\delta$ murinos após ativação com $\alpha$ -CD3 mAb .....                            | 52        |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 4.14 | LTB <sub>4</sub> induz quimiotaxia de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos e LXA <sub>4</sub> inibe a migração induzida por LTB <sub>4</sub> através da regulação da expressão de BLT1 ..... | 52 |
| 4.15 | PGE <sub>2</sub> inibe e LTB <sub>4</sub> potencializa a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos induzida por IPP .....   | 54 |
| 4.16 | LTB <sub>4</sub> induz e PGE <sub>2</sub> inibe a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células tumorais B16F10 .....  | 56 |
| 4.17 | Animais deficientes de 5-LO apresentam aumento na produção de IL-17 e maior susceptibilidade ao tumor .....   | 59 |
| 5    | <b>DISCUSSÃO</b>  | 61 |
| 6    | <b>CONCLUSÃO</b>  | 67 |
| 7    | <b>REFERÊNCIAS</b>  | 69 |
| 8    | <b>ANEXO</b>  | 91 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1. 1: Desenvolvimento embrionário dos subtipos de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> e sua localização tecidual em camundongos. ....</b>                          | <b>4</b>  |
| <b>Figura 1. 2: Mecanismos de reconhecimento de célula tumoral por linfócitos T <math>\gamma\delta</math>. ....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>Figura 1. 3: Linfócitos T <math>\gamma\delta</math> IFN-<math>\gamma^+</math> e IL-17<math>^+</math>. ....</b>   | <b>12</b> |
| <b>Figura 1. 4: Geração de eicosanóides a partir do ácido araquidônico. ....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Figura 1. 5: Envolvimento de prostaglandinas e leucotrienos na indução e progressão do câncer.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Figura 3. 1: Exemplo de pulmão obtido de um camundongo C57BL/6 naíve e de um injetado com B16F10 (<math>2 \times 10^5</math> células i.v.), 14 dias após a injeção. ....</b> | <b>29</b> |
| <b>Figura 4. 1: Expansão de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos com diferentes concentrações de IPP.. ....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Figura 4. 2: Expansão de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos com 1, 7 e 14 dias de cultura.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>Figura 4. 3: Viabilidade de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos 14 dias após estimulação com IPP.. ....</b>   | <b>33</b> |
| <b>Figura 4. 4: Expressão dos receptores de superfície EP4, BLT1 e FPR2/ALX por linfócitos T <math>\gamma\delta</math>.. ....</b>   | <b>34</b> |
| <b>Figura 4. 5: Expressão dos receptores BLT1 e FPR2/ALX por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos por <i>western blot</i>.. ....</b>                                  | <b>35</b> |
| <b>Figura 4. 6: Influxo de cálcio induzido por LTB4 em linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos e murinos.. ....</b>  | <b>37</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 4. 7: Influxo de cálcio induzido por LXA4 em linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Figura 4. 8: Influxo de cálcio induzido por PGE2 em linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos.. ..</b>  | <b>39</b> |
| <b>Figura 4. 9: Efeito de LTB4, LXA4 e PGE2 na expressão de CD25 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos.....</b>                          | <b>41</b> |
| <b>Figura 4. 10: Efeito de LTB4 e LXA4 na expressão de CD25 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> murinos.. ..</b>                               | <b>43</b> |
| <b>Figura 4. 11: Efeito de LTB4, LXA4 e PGE2 sobre a expressão de CD62L por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos.....</b>                   | <b>45</b> |
| <b>Figura 4. 12: Efeito de LTB4, LXA4 e PGE2 sobre a expressão de CD27 e CCR6 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos.. ..</b>             | <b>47</b> |
| <b>Figura 4. 13: Efeito de LTB4, LXA4 e PGE2 sobre a expressão de CD27 e CCR6 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos. ....</b>            | <b>48</b> |
| <b>Figura 4. 14: Expressão de EP4 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos após ativação com IPP.. ..</b>                                   | <b>49</b> |
| <b>Figura 4. 15: Expressão de BLT1 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos após ativação com IPP. ....</b>                                 | <b>51</b> |
| <b>Figura 4. 16: Expressão de BLT1 por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> murinos após ativação. ....</b>   | <b>52</b> |
| <b>Figura 4. 17: Efeito de LTB4 e LXA4 na quimiotaxia in vitro de linfócitos T <math>\gamma\delta</math> e expressão de BLT1. ....</b>                | <b>53</b> |
| <b>Figura 4. 18: Efeito de LTB4 e LXA4 na liberação de granzima B e expressão membranar de CD107a por linfócitos T <math>\gamma\delta</math>.....</b> | <b>55</b> |
| <b>Figura 4. 19: Efeito de LTB4, PGE2 e LXA4 no <i>killing</i> de células B16F10 in vitro por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos.. ..</b> | <b>57</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 4. 20: Efeito de LTB4, PGE2 e LXA4 no <i>killing</i> de células B16F10 <i>in vitro</i> por linfócitos T <math>\gamma\delta</math> humanos. ....</b> | <b>58</b> |
| <b>Figura 4. 21: Animais 5-LO KO são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumor. ...</b>   | <b>60</b> |
| <b>Figura 6. 1: Modelo proposto baseado nas conclusões do trabalho.....</b>   | <b>68</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1. 1: Nomenclatura de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos e humanos.....3**

**Tabela 4. 1: Viabilidade celular de linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados.....36**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| AA:             | Ácido araquidônico  |
| APO-A1:         | Apopoliproteína-A1  |
| BCG:            | Bacillus Calmette-Guérin  |
| cAMP:           | Monofosfato cíclico de adenosina ( <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )                    |
| CCL:            | <i>C-C Chemokine ligand</i>   |
| CCR:            | Receptor de quimiocinas CC ( <i>CC chemokine receptor</i> )                                   |
| CD:             | Cluster of differentiation  |
| CLP:            | Ligação e perfuração do ceco ( <i>cecal ligation and puncture</i> )                           |
| COX:            | Ciclooxigenase  |
| cPLA2:          | Fosfolipase A2 citosólica   |
| CXCR:           | Receptor de quimiocinas CXC ( <i>CXC chemokine receptor</i> )                                 |
| CysLT:          | Cisteinil-leucotrieno   |
| DMEN:           | Meio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> )           |
| DNAM-1:         | DNAX Accessory Molecule-1   |
| ECL:            | Quimioluminescência melhorada ( <i>Enhanced chemiluminescence</i> )                           |
| FasL:           | Ligante de Fas  |
| FPR:            | Receptor formilpeptídeo ( <i>Formylpeptide receptor</i> )                                     |
| GPCR:           | Receptor associado à proteína G ( <i>G protein-coupled receptor</i> )                         |
| HBSS:           | Solução salina balanceada de Hank's ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )                  |
| HEPES:          | Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico   |
| HETE:           | Ácido-hidroxi-eicosatetraenóico   |
| HPETE:          | Hidroperoxi-eicosatetraenóico   |
| HSP:            | Proteínas de choque térmico ( <i>heat shock protein</i> )                                     |
| IFN- $\gamma$ : | Interferon- $\gamma$  |
| IL:             | Interleucina  |
| IPP:            | Isopentenil pirofosfato   |
| KO:             | <i>Knockout</i> (deficientes)   |
| LAMP-1:         | Proteína associada à membrana lisossomal 1 ( <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i> ) |
| LO:             | Lipoxigenase  |
| LPS:            | Lipopolissacarídeo  |



|                 |  |
|-----------------|--|
| LT:             | Leucotrieno  |
| LX:             | Lipoxina   |
| MHC:            | Complexo principal de histocompatibilidade ( <i>major histocompatibility complex</i> )             |
| MIC-A:          | Gene A relacionado à cadeia MHC de classe I ( <i>MHC class I chain-related gene A</i> )            |
| MIC-B:          | Gene B relacionado à cadeia MHC de classe I ( <i>MHC class I chain-related gene B</i> )            |
| MTOC:           | Centro organizador dos microtúbulos ( <i>microtubule-organizing center</i> )                       |
| NBP:            | Aminobifosfonatos  |
| NK:             | <i>Natural killer</i>  |
| OVA:            | Ovoalbumina  |
| PG:             | Prostaglandina   |
| TBST:           | Tampão salina tris com tween 20 ( <i>Tris buffered saline tween</i> )                              |
| TCR:            | Receptor de células T ( <i>T cell receptor</i> )   |
| Th:             | <i>T helper</i>  |
| TNF- $\alpha$ : | Factor de necrose tumoral- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )           |
| TRAIL:          | Ligante de indutor de apoptose relacionado ao TNF ( <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> ) |
| ULBP:           | Proteínas ligadoras de UL-16 ( <i>UL16-binding protein</i> )                                       |
| WT:             | <i>Wild type</i> (selvagens)   |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Desenvolvimento e Distribuição dos linfócitos T $\gamma\delta$

A descoberta da existência de quatro subunidades para o receptor de células T (TCR) por Saito e colaboradores (Saito *et al.*, 1984a; b) possibilitou a classificação dos linfócitos T de acordo com as subunidades de TCR expressas na superfície dessas células. O receptor de células T pode ser constituído por uma cadeia  $\alpha$  (alfa) e outra  $\beta$  (beta) ou de uma cadeia  $\gamma$  (gama) e outra  $\delta$  (delta), expressando assim os heterodímeros  $\alpha\beta$  (caracterizando os linfócitos T  $\alpha\beta$ ) ou o  $\gamma\delta$  (caracterizando os linfócitos T  $\gamma\delta$ ). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  representam apenas 1 a 5% dos linfócitos T presentes nos linfonodos e sangue periférico (Groh *et al.*, 1989), entretanto estas células são encontradas em maior frequência em tecidos epiteliais e mucosas (Haas, Pereira e Tonegawa, 1993). A distribuição tecidual dos linfócitos T  $\gamma\delta$  favorece o seu contato direto com antígenos, sendo proposto um papel importante destas células na primeira linha de defesa contra patógenos e células transformadas (Allison e Havran, 1991). Além disso, os linfócitos T  $\gamma\delta$  têm a capacidade de reconhecer o antígeno de forma independente da apresentação via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Chien, Jores e Crowley, 1996; Born e O'Brien, 2009; Sutton *et al.*, 2009) e, assim, desempenham uma resposta rápida a infecções virais e bacterianas (Ohga *et al.*, 1990; Ferrick *et al.*, 1995).

Os diferentes TCRs são formados através do rearranjo gênico que ocorre durante o desenvolvimento dos linfócitos T. O receptor  $\alpha\beta$  de célula T sofre um rearranjo gênico que lhe atribui uma grande especificidade a antígenos, ligando-se mais restritamente a determinados complexos MHC-peptídeo. O TCR  $\gamma\delta$  apresenta uma menor especificidade a complexos MHC-peptídeo (Rock *et al.*, 1994; Villarrubia, León e Bootello, 2002). Além de antígenos de natureza protéica (tais como os reconhecidos por linfócitos T  $\alpha\beta$ ), os linfócitos T  $\gamma\delta$  podem reconhecer antígenos de diversas naturezas, tais como peptídeos, aminas, pirofosfatos e fosfolipídios (Hayday, 2000). Acredita-se que a capacidade do TCR  $\gamma\delta$  de reconhecer antígenos de diferentes naturezas está relacionada à sua homologia com as imunoglobulinas dos linfócitos B (O'Brien *et al.*, 2007). Como dito acima, os linfócitos T  $\gamma\delta$  são capazes de reconhecer antígenos de forma tanto dependente quanto independente da apresentação pelo MHC. Este processo pode ocorrer diretamente via TCR ou através do reconhecimento de moléculas da família do MHC I, como MIC-A (*MHC class I chain-related*

gene A), MIC-B (*MHC class I chain-related gene B*) e CD1 (*cluster of differentiation 1*) (Villarrubia, León e Bootello, 2002).

### **1.1.1 Subtipos de linfócitos T $\gamma\delta$**

Os linfócitos T  $\gamma\delta$  expressam diferentes subtipos de cadeias  $\gamma$  e de cadeias  $\delta$  do TCR, o que permite sua classificação de acordo com os genes que utilizam para formar as cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ . Acredita-se que o pareamento das cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  não ocorre de forma aleatória, e os subtipos de linfócitos T apresentam ligações preferenciais de cadeias  $\gamma$  com cadeias  $\delta$  específicas (Carding e Egan, 2002; O'Brien *et al.*, 2007). Dentre os subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos incluem-se os linfócitos T V $\gamma$ 4, os linfócitos T V $\delta$ 4 e os linfócitos T V $\delta$ 6.3, nos quais V significa a região variável da cadeia  $\gamma$  ou  $\delta$  no rearranjo V(D)J (Grigoriadou, Boucontet e Pereira, 2002; Chien e Konigshofer, 2007). Existem três diferentes sistemas de nomenclaturas para as cadeias de TCR murinas: a nomenclatura de Heilig e Tonegawa (Heilig e Tonegawa, 1986), a de Garman (Garman, Doherty e Raulet, 1986) e a da WHO-IUIS (Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation, 1995). Para humanos, existem quatro nomenclaturas propostas: a de Porcelli (Porcelli, Brenner e Band, 1991), LeFranc (Lefranc, 2001), WHO-IUIS (*World Health Organization - International Union of Immunological Society*) (Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation, 1995) e HUGO (*Human Genome Organization*, em <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/375>). Nesta dissertação, utilizamos a nomenclatura de Heilig e Tonegawa para subtipos murinos e de Porcelli para os humanos (**Tabela 1. 1**).

**Tabela 1. 1: Nomenclatura de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos e humanos**

| <b>Segmentos V<math>\gamma</math> murinos</b>  |  |                               |
|--|--|-------------------------------|
| <b>Designação proposta por Porcelli et al.</b> | <b>Designação proposta por German et al.</b> | <b>Designação de WHO-IUIS</b> |
| V $\gamma$ 5                                   | V $\gamma$ 3                                 | GV1S1                         |
| V $\gamma$ 6                                   | V $\gamma$ 4                                 | GV2S1                         |
| V $\gamma$ 4                                   | V $\gamma$ 2                                 | GV3S1                         |
| V $\gamma$ 7                                   | V $\gamma$ 5                                 | GV4S1                         |
| V $\gamma$ 1                                   | V $\gamma$ 1.1                               | GV5S1                         |
| V $\gamma$ 2                                   | V $\gamma$ 1.2                               | GV5S2                         |
| V $\gamma$ 3                                   | V $\gamma$ 1.3                               | GV5S3                         |

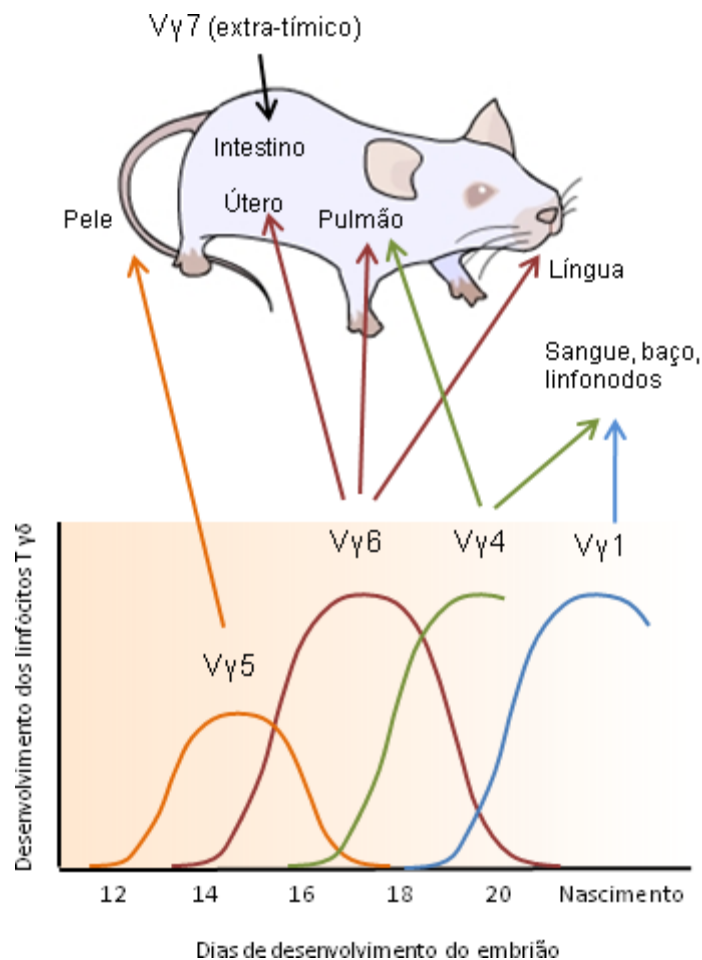
  

| <b>Segmentos V<math>\gamma</math> expressos em humanos</b> |   |                               |                                      |
|--|---|-------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Designação proposta por Porcelli et al.</b>             | <b>Designação proposta por LeFranc et al.</b> | <b>Designação de WHO-IUIS</b> | <b>Nomenclatura HUGO<sup>a</sup></b> |
| V $\gamma$ 2   | V $\gamma$ 1.2                                | GV1S2                         | TRGV2                                |
| V $\gamma$ 3   | V $\gamma$ 1.3                                | GV1S3                         | TRGV3                                |
| V $\gamma$ 4   | V $\gamma$ 1.4                                | GV1S4                         | TRGV4                                |
| V $\gamma$ 5   | V $\gamma$ 1.5                                | GV1S5                         | TRGV5                                |
| V $\gamma$ 8   | V $\gamma$ 1.8                                | GV1S8                         | TRGV8                                |
| V $\gamma$ 9   | V $\gamma$ 2                                  | GV2S1                         | TRGV9                                |

<sup>a</sup> Nomenclatura HUGO: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>

Adaptado de Kabelitz & Wesch 2003. WHO-IUIS: *World Health Organization - International Union of Immunological Society*; HUGO: Human Genome Organization.

O pareamento das cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  determina a localização e a função destes linfócitos no organismo (Carding e Egan, 2002; O'Brien *et al.*, 2007). A Figura 1. 1 demonstra a localização preferencial de diferentes subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. Os linfócitos T V $\gamma$ 4 são encontrados preferencialmente no pulmão e em órgãos linfóides, os linfócitos T V $\gamma$ 1/V $\delta$ 6.3 são encontrados preferencialmente no fígado e no baço, os linfócitos T V $\gamma$ 5 são distribuídos na pele de camundongos enquanto o subtipo V $\gamma$ 7, que apresentam desenvolvimento extra-tímico, são encontrados principalmente no intestino (Grigoriadou, Boucontet e Pereira, 2002).



**Figura 1. 1: Desenvolvimento embrionário dos subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  e sua localização tecidual em camundongos.** Figura adaptada de Carding & Egan, 2002.

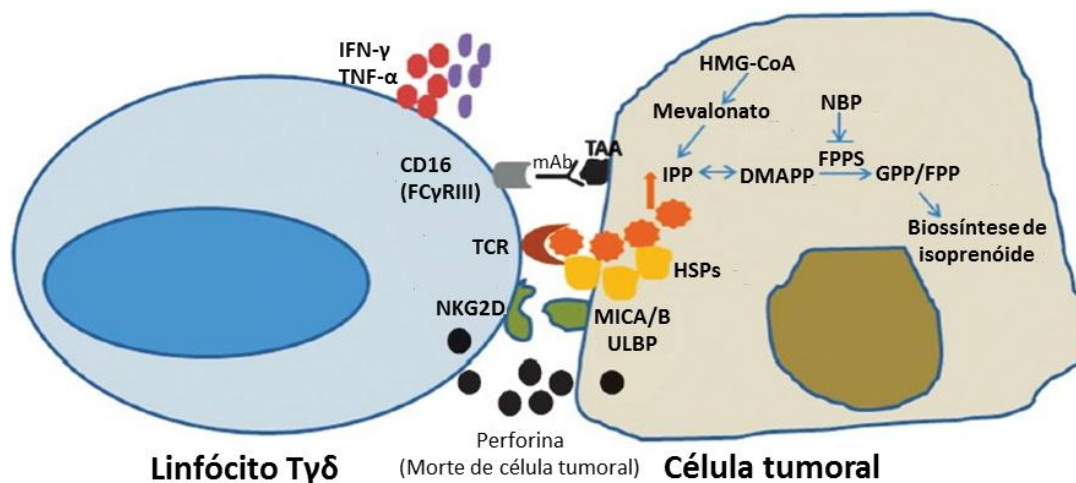
Em humanos, são descritos apenas dois subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$ . O primeiro subtipo de linfócito T  $\gamma\delta$  a surgir no timo durante o desenvolvimento embrionário expressa a cadeia V $\delta$ 1, pareada com diferentes cadeias V $\gamma$ . Os linfócitos T V $\delta$ 1<sup>+</sup> populam preferencialmente tecidos epiteliais, tais como o intestino e a pele. Essas células estão presentes também no sangue periférico, porém em frequências minoritárias dentre os linfócitos T  $\gamma\delta$  (Hayday et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que os linfócitos T V $\delta$ 1<sup>+</sup> encontram-se associadas a diversos tumores epiteliais, dentre eles pulmonar, renal, carcinoma do cólon intestinal e linfomas (Fisch et al., 1997; Zocchi e Poggi, 2004).

Os linfócitos T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (também denominados V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 (Lefranc, 2001), constituem o subtipo de linfócitos T  $\gamma\delta$  majoritários no sangue periférico humano (Kabelitz e Wesch, 2003). Esse subtipo, diferente dos linfócitos T V $\delta$ 1<sup>+</sup>, expandem continuamente em órgãos

linfóides secundários e adquirem um fenótipo de células de memória durante a infância, ao longo das recorrentes exposições a antígenos externos (Dieli *et al.*, 2003). Os linfócitos T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 são então capazes de migrar para o sítio inflamado e reconhecer diferentes antígenos, o que leva a uma intensa expansão destas células. Uma vez no sítio inflamado, os linfócitos T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 liberaram citocinas e exercem atividade citotóxica. Este subtipo constitui aproximadamente de 80-90% dos linfócitos T  $\gamma\delta$  do sangue de um adulto normal (Morita, Mariuzza e Brenner, 2000).

## 1.2 Reconhecimento de antígenos e atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$

Uma vez no sítio inflamatório, os linfócitos T  $\gamma\delta$  são capazes de reconhecer uma grande variedade de antígenos de diferentes naturezas e origens. Durante uma situação de estresse, como uma infecção ou uma transformação tumoral, algumas moléculas são altamente expressas e reconhecidas pelos linfócitos T  $\gamma\delta$ . A **Figura 1. 2** exemplifica o reconhecimento de moléculas expressas por células tumorais pelos linfócitos T  $\gamma\delta$ , dentre as quais destacam-se ULBP (*UL-16 binding protein*), MIC-A e MIC-B (Kong *et al.*, 2009; de Kruijf *et al.*, 2012). O reconhecimento das moléculas MIC-A, MIC-B e ULBP pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  ocorre principalmente pelo receptor NKG2D (*natural killer group 2, member D*), mas também pode ocorrer através do TCR (Das, Groh, *et al.*, 2001; Nedellec *et al.*, 2010). Por outro lado, fosfoantígenos (tais como o isopentenil pirofosfato, IPP), alquilaminas, proteínas de choque térmico (HSP), apolipoproteína A-1 (APO-A1) e aminobisfosfonatos (NBP) são diretamente reconhecidos pelo TCR  $\gamma\delta$  (Kunzmann *et al.*, 2000; Das, Groh, *et al.*, 2001; Scotet *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2009; Mookerjee-Basu *et al.*, 2010; Nedellec *et al.*, 2010). A APO-A1 e as HSP são importantes potencializadoras da resposta citotóxica dos linfócitos T  $\gamma\delta$  (Scotet *et al.*, 2005; Hirsh *et al.*, 2006). Os bifosfonatos, especialmente os nitrogenados (NBP, *nitrogen containing bisphosphonates*) são conhecidos inibidores da reabsorção óssea, entretanto, relatos da literatura sugerem um efeito antitumoral desse composto. Kunzmann e colaboradores (2000) demonstraram que os NBPs aumentam o conteúdo endógeno do fosfoantígeno IPP na célula tumoral, conseqüentemente induzindo a expansão seletiva de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, a produção de citocinas, a expressão de moléculas de ativação e, ainda, a atividade citotóxica e antitumoral (Kunzmann *et al.*, 2000; Das, Wang, *et al.*, 2001).



**Figura 1. 2: Mecanismos de reconhecimento de célula tumoral por linfócitos T  $\gamma\delta$ .** O isopentenil pirofosfato (IPP) gerado pela via do mevalonato em células tumorais é reconhecido pelo TCR do linfócito T  $\gamma\delta$ . Linfócitos T  $\gamma\delta$  reconhecem *heat shock proteins* (HSPs), MICA/B (MHC class I chain-related molecules) e ULBP (UL-16 binding protein) expressas pela célula tumoral através do TCR e do receptor NKG2D (*natural killer group 2, member D*), respectivamente. A perforina liberada pelo linfócito T  $\gamma\delta$  ativado leva à lise da célula tumoral através de morte celular mediada por anticorpo (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*). Linfócitos  $\gamma\delta$  T CD16<sup>+</sup> (FC $\gamma$ RIII) interagem com antígenos associados ao tumor (TAA) via anticorpos monoclonais que mediam ADCC. A ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  leva à produção de citocinas tais como IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ). Intermediários da via de biossíntese de isoprenóides: NBP (*nitrogen containing bisphosphonates*); DMAPP (*dimethyl allyl diphosphate*); FPPS (*farnesyl diphosphate synthase*); GPP (*geranyl pyrophosphate*); FPP (*farnesyl diphosphate*). Figura adaptada de Gogoi & Chiplunkar, 2013.

O efeito citotóxico dos linfócitos T  $\gamma\delta$  (em adição à produção de IFN- $\gamma$ , que será melhor apresentado a seguir) é mediado por uma família de moléculas conhecidas como TRAILS (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) e por ligante de Fas (FasL) expressas na membrana dessas células (Ponomarev e Dittel, 2005). O reconhecimento dos ligantes presentes na superfície de células estressadas ou infectadas leva à indução de apoptose da célula alvo. *DNAX Accessory Molecule-1* (DNAM-1) também é expressa na superfície de linfócitos T  $\gamma\delta$  e esta molécula medeia a morte de linhagens tumorais (Toutirais *et al.*, 2009). A DNAM-1 interage com Necl-5 (também chamado de receptor de poliovírus ou CD155) e Nectina-2 (também chamado de receptor relacionado ao poliovírus 2 ou CD112) expressos em células tumorais. O reconhecimento dos ligantes de DNAM-1 induz a degranulação (e liberação de granzimas e perforinas) e a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  (Bonneville e Scotet, 2006; Toutirais *et al.*, 2009). A liberação de perforinas e granzimas é um mecanismo crucial para mediar a lise de células alvo (Bonneville e Scotet, 2006). Essas proteínas encontram-se

no interior de grânulos citotóxicos presentes no citoplasma dos linfócitos T  $\gamma\delta$ . Quando essas células encontram o alvo, os grânulos se aproximam das sinapses entre a própria célula e a célula alvo (Lieberman, 2003).

A sinapse formada pela célula citotóxica e a célula alvo é dividida em dois domínios: o domínio de sinalização, estruturalmente semelhante às sinapses formadas por células não citotóxicas e o domínio secretor, no qual a membrana dos grânulos se funde com a membrana plasmática para levar o conteúdo até o local de sinapse (Lieberman, 2003). Essa sinapse forma uma adesão forte que permite o direcionamento das moléculas citotóxicas para as células alvo, evitando o extravasamento para células vizinhas evitando assim danos indesejáveis. Quando a perforina encontra a células alvo, permite a entrada das granzimas A e B no interior da célula. Tanto a granzima A quanto a granzima B - uma vez no interior da célula alvo - levam à interrupção do potencial de membrana mitocondrial, iniciando assim o processo de apoptose (Lieberman, 2003). Vale destacar que a molécula CD107a (LAMP-1) é expressa na superfície da célula efetora quando os grânulos citotóxicos são conduzidos até a superfície celular e liberados durante o processo de degranulação. Após esse processo, a proteína CD107a, expressa na membrana do grânulo é exposta na superfície da célula, permitindo assim o uso desta molécula como um marcador de degranulação celular (Cohnen *et al.*, 2013). Alguns linfócitos T  $\gamma\delta$  que expressam Fc $\gamma$ RIII (CD16) também possuem uma atividade citotóxica mediada por anticorpos (Angelini *et al.*, 2004; Tokuyama *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que, devido a sua reconhecida atividade citotóxica contra diferentes tipos de tumor, o potencial terapêutico dos linfócitos T  $\gamma\delta$  tem sido explorado e tem demonstrado eficácia e segurança em diferentes estudos clínicos (Chiplunkar *et al.*, 2009). Atualmente, duas estratégias são utilizadas na clínica: transferência autóloga de linfócitos T  $\gamma\delta$  expandidos *ex vivo* (por estímulo com fosfoantígenos e IL-2) e administração *in vivo* de fosfoantígenos ou aminofosfatados com baixas doses de IL-2 (Wilhelm *et al.*, 2003; Dieli *et al.*, 2007; Godder *et al.*, 2007; Bennouna *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2010; Meraviglia *et al.*, 2010; Nakajima *et al.*, 2010).



### 1.3 Linfócitos T $\gamma\delta$ e a resposta inflamatória

Um grande número de dados demonstra a importância dos linfócitos T  $\gamma\delta$  em processos inflamatórios de diferentes origens (Penido *et al.*, 1997; Penido *et al.*, 2003; Roark *et al.*, 2007; Flierl *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015; Raffray *et al.*, 2015; Zarin *et al.*, 2015). Estes linfócitos migram para o tecido inflamado em direção a um gradiente de mediadores quimiotáticos (Lança *et al.*, 2013; Hammerich *et al.*, 2014) e, ainda, são capazes de proliferar no tecido (Shen *et al.*, 2002). Uma vez no tecido inflamado, os linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados produzem diferentes citocinas, sendo consideradas as principais células produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 em diferentes modelos animais (Shibata, 2012; Murdoch, Gregory e Lloyd, 2014; Shibata *et al.*, 2014); (Uezu *et al.*, 2004; Lockhart, Green e Flynn, 2006; Flierl *et al.*, 2008; Romani *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010). Como exemplo de respostas inflamatórias nas quais os linfócitos T  $\gamma\delta$  desempenham papéis tanto deletérios quanto protetores, podemos citar a resposta associada a: *i.* tumores (Zocchi e Poggi, 2004); *ii.* infecções virais (Carding, 1990); *iii.* infecções bacterianas (Chung *et al.*, 2006; Flierl *et al.*, 2008; Tschöp *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010); *iv.* infecções fúngicas (Steele *et al.*, 2002; Uezu *et al.*, 2004); *v.* e ainda durante a resposta alérgica de vias respiratórias (Zuany-Amorim *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2009).

Em pacientes, diversos estudos têm demonstrado uma intensa expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  no sangue durante infecções sistêmicas, dentre elas lepra, tuberculose, malária, salmonela, meningites bacterianas, entre outras (Chen e Letvin, 2003). Este fato pode ser resultado da estimulação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  por antígenos não peptídicos, tais como as alquilaminas (substâncias não fosfatadas encontradas em plantas e bactérias) e o intermediário da via do mevalonato, o IPP (Holtmeier e Kabelitz, 2005). É importante destacar que as células tumorais (em adição aos microrganismos) expressam fosfoantígenos provavelmente como reflexo do estado avançado de estresse metabólico dessas células (Bonneville e Fournié, 2005). Como exposto anteriormente, o reconhecimento de fosfoantígenos por linfócitos T  $\gamma\delta$  leva à ativação destas células. Desta forma, a exposição a células mortas, estressadas, transformadas e infectadas induz a liberação de citocinas (capazes de modular outras populações celulares) e proteínas citotóxicas (tais como perforina e granzimas) por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos (Chattopadhyay *et al.*, 2009). Além destas propriedades, foi demonstrado que linfócitos T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 podem ainda desempenhar a função de células apresentadoras de antígenos, sendo capazes de ingerir, processar e apresentar antígenos estimulando tanto

linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Brandes, Willimann e Moser, 2005). Vale ressaltar que diversos estudos estão sendo desenvolvidos atualmente a fim de identificar substâncias derivadas de fosfoantígenos com potencial estimulatório da resposta imune em busca de novas terapias contra o câncer (Wilhelm *et al.*, 2003; Lozupone *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Parente-Pereira *et al.*, 2014; Rei, Pennington e Silva-Santos, 2015; Wu *et al.*, 2015) e infecções (Wang *et al.*, 2001; Poccia *et al.*, 2009).

### **1.3.1 Migração e ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ por mediadores inflamatórios**

Durante a resposta imune, os linfócitos T  $\gamma\delta$  migram para o tecido por um mecanismo orquestrado por moléculas de adesão e mediadores quimiotáticos, dentre os quais as quimiocinas se destacam. Diversas quimiocinas das famílias CC e CXC e seus receptores determinam a migração deste subtipo de linfócitos e, além de coordenarem o recrutamento de linfócitos T  $\gamma\delta$  em diferentes respostas imunes, são também capazes de ativar este tipo celular. Além de induzir quimiotaxia, as quimiocinas funcionam como fatores co-estimulatórios durante a resposta imune, causando ativação de linfócitos, levando à produção de citocinas, à proliferação e diferenciação destas células (Luther e Cyster, 2001; Molon *et al.*, 2005; Castellino *et al.*, 2006). A ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  leva à modulação (para cima ou para baixo) da expressão de receptores para CC ou CXC quimiocinas (Cipriani *et al.*, 2000; Glatzel *et al.*, 2002).

Foi demonstrado pelo nosso grupo que a migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  durante a resposta inflamatória induzida por endotoxina bacteriana (LPS), *M. bovis* ou alérgeno, depende da quimiocina CCL2/MCP-1 (e de seu contra-receptor CCR2) e das moléculas de adesão L-selectina (CD62-L) e  $\alpha_4\beta_7$  integrina (Penido *et al.*, 2003; Penido *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009). Em adição, demonstramos que o mediador lipídico leucotrieno (LT)B<sub>4</sub> também desempenha um papel crucial na migração *in vivo* dos linfócitos T  $\gamma\delta$  para o tecido durante a resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais murinos (Costa *et al.*, 2010). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos expressam o receptor de LTB<sub>4</sub>, o BLT1, e este mediador lipídico foi capaz de induzir a quimiotaxia *in vitro* destas células diretamente. De forma interessante, esse trabalho demonstrou que quando administrado *in vivo*, o LTB<sub>4</sub> induziu um aumento nos níveis de CCL2 no tecido inflamado (pleura), sugerindo que o LTB<sub>4</sub> é capaz de induzir a migração destas células direta e indiretamente. De fato, dados da literatura demonstram que este mediador lipídico é capaz de modular a produção de CCL2 (e vice versa) em diferentes

modelos *in vivo* e *in vitro* (Matsukawa *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2007; Cheraim *et al.*, 2008).

Além da expressão de receptores para mediadores linfotáticos, os linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados também aumentam a expressão de marcadores de ativação, tais como o CD25 e CD69 (Costa *et al.*, 2009; Sabbione *et al.*, 2014). O CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (IL-2R) e o aumento na sua expressão está relacionada à ativação e à proliferação de linfócitos T (Hatakeyama *et al.*, 1989). Apesar de sua expressão aumentar durante a ativação, o CD25 também é expresso por linfócitos T em repouso e, ao se associar com o CD122 (cadeia  $\beta$  do receptor de IL-2), estas moléculas formam um receptor heterodímero, que reconhece a IL-2 (Doi *et al.*, 1989). A incubação de linfócitos T  $\gamma\delta$  com IL-2 leva ao aumento de expressão de CD25 e de outras moléculas de ativação, incluindo do CD69. O CD69 também é uma proteína membranar, expressa como homodímero, composta por subunidades glicosiladas. O CD69 é conhecido como um marcador de ativação aguda de linfócitos T e sua expressão é transientemente aumentada em infiltrados inflamatórios, não sendo expressa por linfócitos T em repouso (González-Amaro *et al.*, 2013). Dados da literatura demonstram um papel pró-inflamatório do CD69. Especificamente em linfócitos T  $\gamma\delta$ , foi demonstrado que a expressão de CD69 está associada à citotoxicidade dos subtipos humanos V $\delta$ 1 e V $\delta$ 2 (o que não foi observado para linfócitos T  $\alpha\beta$ ), contra células tumorais de mastocitoma (Moretta *et al.*, 1991; Cao e He, 2005). Outra molécula envolvida na ativação e migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  é a L-selectina (ou CD62L). O CD62L é uma molécula de adesão expressa por leucócitos, incluindo linfócitos T  $\gamma\delta$ , que apresenta um papel fundamental na migração celular (Tedder *et al.*, 1990). Durante o processo de migração e ativação, a CD62-L se destaca da superfície celular (*shedding*), sendo a expressão desta molécula um marcador de ativação de linfócitos T (Palcanda *et al.*, 1992).

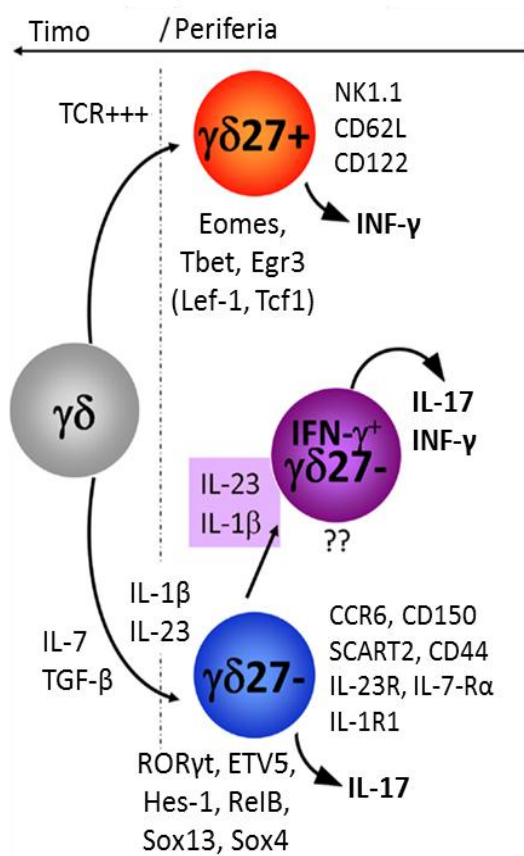
### **1.3.2 Subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ : IL-17+ e IFN- $\gamma$ +**

Como apresentado anteriormente (item 1.1.1), os linfócitos T  $\gamma\delta$  são classificados em diferentes subtipos de acordo com as cadeias V $\gamma$  de seu TCR e sua distribuição tecidual. Entretanto, tem sido recentemente proposto que os linfócitos T  $\gamma\delta$  sejam categorizados de acordo com suas funções efetoras, i.e., pela produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou de interleucina-17 (IL-17) (Prinz, Silva-Santos e Pennington, 2013), que é um fenômeno

determinado durante o seu desenvolvimento no timo (de forma distinta dos linfócitos T  $\alpha\beta$ ) (Schmolka *et al.*, 2013).

De fato, trabalhos publicados demonstram a relação das seleções positiva e negativa no timo com a produção de IFN- $\gamma$  e de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$ . Quando linfócitos T  $\gamma\delta$  não reconhecem antígenos no timo, não entram em apoptose (como os linfócitos T  $\alpha\beta$ ), mas tornam-se produtores de IL-17 (Jensen *et al.*, 2008; Kreslavsky *et al.*, 2008; Meyer, Zeng e Chien, 2010; Wong e Zúñiga-Pflücker, 2010). Já os linfócitos T  $\gamma\delta$  que se ligam moderadamente aos antígenos próprios no timo são diferenciados como células produtoras de IFN- $\gamma$  (Jensen *et al.*, 2008; Meyer, Zeng e Chien, 2010; Wong e Zúñiga-Pflücker, 2010). Foi também descrita a existência de um terceiro subtipo de linfócitos T  $\gamma\delta$ , que secreta IL-4 e que seria selecionado ao se ligar com muita avidéz a antígenos próprios durante a seleção tímica (Nuñez-Cruz *et al.*, 2003; Meyer, Zeng e Chien, 2010). A polarização e o desenvolvimento da população TCR $\gamma\delta$ /IL-17<sup>+</sup> é direcionada principalmente pelas citocinas TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) e IL-7, enquanto a IL-23 e a IL-1 $\beta$  têm um papel importante na expansão e manutenção desta população (**Figura 1. 3**). Esta diferenciação é principalmente regulada pelo fator de transcrição ROR $\gamma$ t (*retinoic-related orphan receptor  $\gamma$ t*) (Ivanov *et al.*, 2006). Entretanto outros fatores de transcrição, tais como Sox13, Sox4, Hes-1, RelB e ETV5, também participam da produção de IL-17 pelos linfócitos T  $\gamma\delta$ . De forma oposta, os fatores de transcrição TCF1 e LEF1 regulam negativamente a produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$ . Estes, em conjunto com os fatores de transcrição T-bet, Eomes e Egr3 induzem a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (Serre e Silva-Santos, 2013), entretanto, os mediadores envolvidos na polarização deste subtipo ainda estão caracterizados.

