

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Taís Monteiro Magne

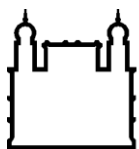
ENVOLVIMENTO DE PGE₂ E HSP90 SOBRE A ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Profa. Dra. Carmen Penido

RIO DE JANEIRO

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Taís Monteiro Magne

**ENVOLVIMENTO DE PGE₂ E HSP90 SOBRE A ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$**

ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Carmen Penido

Aprovada em: 27 / 02 / 2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinicius Cotta Almeida – **Presidente (Fiocruz)**

Profa. Dra. Tatiana Martins Tilli (Fiocruz)

Prof. Dr. Edward Helal Neto (Instituto de Engenharia Nuclear – IEN)

Prof. Dr. Fausto Klabund Ferraris – **Revisor (Fiocruz)**

Profa. Dra. Adriana Lima Vallochi (Fiocruz)

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2019

Monteiro Magne, Taís.

ENVOLVIMENTO DE PGE2 E HSP90 SOBRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ / Taís Monteiro Magne. - Rio de Janeiro, 2019.
xi, 72f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Carmen Penido.

Bibliografia: f. 60-72

1. Linfócitos T gama delta. 2. Melanoma. 3. PGE2. 4. HSP90. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Farmacologia Aplicada do Instituto de Tecnologia e Fármacos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, chefiado pela Dra. Maria das Garças M. O. Henriques e na vigilância de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus e à minha mãe que caminham ao meu lado me protegendo, guiando e abençoando.

À minha orientadora, Dra. Carmen Penido, pelos ensinamentos e oportunidades. Obrigada por aceitar a minha orientação, confiar no meu trabalho e me estender as mãos com tanto carinho. Graças a você alcancei mais uma etapa importante da minha vida.

À Dra. Maria das Graças Henriques por aceitar a realização deste trabalho no seu laboratório colaborando grandemente com à minha formação.

A meu pai, Martin Magne, que independente dos esforços está sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e dando forças para continuar. Pai, você é a minha base, a minha motivação e o meu orgulho. Essa é mais uma conquista nossa.

Ao meu irmão Gil e à minha avó Marisete, que acompanham de perto toda a minha trajetória e suportam pacientemente os meus momentos de estresse. Obrigada por me apoiarem e motivarem tanto. Parte desta vitória eu dedico a vocês.

A toda a minha família, a de sangue, e também a que a vida me deu de presente, que, mesmo de longe, nunca me deixam esquecer o quanto se orgulham de mim. Obrigada por todas as mensagens de apoio e por todo o suporte emocional.

Ao Edward, que me possibilitou iniciar essa trajetória, me guiou e permaneceu ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada por todo o cuidado, carinho e, principalmente, por não ter me deixado desistir.

A todas as minhas amigas por celebrarem comigo cada vitória e acreditarem na minha capacidade de ir cada vez mais longe. Obrigada por mesmo distantes serem tão presentes na minha vida. Obrigada pela parceria, pelos momentos únicos, pelas risadas e por nunca me

deixarem esquecer que sou capaz e me motivarem a não desistir. Obrigada por me ensinarem o real valor da amizade, do companheirismo, da união e do amor. Vocês são a minha força diária.

À Taíze pela ajuda mais que essencial na elaboração deste trabalho, pela amizade, por todo o incentivo, conselhos e por alegrar e acalmar os momentos mais difíceis dessa jornada. Tize, muito obrigada, sem você não teria chegado tão longe.

Ao Thadeu por todo a ajuda, paciência e apoio. Não tenho palavras para agradecer todo o seu suporte, não só acadêmico, mas também emocional. Muito obrigada, sua ajuda foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

As Dra. Elaine Rosas e Dra. Mariana Conceição de Souza, aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada, André Candéia, Bruna Teixeira, Erika Cunha, Fátima Vergara, Leonardo Seito, Luana Barbosa, Tatiana Pádua, Thadeu Costa e à equipe de apoio Márcia, Ubirajara, Suellen e Alan por todo o apoio, suporte, paciência e companhia. Obrigada por me receberem no laboratório de forma tão carinhosa, por estarem sempre dispostos a me ajudar e pelos momentos de descontração.