A identificação destas populações TCR $\gamma\delta$ /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TCR $\gamma\delta$ /IL-17<sup>+</sup> pode ser realizada pela expressão de marcadores expressos na superfície destas células. A expressão do receptor co-estimulatório CD27 determina a população produtora de IFN- $\gamma$  (IL-17<sup>-</sup>) em células de animais naïve e ativados (Ribot *et al.*, 2009), enquanto a expressão do receptor de quimiocinas CCR6 é expresso exclusivamente por linfócitos T  $\gamma\delta$  CD27<sup>-</sup> e distinguem linfócitos TCR $\gamma\delta$ /IL-17<sup>+</sup> (Haas *et al.*, 2009) (**Figura 1. 3**). Vale ressaltar que já foi descrita uma população produtora das duas citocinas (TCR $\gamma\delta$ /CD27<sup>-</sup>/IL-17<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), polarizada *in vitro* pela presença de IL-23 e IL-1 $\beta$  e encontrada *in vivo* em modelos experimentais de tumor, autoimunidade e infecção, quanto em pacientes com HIV (Serre e Silva-Santos, 2013). Entretanto, a função destas células ainda não foi estabelecida.



**Figura 1. 3: Linfócitos T  $\gamma\delta$   $\text{IFN-}\gamma^+$  e  $\text{IL-17}^+$ .** Diferentes sinais extracelulares regulam a produção de  $\text{IFN-}\gamma$  e de  $\text{IL-17}$  por linfócitos T  $\gamma\delta$  no timo e na periferia. O padrão da expressão de marcadores associados a linfócitos produtores de  $\text{IFN-}\gamma$  ( $\gamma\delta 27^+$ ) e de  $\text{IL-17}$  ( $\gamma\delta 27^-$ ) e os fatores de transcrição envolvidos na polarização destas populações está detalhado na figura e apresentados no texto. Adaptado de Serre & Silva Santos, 2013.

Os linfócitos T  $\gamma\delta$  (murinos e humanos) são classicamente conhecidos como importantes produtores de  $\text{IFN-}\gamma$ , o que atribui a estas células um importante papel imunomodulador e anti-tumoral (Ikeda, Old e Schreiber, 2002; Yin *et al.*, 2002; Gomes, Martins e Silva-Santos, 2010). Esse mediador é capaz de inibir o crescimento tumoral de forma direta, inibindo a proliferação ou induzindo a apoptose de células tumorais (Bromberg *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1996) ou ainda através da inibição da angiogênese (Arenberg *et al.*, 1996; Sgadari *et al.*, 1996; Sgadari *et al.*, 1997). Além disso, o  $\text{IFN-}\gamma$  pode inibir o crescimento tumoral de forma indireta, através da ativação da atividade anti-tumoral em outras populações celulares como macrófagos (Schreiber, Celada e Buchmeier, 1986; MacMicking, Xie e Nathan, 1997) e células NK (Paolini *et al.*, 2015).

Mais recentemente, os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram descritos como uma das principais células produtoras de IL-17 em diversos modelos experimentais de origem infecciosa, inflamatória e autoimune (Bonneville, O'Brien e Born, 2010). Estes modelos incluem sepse induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP), artrite induzida por colágeno, infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e por *Cryptococcus neoformans*, nos quais a depleção (genética ou por anticorpos) de linfócitos T  $\gamma\delta$  reduziu a resposta inflamatória pela baixa produção de IL-17, sugerindo que os linfócitos T  $\gamma\delta$  são uma importante fonte desta citocinas no processo inflamatório (Uezu *et al.*, 2004; Lockhart, Green e Flynn, 2006; Flierl *et al.*, 2008; Romani *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010). Vale ressaltar que ambas citocinas (IFN-  $\gamma$  e IL-17) apresentam papéis importantes e controversos no controle de tumores, dependendo do microambiente tumoral (Rei, Pennington e Silva-Santos, 2015). Desta forma, os linfócitos T  $\gamma\delta$  participam (em adição à resposta imune de tumores) da resposta imune contra vírus e patógenos intracelulares através da produção de IFN- $\gamma$  (modulando células NK e linfócitos T  $\alpha\beta$ ) e da resposta contra bactérias extracelulares e fungos através da produção de IL-17, modulando principalmente as funções de neutrófilos (Bonneville, O'Brien e Born, 2010).

#### **1.4 Leucotrieno B<sub>4</sub>, lipoxina A<sub>4</sub> e prostaglandina E<sub>2</sub>: sistema imune e câncer**

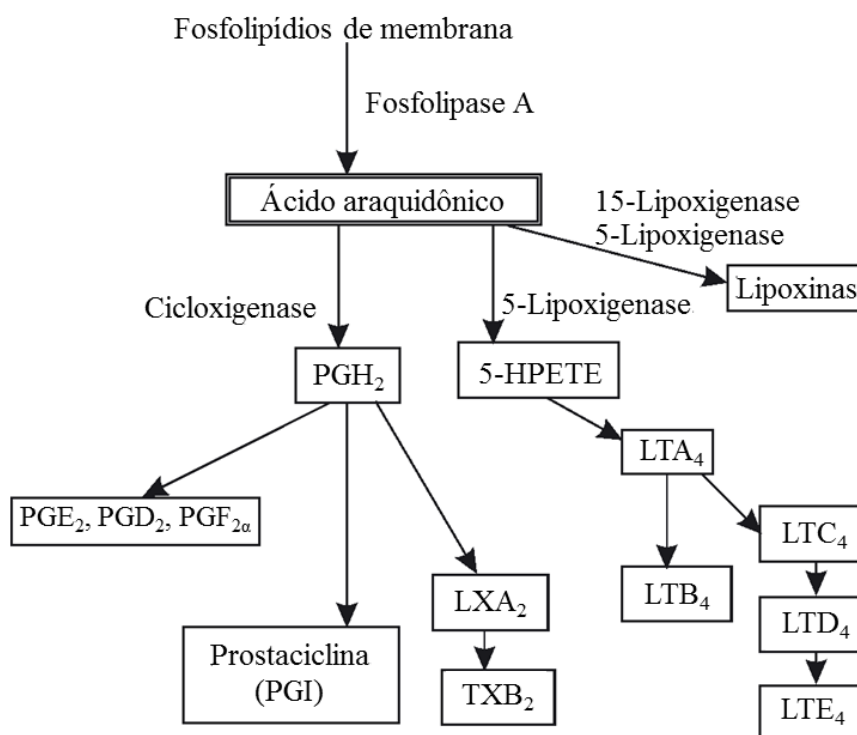
Os mediadores lipídicos, tais como prostaglandina (PG), leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) possuem funções importantes em diversos processos fisiológicos e patológicos do sistema imune. Esses mediadores são derivados do metabolismo do ácido araquidônico de membrana e também são gerados a partir de corpúsculos lipídicos, que são organelas citoplasmáticas dinâmicas e multifuncionais, induzidas em células ativadas e que desempenham um papel central no controle da síntese e da secreção de mediadores inflamatórios (Bozza *et al.*, 2011).

A geração de LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> derivados do ácido araquidônico ocorre pela ação sequencial de enzimas. Inicialmente, estímulos físico e químicos levam à translocação da fosfolipase A2 do citosol (cPLA2) para a membrana do retículo endoplasmático e para a membrana nuclear. Esse processo de translocação é dependente do influxo de cálcio intracelular e leva à hidrólise dos fosfolípidios presentes nas membranas, principalmente a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando assim o ácido araquidônico (Evans *et al.*, 2001). O ácido araquidônico liberado é metabolizado tanto pelo sistema enzimático das

ciclooxigenases (COXs) como das lipoxigenases (LOs) (Funk, 2001) e, em seguida, é reincorporado à membrana da célula (Morrow e Roberts, 2002).

As LOs catalisam a oxigenação de ácidos graxos em hidroperóxidos lipídicos (Brash, 1999), metabolizando o ácido araquidônico em intermediários instáveis, hidroperoxieicosatetraenóico (HPETEs). Os HPETEs, por sua vez, são metabolizados em ácidos-hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e geram LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> por ação das LOs. As principais LOs descritas em humanos são as 5-LO, 12-LO e 15-LO (Brash, 1999).

As COXs, por sua vez, metabolizam o ácido araquidônico no intermediário PGH<sub>2</sub> que sofre a ação da enzima prostaciclina, formando assim a PGE<sub>2</sub> (Jakobsson *et al.*, 1999; Mancini *et al.*, 2001). Existem três isoformas de COXs descritas: a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A COX-1 é responsável pela síntese basal, constitutiva de prostaglandinas enquanto a COX-2 é expressa principalmente de forma induzida como durante em processo inflamatório (Smith, DeWitt e Garavito, 2000). A COX-3 é expressa no sistema nervoso central (córtex cerebral) e no tecido cardíaco (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Quando acetiladas ou nitrosiladas, as COXs também podem levar à formação endógena de epímeros de lipoxinas (Serhan, 2005).



**Figura 1. 4: Geração de eicosanóides a partir do ácido araquidônico.** O esquema demonstra a geração de eicosanóides, incluindo prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) a partir do ácido araquidônico através da ação das enzimas ciclooxigenase, 5-lipoxigenase e 15-lipoxigenase. Adaptado de Goodman e Gilman (1995).

#### 1.4.1 *LTB<sub>4</sub>*

O *LTB<sub>4</sub>* é um mediador lipídico derivado do metabolismo do ácido araquidônico, sintetizado pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO), com contribuição da proteína ativadora de 5-LO (FLAP). O *LTB<sub>4</sub>* exerce suas funções via dois receptores associados à proteína G (GPCR) distintos (Yokomizo *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 2000; Yokomizo *et al.*, 2000) – BLT1 e BLT2, sendo o BLT2 o receptor de baixa afinidade. O receptor de alta afinidade BLT1 é expresso por leucócitos e reconhece o *LTB<sub>4</sub>* em concentrações sub nanomolares (Sabirsh, Bristulf e Owman, 2004). Dentre as principais funções do *LTB<sub>4</sub>*, destaca-se a sua atividade quimioatratante sobre diversas populações celulares como macrófagos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e células dendríticas, em adição à modulação de atividade citotóxica, fagocitose e expressão de moléculas de adesão (Bailie *et al.*, 1996; Mancuso *et al.*, 1998; Canetti *et al.*, 2003; Flamand, Tremblay e Borgeat, 2007); (Palmer *et al.*, 1980; Huang, W. W. *et al.*, 1998; Serhan e Prescott, 2000). Vale ressaltar que, conforme descrito no item 1.3.1, o nosso grupo demonstrou que o *LTB<sub>4</sub>* induz a migração *in vitro* e *in*

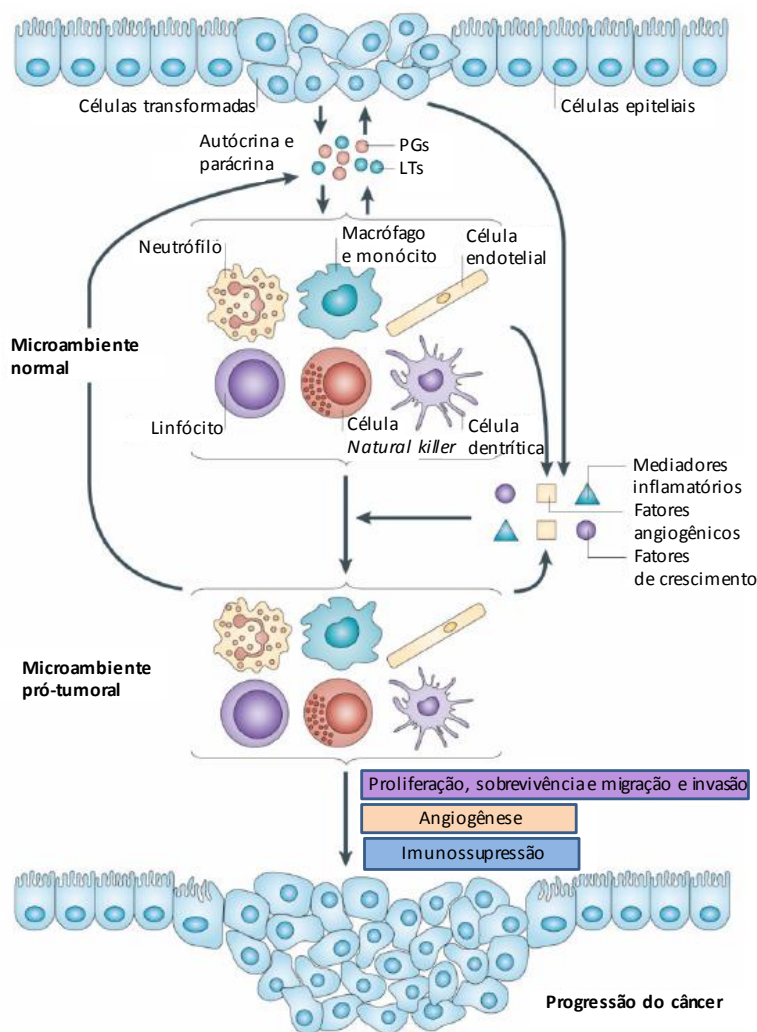


*vivo* de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos, através da ativação de BLT1, expresso por estas células (Costa *et al.*, 2010).

A síntese de LTB<sub>4</sub> e a expressão de BLT1 aumentam no tecido durante diversas condições inflamatórias e no tecido tumoral (Tager *et al.*, 2003; Pace *et al.*, 2004; Cheraim *et al.*, 2008; Mitsopoulos *et al.*, 2008; Rittirsch *et al.*, 2008; Wang e DuBois, 2010; Larré *et al.*, 2008). É estabelecido que a produção de LTB<sub>4</sub> recruta diferentes populações celulares (de forma direta ou indireta), tais como linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NK e células dendríticas para o tecido tumoral e órgãos linfóides secundários, resultando na ativação da resposta imune contra o tumor (Sharma *et al.*, 2013; Del Prete *et al.*, 2007). Entretanto, o papel do LTB<sub>4</sub> na resposta imune contra tumores ainda é pouco esclarecido e controverso, sendo o seu papel pró-tumoral mais descrito na literatura. O LTB<sub>4</sub> presente no ambiente tumoral é um importante indutor da resposta inflamatória, o que no modelo de melanoma subcutâneo induzido pela linhagem celular Tm1, está associado com a progressão tumoral (Bachi *et al.*, 2009). Também já foi demonstrado que animais KO de BLT1 apresentaram uma resposta anti-tumoral mais robusta que a observada em animais selvagens, sendo a sinalização do BLT1 induzida por LTB<sub>4</sub> implicada na diminuição da geração e manutenção de uma resposta anti-tumoral de memória por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Yokota *et al.*, 2012). Além disso, Hennig e colaboradores (2004) propuseram como uma nova ferramenta terapêutica, a utilização do antagonista de BLT1, LY293111, em combinação com o quimioterápico gemcitabina (Hennig *et al.*, 2004). A ideia foi proposta após observarem que esta combinação reduziu de forma mais potente o crescimento tumoral e a metástase no modelo heterotópico murino (em camundongos atímicos) de câncer intestinal induzido por células tumorais humanas HT29 e LoVo (Hennig *et al.*, 2004). No ano seguinte, o grupo demonstrou que esse efeito foi ainda mais evidente no modelo ortotópico murino de câncer de pâncreas induzido por células tumorais humanas S2-013 (Hennig *et al.*, 2005). Entretanto, em humanos, essa associação de medicamentos não aumentou a sobrevida de pacientes com câncer de pâncreas e pulmão durante a fase II do teste clínico (Adrian *et al.*, 2008).

Apesar do papel pró-tumoral do LTB<sub>4</sub> ser mais evidente do que o anti-tumoral, as interações celulares no microambiente tumoral, i.e. células do sistema imune (como os *tumor infiltrating lymphocytes* [TILs]) e as células tumorais são críticas para o estabelecimento para a resposta anti-tumoral do hospedeiro. Desta forma, o recrutamento e a modulação de

atividade de linfócitos T citotóxicos e de células apresentadoras de antígeno pode favorecer uma resposta anti-tumoral do hospedeiro (**Figura 1. 5**).



**Figura 1. 5: Modelo do mecanismo de indução da progressão cancerígena por prostaglandinas e leucotrienos.** Prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) produzidos por células epiteliais transformadas induzem a proliferação, sobrevivência, migração e invasão tecidual de forma autócrina e parácrina. Esses mediadores lipídicos também estimulam células epiteliais e células estromais a produzir fatores de crescimento, mediadores pró-inflamatórios e fatores angiogênicos, o que altera o microambiente de normal para pró-tumoral. O microambiente tumoral por sua vez, recruta células do sistema imune e células endoteliais, que produzem mais mediadores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e fatores angiogênicos. Adaptado de Wang e DuBois (2010).

#### 1.4.2 $LXA_4$

Somente alguns tipos celulares possuem a maquinaria enzimática completa (5-LO e 12-LO) requerida para a produção de  $LXA_4$ , necessitando de interações célula-célula. A  $LXA_4$  também é gerada a partir da ação das LOs sobre o ácido araquidônico, que é catalizado por leucócitos pela 5-LO, gerando o  $LTA_4$ , que é secretado e “transferido” para plaquetas e

células endoteliais próximas, que - por ação de 12-LO e 15-LO respectivamente - o converte em LXA<sub>4</sub>. Além deste mecanismo, uma segunda via de biossíntese conhecida é iniciada na superfície mucosa através do metabolismo enzimático do ácido araquidônico pela 15-lipoxigenase (15-LO) de células epiteliais mucosas que geram o intermediário ácido 15S-HETE. O intermediário é liberado e rapidamente captado por neutrófilos que o convertem à LXA<sub>4</sub>, via 5-LO neutrofílica (Scannell e Maderna, 2006).

A LXA<sub>4</sub> apresenta similaridade estrutural com os leucotrienos e apresentam atividades biológicas por vezes complementares (Levy *et al.*, 2001; Fiore, 2012). A LXA<sub>4</sub> é reconhecida por um GPCR pertencente à família dos receptores FPR (do inglês, *formyl peptide receptor*). Em humanos, há três receptores codificados por genes distintos: FPR1, FPR2/ALX e FPR3 (Ye *et al.*, 2009; Dufton e Perretti, 2010), sendo FPR2/ALX o receptor que medeia os efeitos da LXA<sub>4</sub>, induzindo diferentes vias de sinalização dependendo do tipo celular (Bae *et al.*, 2003). O reconhecimento da LXA<sub>4</sub> pode resultar em efeitos inibitórios ou estimulatórios, através da ativação de diferentes vias em cada tipo celular (Migeotte, Communi e Parmentier, 2006). Por exemplo, a LXA<sub>4</sub> impede a migração de neutrófilos sem a mobilização de cálcio intracelular, enquanto que em monócitos, a interação da LXA<sub>4</sub> ao seu receptor estimula a quimiotaxia, induzindo o aumento de cálcio intracelular (Fiore e Serhan, 1995; Chiang *et al.*, 2006). A LXA<sub>4</sub> promove ainda a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, reduz a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, impede a migração de eosinófilos para o sítio inflamatório, reduz a produção de superóxido e citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 pelos neutrófilos, estimula o recrutamento de monócitos, e aumentam a saída de fagócitos do local inflamado através do sistema linfático (Maddox e Serhan, 1996; Maddox *et al.*, 1997; Filep, Khreiss e József, 2005; Serhan, Chiang e Van Dyke, 2008; Serhan, Yacoubian e Yang, 2008). Sendo assim, a LXA<sub>4</sub> possui ação anti-inflamatória e pró-resolutiva. De forma interessante, também foi demonstrado que a LXA<sub>4</sub> é capaz de modular negativamente a expressão do receptor LTB<sub>4</sub> (BLT1) em linfócitos T de cobaias (Feng *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996).

A relação da LXA<sub>4</sub> com o câncer ainda é pouco explorada, entretanto, as lipoxinas são consideradas essencialmente anti-tumorigênica, o que está parcialmente associado ao processo de resolução da inflamação. De fato, foi proposta uma nova abordagem terapêutica anti-tumoral baseada na administração de mediadores anti-inflamatórios endógenos, como a LXA<sub>4</sub>. Foi observado que esse mediador é capaz de reduzir a proliferação celular, inibe a

invasão de células tumorais e suprime o crescimento de tumores experimentais (Pogodina, 1975; Clària, Lee e Serhan, 1996; Schottelius *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010).

### 1.4.3 PGE<sub>2</sub>

A PGE<sub>2</sub> é gerada por ação da COX, que converte, por ação enzimática, o araquidonato à PGG<sub>2</sub> e, posteriormente à PGH<sub>2</sub>. A PGH<sub>2</sub> é um intermediário instável, sendo substrato de diferentes enzimas. Dentre elas estão as isomerases (ou 9-ceto-redutase, em alguns tecidos) que levam à geração de PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>. Os produtos da COX exercem seus efeitos através de receptores acoplados à proteína G, capazes de induzir diferentes vias de sinalização intracelular. Os receptores de PGE<sub>2</sub> descritos são: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>, expressos por células do sistema imune, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (Narumiya e FitzGerald, 2001). Os receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> levam à sinalização mediada pela proteína G, aumentando o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), enquanto a sinalização induzida pelo EP<sub>1</sub> leva ao aumento de cálcio intracelular também dependente da proteína G. Já o EP<sub>3</sub> está acoplado à proteína G inibitória (G<sub>i</sub>) e inibe a formação de cAMP (Narumiya e FitzGerald, 2001). Sendo assim, a PGE<sub>2</sub> é capaz de induzir diversos efeitos em diferentes populações leucocitárias. O perfil de expressão destes receptores e sua distribuição tecidual é um dos componentes que determina o efeito biológico exercido pela PGE<sub>2</sub>, que pode também sofrer dessensibilização e internalização.

Na resposta inflamatória, a PGE<sub>2</sub> se destaca por apresentar uma importante atividade vasodilatadora e por mediar a dor inflamatória. Os seus efeitos anti-inflamatórios incluem a inibição da proliferação de linfócitos T, da diferenciação de linfócitos B, da ativação e da mobilização de neutrófilos e eosinófilos para o foco inflamatório e a produção/liberação de mediadores inflamatórios (Fischer, Durandy e Griscelli, 1981; Garrone *et al.*, 1994; Sturm *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2012; Wheeldon e Vardey, 1993; Wise e Jones, 1994; Talpain *et al.*, 1995; Wise, 1996). Entretanto, em macrófagos a PGE<sub>2</sub> pode exercer papéis opostos. A PGE<sub>2</sub> é capaz de inibir a ativação dessas células através da sinalização via EP<sub>2</sub> (Zaslona *et al.*, 2012), inibindo a produção de óxido nítrico, a fagocitose e induzindo a migração e a produção de citocinas imunoregulatórias, tais como a IL-10 e IL-17 (Asakrah *et al.*, 2013; Aronoff, Canetti e Peters-Golden, 2004; Aronoff, 2012; Nakayama *et al.*, 2006; Huang, M. *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2012). A PGE<sub>2</sub> também possui efeitos opostos em células dendríticas,

interrompendo a diferenciação dessas células em estágios iniciais do desenvolvimento (Kaliński *et al.*, 1997) e acelerando a sua maturação em estágios mais tardios da diferenciação, na presença de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Rieser *et al.*, 1997; Kaliński *et al.*, 1998). A PGE<sub>2</sub> também é capaz de modular células NK diretamente, inibindo a produção de INF- $\gamma$  (Mailliard *et al.*, 2005), a migração (Dupuy *et al.*, 2012) e a atividade citotóxica, observado através da redução da expressão de CD107a e da indução de morte de células tumorais (Martinet *et al.*, 2010). De maneira similar, foi observado que a PGE<sub>2</sub> inibe a atividade citotóxica de linfócitos T  $\gamma\delta$ , inibindo a expressão de CD107a e do *killing* de células tumorais (Martinet *et al.*, 2010).

Dentre os mediadores lipídicos, a PGE<sub>2</sub> é o que apresenta o papel pro-tumoral mais proeminente. Já foi relatado que a PGE<sub>2</sub> é produzida no tecido tumoral de humanos com câncer de mama, pulmão, intestino, cabeça e pescoço (McLemore *et al.*, 1988; Rigas, Goldman e Levine, 1993; Wang e Dubois, 2004; Hambek *et al.*, 2007; Wang e Dubois, 2010). O aumento na produção desse mediador é associado a um mau prognóstico da doença (Hambek *et al.*, 2007). Além disso, diversos estudos demonstram que a PGE<sub>2</sub> promove a invasão e o crescimento do câncer intestinal em diferentes modelos murinos (Wang *et al.*, 2004; Wang e Dubois, 2006; Cha e DuBois, 2007). Corroborando com esses achados, foi demonstrado que camundongos deficientes para a produção desse mediador, ou ainda para os receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub>, apresentam um menor desenvolvimento tumoral comparado com animais selvagens (Watanabe *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2004; Shoji *et al.*, 2004; Shoji *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2008; Smyth *et al.*, 2009). Um mecanismo crucial pelo qual a PGE<sub>2</sub> exerce sua atividade pró-tumorigênica é via supressão da resposta imune local, através da inibição da resposta de macrófagos, células NK, linfócitos T  $\alpha\beta$  e linfócitos T  $\gamma\delta$  (Walker e Rotondo, 2004; Dinarello, 2006; Martinet *et al.*, 2010; Rodriguez-Vita e Lawrence, 2010).

## 2 OBJETIVOS

Investigar o efeito dos mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> na modulação da atividade de linfócitos T  $\gamma\delta$ , avaliando o seu impacto na atividade citotóxica contra células tumorais.

### 2.1 Objetivos específicos

1. Padronizar a expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  a partir de sangue humano periférico, através da cultura com o fosfoantígeno isopentenil pirofosfato (IPP) para a obtenção de uma cultura com pureza maior que 85%.
2. Avaliar a expressão dos receptores de LTB<sub>4</sub> (BLT1), PGE<sub>2</sub> (EP4) e LXA<sub>4</sub> (FPR2/ALX) por linfócitos T  $\gamma\delta$  (em repouso e ativados) e a mobilização de cálcio intracelular após reconhecimento de seus ligantes.
3. Investigar o papel de LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, e LXA<sub>4</sub> na ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$ , avaliando a expressão do marcador de ativação CD25 e L-selectina (CD62L).
4. Investigar o papel de LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, e LXA<sub>4</sub> na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 e dos marcadores de fenótipo CD27 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) e CCR6 (IL-17<sup>+</sup>).
5. Avaliar o efeito de LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, e LXA<sub>4</sub> na expressão de granzima B e do marcador de citotoxicidade CD107a e na atividade citotóxica de linfócitos T  $\gamma\delta$  contra células tumorais de melanoma B16F10 *in vitro*.
6. Investigar o papel de LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> na quimiotaxia *in vitro* e na migração *in vivo* de linfócitos T  $\gamma\delta$  para o pulmão de camundongos com metástase pulmonar, avaliando o seu perfil de produção de citocinas (IFN- $\gamma$  vs IL-17) e a sua capacidade em inibir o número de nódulos tumorais utilizando camundongos 5-LO KO.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Expansão de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos

Células mononucleares humanas foram obtidas a partir do sangue de doadores voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos e que não estavam sob o uso de corticóides. Para coleta do sangue, foram obtidas alíquotas (20-30 ml) de sangue periférico venoso, obtido através de venopunctura (agulha de calibre 23G). As células mononucleares foram isoladas através da centrifugação (400g) em gradiente de Histopaque 1077 (Sigma) e posteriormente plaqueadas ( $2 \times 10^5$  por poço) em placas de 96 poços de fundo em “U” em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB; 10%; Sigma), piruvato de sódio (1 mM) e penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml; Sigma). As células mononucleares foram incubadas com o fosfoantígeno isopentenil pirofosfato (IPP; 2-10  $\mu$ g/ml; Sigma) e interleucina-2 (IL-2; 12,2 ng/ml; Sigma) por 7 dias a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. No sétimo dia, as células foram recolhidas e lavadas com RPMI 1640 a 400g por 10 minutos. As células foram novamente plaqueadas ( $2 \times 10^5$  por poço) em meio RPMI 1640 contendo IPP (2-10  $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2 ng/ml) e mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por mais 7 dias. A pureza da cultura foi avaliada após os 14 dias de cultura, através de citometria de fluxo (FACScalibur; Becton & Dickinson), conforme descrito abaixo. Todos os procedimentos foram aprovados pela licença do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Fundação Oswaldo Cruz (Licença CEP n° 346.627).

#### 3.2 Estímulo de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos

Após o processo de expansão descrito a cima, os linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos foram plaqueados ( $1 \times 10^6$  células/poço) em placa de 96 poços de fundo em “U” em RPMI 1640 contendo 10% de SFB, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml; Sigma) e 1 mM de piruvato de sódio. As células foram mantidas em repouso em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas e em seguida incubadas com LXA<sub>4</sub> (100 nM; Cayman), PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M; Cayman) ou LTB<sub>4</sub> (10 nM) por 30 minutos. Após a incubação, as células foram estimuladas com 10  $\mu$ g/ml de IPP ou com LTB<sub>4</sub> por diferentes intervalos de tempo. Os grupos controle foram incubados com meio RPMI 1640. Para análise da expressão de marcadores de superfície (CD25, CD62L, CD27 e CCR6), as células foram estimuladas por 24 horas. Para avaliar a expressão de

CD107a na superfície das células e a liberação de granzima B, as células foram estimuladas por 2 horas.

### 3.3 Análise da viabilidade de linfócitos T $\gamma\delta$ *in vitro* por LDH

A viabilidade dos linfócitos T  $\gamma\delta$  na presença de LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> ou PGE<sub>2</sub> foi determinada utilizando o kit *Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit* (Sigma Aldrich). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram plaqueados em placas de 96 poços em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço e em seguida, as células foram incubadas por 2,5 horas na presença de LTB<sub>4</sub> (100 nM), LXA<sub>4</sub> (100 nM) ou PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M). Como controle negativo foi utilizado o RPMI e como controle positivo foi utilizado Tween-20 (3%). O experimento foi feito em quadruplicada por grupo em um volume final de 200  $\mu$ l/poço. Após 2,5 horas de incubação, a placa foi centrifugada a 250g durante 4 minutos para sedimentar as células. Em seguida, alíquotas de 100  $\mu$ l do sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços de fundo plano e foi adicionado 200  $\mu$ l da mistura dos reagentes do *kit* por poço, a placa foi coberta com um material opaco para proteger da luz e incubada à temperatura ambiente durante 20-30 minutos. A reação foi interrompida adicionando HCl 1N. A absorbância foi mensurada no Spectra Max 190 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 490 nm. A absorbância do background foi mensurada a 690 nm e esse valor foi subtraído da medição do comprimento de onda principal (490 nm) conforme as especificações do fabricante.

### 3.4 Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens isogênicas C57BL/6, sv/129 e camundongos sv/129-deficientes (5-LO-KO) na expressão da enzima 5-lipoxigenase (129-Alox5tm1Fun 5-LO<sup>-/-</sup>), pesando entre 20 e 25g, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight) no biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada, Fiocruz, até o momento do uso, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo de 12 horas de claro/escuro. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA, FIOCRUZ) sob licenças n° L62/12 e LW52/12.



### **3.5 Obtenção de células mononucleares murinas**

Baços de camundongos C57BL/6 eutanasiados foram retirados e macerados em RPMI 1640. Para a separação das células mononucleares foi realizado um gradiente de histopaque 1083 (2ml do macerado pipetados cuidadosamente sobre 3ml de histopaque 1083) submetido à centrifugação de 400g por 30 minutos, com aceleração e desaceleração mínimas. As células mononucleares foram recolhidas e após nova centrifugação (400g por 30 minutos), o *pellet* foi ressuspensionado em RPMI 1640 na concentração de células adequada aos ensaios subsequentes.

### **3.6 Isolamento magnético de linfócitos T $\gamma\delta$**

Para isolamento de linfócitos T  $\gamma\delta$ , células mononucleares esplênicas murinas foram submetidas a uma seleção negativa de linfócitos T, utilizando-se esferas magnéticas, recobertas com anticorpos  $\alpha$ -CD45B e  $\alpha$ -CD11b, concomitantemente realizou-se a marcação do TCR  $\gamma\delta$  com anticorpo  $\alpha$ -TCR  $\gamma\delta$  biotilado. Em seguida, as células foram novamente incubadas com estreptoavidina conjugada a esferas magnéticas e submetidas à seleção positiva em uma coluna magnética. Posteriormente, os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram removidos da coluna, conforme o protocolo descrito pelo fabricante (Miltenyi Biotec, CA, EUA), obtendo-se uma pureza de 90-95%.

### **3.7 Estímulo de linfócitos T murinos com anticorpo monoclonal $\alpha$ -CD3**

Uma solução de anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CD3 murino (50  $\mu$ l/poço; 500  $\mu$ g/ml) diluído em tampão fosfato (PBS) foi adicionado à placa de 96 poços de fundo chato por 4 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) para a adsorção. Em seguida, aproximadamente 40 $\mu$ l foram removidos dos poços para eliminar o excesso de anticorpo não adsorvido. As células mononucleares obtidas de baços murinos (descrito a cima) foram plaqueadas (1x10<sup>6</sup>; 100  $\mu$ l/poço) e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A marcação de CD25 e CD69 pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  foi analisada por citometria de fluxo (FACScalibur; Becton Dickinson).

### **3.8 Imunofenotipagem e análise por citometria de fluxo**

As células foram plaqueadas (1x10<sup>6</sup> células/poço) em uma placa de 96 poços de fundo em “U” e centrifugadas por 3 minutos a 964g. Os *pellets* foram ressuspensionados em 100  $\mu$ l de uma solução de PBS contendo 0,1% de azida sódica e 10% de SFB (PBS/Azida/SFB) e as

células foram incubadas por 30 minutos a 4°C para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação a imunoglobulinas. Após nova centrifugação 964g, as células foram ressuspensas em uma solução de PBS/Azida/SFB contendo os anticorpos monoclonais ( $\alpha$ -TCR  $\gamma\delta$ ,  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -BLT1,  $\alpha$ -EP4,  $\alpha$ -FPR2/ALX,  $\alpha$ -CD25,  $\alpha$ -CD69,  $\alpha$ -CD27,  $\alpha$ -CCR6 e  $\alpha$ -CD107a) conjugados a FITC, PE, PerCP ou PE/Cy7 e incubadas por 30 minutos a 4°C. A seguir, as células foram ressuspensas em PBS/Azida e transferidas para tubos de citometria de fluxo (Falcon). Como controle negativo da marcação específica, foram utilizados isotipos de anticorpos IgG conjugados aos respectivos fluorocromos sem especificidade de ligação às proteínas das células analisadas (BD Pharmingen). Ao menos  $10^5$  células foram adquiridas por amostra no citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson). A análise dos marcadores de superfície foi realizada utilizando o software FlowJo<sup>®</sup> (versão 7.6.5). Os dados foram coletados e expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência, apresentados como histogramas ou *dotplots*. O percentual da população de linfócitos T  $\gamma\delta$  CD3<sup>+</sup> foi determinado em uma região física, de acordo com a granulocidade (SSC-H) e tamanho (FSC-H) da célula. A avaliação da morte celular foi realizada através da marcação com iodeto de propídeo (PI) conforme instruções do fabricante (BD Pharmingen).

### 3.9 Western blot

Extratos celulares totais foram obtidos a partir de linfócitos T  $\gamma\delta$  estimulados com IPP (10  $\mu$ g/ml) e pré-tratados ou não com LXA<sub>4</sub> (100 nM) em tampão de lise RIPA (*radio-immunoprecipitation assay*) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolado de sódio, 1 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride* - fenilmetilsulfonil fluoreto) e coquetel de inibidores de protease (Sigma Aldrich). A quantificação das proteínas contidas no extrato celular foi determinado pelo método de Lowry (Sigma Aldrich). Os lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra Laemmli (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1% dodecil sulfato de sódio [SDS]; 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aquecidos a 95°C por 3 minutos. Em seguida, as proteínas obtidas dos lisados totais (20 ou 30  $\mu$ g/raia) foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (em gel 12% de poli(acrilamida)-SDS – 3,18 ml de acrilamida 30%, 1,59 ml de bis-acrilamida 1,6%, 1,23 ml de água deionizada, 100  $\mu$ l de persulfato de amônia (APS) 10%, 10  $\mu$ l tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 2 ml de tampão de gel de separação (1,5 M de Tris e 0,4% de SDS), e transferidas para membranas de transferência de fluoreto de polivinilidene (PVDF), previamente umedecida em metanol, utilizando tampão de transferência (25 mM Tris, 192

mM glicina [pH 8] e 20% metanol em água Milli-Q). A transferência foi realizada a 17V por 1 hora em Sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry, BioRad). Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora de albumina sérica bovina (BSA) a 5% em tampão Tris salino 0,1% Tween-20 (TBST; *tris buffered saline tween* – 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas (*overnight*, a 4°C) com anticorpos primários específicos anti-BLT1 e anti-FPR2/ALX; ambos diluídos a 1:5000 em TBST. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário  $\alpha$ -cabra diluído 1:10000 conjugados a peroxidase (HRP) e diluídos em TBST. A detecção foi feita usando o kit ECL (*Enhanced Chemiluminescence, Pierce*) e as membranas expostas a filme de autorradiografia. As bandas foram quantificadas por densitometria usando o software Image J (domínio público).

### 3.10 Ensaio de influxo de cálcio

Os ensaios de mensuração de cálcio intracelular foram realizados através do *kit* “Calcium Assay Kit” (Molecular Devices) nos equipamentos FlexStation-2 e FlexStation-3 (Molecular Devices), de acordo com as instruções do fabricante. Linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos e murinos (>90% de pureza) foram plaqueados ( $5 \times 10^4$ /poço) em placa preta e incubados em RPMI 1640 por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A placa foi centrifugada a 100g por 4 minutos, sem desaceleração, para retirada do meio. Em seguida, as células foram incubadas com *loading buffer* contido no *kit*, para marcação do cálcio intracelular. Os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram estimulados com LTB<sub>4</sub> (10 nM), LXA<sub>4</sub> (100 nM) ou PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) em meio *Hank's balanced salt solution* (HBSS) e a leitura ( $Y_{ex} = 485\text{nm}$ ;  $Y_{em} = 525\text{nm}$ ; *Cut-off* = 515nm) realizada entre 0 e 2.400 segundos, a cada 10-30 segundos no FlexStation.

### 3.11 Ensaio de quimiotaxia *in vitro*

Linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos (>85% de pureza,  $5 \times 10^4$  células/poço) foram mantidos em repouso por 24 horas em placa de 96 poços de fundo em "U" em RPMI 1640 contendo 10% de SBF, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml) e 1mM de pituvato de sódio em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram tratadas com RPMI 1640 ou BOC-1 (40 nM, antagonista de ALX; Genscript) por 30-60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e em seguida incubadas com RPMI 1640 ou LXA<sub>4</sub> (100 nM) por 45-60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após as incubações, as células ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram adicionadas aos *inserts* de cultura (5,0

µm; Corning) em placas de 96 poços contendo RPMI 1640, LTB<sub>4</sub> (100 nM) ou LXA<sub>4</sub> (100 nM). A placa foi incubada por 2 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células que migraram para a parte inferior do poço foram contadas em Câmara de Neubauer (Bright-line), em microscópio ótico (400x).

### 3.12 Análise da atividade citotóxica de linfócitos T γδ

Linfócitos T γδ humanos (>85% de pureza, 1x10<sup>6</sup> células/poço) foram plaqueados em placa de 96 poços de fundo em “U” 4x10<sup>5</sup> células por poço. As células foram mantidas em repouso por 24 horas em RPMI 1640 contendo 10% de SBF, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 µg/ml) e 1 mM de piruvato de sódio em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após repouso, os linfócitos T γδ foram incubados com RPMI, LXA<sub>4</sub> (100 nM), PGE<sub>2</sub> (1 µM) ou LTB<sub>4</sub> (100 nM) por 45-60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e em seguida estimulados com IPP (10 µg/ml) por 2 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para avaliar o efeito inibitório da LXA<sub>4</sub>, um dos grupos foi pré-tratado com LXA<sub>4</sub> (100 nM, 45 minutos) e posteriormente estimulados com LTB<sub>4</sub> e IPP. A placa foi centrifugada a 31g por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado para a dosagem de granzima B e as células foram marcadas com anticorpo α-CD107a humano para análise por citometria de fluxo conforme descrito acima. A dosagem de granzima B presente no sobrenadante foi realizada através do kit *Granzyme B Activity Fluorometric Assay Kit (Biovision)* conforme especificações do fabricante. Foram adicionados 50µl por poço do sobrenadante das amostras em placa de 96 poços de fundo chato. Como controle positivo, foram adicionados em um poço 2 µl do controle positivo contido no *kit* (granzima B humana recombinante) e 48µl de *Granzyme B assay buffer*. Em poços seriados, foram adicionados 0, 5, 10, 15, 20 e 25µl do padrão AFC a 10µM (molécula fluorescente liberada quando a granzima B degrada o substrato) e os volumes foram ajustados com *Granzyme B assay buffer* para 100µl. Em seguida, foram adicionados 50 µl do *reaction mix* (1 de *granzyme B substrate* para 10 de *Granzyme B assay buffer*) em cada poço contendo as amostras testes e o controle positivo. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C ao abrigo da luz e a fluorescência foi medida Ex/Em=380/500nm através do Spectramax M5 (Molecular Devices).