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

Lista de Siglas e Abreviaturas

- 17-AAG: 17-demetoxi-17-alilamino geldanamicina
- ADCC: Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)
- AKT: Proteína quinase B (*Protein Kinase B*)
- ATP: Adenosina trifosfato
- CCR: Receptor de quimiocinas CC (*CC chemokine receptor*)
- CD: Cluster de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CDK: Quinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)
- COX: Ciclooxygenase
- CTL: Linfócitos T citotóxico (*Cytotoxic T-lymphocytes*)
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- HIF: Fator induzido por hipóxia (*Hypoxia-inducible factors*)
- HSP: Proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
- hTERT: Transcriptase reversa da telomerase humana (*Human telomerase reverse transcriptase*)
- IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
- IFN: Interferon
- IL: Interleucina
- IPP: Isopentenil pirofosfato
- LAMP-1: Proteína associada à membrana lisossomal 1 (*lysosomal-associated membrane*)
- LT: Leucotrieno
- MET: Transição epitélio-mesenquimal (*Mesenchymal-to-epithelial transition*)
- mg: Miligrama
- MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)
- MIC-A: Gene A relacionado à cadeia MHC de classe I (*MHC class I chain-related gene A*)
- MIC-B: Gene B relacionado à cadeia MHC de classe I (*MHC class I chain-related gene B*)
- mL: Mililitro
- MMP: Metaloproteinase de matriz (*Matrix metalloproteinases*)
- NK: Matadora Natural (*Natural killer*)
- NKG2D: Membro D2 do grupo *natural killer* (*natural killer group 2, member D*)
- PBS: Tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*)
- PG: Prostaglandina
- RPMI: Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: Soro fetal bovino

TCR: Receptor de células T (*T cell receptor*)

Th: *T helper*

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor- α*)

TX: Tromboxano

UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

ULBP: Proteína ligadora de UL-16 (*UL-16 binding protein*)

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

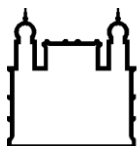
μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

Índice

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. Introdução	10
1.1. Linfócitos T $\gamma\delta$	10
1.1.1. Subtipos e distribuição de linfócitos T $\gamma\delta$	11
1.2. Papel antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$	14
1.3. Prostaglandina E ₂	18
1.3.1. Prostaglandina E ₂ e Melanoma.....	20
1.4. Uso de inibidores de HSP90 em terapias antitumorais	21
1.5. Utilização de linfócitos T $\gamma\delta$ em imunoterapias antitumoral.....	22
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos específicos:	25
3. Metodologia	26
3.1. Expansão de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos.....	26
3.2. Cultura de células de melanoma humano MV3 e obtenção do sobrenadante	26
3.3. Tratamento de células de melanoma humano MV3 e obtenção do sobrenadante	27
3.4. Viabilidade de células de melanoma humano MV3.....	27
3.5. Estímulo e tratamento de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos	27
3.6. Viabilidade celular de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos	28
3.7. Marcação para citometria de fluxo.....	28
3.8. Estratégia de gate	29
3.9. Ensaio imunoenzimático (EIA).....	29
3.10. Ensaio de quimiotaxia.....	30
3.11. Dosagem de Granzima B	30
3.12. Ensaio de killing de células tumorais.....	30
3.13. Análise Estatística	31
3.14. Consideração sobre Aspectos Éticos.....	31
4. Resultados	32
4.1. Efeitos da PGE₂ sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos	32
4.1.1. Pureza da população de linfócitos T $\gamma\delta$ após expansão	32
4.1.2. PGE ₂ não induz a morte de linfócitos T $\gamma\delta$	33
4.1.3. Linfócitos T $\gamma\delta$ expressam o receptor de prostaglandina E ₂ EP4	34
4.1.4. PGE ₂ diminui o killing de células de melanoma por linfócitos T $\gamma\delta$	35
4.1.5. PGE ₂ modula negativamente a produção de INF- γ por linfócitos T $\gamma\delta$	36
4.1.6. Efeito da PGE ₂ sobre a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$	36
4.1.7. Efeito da PGE ₂ sobre a migração de linfócitos T $\gamma\delta$	38

4.2. Efeitos do sobrenadante de células de melanoma humano MV3 sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$	38
4.2.1. Células MV3 produzem PGE ₂	38
4.2.2. Sobrenadante de células MV3 não induz a morte de linfócitos T $\gamma\delta$	40
4.2.3. Efeito do sobrenadante de células MV3 na expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$	41
4.2.4. Sobrenadante de MV3 diminui o killing de células de melanoma por linfócitos T $\gamma\delta$	42
4.2.3. Sobrenadante de células MV3 modula negativamente a produção de IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$	43
4.2.4. Efeitos do sobrenadante de células MV3 sobre a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$	43
4.2.5. Efeito do sobrenadante de células MV3 sobre a migração de linfócitos T $\gamma\delta$	45
4.3. Envolvimento da chaperona HSP90 sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$	46
4.3.1. O inibidor de HSP90 17-AAG não afeta a viabilidade de células MV3	46
4.3.2. O tratamento de células MV3 com 17-AAG diminui a liberação de PGE ₂	47
4.3.3. Efeito da 17-AAG sobre a expressão de proteínas por células MV3	48
4.3.4. Sobrenadante de células MV3 tratadas com 17-AAG não induz a morte de linfócitos T $\gamma\delta$	49
4.3.5. Efeito do sobrenadante de células MV3 pré-tratadas com 17-AAG na expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$	50
4.3.6. Efeitos do sobrenadante de células MV3 pré-tratadas com 17-AAG sobre a atividade citotóxica e migratória de linfócitos T $\gamma\delta$	51
5. Discussão	54
6. Conclusão	59
7. Referências	60



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

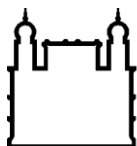
ENVOLVIMENTO DE PGE₂ E HSP90 SOBRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Taís Monteiro Magne

Linfócitos T $\gamma\delta$ são linfócitos não convencionais que apresentam importante atividade citotóxica contra células tumorais, através do reconhecimento direto de metabólitos fosforilados produzidos por estas células, tal como o isopentenil pirofosfato (IPP). No entanto, o microambiente tumoral é composto por diversos fatores imunossupressores, tais como citocinas e mediadores lipídicos, que garantem o desenvolvimento do tumor, via modulação negativa da resposta imune. Dentre estes, o mediador lipídico prostaglandina E₂ (PGE₂) favorece o crescimento tumoral modulando negativamente a resposta de linfócitos T citotóxicos, incluindo os linfócitos T $\gamma\delta$. Considerando i) a produção de PGE₂ por células tumorais, ii) o efeito modulador da PGE₂ sobre linfócitos T, iii) o baixo número de trabalhos sobre os efeitos da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ e iv) o potencial terapêutico de linfócitos T $\gamma\delta$ no tratamento de tumores em ensaios clínicos de transferência autóloga, o objetivo deste projeto foi estudar os efeitos deste mediador lipídico sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ durante a resposta imune antitumoral em modelos *in vitro*. Para tal, avaliamos a produção de PGE₂ por células tumorais de melanoma humano (MV3) e os efeitos diretos deste mediador sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$. Nossos resultados demonstram que o sobrenadante de células MV3 contém PGE₂ e que a incubação dos linfócitos T $\gamma\delta$ tanto com PGE₂ exógena quanto com este sobrenadante modula negativamente a atividade citotóxica dos linfócitos T $\gamma\delta$, reduzindo a sua capacidade de matar células tumorais, a expressão do marcador de degranulação CD107a e a produção intracelular de IFN- γ . Ainda, observamos que a inibição da atividade da chaperona HSP90 de células MV3 (através do tratamento com o inibidor 17-AAG) reduz a produção de PGE₂ por estas células. O sobrenadante de células MV3 tratadas com 17-AAG (contendo níveis reduzidos de PGE₂) tem um efeito imunomodulador reduzido, quando comparado ao sobrenadante de células MV3 não tratadas. Acreditamos que a elucidação dos efeitos da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ seja de extrema relevância para o conhecimento a respeito da resposta imune antitumoral e da imunoterapia contra o câncer.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ENVOLVIMENTO DE PGE₂ E HSP90 SOBRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Taís Monteiro Magne