### 3.13 Cultura de células B16F10

Células B16F10 CRL-6475™, livres de contaminação por micoplasma, foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina G sódica (100 U/ml) e sulfato de estreptomicina

(100µg/ml), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico (HEPES, 3mg/ml), bicarbonato (2,2mg/ml) e L-glutamina (0,3mg/ml). As células foram repicadas 2 vezes por semana, até atingirem confluência, sendo diluídas 10 vezes em cada passagem.

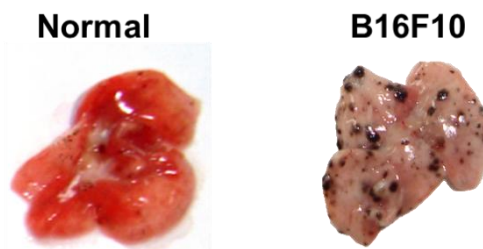
### **3.14 Ensaio de morte de células tumorais**

As células de melanoma B16F10 ( $2 \times 10^5$ /poço) foram plaqueadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) em placa de 96 poços de fundo chato e mantidas em repouso por 24 horas. Linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos (>85% de pureza,  $1 \times 10^6$  células/poço) foram plaqueados em placa de 96 poços de fundo em “U”. Os linfócitos foram mantidos em repouso por 24 horas em RPMI 1640 contendo 10% de SBF, penicilina (100U/ml)/estreptomicina (100µg/ml) e 1mM de piruvato de sódio em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após repouso, os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram pré-tratados com LXA<sub>4</sub> (100nM) ou PGE<sub>2</sub> (1µM) por 30 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e então incubados com PGE<sub>2</sub> ou LTB<sub>4</sub> (100nM) por 30 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com IPP (10µg/ml) e transferidas para a placa contendo células B16F10. As células foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação o sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços de fundo em “U” para recolher as células que se soltaram após a morte. As células aderidas foram desaderidas com tripsina/EDTA 1X (Sigma Aldrich) e transferidas para os poços contendo o sobrenadante anteriormente recolhido. Para avaliar o efeito da morte das células tumorais pelos linfócitos T  $\gamma\delta$ , foi realizada uma marcação com iodeto de propídeo (PI) e anexina V, conforme instruções do fabricante (BD Pharmingen). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson), separando as células B16F10 dos linfócitos T  $\gamma\delta$  através do *gate* realizado no *dotplot* de granulosidade (SSC-H) *versus* tamanho (FSC-H) da célula. Como controle negativo foram utilizadas células B16F10 que não foram incubadas com linfócitos e como controle positivo de morte as células tumorais foram incubadas por 5 minutos a -20°C e depois submetidas a aquecimento a 100°C por 2 minutos.

### **3.15 Modelo de metástase *in vivo***

Células B16F10 ( $2 \times 10^5$  células) foram injetadas sv/129 (WT) e camundongos sv/129 5-LO-KO, por via intra-venosa (i.v.) em 400 µl em PBS. Após duas semanas, os animais

foram eutanasiados em câmara de gás carbônico, suas traquéias foram canuladas e seus pulmões inflados com PBS para a contagem dos nódulos tumorais. A contagem dos nódulos foi realizada com o auxílio de uma lupa e os mesmos foram quantificados em número de nódulos, independente do tamanho. A **Figura 3. 1** abaixo demonstra o pulmão de um animal naïve (normal) e um pulmão de um camundongo C57BL/6 injetado com células B16F10, 14 dias após a injeção.



**Figura 3. 1:** Exemplo de pulmão obtido de um camundongo C57BL/6 naïve e de um injetado com B16F10 ( $2 \times 10^5$  células i.v.), 14 dias após a injeção.

### 3.16 Obtenção das células do tecido pulmonar

Após a eutanásia dos camundongos, os pulmões foram removidos e cortados em pequenos pedaços sobre os quais foi adicionada uma solução de RPMI 1640 contendo 250UI/ml de colagenase tipo IV (Invitrogen, CA, EUA). Os pulmões foram submetidos a duas incubações de 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  sob leve agitação e, entre essas, foi feita uma homogeneização do macerado com ajuda de uma seringa de 5ml e agulha de 14G. O tecido digerido pela colagenase do tipo IV foi filtrado com ajuda de uma rede autoclavada com trama de  $4,0\mu\text{m}$  e a suspensão celular foi centrifugada a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido para dosagem de citocinas, o *pellet* de células foi ressuspensionado em 1,5ml de PBS contendo EDTA (10 mM; PBS-EDTA). As suspensões celulares foram mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Foi feito um gradiente de concentração com Histopaque 1083 (3ml) para separação de células mononucleares (em 1,5ml da suspensão celular) e centrifugados a 400g por 30 minutos com aceleração e desaceleração mínimas. As células mononucleares foram recolhidas dos tubos e contadas em câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas para a concentração adequada para ensaios de citometria de fluxo e ensaios *in vitro*.

### **3.17 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Foram adicionados à placa de polipropileno de fundo chato com 96 poços (NUNC<sup>®</sup> modelo Maxisorp, EUA) anticorpos de captura  $\alpha$ -IL-17 ou  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  diluídos em 50  $\mu$ l de um tampão de cobertura (150mM dihidrogênio fosfato de sódio dihidratado, pH 9,0). Para fixar a cobertura de anticorpos, a placa foi incubada por aproximadamente 18 horas a 4°C. Após a incubação, os poços foram lavados com uma solução de tween 20 a 0,05% diluído em PBS (PBS Tween). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com 200 $\mu$ l de PBS contendo 1% albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich) por 1 hora a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada e incubada com 100 $\mu$ l das amostras e da curva padrão indicada pelo fabricante (18 horas, 4° C). Após nova lavagem a placa foi incubada com 100 $\mu$ l de anticorpos biotinizados diluídos em PBS contendo 1% de BSA (1 hora, 20°C). A placa foi lavada e incubada com 50 $\mu$ l de estreptoavidina (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 20°C, seguida de 100 $\mu$ l de tampão perborato adicionado de 0,5mg/ml de OPD até a revelação. A reação foi bloqueada com 100 $\mu$ l de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M e a leitura realizada por espectrofotometria a 490nm.

### **3.18 Análise Estatística**

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) para comparação intergrupos, com pós-teste de *Newman-Keuls* para comparação múltiplas; e teste *T-Student*. Foram considerados significativos valores com  $p \leq 0,05$ .

### **3.19 Consideração sobre Aspectos Éticos**

O Laboratório de Farmacologia Aplicada é certificado como nível II pela CTNBio (CQB 342/12) o que permite trabalhar com organismos geneticamente modificados.

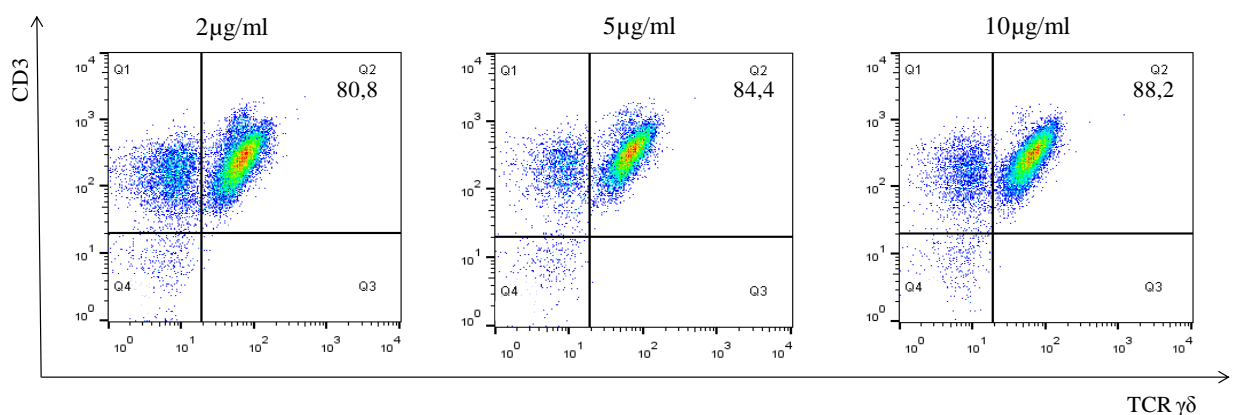
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Padronização do protocolo de expansão de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos induzida por isopentenil pirofosfato (IPP)

Dentre os antígenos diretamente reconhecidos pelos linfócitos T  $\gamma\delta$ , destacam-se os fosfoantígenos, que levam à ativação e à proliferação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos (Bloom *et al.*, 1995). Com o intuito de realizar ensaios com uma cultura de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos com pureza >80%, nós padronizamos o protocolo de expansão *in vitro* de linfócitos T  $\gamma\delta$  a partir de células mononucleares de sangue humano, através do estímulo com o fosfoantígeno derivado da via do mevalonato, o isopentenilpirofosfato (IPP) (Constant *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 2009).

#### 4.1.1 Efeito de diferentes concentrações de IPP

Inicialmente, investigamos o efeito de diferentes concentrações de IPP sobre o enriquecimento de linfócitos T  $\gamma\delta$  a partir de cultura de células mononucleares de sangue humano. A **Figura 4. 1** demonstra *dotplots* representativos da cultura 14 dias após o estímulo com IPP, na presença de IL-2. Podemos observar que aproximadamente 80%, 85% e 88% de células CD3<sup>+</sup>/TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> foram obtidas com 2, 5 e 10 $\mu$ g/ml de IPP, respectivamente. A partir deste resultado escolhemos a concentração de 5 $\mu$ g/ml de IPP para os experimentos subsequentes.

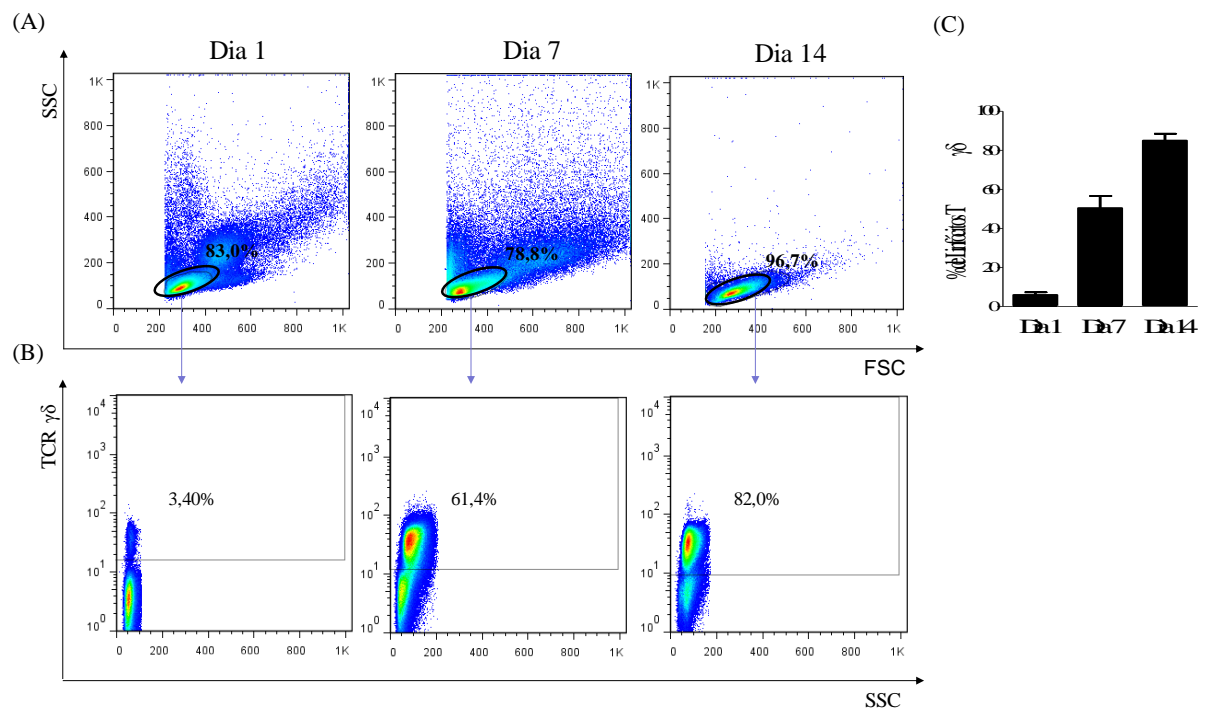


**Figura 4. 1: Expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos com diferentes concentrações de IPP.** Dotplots representativos de células mononucleares de sangue humano mantidas em cultura por 14 dias após estímulo com diferentes concentrações de IPP (2, 5 e 10 $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2ng/ml) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> marcadas com mAbs  $\alpha$ -CD3 e  $\alpha$ -TCR  $\gamma\delta$ . Análise realizada por FACScalibur (Becton Dickinson).



### 4.1.2 Análise temporal

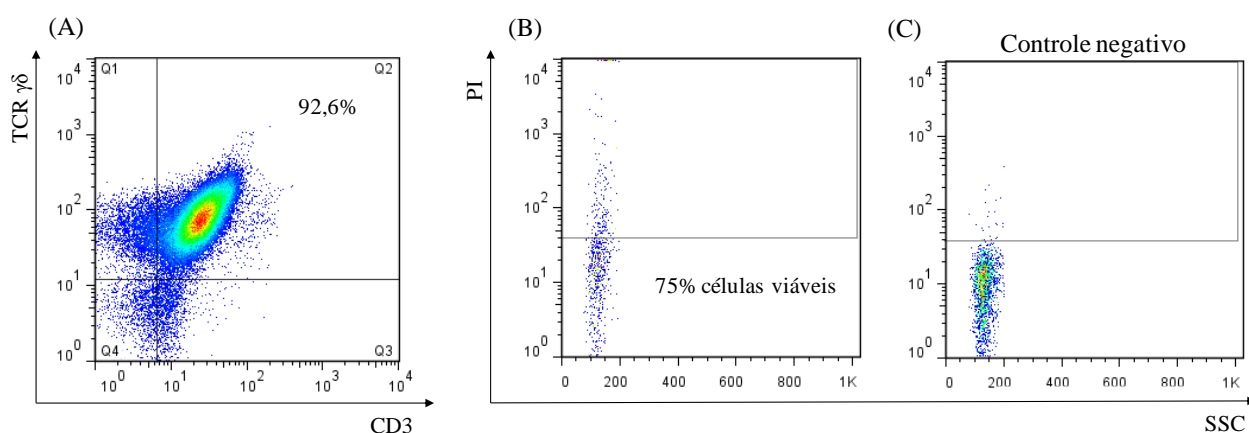
Em seguida, avaliamos a expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  a partir da cultura de células mononucleares 1, 7 e 14 dias após estímulo com IPP ( $5\mu\text{g/ml}$ ). A **Figura 4. 2 A** demonstra *dotplots* representativos das características físicas (tamanho [FSC-H] e granulosidade [SSC-H]) das populações celulares em cultura 1, 7 e 14 dias após incubação com IPP. Observamos que após 14 dias de cultura, ocorreu uma redução quase total da população de monócitos, restando uma população majoritária de linfócitos T (>94%, dados não mostrados). Dentre os linfócitos T presentes na cultura, aproximadamente 90% eram linfócitos T  $\gamma\delta^+$ , conforme demonstrado nos *dotplots* representativos (TCR  $\gamma\delta^+$  vs SSC-H) (**Figura 4. 2 B**) e no gráfico de porcentagens (**Figura 4. 2 C**).



**Figura 4. 2: Expansão de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos com 1, 7 e 14 dias de cultura.** (A) *Dotplots* representativos de granulosidade (SSC-H) x tamanho (FSC-H) de células mononucleares de sangue humano (dia 1) estimuladas com IPP ( $5\mu\text{g/ml}$ ) e IL-2 ( $12,2\text{ ng/ml}$ ) por 7 e 14 dias a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . As porcentagens representam linfócitos T dentro da população total de células. (B) *Dotplots* representativos de granulosidade (SSC-H) e TCR  $\gamma\delta^+$  dentro o *gate* físico de linfócitos 1, 7 e 14 dias após estímulo. (C) O gráfico representa o percentual de linfócitos T  $\gamma\delta$ , 1, 7 e 14 dias após estímulo. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes realizado em quadruplicatas por grupo. Aquisição realizada por FACScalibur (Becton Dickinson).

### 4.1.3 Análise da viabilidade celular de linfócitos T $\gamma\delta$ após expansão

Para avaliar se o estímulo com 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de IPP estaria induzindo morte celular, nós realizamos análise de viabilidade através da incubação das células com o marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI). A análise foi realizada nas células  $\text{CD3}^+/\gamma\delta^+$  demonstradas na **Figura 4. 3 A**. Observamos na **Figura 4. 3 B** que 75% dos linfócitos T  $\gamma\delta$  estavam viáveis (i.e. não apresentaram marcação para PI) após 14 dias de cultura com IPP, conforme observado por citometria de fluxo. Na **Figura 4. 3 C**, está demonstrado um *dotplot* de células não marcadas (controle negativo).

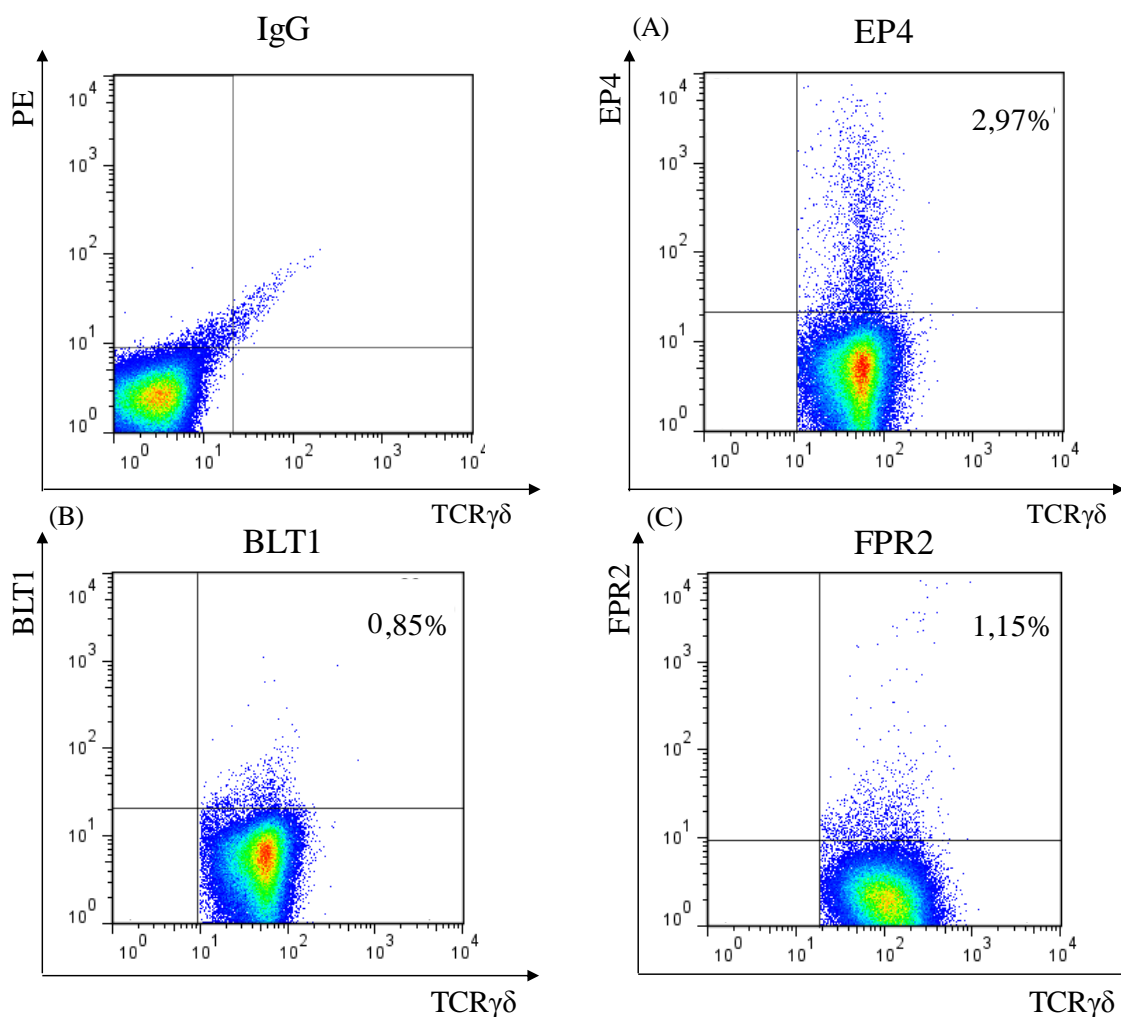


**Figura 4. 3: Viabilidade de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos 14 dias após estimulação com IPP.** (A) *Dotplot* representativo da marcação de  $\text{TCR}\gamma\delta$  x  $\text{CD3}$  em células mononucleares mantidas em cultura por 14 dias na presença de IPP (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e IL-2 (12,2  $\text{ng}/\text{ml}$ ) a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . (B) *Dotplot* representativo da marcação de PI x granulosidade (SSC) da população enriquecida em linfócitos T  $\gamma\delta$ . Análise realizada por FACScalibur (Becton Dickinson). (C) *Dotplot* representativo do controle sem marcação com PI. Resultados representativos de 2 experimentos independentes, em quadruplicata. Para realização do quadrante das células positivas para PI, foi utilizado um controle negativo no qual as células não receberam nenhum tipo de marcação.

## 4.2 Linfócitos T $\gamma\delta$ humanos expressam os receptores de mediadores lipídicos EP4, BLT1 e FPR2/ALX

A expressão dos receptores dos mediadores lipídicos  $\text{PGE}_2$  (EP4),  $\text{LTB}_4$  (BLT1) e  $\text{LXA}_4$  (FPR2/ALX) na superfície de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos foi avaliada inicialmente através da marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, e a análise realizada por citometria de fluxo. Podemos observar que linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos obtidos por expansão na presença de IPP e IL-2 por 14 dias expressam EP4 (2,97%), BLT1 (0,85%) e FPR2/ALX

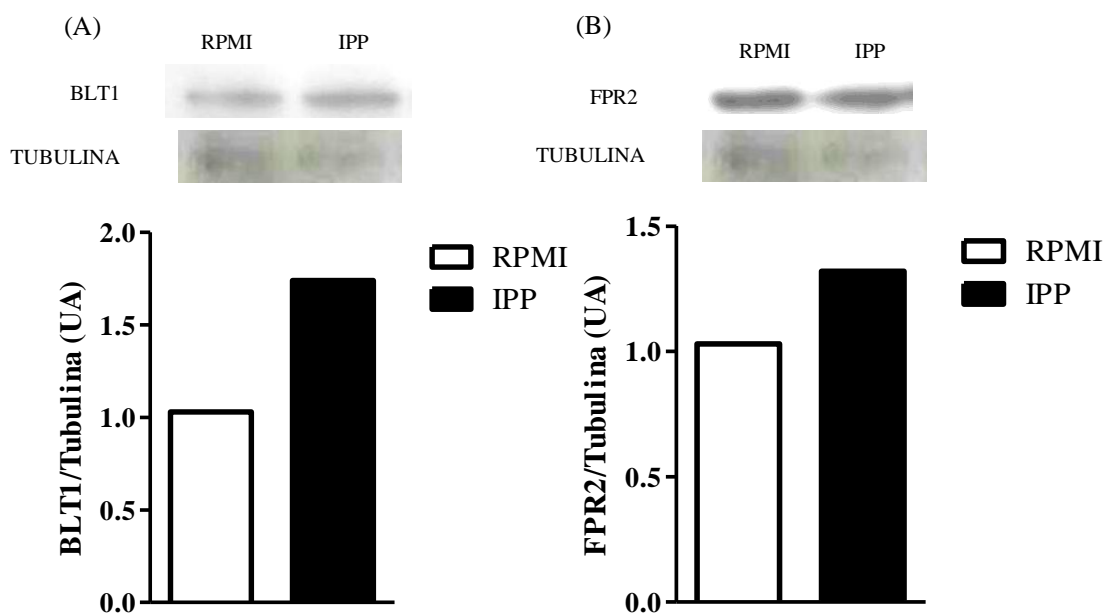
(1,15%), conforme demonstrado nos *dotplots* representativos (**Figura 4. 4 A-C**). Na **Figura 4. 4 D** está demonstrado um *dotplot* representativo do controle negativo da marcação (IgG).



**Figura 4. 4: Expressão dos receptores de superfície EP4, BLT1 e FPR2/ALX por linfócitos T  $\gamma\delta$ .** *Dotplots* representativos da marcação de TCR  $\gamma\delta$  x EP4, BLT1 ou FRP2/ALX em linfócitos T  $\gamma\delta$  obtidos por expansão em cultura com IPP (5 $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2ng/ml) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 14 dias. Análise realizada por FACScalibur (Becton Dickinson) de 2 experimentos independentes, em quadruplicata por grupo.

A expressão dos receptores BLT1 e FPR2/ALX também foi avaliada pela técnica de *western blot* em extratos celulares de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos (pureza >90%) tanto em repouso quanto re-estimulados com IPP, afim de verificar se a ativação aumenta o sinal de detecção dos receptores. Mais uma vez, a presença desses receptores foi detectada, tanto em células em repouso (24h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> após expansão) como em células que receberam um re-estímulo com IPP (10  $\mu$ g/ml) por 2 horas (**Figura 4. 5 A e B**). Observamos que o re-estímulo com IPP induziu um pequeno aumento na expressão dos receptores, entretanto esse

experimento será repetido, pois é representativo de duplicatas de um único experimento. Em adição, também realizaremos a técnica de *western blot* para a avaliação da expressão de EP4 em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, para a confirmação dos dados obtidos por citometria de fluxo.



**Figura 4. 5: Expressão dos receptores BLT1 e FPR2/ALX por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos por *western blot*.** Detecção dos receptores BLT1 (A) e FPR2 (B) após 14 dias de estímulo com IPP (5 $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2ng/ml) seguido por 24 horas de repouso a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram re-estimuladas com IPP (10 $\mu$ g/ml) por 2 horas. A expressão dos receptores foi analisada por *western blot*, a partir dos extratos celulares. A tubulina foi utilizada como proteína constitutiva controle. A análise densitométrica da expressão dos receptores é demonstrada nos gráficos (Image J software).

#### 4.3 LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> não induzem morte de linfócitos T $\gamma\delta$ *in vitro*

Para avaliar os efeitos dos mediadores lipídicos em ensaios com linfócitos T  $\gamma\delta$  isolados *in vitro*, nós inicialmente avaliamos a viabilidade destas células após incubação com as concentrações que foram utilizadas como estímulo. A **Tabela 4. 1** demonstra que a incubação de linfócitos T  $\gamma\delta$  com LTB<sub>4</sub> (100 nM), LXA<sub>4</sub> (100 nM) e PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) por 2,5 horas e 24 horas, não induziu morte celular, através da técnica de detecção de LDH no sobrenadante da cultura celular, garantindo que os efeitos induzidos por estes mediadores não são decorrentes de morte celular.

**Tabela 4. 1: Viabilidade celular de linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados.**

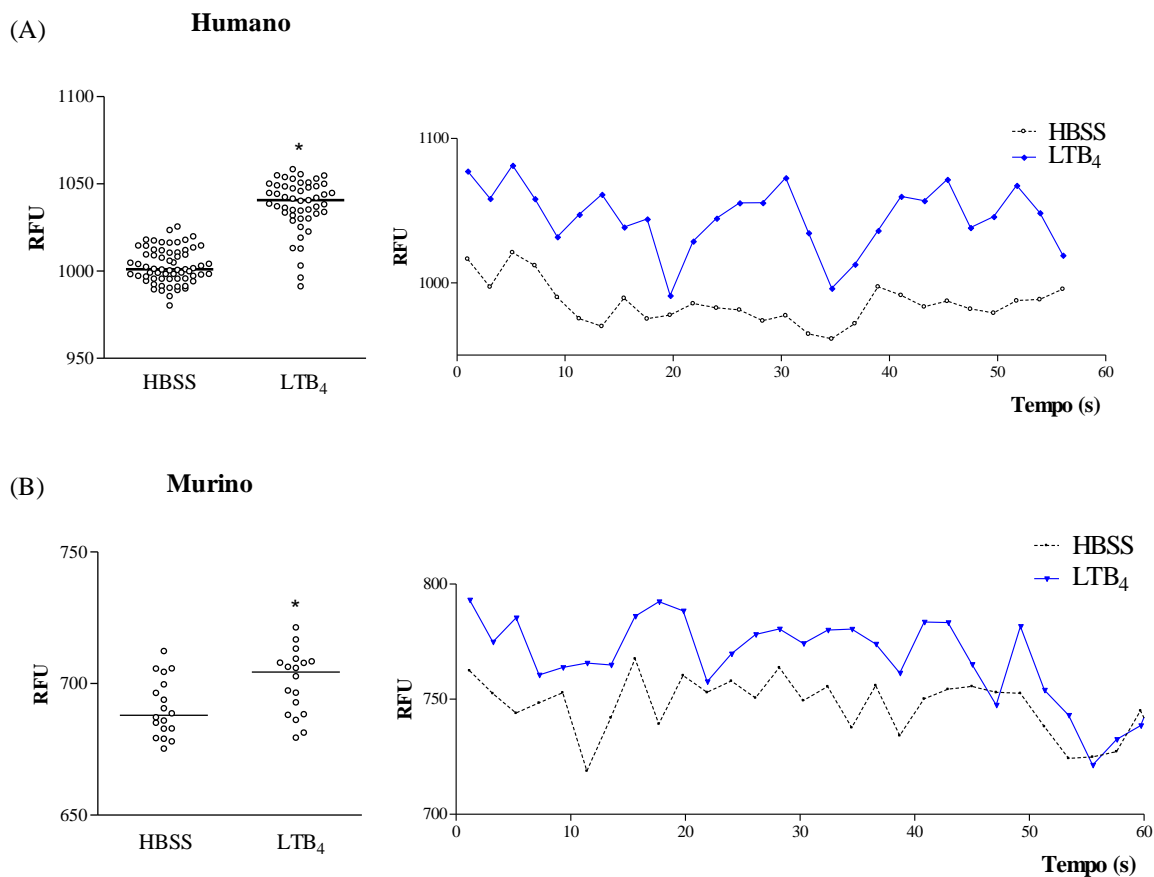
| Estímulo                | RPMI    | LTB <sub>4</sub> (100nM) | LXA <sub>4</sub> (100nM) | PGE <sub>2</sub> (1 $\mu$ M) |
|-------------------------|---------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
| % de viabilidade (2,5h) | 100,00% | 100,00%                  | 100,00%                  | 100,00%                      |
| % de viabilidade (24h)  | 100,00% | 100,00%                  | 100,00%                  | 95,00%                       |

Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de viabilidade. O ensaio foi realizado em quadruplicata por grupo contendo  $1 \times 10^6$  células/poço incubadas com os mediadores por 2,5 horas ou 24 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A porcentagem de células viáveis foi calculada a partir do kit *In Vitro Toxicology Assay, Lactic Dehydrogenase*.

#### **4.4 LTB<sub>4</sub> induz influxo de cálcio em linfócitos T $\gamma\delta$ *in vitro***

Com o intuito de avaliar a funcionalidade do BLT1 expresso por linfócitos T  $\gamma\delta$ , avaliamos a indução de aumento do conteúdo de cálcio intracelular em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos e murinos, após estímulo com LTB<sub>4</sub>. As concentrações utilizadas neste ensaio foram escolhidas a partir de ensaios prévios de dose-resposta realizados com linfócitos T previamente realizados em nosso laboratório (dados não mostrados), sendo 10nM a concentração de escolha para o ensaio de influxo de cálcio, realizado através do o kit “Calcium Assay Kit” no equipamento FlexStation 2 (Molecular Devices).

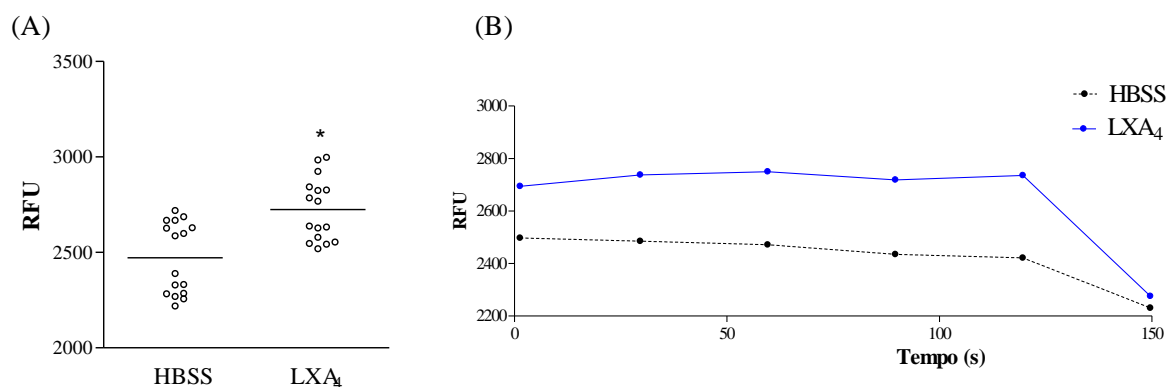
Nós observamos que o estímulo com LTB<sub>4</sub> induziu um rápido acúmulo de cálcio intracelular em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos e murinos, como pode ser observado na **Figura 4. 6 A e B**, respectivamente. Os gráficos à esquerda demonstram os valores de unidade relativa de fluorescência (RFU), obtidos de 1 segundo a 5 minutos após estímulo. Os gráficos temporais demonstrados à direita representam a média de RFU de quadruplicata por grupo, de 1 a 60 segundos após o estímulo.



**Figura 4. 6: Influxo de cálcio induzido por LTB<sub>4</sub> em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos e murinos.** Influxo intracelular de cálcio induzido por LTB<sub>4</sub> (10nM) em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos (A) e murinos (B). Os linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos foram obtidos através da expansão de células mononucleares periféricas por 14 dias com IPP (5 $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2ng/ml) e os linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos foram isolados a partir de esplenócitos de camundongos C57BL/6 por microesferas magnéticas (MiltenyiBiotec). Os ensaios foram realizados com o “Calcium Assay Kit” como recomenda o fabricante e a leitura foi realizada no equipamento FlexStation 2 (Molecular Devices). Diferenças estatísticas entre os controles e os grupos estimulados estão indicadas por (\*). Os gráficos da esquerda demonstram valores de RFU obtidos entre 1 segundo-1 minuto após o estímulo e os gráficos à direita demonstram a média de RFU realizada entre 0-60 segundos.

#### 4.5 LXA<sub>4</sub> induz influxo de cálcio em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos *in vitro*

Após observar que os linfócitos T  $\gamma\delta$  expressam FPR2/ALX, avaliamos se a LXA<sub>4</sub> leva à estimulação celular através do aumento de cálcio intracelular em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos. Observamos que a incubação com LXA<sub>4</sub> (100nM) induziu um rápido aumento de cálcio intracelular em linfócitos T  $\gamma\delta$ , como demonstra a **Figura 4. 7 A e B**. O gráfico **A** demonstra valores de RFU, obtidos de 1 segundo a 2,5 minutos após estímulo. O gráfico temporal demonstrado em **B** representa a média de RFU de quadruplicata por grupo, de 1 segundo a 150 segundos após o estímulo.



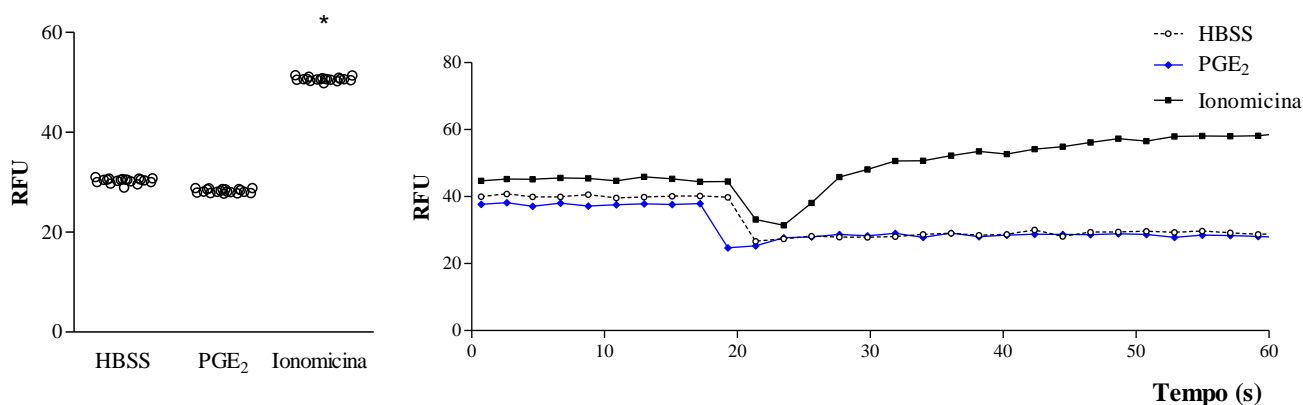
**Figura 4. 7: Influxo de cálcio induzido por LXA<sub>4</sub> em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** Mensuração do influxo intracelular de cálcio induzido por LXA<sub>4</sub> (100nM) em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos obtidos após 14 dias em cultura na presença de IPP (5 $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2ng/ml). O ensaio foi realizado com o “Calcium Assay Kit” como recomenda o fabricante e a placa foi lida no equipamento FlexStation 2 (Molecular Devices). A leitura foi realizada a cada 30 segundos por 2,5 minutos. (A) O gráfico representa os valores de RFU obtido de 1 segundo a 2,5 minutos. Diferenças estatísticas entre o controle e os grupos estimulados estão indicadas por (\*). (B) O gráfico demonstra a média de RFU realizada entre 0-150 segundos, de quadruplicata por grupo.

Em conjunto, estes resultados demonstram que os receptores BLT1 e FPR2/ALX são funcionais e que seus ligantes induzem uma resposta nos linfócitos T  $\gamma\delta$ .

#### 4.6 PGE<sub>2</sub> não induz influxo de cálcio em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos *in vitro*

Após observar que o estímulo com LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> induziram influxo de cálcio em linfócitos T  $\gamma\delta$ , avaliamos se a PGE<sub>2</sub> induziria o mesmo efeito. Como demonstra a **Figura 4.8**,

nós observamos que a PGE<sub>2</sub> não foi capaz de induzir aumento no conteúdo de cálcio intracelular em linfócitos T  $\gamma\delta$ , apresentando um perfil semelhante ao observado pela incubação com HBSS. Este resultado está de acordo com a expressão de EP<sub>4</sub> por linfócitos T  $\gamma\delta$ , uma vez que a ligação da PGE<sub>2</sub> leva a um aumento cálcio intracelular apenas quando reconhecido pelo EP<sub>1</sub>, enquanto que a sinalização induzida através da ligação ao EP<sub>4</sub>, aumenta o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) sem induzir a mobilização de cálcio intracelular (Narumiya e FitzGerald, 2001). Nosso resultado indica que a PGE<sub>2</sub> exerce seus efeitos através do EP<sub>4</sub> em linfócitos T  $\gamma\delta$ . O gráfico **A** demonstra valores de RFU, obtidos de 1 – 60 segundos após estímulo. O gráfico temporal demonstrado em **B** representa a média de RFU de quadruplicata por grupo, de 1 segundo a 60 segundos após o estímulo.



**Figura 4. 8: Influxo de cálcio induzido por PGE<sub>2</sub> em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** Mensuração do influxo intracelular de cálcio induzido por PGE<sub>2</sub> (1 $\mu$ M) em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos obtidos após 14 dias em cultura na presença de IPP (5 $\mu$ g/ml) e IL-2 (12,2ng/ml). O ensaio foi realizado com o “Calcium Assay Kit” como recomenda o fabricante e a placa foi lida no equipamento FlexStation 3 (Molecular Devices). (A) O gráfico representa os valores de RFU obtido de 1-60 segundos. Diferenças estatísticas entre o controle e os grupos estimulados estão indicadas por (\*). (B) O gráfico demonstra a média de RFU realizada entre 0-60 segundos, de quadruplicata por grupo.

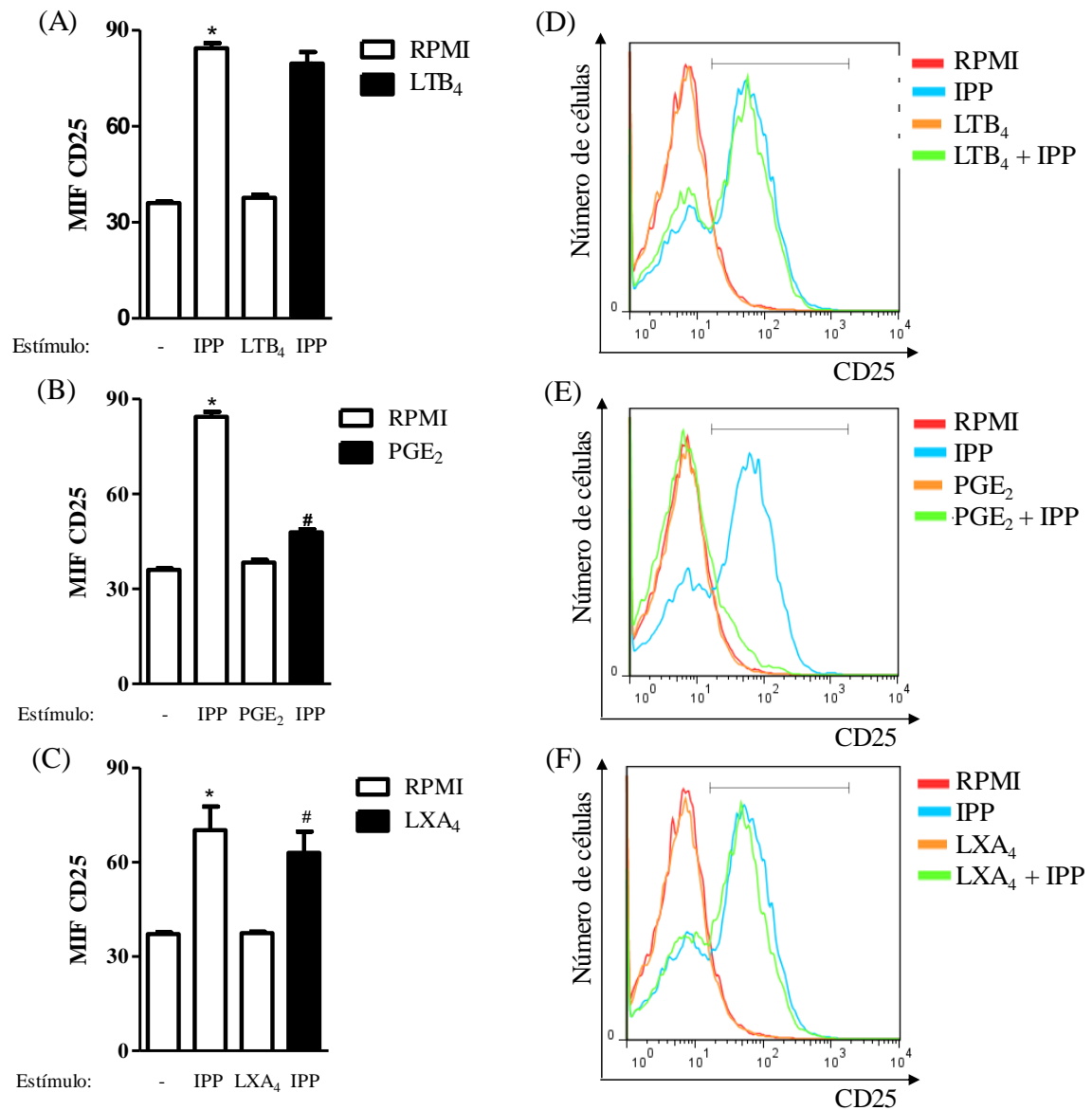
#### 4.7 PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> inibem a expressão de CD25 de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados com IPP

O CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (IL-2R) e o aumento na sua expressão está relacionada com a ativação e a proliferação de linfócitos T (Hatakeyama *et al.*, 1989). Desta forma, avaliamos a modulação da expressão deste receptor através de citometria de fluxo e observamos que o estímulo com IPP (10 $\mu$ g/ml) induziu um aumento na média de intensidade



de fluorescência (MIF) de CD25 nos linfócitos T  $\gamma\delta$ , quando comparado com o grupo não estimulado (incubado com RPMI) (**Figura 4.9 A-C**). O estímulo com LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> não induziu alteração na expressão deste receptor (**Figura 4.9 A-C**).

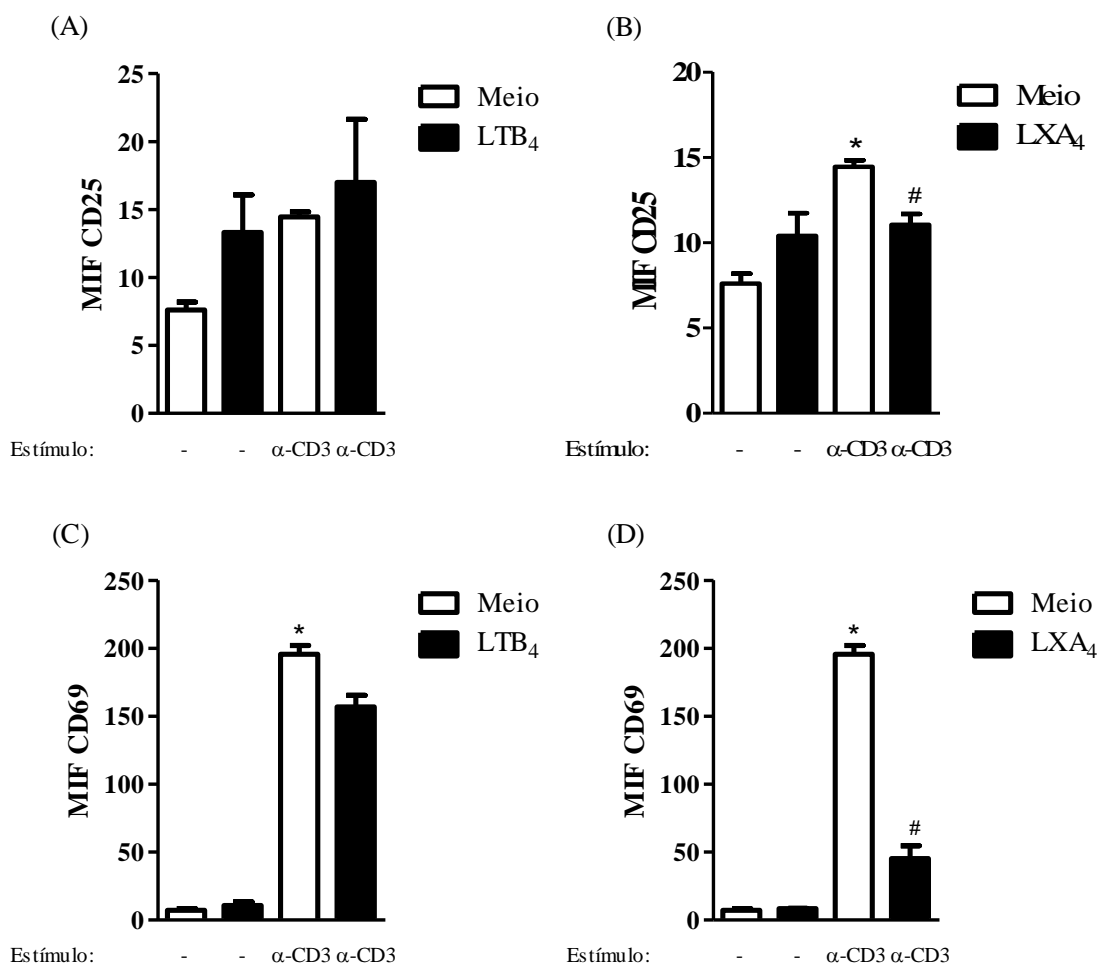
De forma interessante, o pré-tratamento com PGE<sub>2</sub> (**Figura 4.9 B**) e com LXA<sub>4</sub> (**Figura 4.9 C**), inibiu a expressão de CD25 induzida pelo IPP, enquanto o LTB<sub>4</sub> não potencializou nem inibiu a expressão deste receptor (**Figura 4.9 A**). Vale ressaltar que a modulação da expressão do marcador de ativação CD69 pela LXA<sub>4</sub> também foi avaliada, entretanto, não foi observada modulação na sua expressão por linfócitos T  $\gamma\delta$  estimulados (dados não mostrados). A **Figura 4.9 D-E** demonstra histogramas representativos do efeito dos mediadores lipídicos sobre o aumento de expressão de CD25 induzido por IPP nos linfócitos T  $\gamma\delta$  (MIF em FL-2).



**Figura 4. 9: Efeito de LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> na expressão de CD25 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** Os gráficos representam a média de intensidade de fluorescência (MIF) da marcação de CD25 por linfócitos T  $\gamma\delta$  (que passaram pelo processo de expansão) estimulados (IPP 10 $\mu$ g/ml, 24h) e pré-incubados com LTB<sub>4</sub> (100nM) (A), PGE<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) (B) ou LXA<sub>4</sub> (100nM) (C) por 30 minutos antes do estímulo. Alguns grupos foram incubados apenas com os mediadores lipídicos por 24 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM por grupo (n=5). Diferenças estatísticas entre o controle e o grupo estimulado estão indicadas por (\*) e entre os grupos estimulados pré-incubados com os mediadores lipídicos por (#). (D-E) Histogramas representativos da expressão de CD25 dentro da população de linfócitos T  $\gamma\delta$ .

#### **4.8 LXA<sub>4</sub> modula a expressão de CD25 em linfócitos T $\gamma\delta$ murinos ativados com anticorpo $\alpha$ -CD3**

Neste experimento, nós avaliamos o efeito do LTB<sub>4</sub> e da LXA<sub>4</sub> sobre a expressão de CD25 e CD69 por linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos, através de análise por citometria de fluxo. De acordo com o observado em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, os linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos ativados com mAb  $\alpha$ -CD3 apresentaram um aumento nos valores MIF de CD25 (**Figura 4. 10 A-B**) e de CD69 (**Figura 4. 10 C-D**), quando comparados com os valores dos linfócitos T  $\gamma\delta$  não ativados. A incubação das células somente com LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> não induziu alteração significativa no MIF quando comparado com o controle, entretanto, a pré-incubação com a LXA<sub>4</sub> foi capaz de inibir a expressão das moléculas de ativação CD25 e CD69 (**Figura 4. 10 B e D**), como observado em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos. A modulação da expressão destes marcadores pela PGE<sub>2</sub> será futuramente avaliada em linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos para complementar nossos resultados.



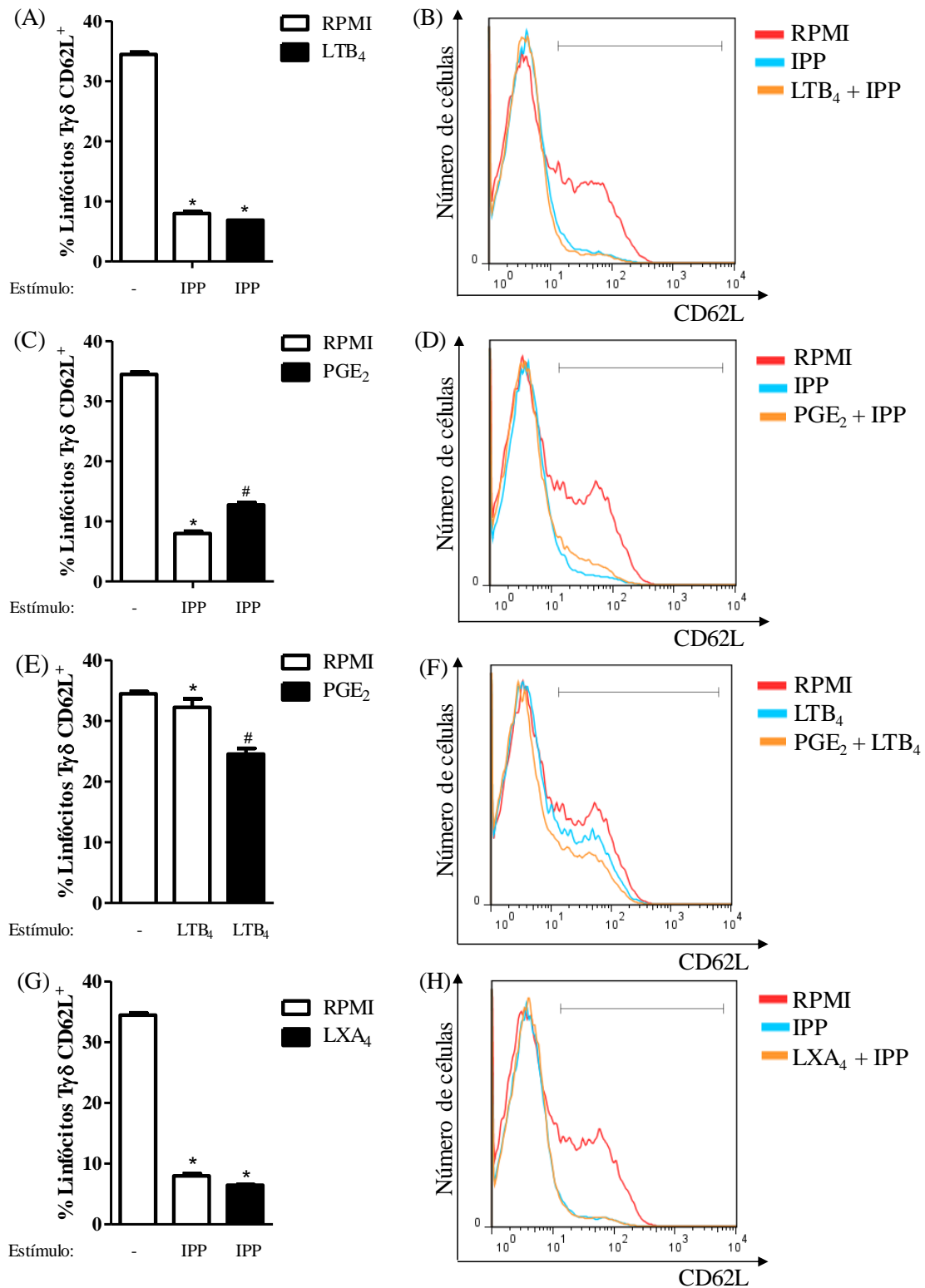
**Figura 4. 10: Efeito de LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> na expressão de CD25 por linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos.** Os gráficos representam a média de intensidade de fluorescência (MIF) da marcação de CD25 (A-B) e CD69 (C-D) por linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos pré-incubados com LTB<sub>4</sub> (100nM) ou LXA<sub>4</sub> (100nM) e estimulados com mAb  $\alpha$ -CD3 (500 $\mu$ g/ml). Alguns grupos foram incubados apenas os mediadores lipídicos por 24 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM de quadruplicata por grupo. Diferenças estatísticas entre o controle e o grupo estimulado estão indicadas por (\*) e entre os grupos estimulados e pré-incubados com os mediadores lipídicos por (#).

#### 4.9 PGE<sub>2</sub> mantém a expressão de L-selectina na superfície de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados

A L-selectina (ou CD62L) é uma molécula de adesão expressa por leucócitos durante o processo de ativação e migração, incluindo linfócitos T  $\gamma\delta$  (Tedder *et al.*, 1990). Durante o processo de ativação e diferenciação de linfócitos T efetores, a CD62-L se destaca da superfície celular (*shedding*). Desta forma, avaliamos a modulação da expressão desta molécula através de citometria de fluxo e observamos que houve uma redução significativa na porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ /CD62L<sup>+</sup> após re-estímulo *in vitro* com IPP (10  $\mu$ g/ml) em

comparação ao grupo controle (não re-estimulado, incubado com RPMI), fenômeno que não foi potencializado pelo LTB<sub>4</sub> (**Figura 4.11 A e B**).

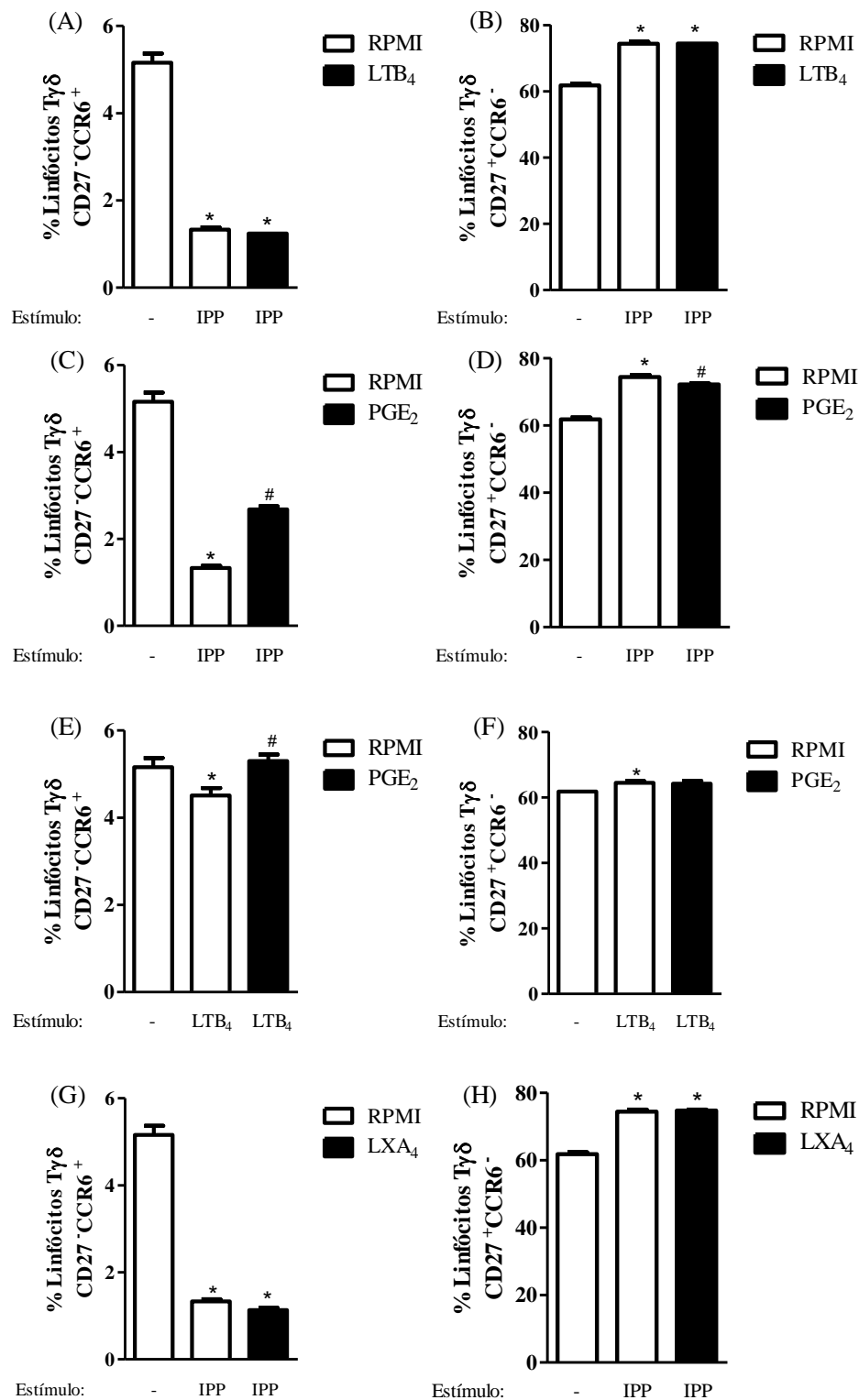
O pré-tratamento com PGE<sub>2</sub> foi capaz de reverter a redução de CD62L induzida pelo IPP (**Figura 4.11 C e D**), fenômeno não observado pela pré-incubação com LXA<sub>4</sub> (**Figura 4.11 G e H**). O estímulo com LTB<sub>4</sub> também foi capaz de induzir uma redução no número de linfócitos T  $\gamma\delta$ /CD62L<sup>+</sup> na superfície das células, porém em menor proporção do que o estímulo com IPP (**Figura 4.11 E e F**). O tratamento com a PGE<sub>2</sub> - de forma diferente do resultado obtido com o IPP - levou à maior redução de linfócitos T  $\gamma\delta$ /CD62L<sup>+</sup> induzida pelo LTB<sub>4</sub> do que a induzida por IPP (**Figura 4.11 E e F**), o que pode estar relacionado ao possível efeito na ativação/migração da PGE<sub>2</sub> sobre linfócitos T (van Epps, 1983), fenômeno que será melhor investigado. Os histogramas demonstrados na figura são representativos do efeito dos mediadores lipídicos sobre a expressão de CD62L induzida por IPP.



**Figura 4. 11: Efeito de LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> sobre a expressão de CD62L por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** Os gráficos representam a porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ /CD62L<sup>+</sup>. As células foram pré-incubadas com LTB<sub>4</sub> (100nM) (A-B), PGE<sub>2</sub> (3 $\mu$ M) (C-F) ou LXA<sub>4</sub> (100nM) (G-H), por 30 minutos antes do estímulo com IPP (10 $\mu$ g/ml) ou LTB<sub>4</sub> (100nM) por 24 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM dos grupos (n=5). Diferenças estatísticas entre o controle e o grupo estimulado estão indicadas por (\*) e entre os grupos e estimulados e pré-tratados por (#). (B, D, F, H) Histogramas representativos da marcação de CD25 dentro da população de linfócitos T  $\gamma\delta$ .

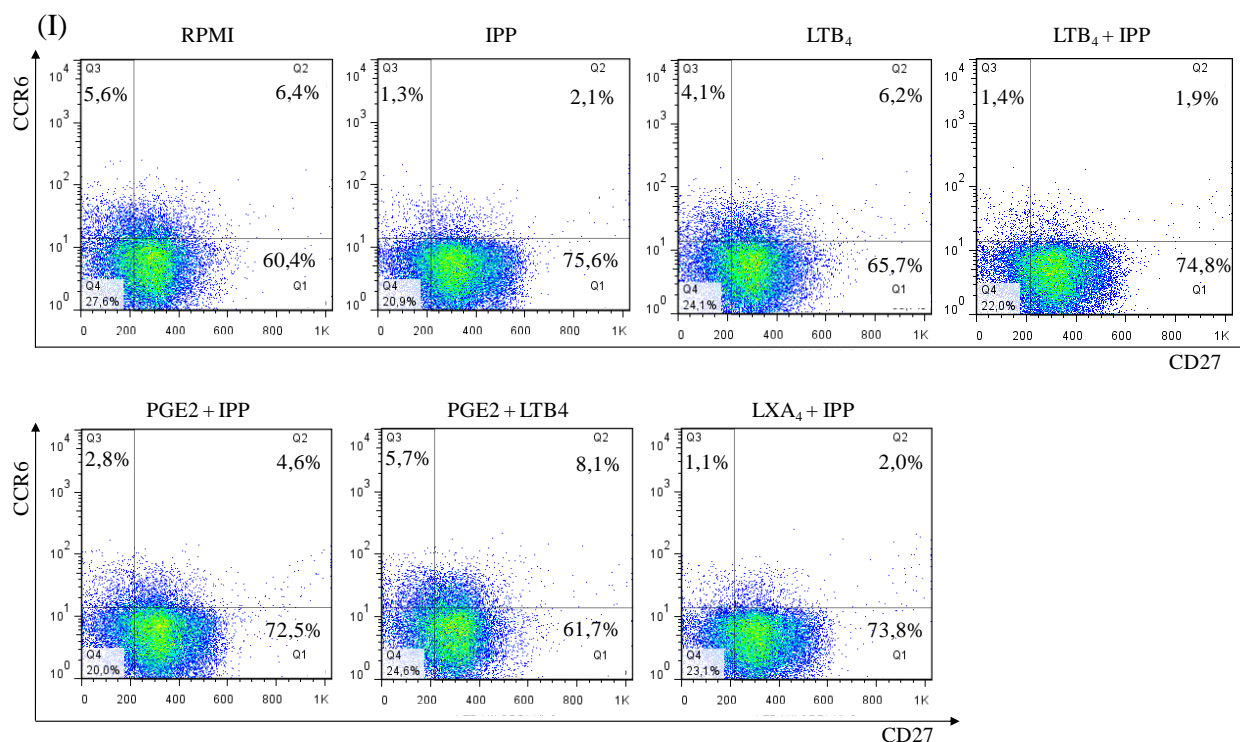
#### 4.10 PGE<sub>2</sub> reverte à polarização para o perfil de produção de IFN- $\gamma$ em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados

O perfil de expressão de CD27 e CCR6 pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  define o seu fenótipo de produção de citocinas. Os linfócitos T  $\gamma\delta$ /CCR6<sup>+</sup> são células produtoras de IL-17, enquanto que linfócitos T  $\gamma\delta$ /CD27<sup>+</sup> produzem IFN- $\gamma$  (Ribotet *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009 e DeBarroset *et al.*, 2011). Observamos, através da análise por citometria de fluxo, que o re-estímulo de linfócitos T  $\gamma\delta$  com 10 $\mu$ g/ml de IPP induziu a redução da porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$  CCR6<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup> produtores de IL-17 (**Figura 4.12 A, C, G**) e um aumento de linfócitos T  $\gamma\delta$  CCR6<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup> produtores de INF- $\gamma$  (**Figura 4.12 B, D, H**), em comparação com o grupo não estimulado (RPMI). O estímulo com LTB<sub>4</sub> também foi capaz de induzir uma polarização semelhante à induzida pelo IPP, porém em menores proporções (**Figura 4.12 E e F**). Vale ressaltar que após o processo de expansão, os linfócitos T  $\gamma\delta$  foram deixados em repouso por 24 horas. De forma interessante, o tratamento com PGE<sub>2</sub> foi capaz de reverter a polarização induzida pelo IPP (**Figura 4.12 C e D**) e pelo LTB<sub>4</sub> (**Figura 4.12 E e F**) induzindo um perfil de linfócitos T  $\gamma\delta$ /IL-17<sup>+</sup>, enquanto que o tratamento com LXA<sub>4</sub> não induziu nenhum efeito no perfil de citocinas dos linfócitos T  $\gamma\delta$  (**Figura 4.12 G e H**). A **Figura 4.13** demonstra *dotplots* representativos da expressão de CCR6 e CD27 nos diferentes grupos experimentais, conforme indicado pelas legendas.



**Figura 4. 12: Efeito de  $LTB_4$ ,  $LXA_4$  e  $PGE_2$  sobre a expressão de  $CD27$  e  $CCR6$  por linfócitos  $T\gamma\delta$  humanos.** Os gráficos representam a porcentagem de linfócitos  $T\gamma\delta$   $CCR6^+/CD27^-$  (A, C, E, G) e  $CCR6^-/CD27^+$  (B, D, F, H). As células foram pré-incubadas com  $LXA_4$  (100nM) (G, H) ou  $PGE_2$  (3  $\mu$ M) (C-F) por 30 minutos antes do estímulo com IPP (10 $\mu$ g/ml) (A-D e G-H) ou  $LTB_4$  (100nM) (E, F) por 24 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas entre o controle e o grupo estimulado estão indicadas por (\*) e entre os grupos e estimulados tratado e não tratado com  $LXA_4$  por (#).



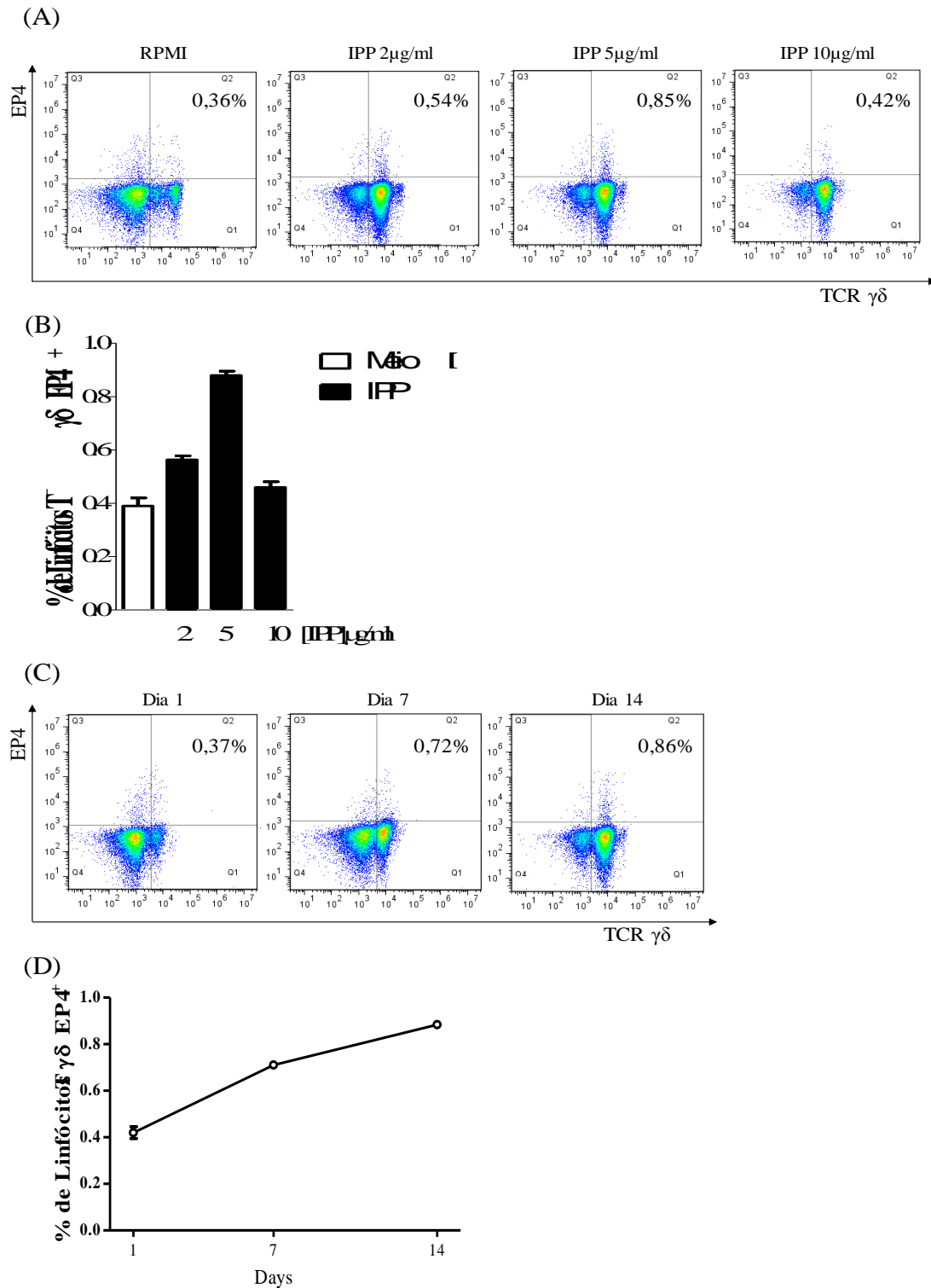


**Figura 4. 13: Efeito de LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> sobre a expressão de CD27 e CCR6 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** Dotplots representativos da dupla marcação de CCR6 e CD27, demonstrados na Figura 4. 12.

#### 4.11 A expressão de EP4 aumenta de forma dose- e tempo-dependente em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos ativados

Após observarmos que linfócitos T  $\gamma\delta$  expressam o EP4, avaliamos a expressão deste receptor em linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos após ativação com diferentes concentrações de IPP por 14 dias. Através da marcação do receptor com o anticorpo monoclonal  $\alpha$ -EP4 e análise por citometria de fluxo, observamos através da **Figura 4.14 A e B**, a modulação positiva da expressão deste receptor após estímulo com IPP (2, 5 e 10 $\mu$ g/ml) por 14 dias, de forma dose-dependente.

Observamos ainda, que a expressão de EP4 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos também aumentou após estimulação (IPP, 5 $\mu$ g/ml) de forma tempo-dependente (**Figura 4.14 C e D**).

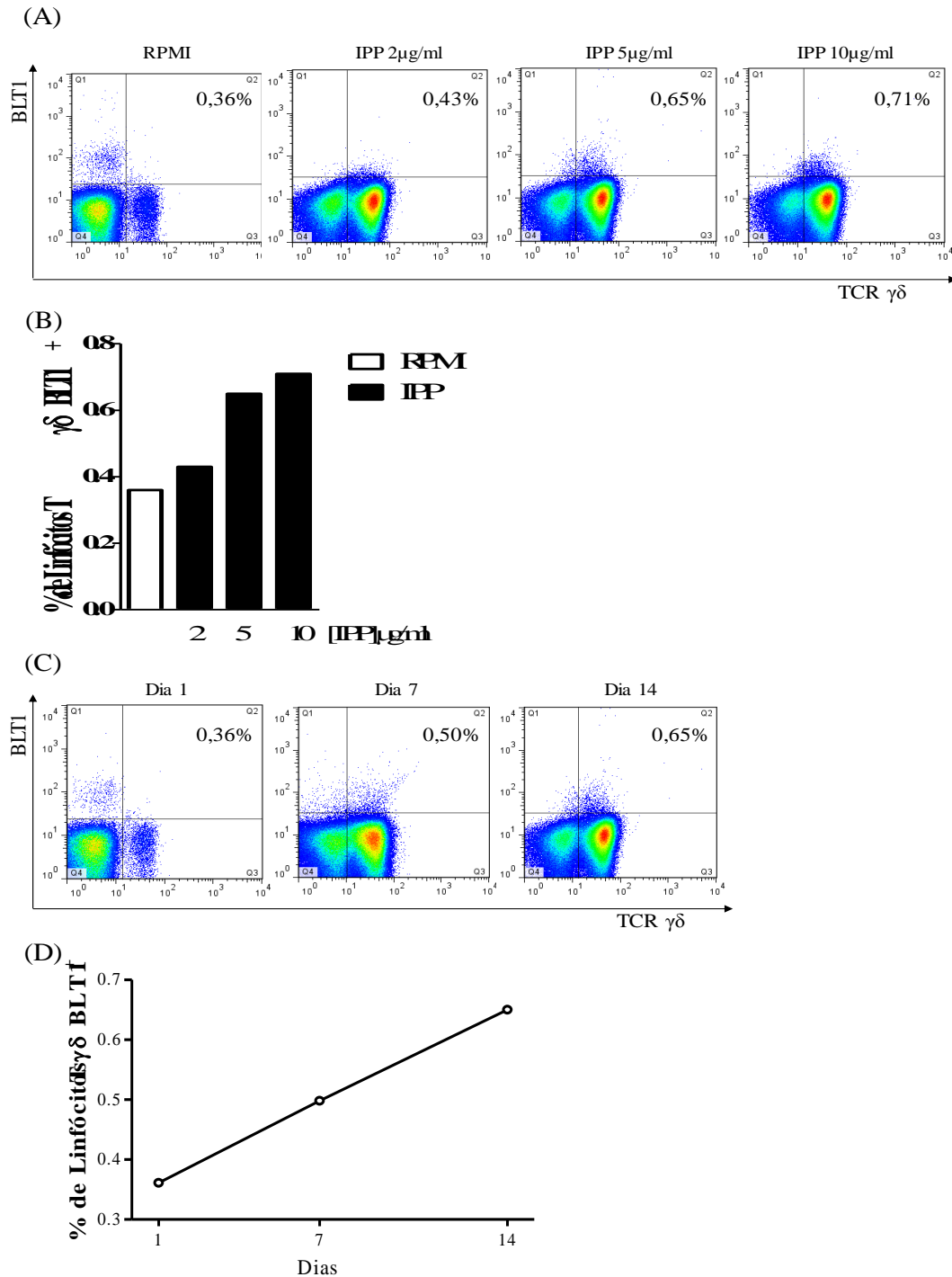


**Figura 4. 14: Expressão de EP4 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos após ativação com IPP.**

(A) *Dotplots* representativos da expressão de EP4 e TCR  $\gamma\delta$  por linfócitos T humanos estimulados com diferentes concentrações de IPP (2, 5 e 10 $\mu$ g/ml) por 14 dias. (B) Gráfico da porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ /EP4<sup>+</sup> 14 dias após estimulação com diferentes concentrações de IPP. (C) *Dotplots* representativos da expressão de EP4 e TCR  $\gamma\delta$  por linfócitos T humanos (dia 1) e re-estimulados com IPP (5 $\mu$ g/ml) por 7 e 14 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. (D) Gráfico da porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ /EP4<sup>+</sup> naíve (dia 1) e estimulados com IPP por 7 e 14 dias.

#### **4.12 A expressão de BLT1 aumenta em linfócitos T $\gamma\delta$ humanos após ativação de forma dose- e tempo-dependente**

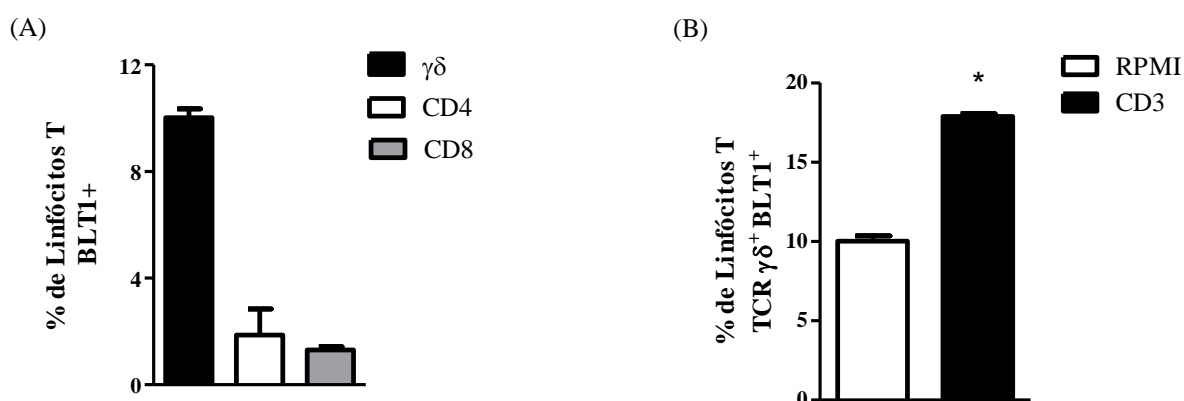
A modulação da expressão de BLT1 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos também foi avaliada após ativação com IPP. Através da marcação do receptor com o anticorpo monoclonal anti-BLT1 e análise por citometria de fluxo, observamos através da **Figura 4.15 A e B**, a modulação positiva na expressão deste receptor após estimulação com IPP (2, 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) por 14 dias, de forma dose-dependente. Observamos ainda, que a expressão de BLT1 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos também aumentou após estimulação (IPP, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) de forma tempo-dependente (**Figura 4.15 C e D**).



**Figura 4. 15: Expressão de BLT1 por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos após ativação com IPP.** (A) *Dotplots* representativos da expressão de BLT1 e TCR  $\gamma\delta$  por linfócitos T humanos estimulados com diferentes concentrações de IPP (2, 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) por 14 dias. (B) Gráfico da porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ /BLT1<sup>+</sup> 14 dias após estimulação com diferentes concentrações de IPP. (C) *Dotplots* representativos da expressão de BLT1 e TCR  $\gamma\delta$  por linfócitos T humanos (dia 1) e re-estimulados com IPP (5  $\mu\text{g/ml}$ ) por 7 e 14 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. (D) Gráfico da porcentagem de linfócitos T  $\gamma\delta$ /BLT1<sup>+</sup> naïve (dia 1) e estimulados com IPP (5  $\mu\text{g/ml}$ ) por 7 e 14 dias.

#### 4.13 A expressão de BLT1 aumenta em linfócitos T $\gamma\delta$ murinos após ativação com $\alpha$ -CD3 mAb

Ao analisarmos a expressão do BLT1 nos diferentes subtipos de linfócitos T murinos obtidos do baço, observamos, de forma bastante interessante, que a expressão de BLT1 prevaleceu em linfócitos T  $\gamma\delta$ , em comparação com os outros subtipos de linfócitos T  $\alpha\beta$  (CD4 e CD8) (**Figura 4.16 A**). Observamos também que ocorreu um aumento na expressão deste receptor nos linfócitos T  $\gamma\delta$ , quando estas células foram estimuladas com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -CD3 (5  $\mu$ g/ml, 24h) (**Figura 4.16 B**).

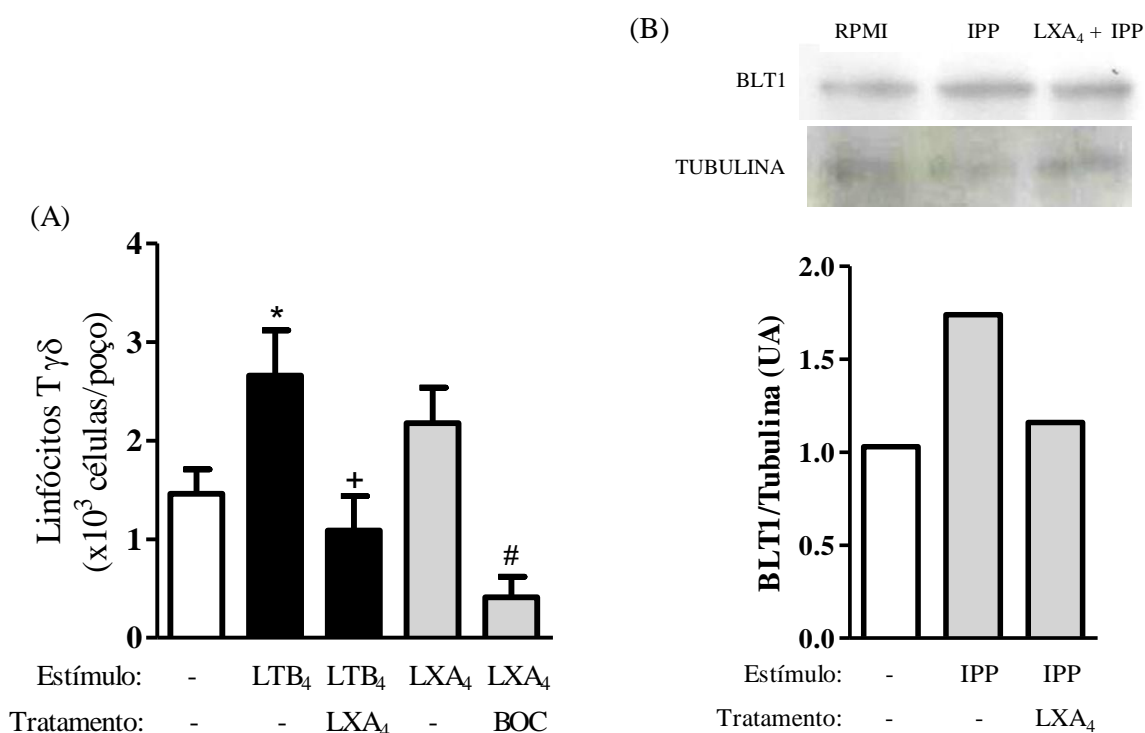


**Figura 4. 16: Expressão de BLT1 por linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos após ativação.** (A) Porcentagem de expressão de BLT1 por linfócitos T  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  (CD4 e CD8) obtidos de baço de camundongos C57BL/6 naïve. (B) Aumento da expressão de BLT1 por linfócitos T  $\gamma\delta$  após estímulo com  $\alpha$ -CD3 mAb (5  $\mu$ g/ml, 24h) *in vitro*. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas entre o controle e o grupo estimulado estão indicadas por (\*).

#### 4.14 LTB<sub>4</sub> induz quimiotaxia de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos e LXA<sub>4</sub> inibe a migração induzida por LTB<sub>4</sub> através da regulação da expressão de BLT1

Dados prévios do nosso grupo demonstraram que o LTB<sub>4</sub> induz a migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Costa *et al.*, 2010). Realizamos então um ensaio de quimiotaxia *in vitro* com linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos isolados e observamos que o LTB<sub>4</sub> também foi capaz de induzir a migração dessas células (**Figura 4. 17 A**). Vale ressaltar que, após o processo de expansão, as células foram mantidas em repouso por 24 horas antes do ensaio. Observamos também que o estímulo com LXA<sub>4</sub> apresentou uma tendência em induzir a migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, entretanto, o pré-tratamento das células com o antagonista do receptor de LXA<sub>4</sub>, BOC-2, inibiu significativamente a quimiotaxia a valores

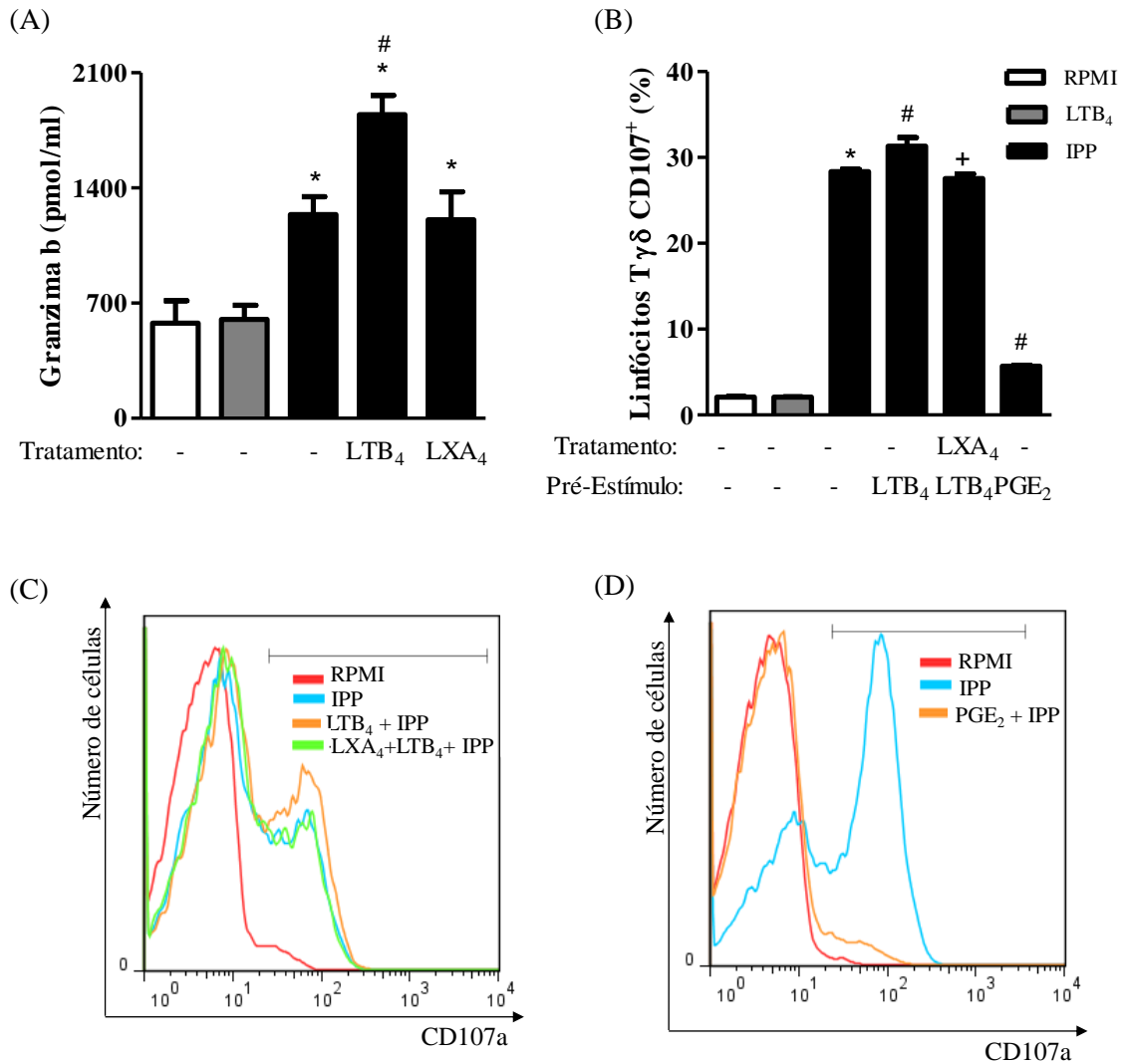
inferiores ao meio. De forma interessante, nós observamos que o pré-tratamento com a LXA<sub>4</sub> foi capaz de inibir a migração dessas células induzida por LTB<sub>4</sub> (**Figura 4. 17 A**). Dados prévios da literatura demonstram que a LXA<sub>4</sub> é capaz de modular negativamente a expressão do receptor de LTB<sub>4</sub> em linfócitos T de cobaias (Lin *et al.*, 1996), o que poderia ser uma explicação para a inibição pela LXA<sub>4</sub> do efeito do LTB<sub>4</sub>. Para testar essa hipótese, realizamos a técnica de *western blot* a partir de extratos celulares de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos. Após análise das bandas, observamos um aumento na expressão do receptor BLT1 induzido por IPP, que foi inibido pelo pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> (**Figura 4. 17 B**). Entretanto, este experimento será repetido para a confirmação do fenômeno.



**Figura 4. 17: Efeito de LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> na quimiotaxia in vitro de linfócitos T  $\gamma\delta$  e expressão de BLT1.** (A) Linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos foram pré-incubadas com RPMI, LXA<sub>4</sub> ou BOC por 30 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram adicionadas nos *inserts* de 5  $\mu$ m e os estímulos adicionados aos poços da placa de 96 poços. A placa foi incubada por 2 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e as células que migraram foram contadas em câmara de Neubauer, em microscópio ótico (objetiva 20x ou 40x). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas entre o controle e os grupos estimulados estão indicadas por (\*), entre os grupos estimulados com LTB<sub>4</sub> tratado e não tratado com LXA<sub>4</sub> por (+) e entre os grupos estimulados com LXA<sub>4</sub> tratado e não tratado com BOC por (#). (B) Marcação de BLT1 em linfócitos T  $\gamma\delta$  14 dias após estímulo com IPP (5  $\mu$ g/ml) seguido por 24 horas de repouso a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram pré-tratadas com LXA<sub>4</sub> por 30 minutos e em seguida re-estimuladas com IPP (10  $\mu$ g/ml) por 2 horas. A expressão dos receptores foi analisada por *western blot*, a partir dos extratos celulares. A análise densitométrica da expressão dos receptores é demonstrada no gráfico. Gráfico representativo de dois experimentos.

#### **4.15 PGE<sub>2</sub> inibe e LTB<sub>4</sub> potencializa a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos induzida por IPP**

Dados da literatura demonstram que os linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, após expansão com fosfoantígenos, apresentam função citotóxica aumentada (Qin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2013). Desta forma, resolvemos avaliar a ação dos mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> na atividade citotóxica dos linfócitos T  $\gamma\delta$  induzida pelo IPP, avaliando a expressão de CD107a na membrana celular e a liberação de granzima B. Observamos que, de fato, o estímulo com IPP induziu um aumento da liberação de granzima B (**Figura 4. 18 A**) quanto na expressão de CD107a na superfície de linfócitos T  $\gamma\delta$  (**Figura 4. 18 B**). Observamos que o estímulo com LTB<sub>4</sub> (100nM) não foi capaz de induzir a liberação de granzima B por essas células na ausência de IPP, mas potencializou este fenômeno em conjunto com o fosfoantígeno (**Figura 4. 18 A**). Porém, o pré-tratamento com esse mediador lipídico foi capaz de aumentar a expressão de CD107a por linfócitos T  $\gamma\delta$  após estímulo com IPP (**Figura 4. 18 B**). O pré-tratamento com PGE<sub>2</sub> inibiu quase a níveis basais a expressão de CD107a na superfície celular (**Figura 4. 18 B**) e ainda será avaliada quanto à liberação de granzima B. O pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> não interferiu na liberação de granzima B dos linfócitos T  $\gamma\delta$  induzida por IPP (**Figura 4. 18 A**), entretanto inibiu o aumento da expressão de CD107a induzido pelo LTB<sub>4</sub> na superfície de linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados com IPP (**Figura 4. 18 B**).



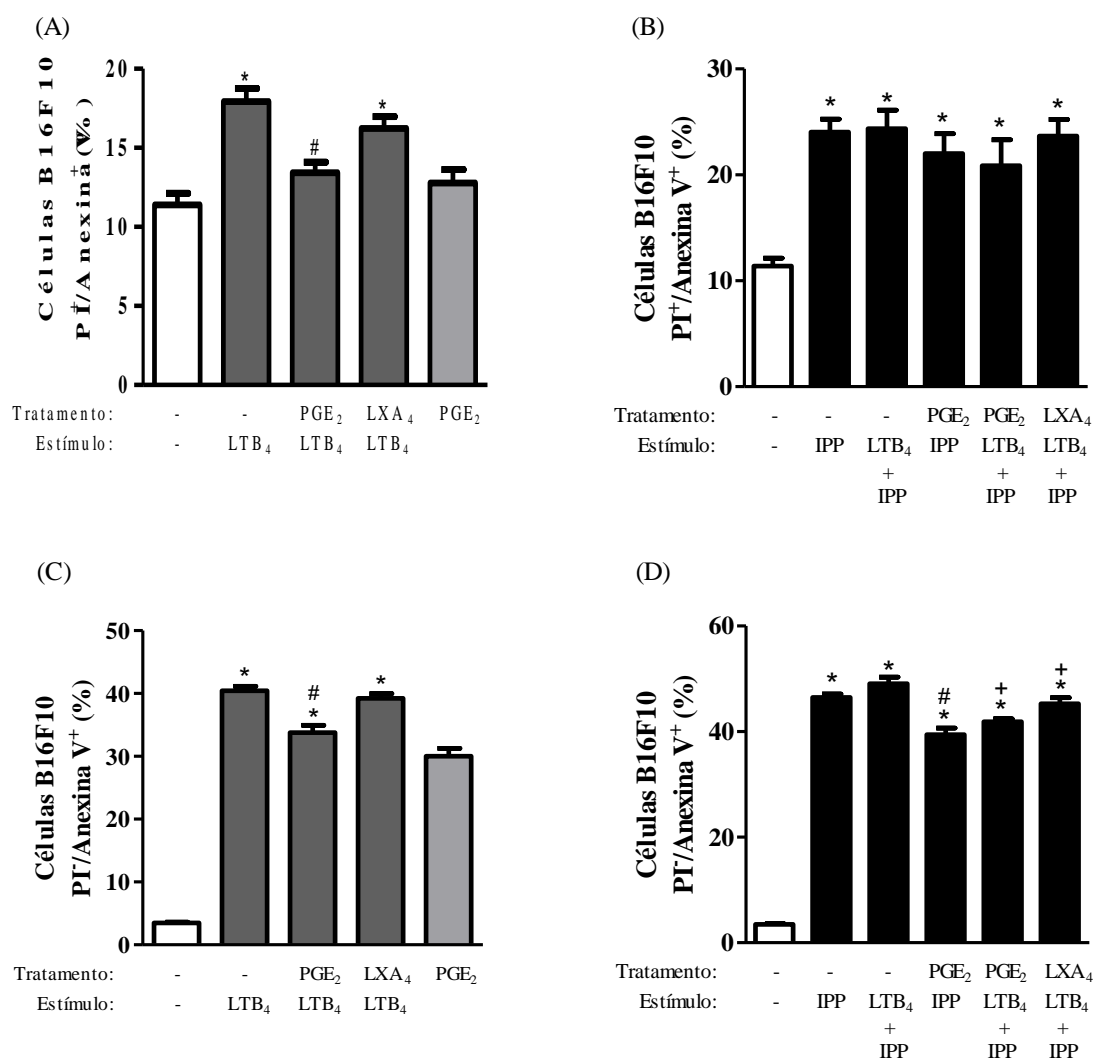
**Figura 4. 18: Efeito de LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> na liberação de granzima B e expressão membranar de CD107a por linfócitos T  $\gamma\delta$ .** Linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos após o processo de expansão, foram deixados de repouso por 24 horas e foram pré-tratados com LXA<sub>4</sub> por 30 minutos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida as células foram pré-incubadas com RPMI ou PGE<sub>2</sub> ou LXA<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub> por 30 minutos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e estimuladas com 10  $\mu$ g/ml de IPP ou 100 nM de LTB<sub>4</sub> ou RPMI por duas horas. Após o estímulo, as células foram marcadas com  $\alpha$ -CD107a mAb e a análise foi realizada por citometria de fluxo (B). A granzima B foi dosada do sobrenadante das células através do “Activity Fluorometric Assay Kit” e a leitura foi realizada em fluorímetro. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas entre o controle e os grupos estimulados estão indicadas por (\*) e entre os grupos estimulados com IPP tratado e não tratado com LTB<sub>4</sub> por (#).



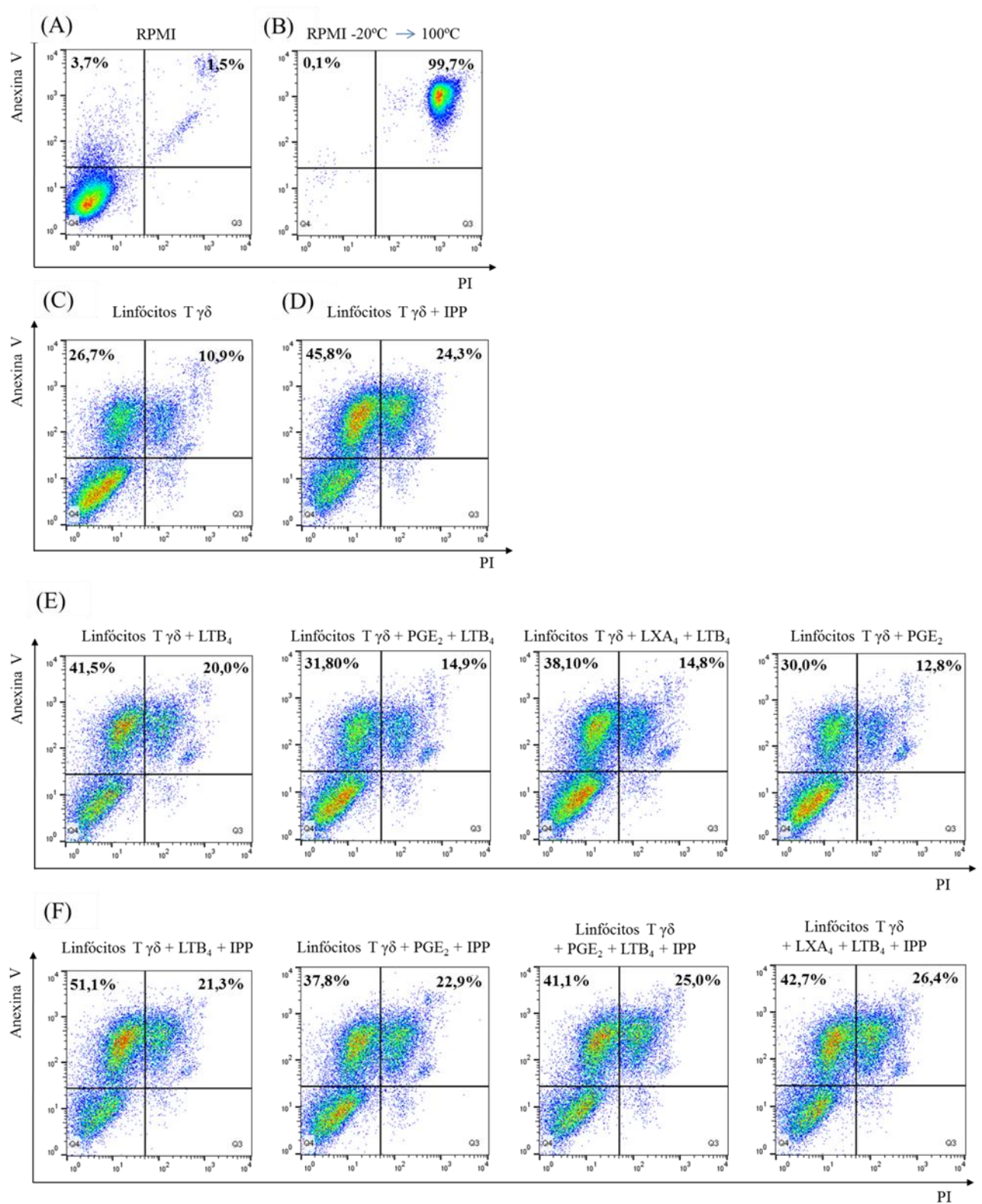
#### 4.16 LTB<sub>4</sub> induz e PGE<sub>2</sub> inibe a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células tumorais B16F10

Após observarmos o efeito dos mediadores lipídicos na degranulação de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos induzida por IPP, avaliamos o seu efeito sobre a indução da morte de células tumorais de melanoma B16F10 por linfócitos T  $\gamma\delta$ . Os gráficos da **Figura 4.19 A e B** demonstram a porcentagem de células B16F10 em apoptose tardia (PI<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup>), enquanto os gráficos **C e D** representam células em apoptose inicial, i.e. células B16F10 PI<sup>-</sup>/Anexina V<sup>+</sup>. Observamos que os linfócitos T  $\gamma\delta$  pré-estimulados com LTB<sub>4</sub> induziram uma maior apoptose - tanto tardia quanto inicial - de células tumorais, quando comparada à morte induzida por linfócitos T  $\gamma\delta$  não estimulados (i.e. pré-incubados com RPMI). De forma interessante, o estímulo com LTB<sub>4</sub> induziu o aumento da atividade citotóxica de linfócitos T  $\gamma\delta$  contra células tumorais em níveis semelhantes de apoptose inicial à induzida pelo estímulo com IPP (**Figura 4.19 C**). O pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> foi capaz de inibir o aumento da porcentagem de células tumorais em apoptose inicial induzida por linfócitos T  $\gamma\delta$  estimulados com LTB<sub>4</sub> na presença de IPP (**Figura 4.19 D**). O pré-tratamento dos linfócitos T  $\gamma\delta$  com PGE<sub>2</sub> inibiu ainda a apoptose (inicial e tardia) induzida por linfócitos T  $\gamma\delta$  estimulados com LTB<sub>4</sub> sem adição de IPP (**Figura 4.19 A e C**). Vale ressaltar que, de forma não esperada, o pré-tratamento de linfócitos T  $\gamma\delta$  com a PGE<sub>2</sub> (sem adição de IPP) induziu maior porcentagem de células em apoptose inicial do que a induzida por linfócitos T não tratados (**Figura 4.19 C**).

A **Figura 4.20 A-E** demonstra os *dotplots* representativos dos grupos apresentados na **Figura 4.19**, sendo em **A** o controle negativo (células tumorais em meio RPMI) e em **B** células tumorais submetidas a choque térmico, por 5 min a -20°C seguido de 2 min a 100°C.



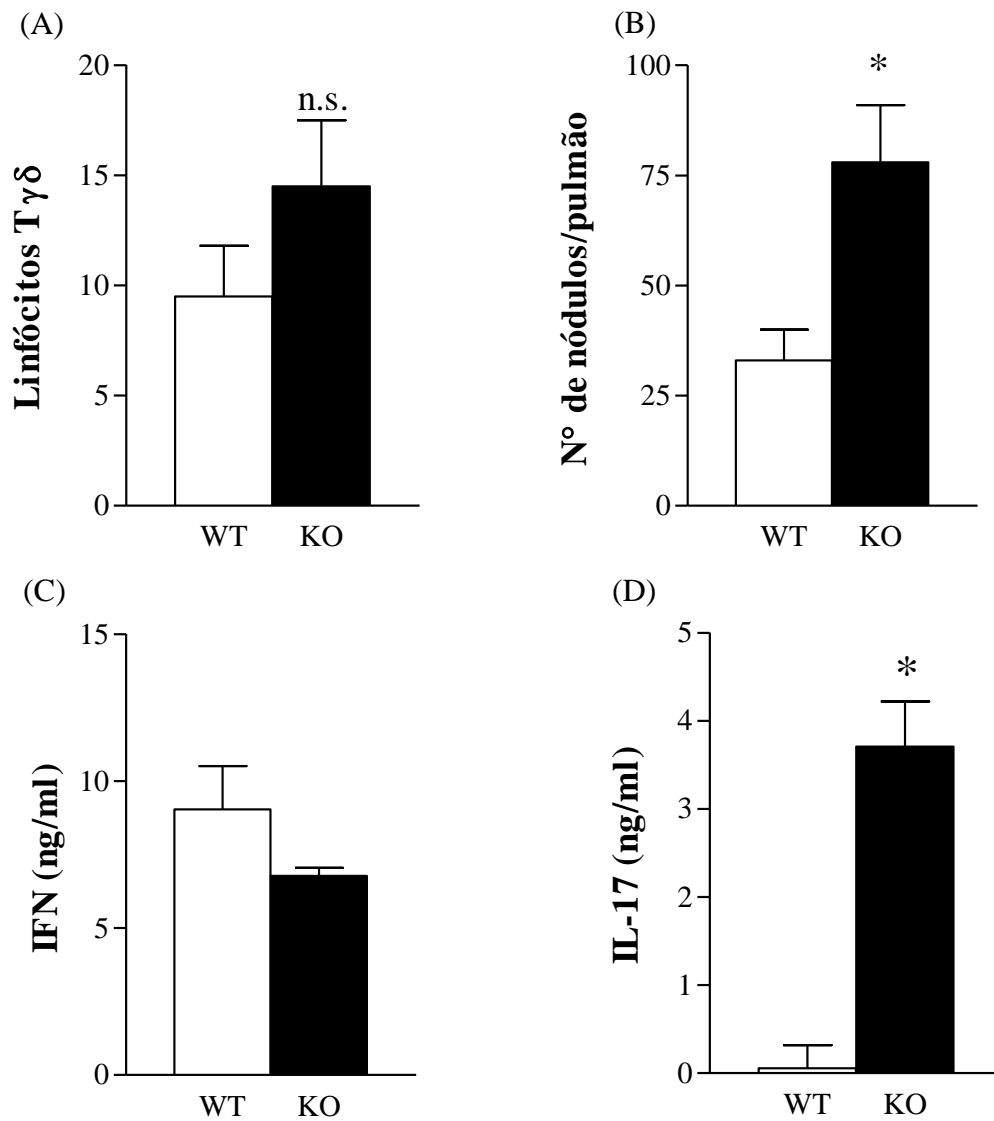
**Figura 4. 19: Efeito de LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> no *killing* de células B16F10 *in vitro* por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** Linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, mantidos em repouso por 24 horas após expansão, foram pré-tratados com LXA<sub>4</sub> (100nM) ou PGE<sub>2</sub> (1 $\mu$ M) por 30 minutos (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e em seguida pré-estimulados com LTB<sub>4</sub> (100nM) por 30 minutos. Após o tempo de incubação, o estímulo foi removido e as células foram co-cultivadas com células B16F10 (5:1) por 4 horas na presença ou não de IPP (5 $\mu$ g/ml) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com anexina V e PI no *gate* físico de células tumorais. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de células tumorais PI<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> na ausência (A) e na presença (B) de IPP; e de células tumorais PI<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> na ausência (C) e na presença (D) de IPP. Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre o controle e os grupos estimulados estão indicadas por (\*), entre os grupos estimulados com IPP tratado e não tratado com LTB<sub>4</sub> ou PGE<sub>2</sub> por (#) e entre o grupo estimulado com IPP e tratado com LTB<sub>4</sub> e pré-tratados e não pré-tratados com LXA<sub>4</sub> ou PGE<sub>2</sub> por (+).



**Figura 4. 20: Efeito de LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> no *killing* de células B16F10 *in vitro* por linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos.** *Dotplots* representativos da marcação de células B16F10 com PI e anexina V, demonstrada na figura 4.19. (A) controle negativo: células tumorais em meio RPMI; (B) células tumorais submetidas a choque térmico para indução de morte (5 min a -20°C seguido de 2 min a 100°C). Células tumorais B16F10 incubadas com linfócitos T  $\gamma\delta$  (C), ativados com IPP (D), ativados com LTB<sub>4</sub> e pré-tratados com PGE<sub>2</sub> ou LXA<sub>4</sub> (E) e ativados com IPP + mediadores lipídicos, conforme indicado acima dos *dotplots*.

#### **4.17 Animais deficientes de 5-LO apresentam aumento na produção de IL-17 e maior susceptibilidade ao tumor**

Utilizamos animais deficientes de 5-LO (5-LO KO), que não produzem LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub>, para observar o efeito da ausência destes mediadores *i*) na migração de linfócitos T  $\gamma\delta$ ; *ii*) na produção de IL-17 e INF- $\gamma$  e *iii*) no controle do crescimento da metástase induzida por células de linhagem tumoral de melanoma B16F10 no pulmão dos animais. Nós não observamos diferença significativa no número de linfócitos T  $\gamma\delta$  nos pulmões de animais 5-LO KO em comparação com os animais selvagens (WT) 15 dias após a injeção i.v. de células B16F10 (**Figura 4.21 A**). Por outro lado, foi encontrado um número maior de nódulos tumorais nos pulmões dos animais 5-LO KO do que nos em comparação com os encontrados nos pulmões dos animais selvagens (**Figura 4.21 B**). Corroborando com nossos resultados anteriores, foi detectado níveis mais elevados de IL-17, mas não de INF- $\gamma$  nos pulmões de animais KO (que produzem PGE<sub>2</sub> e não LXA<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub>), quando comparado com os animais selvagens (**Figura 4.21 C e D**). Estes resultados sugerem que a ausência de LTB<sub>4</sub> e de INF- $\gamma$  pode estar relacionada à maior susceptibilidade ao tumor neste modelo experimental.



**Figura 4. 21: Animais 5-LO KO são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumor.** (A) Número de linfócitos T  $\gamma\delta$ , (B) número de nódulos tumorais, (C) quantificação de IFN- $\gamma$  e (D) de IL-17 no pulmão de camundongos 5-LO KO 15 dias após a injeção i.v. de  $2 \times 10^5$  células B16F10. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM. Diferenças estatísticas entre os animais selvagens e os animais KO para 5-LO estão indicadas por (\*). KO: knockout; WT: *wild type*.

## 5 DISCUSSÃO

Os linfócitos T  $\gamma\delta$  são capazes de reconhecer uma variedade de antígenos independente de apresentação via MHC (Chien, Jores e Crowley, 1996; Born e O'Brien, 2009). Foi descrito que apenas linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos são capazes de reconhecer diretamente o isopentenil pirofosfato (IPP), um componente derivado do metabolismo de micobactéria (Tanaka *et al.*, 1995), que também é produzido em altas concentrações por células tumorais, como consequência de uma desregulação da via do mevalonato (Gober *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2007). O reconhecimento do IPP leva à ativação dessas células que, quando incubadas concomitantemente com a IL-2, leva a uma intensa proliferação destes linfócitos. Vale ressaltar que fosfoantígenos, tais como o IPP, são utilizados como ferramenta para o enriquecimento de linfócitos T  $\gamma\delta$  em condições experimentais e clínicas por induzir a proliferação e, conseqüentemente, a ativação destas células (Tanaka *et al.*, 1995; DeBarros *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). A partir dos nossos resultados, escolhemos a concentração de 5 $\mu$ g/ml (concentração intermediária testada), que induziu uma pureza maior que 80%, no intuito de não super-estimular e/ou induzir a morte dos linfócitos T  $\gamma\delta$ . O nosso grupo vem estudando o papel de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos em diferentes modelos *in vivo*, entretanto, resultados obtidos com células humanas são de extrema relevância para a pesquisa científica. Uma vez que existem diferenças importantes entre os subtipos de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos e murinos, a realização de ensaios complementares realizados com células das duas espécies torna os dados obtidos ainda mais robustos. É importante ressaltar que é crescente o número de dados da literatura que demonstram a importância de fosfoantígenos na ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  *ex vivo* e o uso dessa ferramenta na terapia celular (Pegram, Kershaw e Darcy, 2009; Copier, Bodman-Smith e Dalgleish, 2011; Iovino *et al.*, 2011; Ramutton *et al.*, 2014). A transferência autóloga de linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados com fosfoantígenos têm se mostrado uma promissora terapia contra tumores (Chiplunkar *et al.*, 2009), o que deixa claro que o estudo de mecanismos de ativação e modulação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  é de grande importância não só para contribuir para o conhecimento científico, quanto para otimizar a utilização destas células para tratamentos de terapia celular.

Existem muito poucos dados publicados sobre o papel de mediadores lipídicos na ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$ . Foi previamente demonstrado pelo nosso grupo (Costa *et al.*, 2010) que (de forma diferente dos cys-leucotrienos), o LTB<sub>4</sub> (via BLT1) induz a migração de

linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos *in vitro* e *in vivo*, sendo crucial para sua mobilização em diferentes modelos murinos de inflamação. De forma oposta, Prinz e colaboradores (2005) demonstraram que linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos que apresentam mutação nos resíduos de tirosina da proteína adaptadora essencial para a ativação de linfócitos LAT (“*linker for activation of T cells*”), mas não os camundongos selvagens, expressam altas frequências de receptor de cys-leucotrienos tipo 1 (CysLT1) e que a sua ativação induziu influxo de cálcio e quimiotaxia *in vitro* (Prinz *et al.*, 2005). Em adição aos efeitos de leucotrienos, foi demonstrado que as prostaglandinas E<sub>2</sub> (Martinet *et al.*, 2010) e 15-d-PGJ<sub>2</sub> (Li e Pauza, 2009) também apresentam efeito sobre os linfócitos T  $\gamma\delta$ , inibindo a atividade citotóxica e a proliferação induzida por IPP. Apesar de não haver dados na literatura sobre a modulação de linfócitos T  $\gamma\delta$  pela LXA<sub>4</sub>, foi previamente demonstrado que a LXA<sub>4</sub> é capaz de induzir quimiotaxia de monócitos de sangue humano (Maddox e Serhan, 1996). Sabendo que a PGE<sub>2</sub> e o LTB<sub>4</sub> (e seus respectivos receptores EP4 e BLT1) têm um papel importante na modulação de linfócitos T  $\gamma\delta$ , e a LXA<sub>4</sub> (e seu receptor FPR2/ALX) em células mononucleares, decidimos avaliar a expressão dos receptores de EP4, BLT1 e FPR2/ALX, na superfície de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos. Através da marcação dos receptores com anticorpos monoclonais anti-EP4, anti-BLT1 e anti-FPR2/ALX e análise por citometria de fluxo, detectamos a presença dos três receptores na membrana destas células, mesmo que em uma pequena porcentagem da população de linfócitos T  $\gamma\delta$ , o que provavelmente ocorreu devido ao fato de estas células não estarem ativadas (i.e., terem sido somente expandidas e não re-estimuladas). Foi possível também detectar a expressão dos receptores BLT1 e FPR2/ALX através da técnica de *western blot*, entretanto, estes experimentos serão posteriormente repetidos para confirmação do resultado, em conjunto com a avaliação da expressão de EP4 por estas células.

Os receptores de LTB<sub>4</sub> (BLT1) e LXA<sub>4</sub> (FPR2/ALX) são receptores transmembranares associados à proteína G que induzem uma cascata de ativação dependente do influxo de cálcio (Toda, Yokomizo e Shimizu, 2002; Parkinson, 2006). De acordo, observamos que o estímulo com LTB<sub>4</sub> e LXA<sub>4</sub> induziu um aumento do influxo de cálcio intracelular em linfócitos T  $\gamma\delta$ , demonstrando que os seus respectivos receptores são funcionais. Em adição, demonstramos que a ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos modula positivamente a expressão de EP4 e BLT1 por essas células de forma dependente do tempo. De acordo, observamos que este fenômeno não se restringe aos linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, uma vez que ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos com  $\alpha$ -CD3 modula positivamente a expressão de BLT1. De forma interessante, observamos,

ainda, que os linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos são a população de linfócitos T com maior expressão de BLT1. Os nossos dados que demonstram a modulação de receptores em linfócitos T  $\gamma\delta$  ativador corroboram dados da literatura que demonstram que linfócitos T CD4 e CD8 efetores expressam BLT1 em maiores quantidades do que linfócitos T *naïve* ou de memória central (Goodarzi *et al.*, 2003; Tager *et al.*, 2003). Além disso, linfócitos T BLT1<sup>+</sup> são raros em sangue de pacientes saudáveis, porém estímulos infecciosos ou alérgicos aumentam de forma transiente a frequência de linfócitos T que expressam o receptor para LTB<sub>4</sub> (Islam *et al.*, 2006).

De acordo com dados prévios do nosso grupo que demonstram que o LTB<sub>4</sub> induz a migração *in vivo* e *in vitro* de linfócitos T  $\gamma\delta$  murinos (Costa *et al.*, 2010), observamos que o LTB<sub>4</sub> também induziu a migração *in vitro* de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos. De forma interessante, observamos também que a LXA<sub>4</sub> foi capaz de inibir a migração induzida pelo LTB<sub>4</sub>. Uma possível explicação para essa inibição pode ser a modulação do receptor de LTB<sub>4</sub> pela LXA<sub>4</sub>, uma vez que foi observado em linfócitos T de cobaia que a LXA<sub>4</sub> modula negativamente a expressão de BLT1 (Lin *et al.*, 1996). De fato, identificamos uma redução da expressão desse receptor pelos linfócitos T  $\gamma\delta$  pré-tratados com LXA<sub>4</sub>, através da análise por *western blot*, sugerindo um possível mecanismo para a inibição dos efeitos do LTB<sub>4</sub> pela LXA<sub>4</sub>. Dados da literatura indicam que a LXA<sub>4</sub> possui um papel quimiotático para monócitos de sangue humano (Maddox e Serhan, 1996). Nós observamos que a LXA<sub>4</sub> tende a induzir a migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos *in vitro*, porém não conseguimos observar uma diferença estatística em relação ao grupo controle negativo. Entretanto, nós supomos que isso tenha ocorrido devido à elevada migração observada no grupo controle negativo (RPMI), uma vez que o pré-tratamento das células com BOC (antagonista do receptor de LXA<sub>4</sub>) reduziu drasticamente a quimiotaxia de linfócitos T  $\gamma\delta$  induzida pela LXA<sub>4</sub>, a valores inferiores ao induzido pelo RPMI. Desta forma, experimentos futuros são necessários para esclarecer este fenômeno.

Quando os linfócitos T são ativados, ocorre um aumento da expressão do marcador de ativação CD25, cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (IL-2R), na membrana dessas células, levando à proliferação (Hatakeyama *et al.*, 1989). Outro marcador de ativação destas células é a L-selectina (ou CD62L) que é expressa em altos níveis por linfócitos T *naïve* ou de memória central e, após ativação, tem sua expressão diminuída em linfócitos T efetores (Tedder *et al.*, 1990). Observamos que a LXA<sub>4</sub> e a PGE<sub>2</sub> apresentam um efeito direto sobre linfócitos T  $\gamma\delta$ ,



modulando negativamente a ativação destas células, reduzindo a expressão de CD25 quase a níveis basais. Em adição, a PGE<sub>2</sub> também inibiu o *shedding* de CD62L e o aumento na expressão de CD27 observado após o estímulo com IPP. O CD27, além de ser um marcador de populações de linfócitos T  $\gamma\delta$ , é uma molécula co-estimulatória, também induzida pela ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  via TCR (Ribot *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2012). Estes dados em conjunto, sugerem que a PGE<sub>2</sub> é capaz de modular a ativação induzida pelo TCR em linfócitos T  $\gamma\delta$ , o que foi observado parcialmente pela LXA<sub>4</sub>.

A expressão das moléculas de superfície CD27 e CCR6 é capaz de definir o fenótipo de produção de citocinas em linfócitos T  $\gamma\delta$ . É estabelecido que linfócitos T  $\gamma\delta$  que expressam CCR6 em sua superfície (porém não expressam CD27) são células produtoras de IL-17, enquanto que células positivas para CD27 (negativas para CCR6) produzem IFN- $\gamma$  (Haas *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009; Ribot *et al.*, 2009; DeBarros *et al.*, 2011). Sabe-se que a diferenciação de linfócitos T  $\gamma\delta$  quanto à produção de IFN- $\gamma$  ou IL-17 ocorre durante o desenvolvimento destas células no timo (Shibata *et al.*, 2014), entretanto, mesmo após esse comprometimento durante a diferenciação tímica, essas células possuem uma plasticidade e podem ter a polarização alterada na periferia (Paul *et al.*, 2014; Rani, Zhang e Schwacha, 2014). Já foi demonstrado que células tumorais humanas são capazes apresentar fosfoantígenos (como o IPP) para os linfócitos T  $\gamma\delta$ , induzindo a produção de IFN- $\gamma$  por essas células (Kato *et al.*, 2001), que apresentam um importante papel anti-tumoral (Todaro *et al.*, 2009; Lança *et al.*, 2013; Wada *et al.*, 2014). De fato, nós observamos neste estudo que o estímulo com IPP induziu a diferenciação de linfócitos T  $\gamma\delta$  para a produção de IFN- $\gamma$  (TCR  $\gamma\delta$ /CD27<sup>+</sup>) e que, de forma menos expressiva, o LTB<sub>4</sub> induziu um fenômeno semelhante. É importante ressaltar que dados obtidos no nosso laboratório demonstram que este mediador lipídico é produzido no pulmão metastático de camundongos C57BL/6 injetados com B16F10 (Souza, 2011). Em conjunto com a observação que o LTB<sub>4</sub> induz a degranulação de linfócitos T  $\gamma\delta$ , podemos sugerir que este mediador lipídico contribui para o papel anti-tumoral dos linfócitos T  $\gamma\delta$ , através da ativação destas células e indução da produção de IFN- $\gamma$ . Por outro lado, observamos que esse fenômeno é parcialmente revertido pela PGE<sub>2</sub>, que por sua vez induz uma polarização oposta, induzindo linfócitos T  $\gamma\delta$  produtores de IL-17. A produção de IL-17 por estas células pode favorecer o crescimento tumoral, uma vez que diversos estudos demonstram o papel pró-tumoral desta citocina (Rei *et al.*, 2014; Rei, Pennington e Silva-Santos, 2015). Estes dados corroboram os dados obtidos *in vivo* em camundongos 5-LO KO

que apresentaram um aumento no número de tumores associado a um aumento nos níveis de IL-17 nos pulmões metastáticos. Vale ressaltar que os camundongos 5-LO KO não são capazes de produzir LTB<sub>4</sub> nem LXA<sub>4</sub> (Fahel *et al.*, 2015), sendo ainda possível que ocorresse uma maior produção de mediadores lipídicos para os derivados da COX-2 nestes animais. De acordo com nossos dados, Hodge e colaboradores (2014) demonstraram uma correlação entre a produção de PGE<sub>2</sub> por células tumorais e a redução na liberação de granzima B, perforina e IFN- $\gamma$  por linfócitos T do infiltrado tumoral, que pode representar um mecanismo de evasão tumoral. Além disso, foi demonstrado que a PGE<sub>2</sub> está relacionada com a produção de IL-17 por linfócitos T (Schiffmann *et al.*, 2014) o que contribui ao favorecimento do crescimento tumoral. Para a melhor compreensão da relevância deste fenômeno no modelo experimental de melanoma *in vivo*, será importante avaliar a produção destes mediadores lipídicos no ambiente tumoral e correlaciona-los com a ativação e o perfil linfócitos T  $\gamma\delta$ .

O CD107a (LAMP-1) é expresso na superfície da célula efetora quando os grânulos citotóxicos são conduzidos até a superfície celular e liberados durante o processo de degranulação. Após esse processo, a proteína ligada à membrana do grânulo CD107a é exposta na superfície da célula e o conteúdo dos grânulos é liberado, dentre eles a granzima B (Cohen *et al.*, 2013). Considerando a importante atividade citotóxica dos linfócitos T  $\gamma\delta$  e a sua modulação por fosfoantígenos (Qin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2013), nós avaliamos a expressão desta molécula no nosso modelo experimental. Nós demonstramos, através da observação da presença do marcador de degranulação CD107a na superfície dos linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos, que o LTB<sub>4</sub> foi capaz de aumentar a atividade citotóxica dessas células, após estímulo com IPP. Nossos resultados estão de acordo com Nancey e colaboradores (2011), que demonstraram que o tratamento *in vivo* de camundongos C57BL/6 com o antagonista específico do BLT1 reduziu a ação efetora de linfócitos T CD8 citotóxicos no modelo de colite (Nancey *et al.*, 2011). Observamos ainda uma inibição muito expressiva da degranulação de linfócitos T  $\gamma\delta$  induzida por IPP pelo tratamento com PGE<sub>2</sub>. Esse dado também está de acordo com os achados de Martinet e colaboradores (2010), que demonstram a redução da atividade citotóxica de linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados com anticorpos anti-TCR V $\delta$ 2 induzida pelo tratamento com a PGE<sub>2</sub>. Por outro lado, não foi possível observar influência do pré-tratamento dos linfócitos T  $\gamma\delta$  com LXA<sub>4</sub> na modulação da citotoxicidade dessas células induzida por IPP. Entretanto, é interessante o fato de que LXA<sub>4</sub> reverteu o efeito do LTB<sub>4</sub> ao

potencializar a citotoxicidade induzida por IPP, assim como observado no ensaio de quimiotaxia.

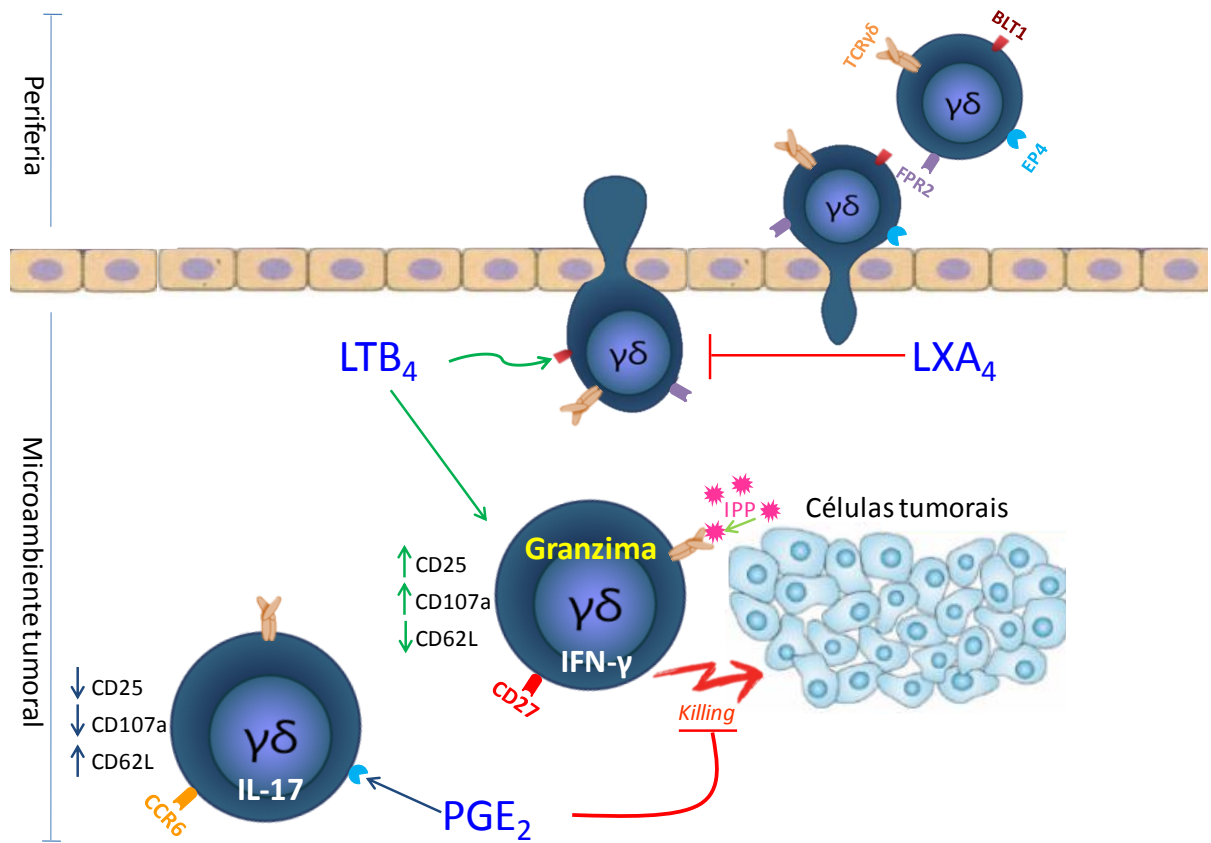
A enzima 5-LO é essencial para a produção dos mediadores lipídicos LXA<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> (Fahel et al., 2015) e, conseqüentemente, os camundongos 5-LO KO não são capazes de produzir esses mediadores (Fahel et al., 2015). Nós observamos que no pulmão de animais KO para 5-LO com metástase pulmonar ocorre uma maior produção de IL-17 e uma menor produção de IFN- $\gamma$ , o que pode ser explicado pela polarização pela PGE<sub>2</sub> (que ainda será mensurada no tecido pulmonar destes animais) e pela ausência de LTB<sub>4</sub>. Nossos dados estão de acordo com os trabalhos publicados que demonstram um papel pró-tumoral da IL-17, e sua associação com a angiogênese, crescimento e invasão tumoral (Ye, Livergood e Peng, 2013; Tartour et al., 1999; Numasaki et al., 2003; Numasaki et al., 2005). De fato, em nossos resultados, observamos que o aumento da IL-17 no pulmão de animais 5-LO KO com metástase está associado a uma maior quantidade de nódulos tumorais no pulmão.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> modulam de formas distintas a ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  humanos e murinos, sugerindo um papel desses mediadores na ativação e modulação da função efetora de linfócitos T  $\gamma\delta$  durante a resposta inflamatória associada a tumores.

## 6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho demonstram que os mediadores lipídicos PGE<sub>2</sub>, LXA<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> modulam a ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$ , o que pode apresentar um impacto durante a resposta inflamatória e anti-tumoral. Especificamente, concluímos que:

1. LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> são capazes de modular a ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  através do reconhecimento por seus respectivos receptores funcionais BLT1, EP4 e FPR2/ALX, expressos por estas células;
2. PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> apresentam um efeito inibitório sobre estimulação em linfócitos T  $\gamma\delta$  induzida por fosfoantígeno, diminuindo degranulação, a expressão de CD25, a quimiotaxia e mantendo a expressão de CD62L na superfície dessas células; enquanto o LTB<sub>4</sub> aumenta a ativação destas células na presença e na ausência de fosfoantígeno;
3. A ativação de linfócitos T  $\gamma\delta$  por LTB<sub>4</sub> induz uma polarização para a produção de INF- $\gamma$  por estas células, enquanto a PGE<sub>2</sub> induz um aumento na população de linfócitos T  $\gamma\delta$  produtores de IL-17;
4. A PGE<sub>2</sub> é capaz de inibir o efeito citotóxico de linfócitos T  $\gamma\delta$ , inibindo a degranulação destas células e a expressão do marcador CD107a. O LTB<sub>4</sub> potencializa a degranulação e o *killing* de B16F10 induzidos pelo IPP, enquanto a LXA<sub>4</sub> reverte o efeito induzido pelo LTB<sub>4</sub>;
5. Camundongos deficientes de 5-LO (que não produzem LXA<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub>) apresentam mais IL-17 nos pulmões metastáticos do que camundongos selvagens, o que está associado ao maior número de nódulos tumorais.



**Figura 6. 1: Modelo proposto baseado nas conclusões do trabalho.** 1- A migração de linfócitos T  $\gamma\delta$  é coordenada pelo reconhecimento BLT1/LTB<sub>4</sub>, que é inibida pela LXA<sub>4</sub>. 2- O LTB<sub>4</sub>, em conjunto com o IPP, presente no microambiente tumoral leva à ativação dos linfócitos T  $\gamma\delta$ , induzindo a produção de granzima e a polarização de linfócitos T  $\gamma\delta$ /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, resultando na morte de células tumorais. 3- A PGE<sub>2</sub> induz a polarização de linfócitos T  $\gamma\delta$ /IL-17<sup>+</sup> e inibe a atividade citotóxica inibindo o *killing* de células tumorais.

## 7 REFERÊNCIAS

1995. "Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation." *Immunogenetics* no. 42 (6):451-3.
- Allison, J. P., and W. L. Havran. 1991. "The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors." *Annu Rev Immunol* no. 9:679-705. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.003335.
- Angelini, D. F., G. Borsellino, M. Poupot, A. Diamantini, R. Poupot, G. Bernardi, F. Poccia, J. J. Fournié, and L. Battistini. 2004. "FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways." *Blood* no. 104 (6):1801-7. doi: 10.1182/blood-2004-01-0331.
- Arenberg, D. A., S. L. Kunkel, P. J. Polverini, S. B. Morris, M. D. Burdick, M. C. Glass, D. T. Taub, M. D. Iannettoni, R. I. Whyte, and R. M. Strieter. 1996. "Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases." *J Exp Med* no. 184 (3):981-92.
- Aronoff, D. M. 2012. "Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death?" *Mediators Inflamm* no. 2012:696897. doi: 10.1155/2012/696897.
- Aronoff, D. M., C. Canetti, and M. Peters-Golden. 2004. "Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP." *J Immunol* no. 173 (1):559-65.
- Asakrah, S., W. Nieves, Z. Mahdi, M. Agard, A. H. Zea, C. J. Roy, and L. A. Morici. 2013. "Post-exposure therapeutic efficacy of COX-2 inhibition against *Burkholderia pseudomallei*." *PLoS Negl Trop Dis* no. 7 (5):e2212. doi: 10.1371/journal.pntd.0002212.
- Bachi AL, Kim FJ, Nonogaki S, Carneiro CR, Lopes JD, Jasiulionis MG, et al. Leukotriene B4 creates a favorable microenvironment for murine melanoma growth. *Mol Cancer Res*. 2009;7(9):1417-24.
- Bae, Y. S., H. J. Yi, H. Y. Lee, E. J. Jo, J. I. Kim, T. G. Lee, R. D. Ye, J. Y. Kwak, and S. H. Ryu. 2003. "Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands." *J Immunol* no. 171 (12):6807-13.
- Bailie, M. B., T. J. Standiford, L. L. Laichalk, M. J. Coffey, R. Strieter, and M. Peters-Golden. 1996. "Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonia* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities." *J Immunol* no. 157 (12):5221-4.

- Bennouna, J., E. Bompas, E. M. Neidhardt, F. Rolland, I. Philip, C. Galéa, S. Salot, S. Saiagh, M. Audrain, M. Rimbert, S. Lafaye-de Micheaux, J. Tiollier, and S. Négrier. 2008. "Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma." *Cancer Immunol Immunother* no. 57 (11):1599-609. doi: 10.1007/s00262-008-0491-8.
- Bonneville, M., and J. J. Fournié. 2005. "Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites." *Microbes Infect* no. 7 (3):503-9. doi: 10.1016/j.micinf.2005.03.004.
- Bonneville, M., R. L. O'Brien, and W. K. Born. 2010. "Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity." *Nat Rev Immunol* no. 10 (7):467-78. doi: 10.1038/nri2781.
- Bonneville, M., and E. Scotet. 2006. "Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors." *Curr Opin Immunol* no. 18 (5):539-46. doi: 10.1016/j.coi.2006.07.002.
- Born, W. K., and R. L. O'Brien. 2009. "Antigen-restricted gammadelta T-cell receptors?" *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* no. 57 (2):129-35. doi: 10.1007/s00005-009-0017-x.
- Bozza, P. T., I. Bakker-Abreu, R. A. Navarro-Xavier, and C. Bandeira-Melo. 2011. "Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* no. 85 (5):205-13. doi: 10.1016/j.plefa.2011.04.020.
- Brandes, M., K. Willmann, and B. Moser. 2005. "Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells." *Science* no. 309 (5732):264-8. doi: 10.1126/science.1110267.
- Brash, A. R. 1999. "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." *J Biol Chem* no. 274 (34):23679-82.
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, Z. Wen, R. D. Schreiber, and J. E. Darnell. 1996. "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 93 (15):7673-8.
- Canetti, C., B. Hu, J. L. Curtis, and M. Peters-Golden. 2003. "Syk activation is a leukotriene B4-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells." *Blood* no. 102 (5):1877-83. doi: 10.1182/blood-2003-02-0534.
- Cao, W., and W. He. 2005. "The recognition pattern of gammadelta T cells." *Front Biosci* no. 10:2676-700.
- Carding, S. R. 1990. "A role for gamma/delta T cells in the primary immune response to influenza virus." *Res Immunol* no. 141 (7):603-6.
- Carding, S. R., and P. J. Egan. 2002. "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." *Nat Rev Immunol* no. 2 (5):336-45. doi: 10.1038/nri797.

- Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R. N. Germain. 2006. "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction." *Nature* no. 440 (7086):890-5. doi: 10.1038/nature04651.
- Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, and D. L. Simmons. 2002. "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 99 (21):13926-31. doi: 10.1073/pnas.162468699.
- Chattopadhyay, P. K., M. R. Betts, D. A. Price, E. Gostick, H. Horton, M. Roederer, and S. C. De Rosa. 2009. "The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression." *J Leukoc Biol* no. 85 (1):88-97. doi: 10.1189/jlb.0208107.
- Chen, C. Y., S. Yao, D. Huang, H. Wei, H. Sicard, G. Zeng, H. Jomaa, M. H. Larsen, W. R. Jacobs, R. Wang, N. Letvin, Y. Shen, L. Qiu, L. Shen, and Z. W. Chen. 2013. "Phosphoantigen/IL2 expansion and differentiation of V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells increase resistance to tuberculosis in nonhuman primates." *PLoS Pathog* no. 9 (8):e1003501. doi: 10.1371/journal.ppat.1003501.
- Chen, Z. W., and N. L. Letvin. 2003. "V $\gamma$ 2V $\delta$ 2+ T cells and anti-microbial immune responses." *Microbes Infect* no. 5 (6):491-8.
- Cheraim, A. B., P. Xavier-Elsas, S. H. de Oliveira, T. Batistella, M. Russo, M. I. Gaspar-Elsas, and F. Q. Cunha. 2008. "Leukotriene B4 is essential for selective eosinophil recruitment following allergen challenge of CD4+ cells in a model of chronic eosinophilic inflammation." *Life Sci* no. 83 (5-6):214-22. doi: 10.1016/j.lfs.2008.06.004.
- Chiang, N., C. N. Serhan, S. E. Dahlén, J. M. Drazen, D. W. Hay, G. E. Rovati, T. Shimizu, T. Yokomizo, and C. Brink. 2006. "The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo." *Pharmacol Rev* no. 58 (3):463-87. doi: 10.1124/pr.58.3.4.
- Chien, Y. H., R. Jores, and M. P. Crowley. 1996. "Recognition by gamma/delta T cells." *Annu Rev Immunol* no. 14:511-32. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.511.
- Chien, Y. H., and Y. Konigshofer. 2007. "Antigen recognition by gammadelta T cells." *Immunol Rev* no. 215:46-58. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00470.x.
- Chin, Y. E., M. Kitagawa, W. C. Su, Z. H. You, Y. Iwamoto, and X. Y. Fu. 1996. "Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1." *Science* no. 272 (5262):719-22.
- Chiplunkar, S., S. Dhar, D. Wesch, and D. Kabelitz. 2009. "gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects." *Immunotherapy* no. 1 (4):663-78. doi: 10.2217/imt.09.27.



- Chung, C. S., L. Watkins, A. Funches, J. Lomas-Neira, W. G. Cioffi, and A. Ayala. 2006. "Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* no. 291 (5):R1338-43. doi: 10.1152/ajpregu.00283.2006.
- Cipriani, B., G. Borsellino, F. Poccia, R. Placido, D. Tramonti, S. Bach, L. Battistini, and C. F. Brosnan. 2000. "Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines." *Blood* no. 95 (1):39-47.
- Cohnen, A., S. C. Chiang, A. Stojanovic, H. Schmidt, M. Claus, P. Saftig, O. Janßen, A. Cerwenka, Y. T. Bryceson, and C. Watzl. 2013. "Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage." *Blood* no. 122 (8):1411-8. doi: 10.1182/blood-2012-07-441832.
- Constant, P., Y. Poquet, M. A. Peyrat, F. Davodeau, M. Bonneville, and J. J. Fournié. 1995. "The antituberculous Mycobacterium bovis BCG vaccine is an attenuated mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic antigens for human gamma delta T cells." *Infect Immun* no. 63 (12):4628-33.
- Copier J, Bodman-Smith M, Dalglish A. Current status and future applications of cellular therapies for cancer. *Immunotherapy*. 2011;3(4):507-16.
- Costa, M. F., R. de Souza-Martins, M. C. de Souza, C. F. Benjamim, B. Piva, B. L. Diaz, M. Peters-Golden, M. Henriques, C. Canetti, and C. Penido. 2010. "Leukotriene B4 mediates gammadelta T lymphocyte migration in response to diverse stimuli." *J Leukoc Biol* no. 87 (2):323-32. doi: 10.1189/jlb.0809563.
- Costa, M. F., J. Nihei, J. Mengel, M. G. Henriques, and C. Penido. 2009. "Requirement of L-selectin for gammadelta T lymphocyte activation and migration during allergic pleurisy: co-relation with eosinophil accumulation." *Int Immunopharmacol* no. 9 (3):303-12. doi: 10.1016/j.intimp.2008.12.004.
- Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C. T. Morita, T. Spies, and J. F. Bukowski. 2001. "MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function." *Immunity* no. 15 (1):83-93.
- Das, H., L. Wang, A. Kamath, and J. F. Bukowski. 2001. "Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates." *Blood* no. 98 (5):1616-8.
- de Kruijf, E. M., A. Sajet, J. G. van Nes, H. Putter, V. T. Smit, R. A. Eagle, I. Jafferji, J. Trowsdale, G. J. Liefers, C. J. van de Velde, and P. J. Kuppen. 2012. "NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study." *BMC Cancer* no. 12:24. doi: 10.1186/1471-2407-12-24.
- DeBarros, A., M. Chaves-Ferreira, F. d'Orey, J. C. Ribot, and B. Silva-Santos. 2011. "CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human  $\gamma\delta$  peripheral blood lymphocytes." *Eur J Immunol* no. 41 (1):195-201. doi: 10.1002/eji.201040905.

- Del Prete A, Shao WH, Mitola S, Santoro G, Sozzani S, Haribabu B. Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood*. 2007;109(2):626-31.
- Dieli, F., F. Poccia, M. Lipp, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano, and A. Salerno. 2003. "Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites." *J Exp Med* no. 198 (3):391-7. doi: 10.1084/jem.20030235.
- Dieli, F., D. Vermijlen, F. Fulfaro, N. Caccamo, S. Meraviglia, G. Cicero, A. Roberts, S. Buccheri, M. D'Asaro, N. Gebbia, A. Salerno, M. Eberl, and A. C. Hayday. 2007. "Targeting human  $\{\gamma\}\delta\}$  T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* no. 67 (15):7450-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0199.
- Doi, T., M. Hatakeyama, S. Minamoto, T. Kono, H. Mori, and T. Taniguchi. 1989. "Human interleukin 2 (IL 2) receptor beta chain allows transduction of IL 2-induced proliferation signal(s) in a murine cell line." *Eur J Immunol* no. 19 (12):2375-8. doi: 10.1002/eji.1830191229.
- Dufton, N., and M. Perretti. 2010. "Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists." *Pharmacol Ther* no. 127 (2):175-88. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.010.
- Dupuy, S., M. Lambert, D. Zucman, S. P. Choukem, S. Tognarelli, C. Pages, C. Lebbé, and S. Caillat-Zucman. 2012. "Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma." *PLoS Pathog* no. 8 (1):e1002486. doi: 10.1371/journal.ppat.1002486.
- Evans, J. H., D. M. Spencer, A. Zweifach, and C. C. Leslie. 2001. "Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes." *J Biol Chem* no. 276 (32):30150-60. doi: 10.1074/jbc.M100943200.
- Fahel, J. S., M. B. de Souza, M. T. Gomes, P. P. Corsetti, N. B. Carvalho, F. A. Marinho, L. A. de Almeida, M. V. Caliari, F. S. Machado, and S. C. Oliveira. 2015. "5-Lipoxygenase negatively regulates Th1 response during *Brucella abortus* infection in mice." *Infect Immun* no. 83 (3):1210-6. doi: 10.1128/IAI.02592-14.
- Feng, Z., H. P. Godfrey, S. Mandy, S. Strudwick, K. T. Lin, E. Heilman, and P. Y. Wong. 1996. "Leukotriene B4 modulates in vivo expression of delayed-type hypersensitivity by a receptor-mediated mechanism: regulation by lipoxin A4." *J Pharmacol Exp Ther* no. 278 (2):950-6.
- Ferrick, D. A., M. D. Schrenzel, T. Mulvania, B. Hsieh, W. G. Ferlin, and H. Lepper. 1995. "Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo." *Nature* no. 373 (6511):255-7. doi: 10.1038/373255a0.

- Filep, J. G., T. Khreiss, and L. József. 2005. "Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* no. 73 (3-4):257-62. doi: 10.1016/j.plefa.2005.05.014.
- Fiore, S. 2012. *Leukotrienes and lipoxins Bioactive Lipids*.
- Fiore, S., and C. N. Serhan. 1995. "Lipoxin A4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloid cells: inhibition of CD11/18 expression by lipoxin A4-lipoxin A4 receptor interaction." *Biochemistry* no. 34 (51):16678-86.
- Fisch, P., E. Meuer, D. Pende, S. Rothenfusser, O. Viale, S. Kock, S. Ferrone, D. Fradelizi, G. Klein, L. Moretta, H. G. Rammensee, T. Boon, P. Coulie, and P. van der Bruggen. 1997. "Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity." *Eur J Immunol* no. 27 (12):3368-79. doi: 10.1002/eji.1830271236.
- Fischer, A., A. Durandy, and C. Griscelli. 1981. "Role of prostaglandin E2 in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity." *J Immunol* no. 126 (4):1452-5.
- Flamand, L., M. J. Tremblay, and P. Borgeat. 2007. "Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents." *J Immunol* no. 178 (12):8036-45.
- Flierl, M. A., D. Rittirsch, H. Gao, L. M. Hoesel, B. A. Nadeau, D. E. Day, F. S. Zetoune, J. V. Sarma, M. S. Huber-Lang, J. L. Ferrara, and P. A. Ward. 2008. "Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis." *FASEB J* no. 22 (7):2198-205. doi: 10.1096/fj.07-105221.
- Funk, C. D. 2001. "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." *Science* no. 294 (5548):1871-5. doi: 10.1126/science.294.5548.1871.
- Garman, R. D., P. J. Doherty, and D. H. Raulet. 1986. "Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes." *Cell* no. 45 (5):733-42.
- Garrone, P., L. Galibert, F. Rousset, S. M. Fu, and J. Banchereau. 1994. "Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen." *J Immunol* no. 152 (9):4282-90.
- Glatzel, A., D. Wesch, F. Schiemann, E. Brandt, O. Janssen, and D. Kabelitz. 2002. "Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells." *J Immunol* no. 168 (10):4920-9.
- Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero. 2003. "Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells." *J Exp Med* no. 197 (2):163-8.
- Godder, K. T., P. J. Henslee-Downey, J. Mehta, B. S. Park, K. Y. Chiang, S. Abhyankar, and L. S. Lamb. 2007. "Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor

- bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* no. 39 (12):751-7. doi: 10.1038/sj.bmt.1705650.
- Gomes, A. Q., D. S. Martins, and B. Silva-Santos. 2010. "Targeting  $\gamma\delta$  T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application." *Cancer Res* no. 70 (24):10024-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3236.
- González-Amaro, R., J. R. Cortés, F. Sánchez-Madrid, and P. Martín. 2013. "Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?" *Trends Mol Med* no. 19 (10):625-32. doi: 10.1016/j.molmed.2013.07.006.
- Goodarzi, K., M. Goodarzi, A. M. Tager, A. D. Luster, and U. H. von Andrian. 2003. "Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues." *Nat Immunol* no. 4 (10):965-73. doi: 10.1038/ni972.
- Goodman, Louis, and Alfred Goldman. 1995. Goodman e Gilman
- Grigoriadou, K., L. Boucontet, and P. Pereira. 2002. "T cell receptor-gamma allele-specific selection of V gamma 1/V delta 4 cells in the intestinal epithelium." *J Immunol* no. 169 (7):3736-43.
- Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L. L. Lanier, L. J. Picker, T. Anderson, R. A. Warnke, A. K. Bhan, J. L. Strominger, and M. B. Brenner. 1989. "Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system." *J Exp Med* no. 169 (4):1277-94.
- Haas, J. D., F. H. González, S. Schmitz, V. Chennupati, L. Föhse, E. Kremmer, R. Förster, and I. Prinz. 2009. "CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells." *Eur J Immunol* no. 39 (12):3488-97. doi: 10.1002/eji.200939922.
- Haas, J. D., S. Ravens, S. Düber, I. Sandrock, L. Oberdörfer, E. Kashani, V. Chennupati, L. Föhse, R. Naumann, S. Weiss, A. Krueger, R. Förster, and I. Prinz. 2012. "Development of interleukin-17-producing  $\gamma\delta$  T cells is restricted to a functional embryonic wave." *Immunity* no. 37 (1):48-59. doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.003.
- Haas, W., P. Pereira, and S. Tonegawa. 1993. "Gamma/delta cells." *Annu Rev Immunol* no. 11:637-85. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003225.
- Hambek M, Baghi M, Wagenblast J, Schmitt J, Baumann H, Knecht R. Inverse correlation between serum PGE2 and T classification in head and neck cancer. *Head Neck*. 2007;29(3):244-8.
- Hammerich, L., J. M. Bangen, O. Govaere, H. W. Zimmermann, N. Gassler, S. Huss, C. Liedtke, I. Prinz, S. A. Lira, T. Luedde, T. Roskams, C. Trautwein, F. Heymann, and F. Tacke. 2014. "Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of  $\gamma\delta$  T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis." *Hepatology* no. 59 (2):630-42. doi: 10.1002/hep.26697.

- Hatakeyama, M., H. Mori, T. Doi, and T. Taniguchi. 1989. "A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization." *Cell* no. 59 (5):837-45.
- Hayday, A. C. 2000. "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* no. 18:975-1026. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.975.
- Hayday, A., E. Theodoridis, E. Ramsburg, and J. Shires. 2001. "Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology." *Nat Immunol* no. 2 (11):997-1003. doi: 10.1038/ni1101-997.
- Heilig, J. S., and S. Tonegawa. 1986. "Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes." *Nature* no. 322 (6082):836-40. doi: 10.1038/322836a0.
- Heise, C. E., B. F. O'Dowd, D. J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D. S. Im, R. Stocco, J. N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D. L. Williams, Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M. K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C. P. Austin, S. R. George, G. P. O'Neill, K. M. Metters, K. R. Lynch, and J. F. Evans. 2000. "Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor." *J Biol Chem* no. 275 (39):30531-6. doi: 10.1074/jbc.M003490200.
- Hirsh, M. I., N. Hashiguchi, Y. Chen, L. Yip, and W. G. Junger. 2006. "Surface expression of HSP72 by LPS-stimulated neutrophils facilitates gammadeltaT cell-mediated killing." *Eur J Immunol* no. 36 (3):712-21. doi: 10.1002/eji.200535422.
- Hodge G, Barnawi J, Jurisevic C, Moffat D, Holmes M, Reynolds PN, et al. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- $\gamma$  by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clin Exp Immunol*. 2014;178(1):79-85.
- Holtmeier, W., and D. Kabelitz. 2005. "gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses." *Chem Immunol Allergy* no. 86:151-83. doi: 10.1159/000086659.
- Huang, L., A. Zhao, F. Wong, J. M. Ayala, M. Struthers, F. Ujjainwalla, S. D. Wright, M. S. Springer, J. Evans, and J. Cui. 2004. "Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* no. 24 (10):1783-8. doi: 10.1161/01.ATV.0000140063.06341.09.
- Huang, M., M. Stolina, S. Sharma, J. T. Mao, L. Zhu, P. W. Miller, J. Wollman, H. Herschman, and S. M. Dubinett. 1998. "Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production." *Cancer Res* no. 58 (6):1208-16.
- Huang, W. W., E. A. Garcia-Zepeda, A. Sauty, H. C. Oettgen, M. E. Rothenberg, and A. D. Luster. 1998. "Molecular and biological characterization of the murine leukotriene B4 receptor expressed on eosinophils." *J Exp Med* no. 188 (6):1063-74.

- Human Genome Organization. Gene Family: T cell receptor gamma locus at 7p14 (TRG). [Internet]. Cambridge: HUGO Gene Nomenclature Committee(HGNC), European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Trust Genome Campus; Disponível em: <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/375>
- Ikeda, H., L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* no. 13 (2):95-109.
- Iovino F, Meraviglia S, Spina M, Orlando V, Saladino V, Dieli F, et al. Immunotherapy targeting colon cancer stem cells. *Immunotherapy*. 2011;3(1):97-106.
- Islam, S. A., S. Y. Thomas, C. Hess, B. D. Medoff, T. K. Means, C. Brander, C. M. Lilly, A. M. Tager, and A. D. Luster. 2006. "The leukotriene B4 lipid chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans." *Blood* no. 107 (2):444-53. doi: 10.1182/blood-2005-06-2362.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
- Jakobsson, P. J., S. Thorén, R. Morgenstern, and B. Samuelsson. 1999. "Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 96 (13):7220-5.
- Jensen, K. D., X. Su, S. Shin, L. Li, S. Youssef, S. Yamasaki, L. Steinman, T. Saito, R. M. Locksley, M. M. Davis, N. Baumgarth, and Y. H. Chien. 2008. "Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma." *Immunity* no. 29 (1):90-100. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.022.
- Kabelitz, D., and D. Wesch. 2003. "Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors." *Crit Rev Immunol* no. 23 (5-6):339-70.
- Kaliński, P., C. M. Hilkens, A. Snijders, F. G. Snijdewint, and M. L. Kapsenberg. 1997. "IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells." *J Immunol* no. 159 (1):28-35.
- Kaliński, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. "Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation." *J Immunol* no. 161 (6):2804-9.
- Kato, Y., Y. Tanaka, F. Miyagawa, S. Yamashita, and N. Minato. 2001. "Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens." *J Immunol* no. 167 (9):5092-8.

- Kjeldsen-Kragh, J., A. J. Quayle, B. S. Skålhegg, M. Sioud, and O. Førre. 1993. "Selective activation of resting human gamma delta T lymphocytes by interleukin-2." *Eur J Immunol* no. 23 (9):2092-9. doi: 10.1002/eji.1830230908.
- Kobayashi, H., Y. Tanaka, H. Shimmura, N. Minato, and K. Tanabe. 2010. "Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma." *Anticancer Res* no. 30 (2):575-9.
- Kong, Y., W. Cao, X. Xi, C. Ma, L. Cui, and W. He. 2009. "The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D." *Blood* no. 114 (2):310-7. doi: 10.1182/blood-2008-12-196287.
- Kreslavsky, T., A. I. Garbe, A. Krueger, and H. von Boehmer. 2008. "T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis." *J Exp Med* no. 205 (5):1173-86. doi: 10.1084/jem.20072425.
- Kunzmann, V., E. Bauer, J. Feurle, F. Weissinger, H. P. Tony, and M. Wilhelm. 2000. "Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma." *Blood* no. 96 (2):384-92.
- Lança, T., M. F. Costa, N. Gonçalves-Sousa, M. Rei, A. R. Grosso, C. Penido, and B. Silva-Santos. 2013. "Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic  $\gamma\delta$  T lymphocytes to tumor beds." *J Immunol* no. 190 (12):6673-80. doi: 10.4049/jimmunol.1300434.
- Lefranc, M. P. 2001. "Nomenclature of the human T cell receptor genes." *Curr Protoc Immunol* no. Appendix 1:Appendix 1O. doi: 10.1002/0471142735.ima01os40.
- Levy, B. D., C. B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert, and C. N. Serhan. 2001. "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." *Nat Immunol* no. 2 (7):612-9. doi: 10.1038/89759.
- Li, H., and C. D. Pauza. 2009. "Effects of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and rosiglitazone on human gammadelta2 T cells." *PLoS One* no. 4 (11):e7726. doi: 10.1371/journal.pone.0007726.
- Li, Y. Y., X. L. Wu, L. M. Chen, S. Lyu, J. Y. Zhang, and F. S. Wang. 2015. "[Decrease in Gamma Delta T cells correlates with severity of liverinjury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B]." *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* no. 23 (2):94-8.
- Lieberman, J. 2003. "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." *Nat Rev Immunol* no. 3 (5):361-70. doi: 10.1038/nri1083.
- Lin, K. T., A. Dudhane, H. P. Godfrey, and P. Y. Wong. 1996. "Identification and characterization of a high-affinity leukotriene B4 receptor on guinea pig T lymphocytes and its regulation by lipoxin A4." *J Pharmacol Exp Ther* no. 277 (2):679-84.

- Liu, L., D. Ge, L. Ma, J. Mei, S. Liu, Q. Zhang, F. Ren, H. Liao, Q. Pu, T. Wang, and Z. You. 2012. "Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer." *J Thorac Oncol* no. 7 (7):1091-100. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182542752.
- Liu, Z., B. L. Guo, B. C. Gehrs, L. Nan, and R. D. Lopez. 2005. "Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro." *J Urol* no. 173 (5):1552-6.
- Lockhart, E., A. M. Green, and J. L. Flynn. 2006. "IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection." *J Immunol* no. 177 (7):4662-9.
- Lozupone, F., D. Pende, V. L. Burgio, C. Castelli, M. Spada, M. Venditti, F. Luciani, L. Lugini, C. Federici, C. Ramoni, L. Rivoltini, G. Parmiani, F. Belardelli, P. Rivera, S. Marcenaro, L. Moretta, and S. Fais. 2004. "Effect of human natural killer and gammadelta T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice." *Cancer Res* no. 64 (1):378-85.
- Luther, S. A., and J. G. Cyster. 2001. "Chemokines as regulators of T cell differentiation." *Nat Immunol* no. 2 (2):102-7. doi: 10.1038/84205.
- Lynch, K. R., G. P. O'Neill, Q. Liu, D. S. Im, N. Sawyer, K. M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D. J. Figueroa, Z. Zeng, B. M. Connolly, C. Bai, C. P. Austin, A. Chateauneuf, R. Stocco, G. M. Greig, S. Kargman, S. B. Hooks, E. Hosfield, D. L. Williams, A. W. Ford-Hutchinson, C. T. Caskey, and J. F. Evans. 1999. "Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor." *Nature* no. 399 (6738):789-93. doi: 10.1038/21658.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* no. 15:323-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
- Maddox, J. F., M. Hachicha, T. Takano, N. A. Petasis, V. V. Fokin, and C. N. Serhan. 1997. "Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor." *J Biol Chem* no. 272 (11):6972-8.
- Maddox, J. F., and C. N. Serhan. 1996. "Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction." *J Exp Med* no. 183 (1):137-46.
- Mailliard, R. B., S. M. Alber, H. Shen, S. C. Watkins, J. M. Kirkwood, R. B. Herberman, and P. Kalinski. 2005. "IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells." *J Exp Med* no. 202 (7):941-53. doi: 10.1084/jem.20050128.
- Mancini, J. A., K. Blood, J. Guay, R. Gordon, D. Claveau, C. C. Chan, and D. Riendeau. 2001. "Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis." *J Biol Chem* no. 276 (6):4469-75. doi: 10.1074/jbc.M006865200.



- Mancuso, P., T. J. Standiford, T. Marshall, and M. Peters-Golden. 1998. "5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*." *Infect Immun* no. 66 (11):5140-6.
- Martin, B., K. Hirota, D. J. Cua, B. Stockinger, and M. Veldhoen. 2009. "Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals." *Immunity* no. 31 (2):321-30. doi: 10.1016/j.immuni.2009.06.020.
- Martinet, L., C. Jean, G. Dietrich, J. J. Fournié, and R. Poupot. 2010. "PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling." *Biochem Pharmacol* no. 80 (6):838-45. doi: 10.1016/j.bcp.2010.05.002.
- Matsukawa, A., C. M. Hogaboam, N. W. Lukacs, P. M. Lincoln, R. M. Strieter, and S. L. Kunkel. 1999. "Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4." *J Immunol* no. 163 (11):6148-54.
- Medeiros, A., C. Peres-Buzalaf, F. Fortino Verdan, and C. H. Serezani. 2012. "Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs." *Mediators Inflamm* no. 2012:327568. doi: 10.1155/2012/327568.
- Meraviglia, S., M. Eberl, D. Vermijlen, M. Todaro, S. Buccheri, G. Cicero, C. La Mendola, G. Guggino, M. D'Asaro, V. Orlando, F. Scarpa, A. Roberts, N. Caccamo, G. Stassi, F. Dieli, and A. C. Hayday. 2010. "In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients." *Clin Exp Immunol* no. 161 (2):290-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04167.x.
- Migeotte, I., D. Communi, and M. Parmentier. 2006. "Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses." *Cytokine Growth Factor Rev* no. 17 (6):501-19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.009.
- Mitsopoulos, P., A. Omri, M. Alipour, N. Vermeulen, M. G. Smith, and Z. E. Suntres. 2008. "Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents." *Int J Pharm* no. 363 (1-2):106-11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.07.015.
- Molon, B., G. Gri, M. Bettella, C. Gómez-Moutón, A. Lanzavecchia, C. Martínez-A, S. Mañes, and A. Viola. 2005. "T cell costimulation by chemokine receptors." *Nat Immunol* no. 6 (5):465-71. doi: 10.1038/ni1191.
- Mookerjee-Basu, J., P. Vantourout, L. O. Martinez, B. Perret, X. Collet, C. Périgaud, S. Peyrottes, and E. Champagne. 2010. "F1-adenosine triphosphatase displays properties characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells." *J Immunol* no. 184 (12):6920-8. doi: 10.4049/jimmunol.0904024.

- Moretta, A., A. Poggi, D. Pende, G. Tripodi, A. M. Orengo, N. Pella, R. Augugliaro, C. Bottino, E. Ciccone, and L. Moretta. 1991. "CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta." *J Exp Med* no. 174 (6):1393-8.
- Morita, C. T., R. A. Mariuzza, and M. B. Brenner. 2000. "Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system." *Springer Semin Immunopathol* no. 22 (3):191-217.
- Morrow, J. D., and L. J. Roberts. 2002. "The isoprostanes: their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* no. 166 (12 Pt 2):S25-30. doi: 10.1164/rccm.2206011.
- Murdoch, J. R., L. G. Gregory, and C. M. Lloyd. 2014. " $\gamma\delta$ T cells regulate chronic airway inflammation and development of airway remodelling." *Clin Exp Allergy* no. 44 (11):1386-98. doi: 10.1111/cea.12395.
- Nakajima, J., T. Murakawa, T. Fukami, S. Goto, T. Kaneko, Y. Yoshida, S. Takamoto, and K. Kakimi. 2010. "A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells." *Eur J Cardiothorac Surg* no. 37 (5):1191-7. doi: 10.1016/j.ejcts.2009.11.051.
- Nakayama, T., N. Mutsuga, L. Yao, and G. Tosato. 2006. "Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells." *J Leukoc Biol* no. 79 (1):95-104. doi: 10.1189/jlb.0405226.
- Nancey, S., G. Boschetti, F. Hacini, F. Sardi, P. Y. Durand, M. Le Borgne, L. Furhmann, B. Flourie, and D. Kaiserlian. 2011. "Blockade of LTB(4) /BLT(1) pathway improves CD8(+) T-cell-mediated colitis." *Inflamm Bowel Dis* no. 17 (1):279-88. doi: 10.1002/ibd.21404.
- Narumiya, S., and G. A. FitzGerald. 2001. "Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function." *J Clin Invest* no. 108 (1):25-30. doi: 10.1172/JCI13455.
- Nedellec, S., C. Sabourin, M. Bonneville, and E. Scotet. 2010. "NKG2D costimulates human V gamma 9V delta 2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals." *J Immunol* no. 185 (1):55-63. doi: 10.4049/jimmunol.1000373.
- Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavodny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara, and M. T. Lotze. 2003. "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth." *Blood* no. 101 (7):2620-7. doi: 10.1182/blood-2002-05-1461.
- Numasaki, M., M. Watanabe, T. Suzuki, H. Takahashi, A. Nakamura, F. McAllister, T. Hishinuma, J. Goto, M. T. Lotze, J. K. Kolls, and H. Sasaki. 2005. "IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis." *J Immunol* no. 175 (9):6177-89.

- Nuñez-Cruz, S., E. Aguado, S. Richelme, B. Chetaille, A. M. Mura, M. Richelme, L. Pouyet, E. Jouvin-Marche, L. Xerri, B. Malissen, and M. Malissen. 2003. "LAT regulates gammadelta T cell homeostasis and differentiation." *Nat Immunol* no. 4 (10):999-1008. doi: 10.1038/ni977.
- O'Brien, R. L., C. L. Roark, N. Jin, M. K. Aydintug, J. D. French, J. L. Chain, J. M. Wands, M. Johnston, and W. K. Born. 2007. "gammadelta T-cell receptors: functional correlations." *Immunol Rev* no. 215:77-88. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00477.x.
- Ohga, S., Y. Yoshikai, Y. Takeda, K. Hiromatsu, and K. Nomoto. 1990. "Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with *Listeria monocytogenes*." *Eur J Immunol* no. 20 (3):533-8. doi: 10.1002/eji.1830200311.
- Pace, E., M. Profita, M. Melis, A. Bonanno, A. Paternò, C. H. Mody, M. Spatafora, M. Ferraro, L. Siena, A. M. Vignola, G. Bonsignore, and M. Gjomarkaj. 2004. "LTB4 is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space." *Clin Exp Immunol* no. 135 (3):519-27.
- Pacheco, P., A. Vieira-de-Abreu, R. N. Gomes, G. Barbosa-Lima, L. B. Wermelinger, C. M. Maya-Monteiro, A. R. Silva, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, C. Bandeira-Melo, and P. T. Bozza. 2007. "Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response." *J Immunol* no. 179 (12):8500-8.
- Palecanda, A., B. Walcheck, D. K. Bishop, and M. A. Jutila. 1992. "Rapid activation-independent shedding of leukocyte L-selectin induced by cross-linking of the surface antigen." *Eur J Immunol* no. 22 (5):1279-86. doi: 10.1002/eji.1830220524.
- Palmer, R. M., R. J. Stepney, G. A. Higgs, and K. E. Eakins. 1980. "Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leucocytes of different species." *Prostaglandins* no. 20 (2):411-8.
- Paolini, R., G. Bernardini, R. Molfetta, and A. Santoni. 2015. "NK cells and interferons." *Cytokine Growth Factor Rev* no. 26 (2):113-20. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.11.003.
- Parente-Pereira, A. C., H. Shmeeda, L. M. Whilding, C. P. Zambirinis, J. Foster, S. J. van der Stegen, R. Beatson, T. Zabinski, N. Brewig, J. K. Sosabowski, S. Mather, S. Ghaem-Maghani, A. Gabizon, and J. Maher. 2014. "Adoptive immunotherapy of epithelial ovarian cancer with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, potentiated by liposomal alendronic acid." *J Immunol* no. 193 (11):5557-66. doi: 10.4049/jimmunol.1402200.
- Parkinson, J. F. 2006. "Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation." *Inflamm Allergy Drug Targets* no. 5 (2):91-106.

- Paul, S., A. K. Singh, Shilpi, and G. Lal. 2014. "Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in inflammation and tolerance." *Int Rev Immunol* no. 33 (6):537-58. doi: 10.3109/08830185.2013.863306.
- Pegram HJ, Kershaw MH, Darcy PK. Genetic modification of natural killer cells for adoptive cellular immunotherapy. *Immunotherapy*. 2009;1(4):623-30.
- Penido, C., H. C. Castro-Faria-Neto, A. P. Larangeira, E. C. Rosas, R. Ribeiro-dos-Santos, P. T. Bozza, and M. G. Henriques. 1997. "The role of gammadelta T lymphocytes in lipopolysaccharide-induced eosinophil accumulation into the mouse pleural cavity." *J Immunol* no. 159 (2):853-60.
- Penido, C., M. F. Costa, M. C. Souza, K. A. Costa, A. L. Candéa, C. F. Benjamim, and M. Henriques. 2008. "Involvement of CC chemokines in gammadelta T lymphocyte trafficking during allergic inflammation: the role of CCL2/CCR2 pathway." *Int Immunol* no. 20 (1):129-39. doi: 10.1093/intimm/dxm128.
- Penido, C., A. Vieira-de-Abreu, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2003. "Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin." *J Immunol* no. 171 (12):6788-94.
- Peters-Golden, M. 2008. "Expanding roles for leukotrienes in airway inflammation." *Curr Allergy Asthma Rep* no. 8 (4):367-73.
- Poccia, F., C. Gioia, F. Martini, A. Sacchi, P. Piacentini, M. Tempestilli, C. Agrati, A. Amendola, A. Abdeddaim, C. Vlassi, M. Malkovsky, and G. D'Offizi. 2009. "Zoledronic acid and interleukin-2 treatment improves immunocompetence in HIV-infected persons by activating Vgamma9Vdelta2 T cells." *AIDS* no. 23 (5):555-65. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283244619.
- Ponomarev, E. D., and B. N. Dittel. 2005. "Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism." *J Immunol* no. 174 (8):4678-87.
- Porcelli, S., M. B. Brenner, and H. Band. 1991. "Biology of the human gamma delta T-cell receptor." *Immunol Rev* no. 120:137-83.
- Prinz, I., C. Gregoire, H. Mollenkopf, E. Aguado, Y. Wang, M. Malissen, S. H. Kaufmann, and B. Malissen. 2005. "The type 1 cysteinyl leukotriene receptor triggers calcium influx and chemotaxis in mouse alpha beta- and gamma delta effector T cells." *J Immunol* no. 175 (2):713-9.
- Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of  $\gamma\delta$  T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(8):1988-94.
- Qin, G., H. Mao, J. Zheng, S. F. Sia, Y. Liu, P. L. Chan, K. T. Lam, J. S. Peiris, Y. L. Lau, and W. Tu. 2009. "Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display

- potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses." *J Infect Dis* no. 200 (6):858-65. doi: 10.1086/605413.
- Raffray, L., C. Giry, Y. Thirapathi, F. Binois, M. P. Moiton, M. Lagrange-Xelot, D. Ferrandiz, M. C. Jaffar-Bandjee, and P. Gasque. 2015. "High leptospiremia is associated with low gamma-delta T cell counts." *Microbes Infect.* doi: 10.1016/j.micinf.2015.04.001.
- Ramutton T, Buccheri S, Dieli F, Todaro M, Stassi G, Meraviglia S.  $\gamma\delta$  T cells as a potential tool in colon cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2014;6(9):989-99.
- Rani, M., Q. Zhang, and M. G. Schwacha. 2014. "Burn wound  $\gamma\delta$  T-cells support a Th2 and Th17 immune response." *J Burn Care Res* no. 35 (1):46-53. doi: 10.1097/01.bcr.0000440705.91099.cc.
- Rei, M., N. Gonçalves-Sousa, T. Lança, R. G. Thompson, S. Mensurado, F. R. Balkwill, H. Kulbe, D. J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2014. "Murine CD27(-) V $\gamma$ 6(+)  $\gamma\delta$  T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 111 (34):E3562-70. doi: 10.1073/pnas.1403424111.
- Rei, M., D. J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2015. "The emerging Protumor role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy." *Cancer Res* no. 75 (5):798-802. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3228.
- Ribot, J. C., A. deBarros, D. J. Pang, J. F. Neves, V. Peperzak, S. J. Roberts, M. Girardi, J. Borst, A. C. Hayday, D. J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2009. "CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets." *Nat Immunol* no. 10 (4):427-36. doi: 10.1038/ni.1717.
- Rieser, C., G. Böck, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1997. "Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production." *J Exp Med* no. 186 (9):1603-8.
- Rittirsch, D., M. A. Flierl, D. E. Day, B. A. Nadeau, S. R. McGuire, L. M. Hoesel, K. Ipaktchi, F. S. Zetoune, J. V. Sarma, L. Leng, M. S. Huber-Lang, T. A. Neff, R. Bucala, and P. A. Ward. 2008. "Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation." *J Immunol* no. 180 (11):7664-72.
- Roark, C. L., J. D. French, M. A. Taylor, A. M. Bendele, W. K. Born, and R. L. O'Brien. 2007. "Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells." *J Immunol* no. 179 (8):5576-83.
- Rock, E. P., P. R. Sibbald, M. M. Davis, and Y. H. Chien. 1994. "CDR3 length in antigen-specific immune receptors." *J Exp Med* no. 179 (1):323-8.
- Romani, L., F. Fallarino, A. De Luca, C. Montagnoli, C. D'Angelo, T. Zelante, C. Vacca, F. Bistoni, M. C. Fioretti, U. Grohmann, B. H. Segal, and P. Puccetti. 2008. "Defective

- tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease." *Nature* no. 451 (7175):211-5. doi: 10.1038/nature06471.
- Sabbione, F., M. L. Gabelloni, G. Ernst, M. S. Gori, G. Salamone, M. Oleastro, A. Trevani, J. Geffner, and C. C. Jancic. 2014. "Neutrophils suppress  $\gamma\delta$  T-cell function." *Eur J Immunol* no. 44 (3):819-30. doi: 10.1002/eji.201343664.
- Sabirsh A, Bristulf J, Owman C. Exploring the pharmacology of the leukotriene B4 receptor BLT1, without the confounding effects of BLT2. *Eur J Pharmacol*. 2004;499(1-2):53-65.
- Saito, H., D. M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen, and S. Tonegawa. 1984a. "A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes." *Nature* no. 312 (5989):36-40.
- Saito, H., D. M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen, and S. Tonegawa. 1984b. "Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences." *Nature* no. 309 (5971):757-62.
- Scannell, M., and P. Maderna. 2006. "Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells." *ScientificWorldJournal* no. 6:1555-73. doi: 10.1100/tsw.2006.259.
- Schiffmann, S., A. Weigert, J. Männich, M. Eberle, K. Birod, A. Häussler, N. Ferreiros, Y. Schreiber, H. Kunkel, M. Grez, B. Weichand, B. Brüne, W. Pfeilschifter, R. Nüsing, E. Niederberger, S. Grösch, K. Scholich, and G. Geisslinger. 2014. "PGE2/EP4 signaling in peripheral immune cells promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Biochem Pharmacol* no. 87 (4):625-35. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.006.
- Schmolka, N., K. Serre, A. R. Grosso, M. Rei, D. J. Pennington, A. Q. Gomes, and B. Silva-Santos. 2013. "Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory  $\gamma\delta$  T cell subsets." *Nat Immunol* no. 14 (10):1093-100. doi: 10.1038/ni.2702.
- Schreiber, R. D., A. Celada, and N. Buchmeier. 1986. "The role of interferon-gamma in the induction of activated macrophages." *Ann Inst Pasteur Immunol* no. 137C (2):203-6.
- Scotet, E., L. O. Martinez, E. Grant, R. Barbaras, P. Jenö, M. Guiraud, B. Monsarrat, X. Saulquin, S. Maillat, J. P. Estève, F. Lopez, B. Perret, X. Collet, M. Bonneville, and E. Champagne. 2005. "Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I." *Immunity* no. 22 (1):71-80. doi: 10.1016/j.immuni.2004.11.012.
- Serhan, C. N. 2005. "Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* no. 73 (3-4):141-62. doi: 10.1016/j.plefa.2005.05.002.

- Serhan, C. N., N. Chiang, and T. E. Van Dyke. 2008. "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." *Nat Rev Immunol* no. 8 (5):349-61. doi: 10.1038/nri2294.
- Serhan, C. N., and S. M. Prescott. 2000. "The scent of a phagocyte: Advances on leukotriene b(4) receptors." *J Exp Med* no. 192 (3):F5-8.
- Serhan, C. N., S. Yacoubian, and R. Yang. 2008. "Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators." *Annu Rev Pathol* no. 3:279-312. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409.
- Serre K, Silva-Santos B. Molecular Mechanisms of Differentiation of Murine Pro-Inflammatory  $\gamma\delta$  T Cell Subsets. *Front Immunol*. 2013;4:431.
- Sgadari, C., A. L. Angiolillo, B. W. Cherney, S. E. Pike, J. M. Farber, L. G. Koniaris, P. Vanguri, P. R. Burd, N. Sheikh, G. Gupta, J. Teruya-Feldstein, and G. Tosato. 1996. "Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 93 (24):13791-6.
- Sgadari, C., J. M. Farber, A. L. Angiolillo, F. Liao, J. Teruya-Feldstein, P. R. Burd, L. Yao, G. Gupta, C. Kanegane, and G. Tosato. 1997. "Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo." *Blood* no. 89 (8):2635-43.
- Sharma, R. K., Z. Chheda, V. R. Jala, and B. Haribabu. 2013. "Expression of leukotriene B<sub>4</sub> receptor-1 on CD8<sup>+</sup> T cells is required for their migration into tumors to elicit effective antitumor immunity." *J Immunol* no. 191 (6):3462-70. doi: 10.4049/jimmunol.1300967.
- Shen, Y., D. Zhou, L. Qiu, X. Lai, M. Simon, L. Shen, Z. Kou, Q. Wang, L. Jiang, J. Estep, R. Hunt, M. Clagett, P. K. Sehgal, Y. Li, X. Zeng, C. T. Morita, M. B. Brenner, N. L. Letvin, and Z. W. Chen. 2002. "Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections." *Science* no. 295 (5563):2255-8. doi: 10.1126/science.1068819.
- Shibata, K. 2012. "Close link between development and function of gamma-delta T cells." *Microbiol Immunol* no. 56 (4):217-27. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00435.x.
- Shibata, K., H. Yamada, M. Nakamura, S. Hatano, Y. Katsuragi, R. Kominami, and Y. Yoshikai. 2014. "IFN- $\gamma$ -producing and IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus." *J Immunol* no. 192 (5):2210-8. doi: 10.4049/jimmunol.1302145.
- Smith, A. L., and A. C. Hayday. 2000. "An alphabeta T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by gammadelta cells." *Immunology* no. 101 (3):325-32.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt, and R. M. Garavito. 2000. "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." *Annu Rev Biochem* no. 69:145-82. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.145.

- Spencer, C. T., G. Abate, I. G. Sakala, M. Xia, S. M. Truscott, C. S. Eickhoff, R. Linn, A. Blazevic, S. S. Metkar, G. Peng, C. J. Froelich, and D. F. Hoft. 2013. "Granzyme A produced by  $\gamma(9)\delta(2)$  T cells induces human macrophages to inhibit growth of an intracellular pathogen." *PLoS Pathog* no. 9 (1):e1003119. doi: 10.1371/journal.ppat.1003119.
- Steele, C., M. Zheng, E. Young, L. Marrero, J. E. Shellito, and J. K. Kolls. 2002. "Increased host resistance against *Pneumocystis carinii* pneumonia in gammadelta T-cell-deficient mice: protective role of gamma interferon and CD8(+) T cells." *Infect Immun* no. 70 (9):5208-15.
- Sturm, E. M., P. Schratl, R. Schuligoi, V. Konya, G. J. Sturm, I. T. Lippe, B. A. Peskar, and A. Heinemann. 2008. "Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors." *J Immunol* no. 181 (10):7273-83.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Breerton, E. C. Lavelle, and K. H. Mills. 2009. "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity." *Immunity* no. 31 (2):331-41. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.001.
- Tager, A. M., S. K. Bromley, B. D. Medoff, S. A. Islam, S. D. Bercury, E. B. Friedrich, A. D. Carafone, R. E. Gerszten, and A. D. Luster. 2003. "Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment." *Nat Immunol* no. 4 (10):982-90. doi: 10.1038/ni970.
- Talpain, E., R. A. Armstrong, R. A. Coleman, and C. J. Vardey. 1995. "Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils." *Br J Pharmacol* no. 114 (7):1459-65.
- Tanaka, Y., C. T. Morita, E. Nieves, M. B. Brenner, and B. R. Bloom. 1995. "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." *Nature* no. 375 (6527):155-8. doi: 10.1038/375155a0.
- Tartour, E., F. Fossiez, I. Joyeux, A. Galinha, A. Gey, E. Claret, X. Sastre-Garau, J. Couturier, V. Mosseri, V. Vives, J. Banchereau, W. H. Fridman, J. Wijdenes, S. Lebecque, and C. Sautès-Fridman. 1999. "Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice." *Cancer Res* no. 59 (15):3698-704.
- Tedder, T. F., T. Matsuyama, D. Rothstein, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1990. "Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation." *Eur J Immunol* no. 20 (6):1351-5. doi: 10.1002/eji.1830200622.
- Toda, A., T. Yokomizo, and T. Shimizu. 2002. "Leukotriene B4 receptors." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* no. 68-69:575-85.



- Todaro, M., M. D'Asaro, N. Caccamo, F. Iovino, M. G. Francipane, S. Meraviglia, V. Orlando, C. La Mendola, G. Gulotta, A. Salerno, F. Dieli, and G. Stassi. 2009. "Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes." *J Immunol* no. 182 (11):7287-96. doi: 10.4049/jimmunol.0804288.
- Tokuyama, H., T. Hagi, S. R. Mattarollo, J. Morley, Q. Wang, H. F. So, H. Fai-So, F. Moriyasu, M. Nieda, and A. J. Nicol. 2008. "V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab." *Int J Cancer* no. 122 (11):2526-34. doi: 10.1002/ijc.23365.
- Toutirais, O., F. Cabillic, G. Le Friec, S. Salot, P. Loyer, M. Le Gallo, M. Desille, C. T. de La Pintièrre, P. Daniel, F. Bouet, and V. Catros. 2009. "DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells." *Eur J Immunol* no. 39 (5):1361-8. doi: 10.1002/eji.200838409.
- Tschöp, J., A. Martignoni, H. S. Goetzman, L. G. Choi, Q. Wang, J. G. Noel, C. K. Ogle, T. A. Pritts, J. A. Johannigman, A. B. Lentsch, and C. C. Caldwell. 2008. "Gammadelta T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis." *J Leukoc Biol* no. 83 (3):581-8. doi: 10.1189/jlb.0707507.
- Uchida, R., E. Ashihara, K. Sato, S. Kimura, J. Kuroda, M. Takeuchi, E. Kawata, K. Taniguchi, M. Okamoto, K. Shimura, Y. Kiyono, C. Shimazaki, M. Taniwaki, and T. Maekawa. 2007. "Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface." *Biochem Biophys Res Commun* no. 354 (2):613-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.031.
- Uezu, K., K. Kawakami, K. Miyagi, Y. Kinjo, T. Kinjo, H. Ishikawa, and A. Saito. 2004. "Accumulation of gammadelta T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." *J Immunol* no. 172 (12):7629-34.
- van Epps, D. E. 1983. "Mediators and modulators of human lymphocyte chemotaxis." *Agents Actions Suppl* no. 12:217-33.
- Villarrubia, N., F. León, and A. Bootello. 2002. "[T gamma-delta lymphocytes and their role in hypersensitivity processes in the digestive and respiratory mucosa]." *Allergol Immunopathol (Madr)* no. 30 (5):273-82.
- Wada, I., H. Matsushita, S. Noji, K. Mori, H. Yamashita, S. Nomura, N. Shimizu, Y. Seto, and K. Kakimi. 2014. "Intraperitoneal injection of in vitro expanded Vγ9Vδ2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer." *Cancer Med* no. 3 (2):362-75. doi: 10.1002/cam4.196.
- Wang, L., A. Kamath, H. Das, L. Li, and J. F. Bukowski. 2001. "Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo." *J Clin Invest* no. 108 (9):1349-57. doi: 10.1172/JCI13584.
- Wheeldon, A., and C. J. Vardey. 1993. "Characterization of the inhibitory prostanoid receptors on human neutrophils." *Br J Pharmacol* no. 108 (4):1051-4.

- Wilhelm, M., V. Kunzmann, S. Eckstein, P. Reimer, F. Weissinger, T. Ruediger, and H. P. Tony. 2003. "Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies." *Blood* no. 102 (1):200-6. doi: 10.1182/blood-2002-12-3665.
- Wise, H. 1996. "The inhibitory effect of prostaglandin E2 on rat neutrophil aggregation." *J Leukoc Biol* no. 60 (4):480-6.
- Wise, H., and R. L. Jones. 1994. "Characterization of prostanoid receptors on rat neutrophils." *Br J Pharmacol* no. 113 (2):581-7.
- Wong, G. W., and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2010. "gammadelta and alphabeta T cell lineage choice: resolution by a stronger sense of being." *Semin Immunol* no. 22 (4):228-36. doi: 10.1016/j.smim.2010.04.005.
- Wu, D., P. Wu, X. Wu, J. Ye, Z. Wang, S. Zhao, C. Ni, G. Hu, J. Xu, Y. Han, T. Zhang, F. Qiu, J. Yan, and J. Huang. 2015. "Ex vivo expanded human circulating V $\delta$ 1  $\gamma\delta$ T cells exhibit favorable therapeutic potential for colon cancer." *Oncoimmunology* no. 4 (3):e992749. doi: 10.4161/2162402X.2014.992749.
- Xu, R., R. Wang, G. Han, J. Wang, G. Chen, L. Wang, X. Li, R. Guo, B. Shen, and Y. Li. 2010. "Complement C5a regulates IL-17 by affecting the crosstalk between DC and gammadelta T cells in CLP-induced sepsis." *Eur J Immunol* no. 40 (4):1079-88. doi: 10.1002/eji.200940015.
- Ye, J., R. S. Livergood, and G. Peng. 2013. "The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity." *Am J Pathol* no. 182 (1):10-20. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.041.
- Ye, R. D., F. Boulay, J. M. Wang, C. Dahlgren, C. Gerard, M. Parmentier, C. N. Serhan, and P. M. Murphy. 2009. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family." *Pharmacol Rev* no. 61 (2):119-61. doi: 10.1124/pr.109.001578.
- Yin, Z., C. Chen, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, A. Ray, and J. Craft. 2002. "T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells." *J Immunol* no. 168 (4):1566-71.
- Yokomizo, T., T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa, and T. Shimizu. 1997. "A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis." *Nature* no. 387 (6633):620-4. doi: 10.1038/42506.
- Yokomizo, T., K. Kato, K. Terawaki, T. Izumi, and T. Shimizu. 2000. "A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders." *J Exp Med* no. 192 (3):421-32.
- Yokota, Y., H. Inoue, Y. Matsumura, H. Nabeta, M. Narusawa, A. Watanabe, C. Sakamoto, Y. Hijikata, M. Iga-Murahashi, K. Takayama, F. Sasaki, Y. Nakanishi, T. Yokomizo, and K. Tani. 2012. "Absence of LTB4/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunologic memory by enhancing innate and

- adaptive immune systems." *Blood* no. 120 (17):3444-54. doi: 10.1182/blood-2011-10-383240.
- Zarin, P., E. L. Chen, T. S. In, M. K. Anderson, and J. C. Zúñiga-Pflücker. 2015. "Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much?" *Cell Immunol.* doi: 10.1016/j.cellimm.2015.03.007.
- Zaslona, Z., C. H. Serezani, K. Okunishi, D. M. Aronoff, and M. Peters-Golden. 2012. "Prostaglandin E2 restrains macrophage maturation via E prostanoid receptor 2/protein kinase A signaling." *Blood* no. 119 (10):2358-67. doi: 10.1182/blood-2011-08-374207.
- Zocchi, M. R., and A. Poggi. 2004. "Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense." *Front Biosci* no. 9:2588-604.
- Zuany-Amorim, C., C. Ruffié, S. Hailé, B. B. Vargaftig, P. Pereira, and M. Pretolani. 1998. "Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation." *Science* no. 280 (5367):1265-7.

## 8 ANEXO

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Murine IL-17<sup>+</sup> V $\gamma$ 4 T lymphocytes accumulate in the lungs and play a protective role during severe sepsis

Maria Fernanda de Souza Costa<sup>1,2†</sup>, Catarina Bastos Trigo de Negreiros<sup>1†</sup>, Victor Ugarte Bornstein<sup>1,7†</sup>, Richard Hemmi Valente<sup>3</sup>, José Mengel<sup>4,5</sup>, Maria das Graças Henriques<sup>1,2</sup>, Claudia Farias Benjamim<sup>6</sup> and Carmen Penido<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Lung inflammation is a major consequence of the systemic inflammatory response caused by severe sepsis. Increased migration of  $\gamma\delta$  T lymphocytes into the lungs has been previously demonstrated during experimental sepsis; however, the involvement of the  $\gamma\delta$  T cell subtype V $\gamma$ 4 has not been previously described.

**Methods:** Severe sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP; 9 punctures, 21G needle) in male C57BL/6 mice.  $\gamma\delta$  and V $\gamma$ 4 T lymphocyte depletion was performed by 3A10 and UC3-10A6 mAb i.p. administration, respectively. Lung infiltrating T lymphocytes, IL-17 production and mortality rate were evaluated.

**Results:** Severe sepsis induced by CLP in C57BL/6 mice led to an intense lung inflammatory response, marked by the accumulation of  $\gamma\delta$  T lymphocytes (comprising the V $\gamma$ 4 subtype).  $\gamma\delta$  T lymphocytes present in the lungs of CLP mice were likely to be originated from peripheral lymphoid organs and migrated towards CCL2, CCL3 and CCL5, which were highly produced in response to CLP-induced sepsis. Increased expression of CD25 by V $\gamma$ 4 T lymphocytes was observed in spleen earlier than that by  $\alpha\beta$  T cells, suggesting the early activation of V $\gamma$ 4 T cells. The V $\gamma$ 4 T lymphocyte subset predominated among the IL-17<sup>+</sup> cell populations present in the lungs of CLP mice (unlike V $\gamma$ 1 and  $\alpha\beta$  T lymphocytes) and was strongly biased toward IL-17 rather than toward IFN- $\gamma$  production. Accordingly, the *in vivo* administration of anti-V $\gamma$ 4 mAb abrogated CLP-induced IL-17 production in mouse lungs. Furthermore, anti-V $\gamma$ 4 mAb treatment accelerated mortality rate in severe septic mice, demonstrating that V $\gamma$ 4 T lymphocytes play a beneficial role in host defense.

**Conclusions:** Overall, our findings provide evidence that early-activated V $\gamma$ 4 T lymphocytes are the main responsible cells for IL-17 production in inflamed lungs during the course of sepsis and delay mortality of septic mice.

**Keywords:**  $\gamma\delta$  T cell, Interleukin-17, Chemokines, Sepsis

## Background

Mortality induced by sepsis is highly associated with secondary acute lung injury. Systemic inflammation during sepsis leads to acute respiratory distress syndrome (ARDS) caused by an exacerbated response of the immune system to bacteria and their products [1–4]. Indeed, mice subjected to

experimental model of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) show deregulation in pulmonary immune response, marked by cytokine storm and intense accumulation of activated leukocytes in lung tissue, including T lymphocytes [5–8].

$\gamma\delta$  T lymphocytes are unconventional lymphocytes that have antigen recognition properties fundamentally different from those of  $\alpha\beta$  T lymphocytes, and are comprised by distinct functional subsets, defined by the differential usage of V $\gamma$  and V $\delta$  gene repertoire [9, 10]. The V $\gamma$ 4 T lymphocyte subset is highly associated with lung immune surveillance and increases in number in mouse lungs at early time points during bacterial infections [10–13]. Increased migration of  $\gamma\delta$  T cells into the lungs

\* Correspondence: cpenido@ccts.fiocruz.br

†Equal contributors

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia Aplicada, Departamento de Farmacologia, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21041-250, Brazil

<sup>2</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT-IDN), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

has been previously demonstrated during experimental sepsis; however, the identification of  $\gamma\delta$  T cell subtypes has not been previously described [7, 8, 14].

The migration of  $\gamma\delta$  T lymphocytes is largely dictated by the activation of chemokine receptors by their counterpart ligands, among which members from both CC and CXC subfamilies play compelling roles [15–17]. Once at the infection site, these cells can rapidly respond to microbial antigens via innate surface receptors [18–21], producing high amounts of interferon (IFN)- $\gamma$  and interleukin (IL)-17, which are signature cytokines produced by specific subsets of  $\gamma\delta$  T cells [22–26]. V $\gamma$ 4 T lymphocytes represent one of the major subsets that produce IL-17 in different experimental models [27–30].

$\gamma\delta$  T lymphocytes have been shown to play divergent roles in mouse models of sepsis [8, 14, 31–34]. The protective role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes during experimental sepsis has been attributed to the production of IL-17, a cytokine that triggers neutrophil recruitment and improves bacterial clearance [33, 35–37]. Furthermore, the accumulation of activated  $\gamma\delta$  T lymphocytes in the lungs of CLP mice has been correlated with beneficial outcome of septic mice [8, 14]. Here we show that during the course of experimental severe sepsis, V $\gamma$ 4 T lymphocytes migrate into injured lungs of CLP mice and exert a protective role via the production of IL-17.

## Results

### Activated $\gamma\delta$ T lymphocytes accumulate in mouse lungs during severe sepsis

The induction of severe sepsis triggered an intense inflammatory response in mouse lungs, marked by a significant increase of  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T lymphocyte numbers observed from 1 to 10 days after the surgery (Fig. 1a–c). The  $\gamma\delta$  T cell subtype V $\gamma$ 4 also infiltrated into the lungs of CLP-induced mice and, differently from those of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T lymphocytes, did not decrease in numbers at day 3 post-surgery. Both  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T lymphocyte numbers were decreased in mouse spleen from 1–3 days after CLP, returning to control (sham-operated mice) levels within 10 days (Fig. 1d–f), suggesting that T cells found in the lungs egress from secondary lymphoid organs.

The analysis of activation marker expression revealed that the presence of CD25<sup>+</sup> T lymphocytes in the lungs and spleen of CLP mice was more expressive among  $\gamma\delta$  rather than among  $\alpha\beta$  T cell population. The percentages of  $\gamma\delta$  (and V $\gamma$ 4<sup>+</sup>) T lymphocytes expressing CD25 were increased in the lungs of CLP mice at day 3 post CLP and persisted elevated until 10 days after surgery, when the number of  $\alpha\beta$  T lymphocyte also increased (Fig. 2a–c). In spleens,  $\gamma\delta$  and V $\gamma$ 4 T lymphocytes were constantly activated during the course of experimental severe sepsis, whereas CD25<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T lymphocytes were only elevated at day 3 after CLP (Fig. 2d–f).

### $\gamma\delta$ T lymphocytes migrate from spleen into the lungs of CLP-operated recipient mice coordinated by lymphotactic chemokines

Ten days after surgery, CFSE<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  (but not  $\alpha\beta$ ) T cells adoptively transferred from naïve mice were preferentially localized in the lungs of CLP-operated mice, when compared to blood and spleen (Fig. 3a–f). In accordance, increased levels of CCL2, CCL3 and CCL5 were detected in lung homogenates of CLP-operated mice, when compared to chemokine levels detected in naïve and sham mouse lung samples (Fig. 3g). No differences were observed in CCL25 levels between CLP- and sham-operated mice (sham 681 ± 94; CLP 753 ± 175 pg/lung).  $\gamma\delta$  T lymphocytes migrated *in vitro* towards lung homogenates obtained from CLP mice at a higher extent than towards lung homogenates from naïve or sham-operated mice. The *in vitro* neutralization of CCL2, CCL3 and CCL5 by mAbs inhibited  $\gamma\delta$  T lymphocyte chemotaxis towards the respective chemokines and lung homogenates obtained from CLP mice, suggesting that these chemokines coordinate  $\gamma\delta$  T cell *in vivo* migration into the lungs during severe sepsis (Fig. 3h).

### $\gamma\delta$ T lymphocytes from the lungs of CLP-operated mice produce IL-17

Ten days after surgery, intracellular staining revealed that the percentage of IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes increased among total CD3<sup>+</sup> cell population in the lungs of CLP mice, while the percentage of IL-17<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T lymphocytes decreased after CLP, when compared to sham-operated mice (Fig. 4a). Evaluation of  $\gamma\delta$  T cell cytokine profile revealed a slight decrease in IL-10<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes in CLP mouse lungs, whereas no differences between IL-4<sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup> or tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes were detected between CLP and sham mice (Additional file 1: Figure S1A). It is noteworthy that the percentage of IL-17<sup>+</sup> (but not IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)  $\gamma\delta$  T lymphocytes increased upon *in vitro* restimulation with  $\alpha$ -CD3 mAb (Additional file 1: Figure S1B–C). Representative dot plots show that IL-17 positive staining was detected among  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> and V $\gamma$ 4<sup>+</sup>, but not among the V $\gamma$ 1<sup>+</sup> lymphocyte subtype recovered from the lungs of CLP mice (Fig. 4b). IL-17 production by  $\gamma\delta$  T cells is restricted to CD27<sup>+</sup> cells. Accordingly, our data demonstrate that the percentage of CD27<sup>+</sup> lymphocytes increased among V $\gamma$ 4<sup>+</sup>, but not among the V $\gamma$ 1<sup>+</sup> lymphocytes in the spleen 3 days after CLP (Fig. 4c–d). To evaluate the implication of V $\gamma$ 4 T lymphocytes in IL-17 production during sepsis, mice were treated with anti-V $\gamma$ 4 mAb 1 day before CLP. Figure 4e shows that anti-V $\gamma$ 4 mAb treatment decreased IL-17 production in CLP mouse lungs 7 days after surgery, in a similar extent as  $\gamma\delta$  T lymphocytes.

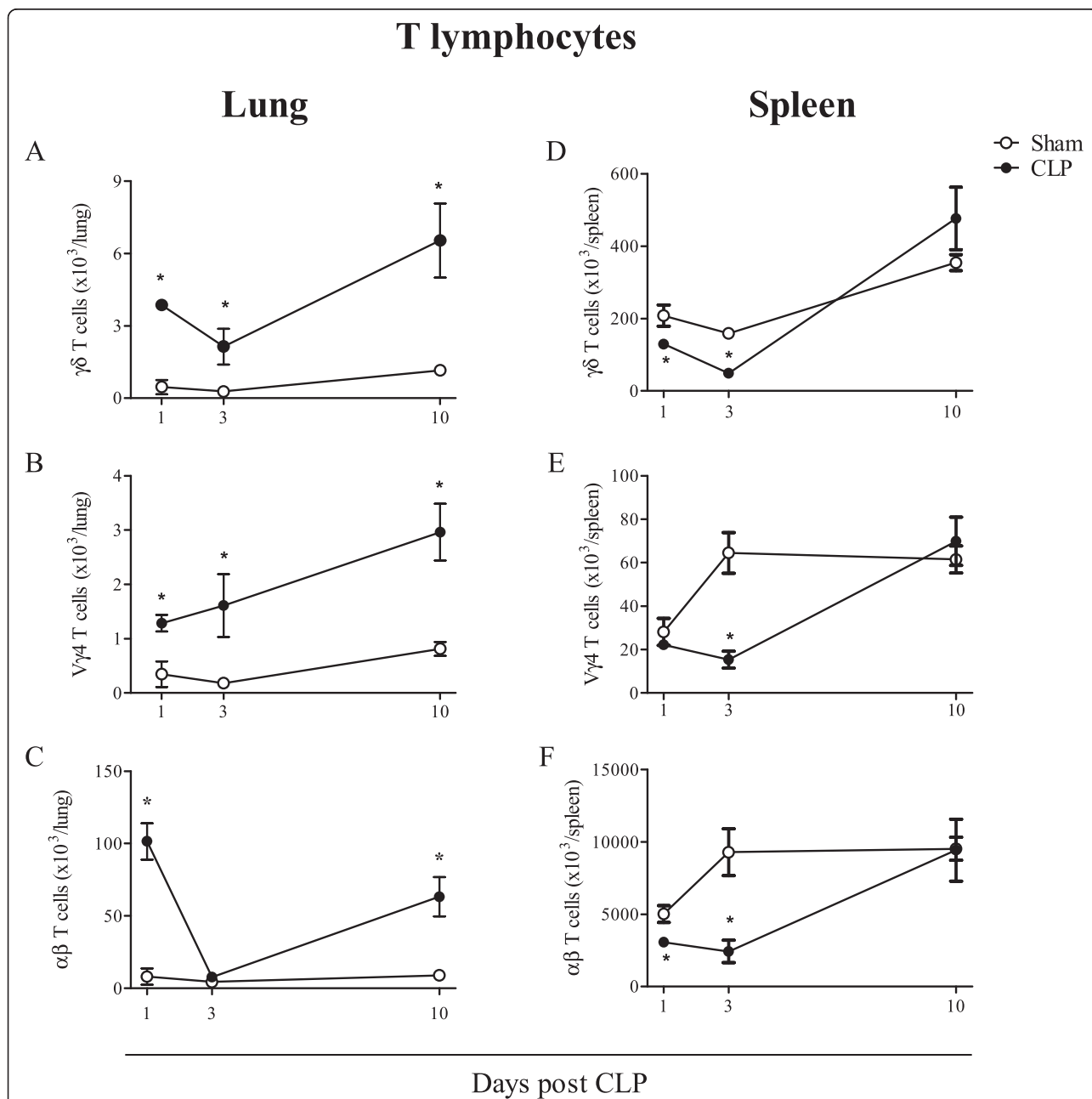
**Anti-V $\gamma$ 4 TCR mAb treatment decreases survival rate in C57BL/6 mice subjected to severe sepsis**

Approximately 50 % of C57BL/6 mice subjected to the experimental model of severe sepsis and antibiotic treatment died within 7 days (Fig. 5a). Anti-V $\gamma$ 4 mAb treated mice that underwent CLP died in shorter periods of time, achieving 30 % of survival rate within 7 days. Worthy of note, anti- $\gamma\delta$  mAb treatment similarly precipitated CLP mouse death, suggesting that V $\gamma$ 4 T cell subset presents a

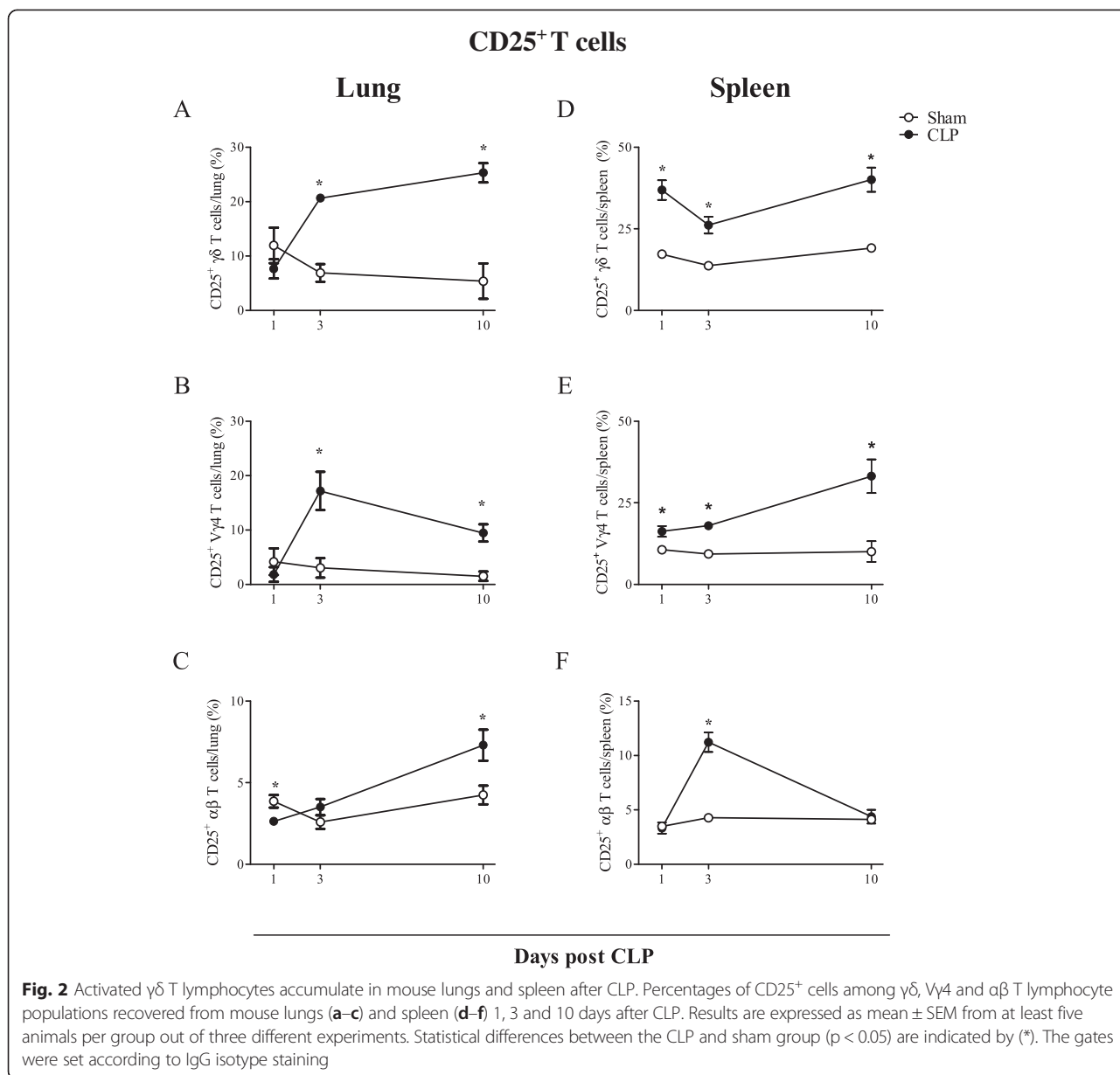
protective role in septic mice. IgG isotype-treated mice showed similar survival rate than untreated mice. Figure 5b and Additional file 2: Figure S2A–B show the effectiveness of depletion by mAb administration in spleen and lungs.

**Discussion**

Sepsis triggers a complex immune response that involves both innate and adaptive systems.  $\gamma\delta$  T lymphocytes represent a link between these two branches of the immune



**Fig. 1**  $\gamma\delta$  T lymphocytes accumulate in mouse lungs and spleen after CLP.  $\gamma\delta$ , V $\gamma$ 4 and  $\alpha\beta$  T lymphocyte numbers in C57BL/6 mouse lungs (a–c) and spleen (d–f) 1, 3 and 10 days after CLP. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least five animals per group out of three different experiments. Statistical differences between the CLP and sham group ( $p < 0.05$ ) are indicated by (\*). The gates were set according to IgG isotype staining



system, by coordinating the activation of different cell populations via cytokine production [27].  $\gamma\delta$  T lymphocytes have been described as a major source of IL-17 in peritoneum and lymphoid organs during experimental sepsis, a phenomenon shown to present either beneficial or deleterious effects, depending on the experimental model [33–35, 38]. The data presented here identifies the V $\gamma$ 4 subset as a dominant producer of IL-17 in the lungs of septic mice and as a central T cell population involved in host defense against sepsis.

The experimental model of severe sepsis used in the present work resulted in the accumulation of T lymphocytes in lung tissue, which were likely originated from lymphoid organs. Increased numbers of both  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$

T lymphocyte subsets were detected in the lungs; however it is noteworthy that, differently from  $\alpha\beta$  T lymphocytes,  $\gamma\delta$  T cell numbers continually increased up to day 10 after CLP, mainly due to the accumulation of V $\gamma$ 4 subset. The progressive accumulation of  $\gamma\delta$  T cells in the lungs of CLP-operated mice has been previously demonstrated by Hirsh and coworkers [7]; however, the presence of  $\gamma\delta$  T cell subtypes has not been described. The decrease in  $\alpha\beta$  T cell numbers observed at day 3 after CLP is in accordance with several reports in mice and humans that demonstrate a reduction in circulating CD3<sup>+</sup> T lymphocytes during sepsis [39]. This reduction is explained by a massive apoptotic event of T lymphocytes, which is correlated with severity and mortality in



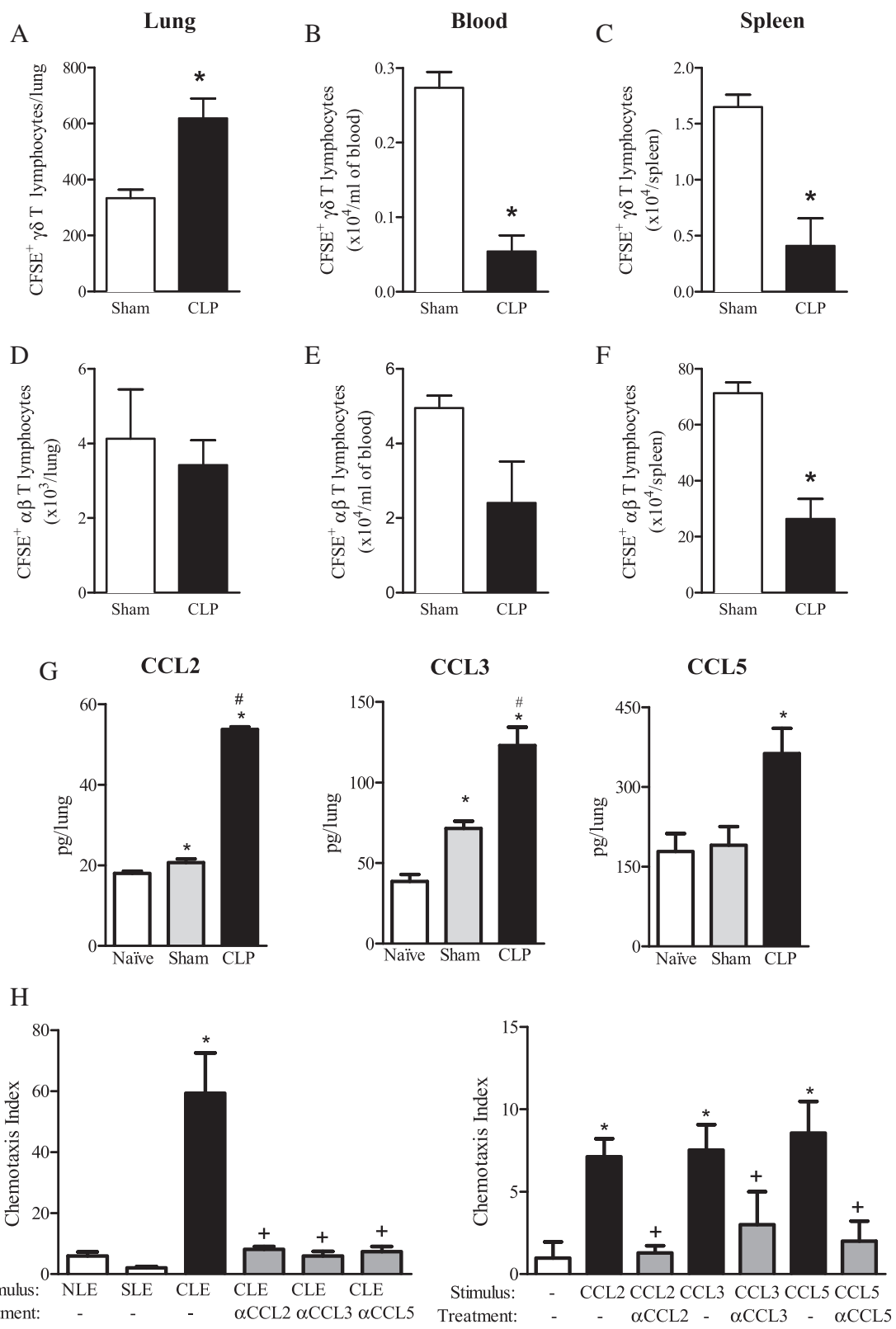


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Fig. 3**  $\gamma\delta$  T lymphocytes migrate from spleen into the lungs of CLP-operated recipient mice. T lymphocytes recovered from the spleen of naïve mice were labeled with CFSE and transferred to CLP-operated mice 3 and 8 days after surgery. Recipient animals were euthanized 10 days after surgery, and their lungs, blood and spleen were collected for  $\gamma\delta$  (a–c) and  $\alpha\beta$  (d–f) T cell analysis by flow cytometry. Quantification of CCL2, CCL3, and CCL5 levels in lung homogenates of naïve, sham and CLP C57BL/6 mice by ELISA, 7 days after surgery (g).  $\gamma\delta$  T cell chemotaxis towards lung homogenates from CLP mice (or towards CCL2, CCL3 and CCL5), incubated or not with neutralizing  $\alpha$ -CCL2,  $\alpha$ -CCL3 or  $\alpha$ -CCL5, as described in methods (h). Representative results of two experiments from at least 4 animals per experimental group are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical differences ( $p < 0.05$ ) between CLP and sham groups are indicated by (\*), and between stimulated and mAb-treated groups are indicated by (+)

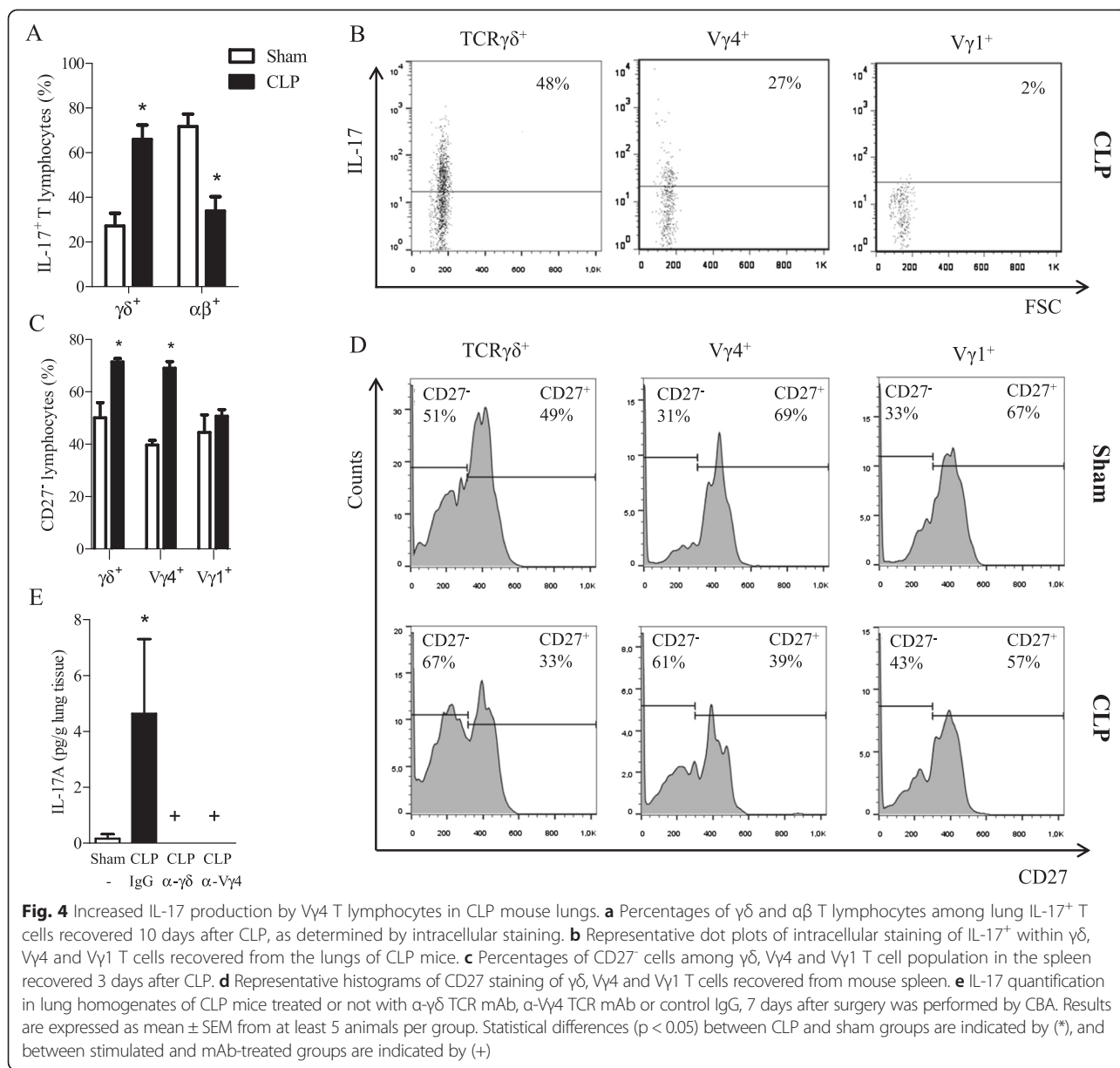
experimental animals and patients [2, 39–41]. The fact that the percentage of CD25<sup>+</sup> T lymphocytes increased among  $\gamma\delta$  T lymphocytes in the lungs at early time points after CLP (day 1) suggests that  $\gamma\delta$  (but not  $\alpha\beta$ ) T lymphocytes are constantly activated in lymphoid tissues during the course of sepsis and continuously migrate towards inflamed lungs. In accordance with our data, Matsushima and co-workers [40] demonstrated the early activation of  $\gamma\delta$  T lymphocytes from peripheral blood of patients with sepsis and systemic inflammatory response syndrome. These patients presented increased percentages of peripheral CD69<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells at acute time points after injuries, whereas CD69 expression by  $\alpha\beta$  T cells did not increase during a 2-week period [40]. It is noteworthy that, in our study, such early activation was also evident for V $\gamma$ 4 T cell population, as observed in mouse spleen and lungs 1 day after CLP.

The selective migration of  $\gamma\delta$  T lymphocyte subsets into the tissue during inflammation is dictated by elevated levels of chemoattractant mediators in the tissue and by the expression pattern of chemokine receptors on cell surface [9, 10, 15, 16, 42, 43]. Our results suggest that  $\gamma\delta$  and V $\gamma$ 4 T cell migration into the lungs of CLP mice is likely accounted by the combined *in situ* accumulation of multiple chemokines. CLP-induced lung inflammation increased tissue levels of CCL2, CCL3 and CCL5, chemokines that are known to mediate  $\gamma\delta$  T lymphocyte migration *in vivo* and *in vitro* [44–47]. Consistently, here we show that adoptively transferred  $\gamma\delta$  T cells preferentially accumulated in the lungs (rather than in blood or spleen) of recipient CLP mice. Even though CCL2, CCL3 and CCL5 are also chemoattractant for  $\alpha\beta$  T lymphocytes [48], the neutralization of these chemokines in CLP lung homogenates did not impair the chemotaxis of  $\gamma\delta$  T lymphocytes (data not shown), suggesting that these chemokines selectively dictate the migration of  $\gamma\delta$  T cells into the lungs in our model. The involvement of CCL25 in  $\gamma\delta$  T cell migration towards inflamed lungs during sepsis was also investigated by us, since CCL25 has been shown to attract IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells into inflamed airways [15]. However, CCL25 was not enhanced in CLP mouse lungs (data not shown).

Our data demonstrate that the V $\gamma$ 4 T lymphocyte subset predominated among the IL-17<sup>+</sup> cell populations in CLP mouse lungs. In line with this, it has been demonstrated

that mice lacking  $\gamma\delta$  T cells (but not  $\alpha\beta$  T cells) subjected to CLP failed to present elevated IL-17 levels in the plasma and peritoneal lavage, showing that  $\gamma\delta$  T cells are the major producers of IL-17 during experimental sepsis [33–35, 38]. It has been established that, among murine  $\gamma\delta$  T lymphocytes, IL-17 production is restricted to V $\gamma$ 4 and V $\gamma$ 6 subtypes [27, 49]. Consistently with our data, V $\gamma$ 4 T lymphocytes comprise the major subset that migrates into the lungs and have been shown to produce IL-17 in different experimental models [10, 13, 24–30]. It is noteworthy that our supplemental data (Additional file 1: Figure S1A) demonstrate that IL-17 production by  $\gamma\delta$  T cells from CLP-mouse lungs predominated over the expression of other cytokines, including IFN- $\gamma$ . These data are reinforced by the increase in the percentage of CD27<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (and V $\gamma$ 4<sup>+</sup>) population in CLP-mouse spleen and by the fact that, upon  $\alpha$ -CD3 mAb *in vitro* stimulation, these cells were enriched for IL-17 but not for IFN- $\gamma$  (Additional file 1: Figure S1B–C).

Increased numbers of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in the blood, peritoneum and lungs have been correlated with sepsis positive outcome in patients and experimental animals [8, 14, 32, 35, 50]. Indeed, mice lacking  $\gamma\delta$  T lymphocytes and subjected to CLP presented increased mortality rate and decreased survival periods [14, 32]. The protective role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes during sepsis results from the ability of these cells to produce inflammatory mediators capable to modulate other leukocyte populations, among which IL-17 is of particular importance [35, 51, 52]. Here we show that IL-17 production in the lungs of CLP mice depends on infiltrated V $\gamma$ 4  $\gamma\delta$  T cell subset, which likely contributes to host protective immune response. Since adverse roles have been proposed for IL-17 during experimental sepsis, the effect of IL-17 in the lungs of CLP mice needs further investigation. It has been described that IL-17 derived from  $\gamma\delta$  T cells promotes epithelial repair in different tissues [53–55], suggesting that IL-17 produced by V $\gamma$ 4 T cells might act on lung epithelium, promoting tissue repair and ameliorating mouse illness after CLP [33–35, 56]. IL-17 has also been associated with neutrophil influx into inflamed tissue, which can lead to either protective or harmful outcomes [35, 37, 57, 58]. Concerning lung immune response, effective bacteria clearance by neutrophils reduces the risk of lung failure [36]; however, it is well

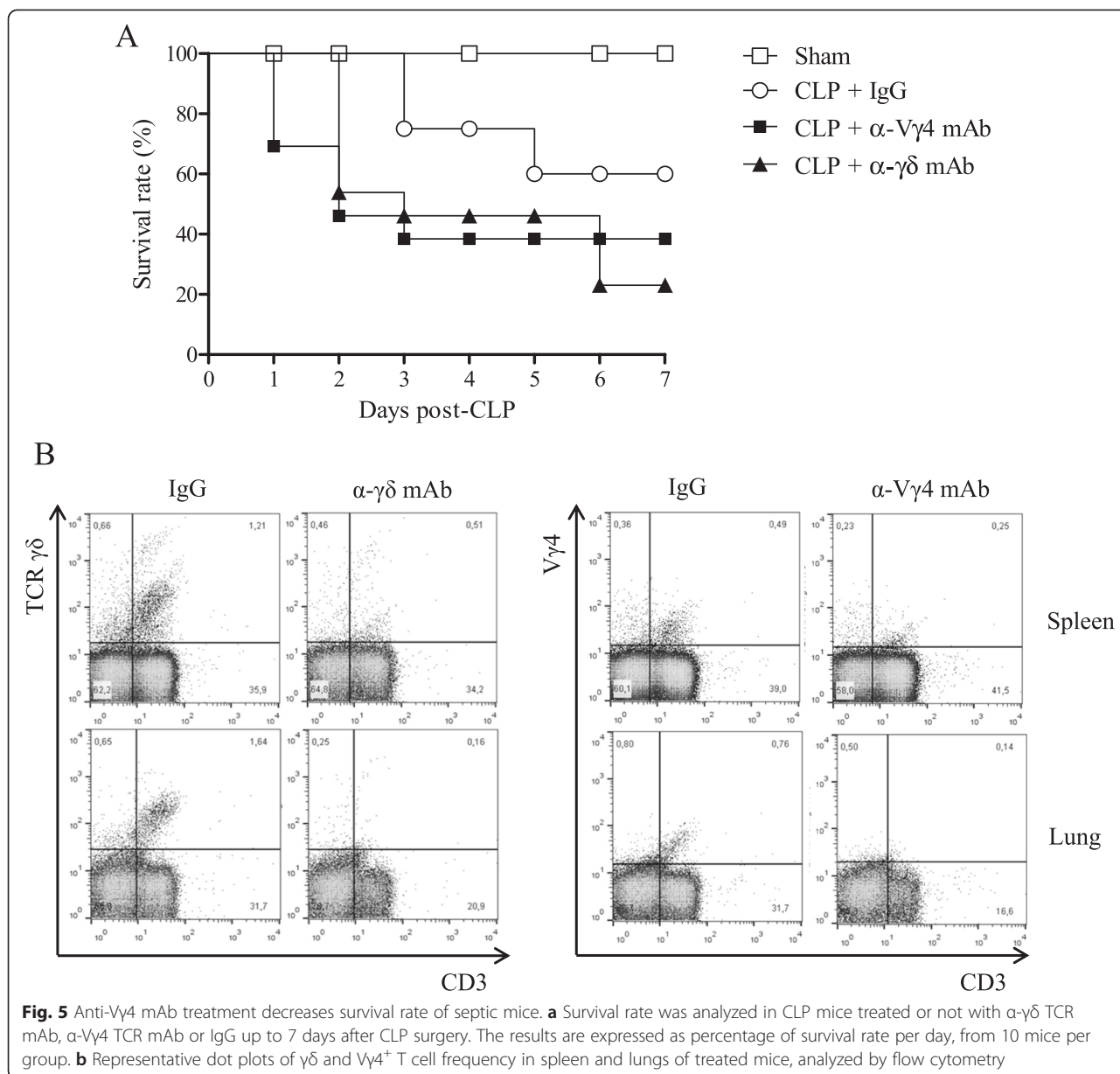


known that excessive neutrophil activation and production of myeloperoxidase (MPO) can cause tissue damage [57]. In our study, we observed increased neutrophil numbers in the lungs of CLP mice, which was significantly reduced after anti-V $\gamma$ 4 mAb treatment (data not shown), suggesting neutrophil involvement in the resolutive response. The involvement of tissue-recruited neutrophils coordinated by IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells in tissue repair has been demonstrated in different experimental models.  $\gamma\delta$  T cell knockout (KO) mice submitted to inflammatory insults are shown to present reduced neutrophil and MPO accumulation in the lungs, liver and cornea, which correlated with increased lesions and delayed epithelial regeneration [53–55]. Moreover, in a

model of corneal epithelial abrasion, it was demonstrated that  $\gamma\delta$  T cells induced, via IL-17, the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by neutrophils, promoting corneal nerve regeneration [59]. Our study evidenced that IL-17<sup>+</sup> V $\gamma$ 4 T lymphocytes migrate into injured lungs of CLP mice, presenting a beneficial role during the course of sepsis.

### Conclusions

In the present work, we show that early-activated V $\gamma$ 4 T lymphocytes continuously accumulate in inflamed lungs during the course of sepsis and that local IL-17 production depends on the tissue infiltration of this subset, which preferentially produces this cytokine.



**Fig. 5** Anti-V $\gamma$ 4 mAb treatment decreases survival rate of septic mice. **a** Survival rate was analyzed in CLP mice treated or not with  $\alpha$ - $\gamma$  $\delta$  TCR mAb,  $\alpha$ -V $\gamma$ 4 TCR mAb or IgG up to 7 days after CLP surgery. The results are expressed as percentage of survival rate per day, from 10 mice per group. **b** Representative dot plots of  $\gamma$  $\delta$  and V $\gamma$ 4<sup>+</sup> T cell frequency in spleen and lungs of treated mice, analyzed by flow cytometry

Based on our findings, we also propose that V $\gamma$ 4 T lymphocytes contribute to the protective immune response of septic mice and delay mortality. Further complementary investigation concerning cellular and molecular mechanisms of V $\gamma$ 4 T cell/IL-17 pathway associated with protection during sepsis is of extreme value to bring new insights to approach novel targets and therapies.

**Methods**

**Cecal ligation and puncture**

Polymicrobial sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) in normal fed and anesthetized (112.5 mg/kg of ketamin and 7.5 mg/kg of xylazine, i.p. Rhobifarma,

Brazil) male C57BL/6 mice (18 to 20 g) provided by Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (Rio de Janeiro, Brazil). After laparotomy (incision of 0.5–1 cm), the cecum was ligated with a cotton suture distal to the ileocecal valve to avoid bowel obstruction, and punctured nine times with a 21-gauge needle. The cecum was placed back into the abdomen and the incision was closed by a 4–0 polyamide suture. Sham-operated animals received midline laparotomies, exteriorization of the cecum with its immediate return and closure of incisions. Mice were resuscitated by a subcutaneous injection of 1 ml sterile saline solution. Mice were treated with ertapenem (Merck, Germany; 75 mg/kg, i.p.) 6, 24 and 48 h after surgery. For lung analysis, mice were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber 1,

3, 7 and 10 days after CLP operation. For the assessment of survival rate, mice were evaluated every 12 h following CLP until death. During all experimental procedures, mice were monitored daily and those that presented impaired locomotor activity and no struggle response to sequential handling were euthanized. All experimental procedures were performed according to the Committee on Ethical Use of Laboratory Animals of Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz, Brazil, #L62/12).

#### **Antibody treatment**

Hamster anti-TCR  $\gamma\delta$  (3A10, anti-pan- $\delta$ , described by Itohara *et al.* [60]) and anti-V $\gamma$ 4 (UC3-10A6, described by Dent *et al.* [61]) monoclonal antibodies (mAb) were obtained from SCID mice (Oswaldo Cruz Foundation breeding unit, Rio de Janeiro, Brazil) ascitic fluid. 3A10 preparation was further purified/concentrated by Protein G (GE Healthcare, USA) affinity chromatography while UC3 was concentrated by ammonium sulfate precipitation. Both antibody preparations were dialyzed against saline solution before use. mAbs were i.p. administered (500  $\mu$ g/mice every other day for 7 days, starting 1 day before CLP). Control mice were similarly sham-treated with normal hamster serum IgG.

#### **Recovery of leukocytes from lung and spleen**

Lung tissue samples were obtained from euthanized C57BL/6 mice at 1, 3, 7 and 10 days after CLP, macerated in RPMI 1640 medium containing collagenase type IV (250 IU/ml, 37 °C, 30 min) and centrifuged (400 g, 10 min). Spleens were dissected, macerated in PBS containing EDTA (10 mM, pH 7.4), and centrifuged (420 g for 10 min at 20 °C). Cell pellets from lung and spleen were re-suspended in 3 ml of PBS/EDTA and subjected to centrifugation on a Histopaque 1083 gradient (400 g for 30 min) for mononuclear cell separation.

#### **Flow cytometric analysis**

Leukocytes were stained with the appropriate concentration of the following antibodies: PE/FITC CD3 (145-2C11), PE/FITC TCR  $\delta$  chain (GL3), PE TCR  $\beta$  chain (H57-597), FITC V $\gamma$ 4 TCR (UC3-10A6), FITC V $\delta$ 4 TCR (GL2), FITC CD25 (7D4), PE/FITC IgG1 and IgG2 isotypes (BD Pharmingen, USA) and APC V $\gamma$ 1 TCR (2.11) (Biolegend, USA). For intracellular cytokine staining, cells were pre-incubated for 4 h with PMA (20 ng/ml), ionomycin (500 ng/ml) and brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. After surface marker staining, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12 and anti-IL-17 antibodies (BD Pharmingen, USA). IgG isotypes were used as irrelevant antibodies. Cells were acquired by FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and analyzed either by Cell Quest or FlowJo softwares. Counts are reported as percentage and as numbers of cells after the

multiplication of the percentage of T lymphocyte population by the total number of leukocytes. Gating strategies are shown in additional files (Additional file 3: Figure S3 and Additional file 4: Figure S4).

#### **Adoptive transfer assay**

Naïve C57BL/6 splenocytes were labeled with CFSE (Invitrogen USA, 1  $\mu$ M/8 $\times$ 10<sup>6</sup> cells) and i.v. injected (4  $\times$  10<sup>7</sup> cells,  $\geq$  90 % viability) into recipient mice 3 and 8 days after CLP or sham operations. Recipient mice were euthanized 10 days after adoptive transfer and their lungs were recovered for leukocyte analysis.

#### **Preparation of lung homogenates**

Lung homogenates were prepared by homogenizing perfused whole lung tissue using a glass potter homogenizer (Kontes Glass Company, USA) in 2 ml of PBS containing cell lysis buffer (Sigma Aldrich, USA) and protease inhibitor (1  $\mu$ l/ml; Sigma Aldrich, USA), at 4 °C. The homogenates were centrifuged (8400 g for 30 min, 4 °C) and the supernatants were filtered (0.2  $\mu$ m). For chemotaxis assays, lungs were homogenized using PBS only.

#### **Cytokine quantification**

Levels of chemokines were evaluated in lung homogenates from lungs recovered 7 days after CLP surgery by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by using matched antibody pairs from R&D (Minneapolis, MN), according to manufacturer's instructions. IL-17 quantification was performed using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences, USA), and samples were analyzed using a FACScalibur flow cytometer.

#### **Transwell migration assay**

Spleen T lymphocytes (3  $\times$  10<sup>6</sup> in HBSS without Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) were placed in the upper chamber of 5.0  $\mu$ m pore diameter transwell tissue culture inserts (BD Falcon, USA). Transwell inserts were placed in the individual wells of a 24-well cell culture plate containing assay buffer or lung homogenates from naïve, sham-operated and CLP-operated mice, neutralized (30 min, 37 °C) with anti-CCL2 mAb (2.5 ng/well), anti-CCL3 mAb (200 ng/well) or anti-CCL5 mAb (50 ng/well). The recombinant chemokines rmCCL2 (2.5 ng/well), rmCCL3 (4 ng/well) and rmCCL5 (4 ng/well) (R&D Systems, USA) were used as positive controls. After 2 h, the migrated cells were counted, labeled as described above, and analyzed by FACScalibur. Results are expressed as chemotactic index, generated by using the number of cells that migrated towards buffer as comparison.



### Statistical analysis

Data are reported as the mean  $\pm$  SEM and were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls-Student test or Student's t test. Values of  $p \leq 0.05$  were regarded as significant.

### Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Cytokine production by  $\gamma\delta$  T lymphocytes from the lungs of CLP-operated mice. (A) Percentage of IL-4<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes obtained from the lungs of C57BL/6 mice 10 days after CLP or sham surgery. Cells were cultured with brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, 4 h), submitted to intracellular staining and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from at least 4 animals per experimental group. (B) Percentage of IL-17<sup>+</sup> and (C) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes within the population of splenic  $\gamma\delta$  T lymphocytes recovered 10 days after CLP, stimulated *ex-vivo* with  $\alpha$ -CD3 mAb (5  $\mu$ g/ml, 4 h), submitted to intracellular staining and analyzed by flow cytometry. Statistical differences between the CLP or  $\alpha$ -CD3-stimulated groups and the negative control groups ( $p < 0.05$ ) are indicated by (\*). Gates were established after the staining with their IgG isotypes.

**Additional file 2: Figure S2.**  $\gamma\delta$  T cell depletion induced by  $\alpha$ - $\gamma\delta$  mAb (3A10) administration. To certify the effectiveness of  $\alpha$ - $\gamma\delta$  mAb treatment,  $\gamma\delta$  TCR staining was performed in permeabilized cells recovered from C57BL/6 mouse spleens after  $\alpha$ - $\gamma\delta$  TCR mAb (3A10) or hamster serum IgG administration. (A) Representative dot plots of intracellular  $\gamma\delta$  TCR staining with UC7 (Southern Biotech, USA) and GL3 (Caltag, UK) mAbs in  $\alpha\beta$ /B220<sup>+</sup> cell population. (B) Representative histograms of intracellular  $\gamma\delta$  TCR staining (GL3 mAb) of  $\alpha\beta$ /B220<sup>+</sup> cells recovered from  $\alpha$ - $\gamma\delta$  TCR mAb (3A10) or hamster serum IgG-treated mouse, placed in culture for 48 h.

**Additional file 3: Figure S3.** Gating strategies used for FACS analysis of  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T lymphocytes. A lymphocyte gate (R1) was defined based on the cells' Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC), further gated on TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (R2) or  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> (R3) lymphocytes.

**Additional file 4: Figure S4.** Gating strategies used for FACS analysis of  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T lymphocytes within IL-17<sup>+</sup> cells. IL-17<sup>+</sup> lymphocyte gate (R6) was defined and further gated on TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> and  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> lymphocytes.

### Abbreviations

APC: Allophycocyanin; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; CBA: Cytometric Bead Array; CCL: CC chemokine ligand; CD: Cluster of differentiation; CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester; CLP: Cecal ligation and puncture; CO<sub>2</sub>: Carbon dioxide; EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FACS: Fluorescence activated cell sorter; FITC: Fluorescein isothiocyanate; g: Gravity; IFN: Interferon; IgG: Immunoglobulin; IL: Interleukin; i.p: Intraperitoneal; i.v: Intravenously; KO: Knockout; mAb: Monoclonal antibody; min: Minute; ml: Milliliter; MPO: Myeloperoxidase; PBS: Phosphate buffered saline; PE: Phycoerythrin; PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate; RM: recombinant murine; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; SEM: Standard error of the mean; TCR: T cell receptor; TNF: Tumor necrosis factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contribution

MFSC, CBTN and VUB performed the experiments and analyzed the data; RHV, JM, and MGH contributed with reagents and analysis tools; MFSC, VUB, RHV, JM, CFB and CP conceived and designed the experiments; RHV and CFB critically reviewed the manuscript; MFSC and CP wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Authors information

Claudia Farias Benjamin, Carmen Penido are considered last authors.

### Acknowledgments

This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); *Jovem Cientista do Nosso Estado* to C.P. and *Apoio às Instituições de Ensino e Pesquisa Sediadas no Estado do Rio de Janeiro 09/2011* to C.F.B. and C.P., M.F.S.C, V.U.B. and C.B.T.N. were supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) as students of the Graduate Program in Cellular and Molecular Biology from Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. The authors are grateful to Mariana Souza and Fernanda Schnoor for critical reading of the manuscript and to Thadeu Costa and Luana Correa for technical assistance.

### Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia Aplicada, Departamento de Farmacologia, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, Mangunhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21041-250, Brazil. <sup>2</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT-IDN), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup>Laboratório de Imunologia, Faculdade de Medicina de Petrópolis, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>6</sup>Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>7</sup>Mount Sinai School of Medicine, New York City, USA.

Received: 18 November 2014 Accepted: 19 May 2015

Published online: 03 June 2015

### References

- Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1334–49.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138–50.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(5):L355–63.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4–11.
- London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MC, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med*. 2010;2(23):23ra19.
- Benjamin CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2605–17.
- Hirsh M, Dyugovskaya L, Kaplan V, Krausz MM. Response of lung gammadelta T cells to experimental sepsis in mice. *Immunology*. 2004;112(1):153–60.
- Hirsh MI, Hashiguchi N, Chen Y, Yip L, Junger WG. Surface expression of HSP72 by LPS-stimulated neutrophils facilitates gammadelta T cell-mediated killing. *Eur J Immunol*. 2006;36(3):712–21.
- Vantourou P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):88–100.
- Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):336–45.
- Nakasono C, Yamamoto N, Nakamatsu M, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, et al. Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection. *Microbes Infect*. 2007;9(3):251–8.
- Kirby AC, Newton DJ, Carding SR, Kaye PM. Evidence for the involvement of lung-specific gammadelta T cell subsets in local responses to Streptococcus pneumoniae infection. *Eur J Immunol*. 2007;37(12):3404–13.
- Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, et al. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*. 2010;184(8):4414–22.
- Chung CS, Watkins L, Funches A, Lomas-Neira J, Cioffi WG, Ayala A. Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):R1338–43.
- Costa MF, Bornstein VU, Candea AL, Henriques-Pons A, Henriques MG, Penido C. CCL25 induces alpha(4)beta(7) integrin-dependent migration of

- IL-17(+) gammadelta T lymphocytes during an allergic reaction. *Eur J Immunol.* 2012;42(5):1250–60.
16. Lanca T, Costa MF, Goncalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, et al. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds. *J Immunol.* 2013;190(12):6673–80.
  17. Poggi A, Carosio R, Fenoglio D, Brenci S, Murdaca G, Setti M, et al. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood.* 2004;103(6):2205–13.
  18. Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA. Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol.* 2005;174(10):6045–53.
  19. Welsh KJ, Risin SA, Actor JK, Hunter RL. Immunopathology of postprimary tuberculosis: increased T-regulatory cells and DEC-205-positive foamy macrophages in cavitory lesions. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:307631.
  20. Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol.* 2013;14(11):1137–45.
  21. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:413–41.
  22. Silva-Santos B. Gammadelta cells making IL-17. *Blood.* 2011;118(1):3–5.
  23. Ribot JC, de Barros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol.* 2009;10(4):427–36.
  24. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al.  $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40(5):785–800.
  25. Haas JD, González FH, Schmitz S, Chennupati V, Föhse L, Kremmer E, et al. CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells. *Eur J Immunol.* 2009;39(12):3488–97.
  26. Kong X, Sun R, Chen Y, Wei H, Tian Z.  $\gamma\delta$ T cells drive myeloid-derived suppressor cell-mediated CD8+ T cell exhaustion in hepatitis B virus-induced immunotolerance. *J Immunol.* 2014;193(4):1645–53.
  27. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):467–78.
  28. Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK, O'Brien RL. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol.* 2007;179(8):5576–83.
  29. Murdoch JR, Lloyd CM. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing  $\{\text{gamma}\}\{\text{delta}\}$ T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(4):464–76.
  30. Ma S, Cheng Q, Cai Y, Gong H, Wu Y, Yu X, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74(7):1969–82.
  31. Enoch VT, Lin SH, Lin CY, Toliver-Kinsky T, Murphey ED, Varma TK, et al. Mice depleted of alphabeta but not gammadelta T cells are resistant to mortality caused by cecal ligation and puncture. *Shock.* 2007;27(5):507–19.
  32. Tschopp J, Martignoni A, Goetzman HS, Choi LG, Wang Q, Noel JG, et al. Gammadelta T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008;83(3):581–8.
  33. Flierl MA, Rittirsch D, Gao H, Hoesel LM, Nadeau BA, Day DE, et al. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *Faseb j.* 2008;22(7):2198–205.
  34. Xu R, Wang R, Han G, Wang J, Chen G, Wang L, et al. Complement C5a regulates IL-17 by affecting the crosstalk between DC and gammadelta T cells in CLP-induced sepsis. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1079–88.
  35. Kasten KR, Prakash PS, Unsinger J, Goetzman HS, England LG, Cave CM, et al. Interleukin-7 (IL-7) treatment accelerates neutrophil recruitment through gamma delta T-cell IL-17 production in a murine model of sepsis. *Infect Immun.* 2010;78(11):4714–22.
  36. Rice L, Orlow D, Ceonzo K, Stahl GL, Tzianabos AO, Wada H, et al. CpG oligodeoxynucleotide protection in polymicrobial sepsis is dependent on interleukin-17. *J Infect Dis.* 2005;191(8):1368–76.
  37. Alves-Filho JC, Sonogo F, Souto FO, Freitas A, Verri Jr WA, Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 2010;16(6):708–12.
  38. Han G, Geng S, Li Y, Chen G, Wang R, Li X, et al. Gammadelta-T cell function in sepsis is modulated by C5a receptor signalling. *Immunology.* 2011;133(3):340–9.
  39. Condotta SA, Cabrera-Perez J, Badovinac VP, Griffith TS. T-cell-mediated immunity and the role of TRAIL in sepsis-induced immunosuppression. *Crit Rev Immunol.* 2013;33(1):23–40.
  40. Matsushima A, Ogura H, Fujita K, Koh T, Tanaka H, Sumi Y, et al. Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *Shock.* 2004;22(1):11–5.
  41. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med.* 2005;33(12):2836–40.
  42. Hammerich L, Bangen JM, Govaere O, Zimmermann HW, Gassler N, Huss S, et al. Chemokine receptor CCR6-dependent accumulation of gammadelta T cells in injured liver restricts hepatic inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 2014;59(2):630–42.
  43. Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma delta T cells. *J Immunol.* 2002;168(10):4920–9.
  44. Penido C, Costa MF, Souza MC, Costa KA, Candea AL, Benjamim CF, et al. Involvement of CC chemokines in gammadelta T lymphocyte trafficking during allergic inflammation: the role of CCL2/CCR2 pathway. *Int Immunol.* 2008;20(1):129–39.
  45. Penido C, Vieira-de-Abreu A, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *J Immunol.* 2003;171(12):6788–94.
  46. Roth SJ, Diacovo TG, Brenner MB, Rosat JP, Buccola J, Morita CT, et al. Transendothelial chemotaxis of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to chemokines. *Eur J Immunol.* 1998;28(1):104–13.
  47. Brandes M, Willmann K, Lang AB, Nam KH, Jin C, Brenner MB, et al. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood.* 2003;102(10):3693–701.
  48. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol.* 2008;9(9):970–80.
  49. Rei M, Goncalves-Sousa N, Lanca T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27(-)  $\gamma\delta$ (+)  $\gamma\delta$  T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34):E3562–70.
  50. Andreu-Ballester JC, Tormo-Calandin C, Garcia-Ballesteros C, Perez-Griera J, Amigo V, Almela-Quilis A, et al. Association of gammadelta T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(5):738–46.
  51. Li J, Zhang Y, Lou J, Zhu J, He M, Deng X, et al. Neutralisation of peritoneal IL-17A markedly improves the prognosis of severe septic mice by decreasing neutrophil infiltration and proinflammatory cytokines. *PLoS One.* 2012;7(10):e46506.
  52. Inoue S, Niihara M, Takeo S, Mineo S, Kawakami Y, Uchida A, et al. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing  $\gamma\delta$  T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(30):12129–34.
  53. Braun RK, Ferrick C, Neubauer P, Sjoding M, Sterner-Kock A, Kock M, et al. IL-17 producing gammadelta T cells are required for a controlled inflammatory response after bleomycin-induced lung injury. *Inflammation.* 2008;31(3):167–79.
  54. Li Z, Burns AR, Miller SB, Smith CW. CCL20,  $\gamma\delta$  T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing. *FASEB J.* 2011;25(8):2659–68.
  55. Rao R, Graffeo CS, Gulati R, Jamal M, Narayan S, Zambirinis CP, et al. Interleukin 17-producing  $\gamma\delta$ T cells promote hepatic regeneration in mice. *Gastroenterology.* 2014;147(2):473–84. e472.
  56. Cauvi DM, Williams MR, Bermudez JA, Armijo G, De Maio A. Elevated expression of IL-23/IL-17 pathway-related mediators correlates with exacerbation of pulmonary inflammation during polymicrobial sepsis. *Shock.* 2014;42(3):246–55.
  57. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(7):379–88.
  58. Huppler AR, Conti HR, Hernández-Santos N, Darville T, Biswas PS, Gaffen SL. Role of neutrophils in IL-17-dependent immunity to mucosal candidiasis. *J Immunol.* 2014;192(4):1745–52.
  59. Li Z, Burns AR, Han L, Rumbaut RE, Smith CW. IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration. *Am J Pathol.* 2011;178(3):1106–16.

60. Itohara S, Nakanishi N, Kanagawa O, Kubo R, Tonegawa S. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor gamma delta: analysis of gamma delta T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(13):5094–8.
61. Dent AL, Matis LA, Hooshmand F, Widacki SM, Bluestone JA, Hedrick SM. Self-reactive gamma delta T cells are eliminated in the thymus. *Nature*. 1990;343(6260):714–9.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