$\gamma\delta$ T cells are unique lymphocytes that exhibit significant cytotoxic activity against tumor cells through the direct recognition of phosphorylated metabolites, such as isopentenyl pyrophosphate (IPP). However, tumor microenvironment is composed of several immunosuppressive factors that favour tumor development through the negative modulation of the immune response. Among these factors, the lipid mediator prostaglandin E₂ (PGE₂) promotes tumor growth by decreasing T cytotoxicity lymphocytes, including $\gamma\delta$ T cell. Considering: i) the production of PGE₂ by tumor cells, ii) the modulating effect of PGE₂ on lymphocytes, (iii) the low number of studies on the effects of PGE₂ on the cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells and iv) the therapeutic potential of $\gamma\delta$ T lymphocytes in adoptive cell transfer therapy; the aim of the present study was to investigate the effects of PGE₂ on $\gamma\delta$ T lymphocyte cytotoxic activity, during the antitumor immune response in *in vitro* models. For this purpose, we evaluated the production of PGE₂ by human melanoma tumor cells (MV3) and the direct effects of this mediator on the activation of $\gamma\delta$ T cells. Our results demonstrate that MV3 cell supernatant contains PGE₂ and that the incubation of $\gamma\delta$ T cells with both exogenous PGE₂ or with MV3 supernatant negatively modulates the cytotoxic activity of the $\gamma\delta$ T cells. MV3 cell supernatant also reduced the expression of the degranulation marker CD107a and the intracellular production of IFN- γ . Furthermore, the inhibition of HSP90 chaperone activity of MV3 cells (by using the HSP90 inhibitor 17-AAG) reduces the production of PGE₂ by these cells. The supernatant of 17-AAG treated MV3 cells (containing reduced levels of PGE₂) showed a reduced immunomodulatory effect when compared to the supernatant of untreated MV3 cells. The elucidation of the effects of PGE₂ on the cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells is extremely relevant for a better comprehension of the immune response and immunotherapy against cancer.

1. Introdução

1.1.Linfócitos T $\gamma\delta$

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são um subtipo de linfócitos T que desempenham papel importante no elo entre o sistema imune inato e adaptativo (Holtmeier & Kabelitz, 2005). Desde o ano de 1984, quando Saito e colaboradores estudaram a genética dos receptores de células T (TCR) e descobriram a existência de subunidades distintas formadoras deste receptor, os linfócitos T passaram a ser classificados de acordo com as subunidades do TCR expressas em sua superfície celular. Linfócitos T $\gamma\delta$ são caracterizados por expressarem TCRs constituídos por uma cadeia γ (gama) e outra δ (delta) formados por recombinação somática durante o seu desenvolvimento (Saito *et al.*, 1984a; Saito *et al.*, 1984b).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ representa de 1 a 5% dos linfócitos T nos órgãos linfoides secundários e no sangue periférico, sendo encontrados com maior frequência em tecidos epiteliais e mucosas (Raulet, 1989; Haas *et al.*, 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 & Havran, 1991). Ainda, os linfócitos T $\gamma\delta$ têm a capacidade única de reconhecer antígenos de forma independente da apresentação via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Chien *et al.*, 1996; Born & O'Brien, 2009), desempenhando uma resposta rápida a infecções virais, bacterianas e células tumorais (Ohga *et al.*, 1990; Ferrick *et al.*, 1995).

O TCR $\gamma\delta$ apresenta especificidade limitada aos complexos MHC-peptídeo e reconhece antígenos de diversas naturezas, tais como peptídeos, aminas, pirofosfatos e fosfolípidios (Chien & Königshofer, 2007). O reconhecimento antigênico pode ocorrer classicamente via TCR-MHC-peptídeo ou independente de apresentação através do reconhecimento de moléculas da família do MHC I. Após serem ativados, os linfócitos T $\gamma\delta$ exercem diversas funções efetoras como: promoção da lise de células infectadas ou transformadas, produção de citocinas e quimiocinas que regulam a migração de outras células imunes, secreção de grânulos citotóxicos e produção de fatores de crescimento que regulam a função de células estromais (Tonegawa *et al.*, 1989; Battistini *et al.*, 1997; Dalton *et al.*, 2003; Dodd *et al.*, 2009; Sourav *et al.*, 2014) (**figura 1.1**). Ainda, os linfócitos T $\gamma\delta$ podem cooperar com células B na produção de anticorpos (Bansal *et al.*, 2012), apresentar antígenos aos outros subtipos de linfócitos T (Moser & Eberl, 2007) e induzir a maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs) (Fang *et al.*, 2010).

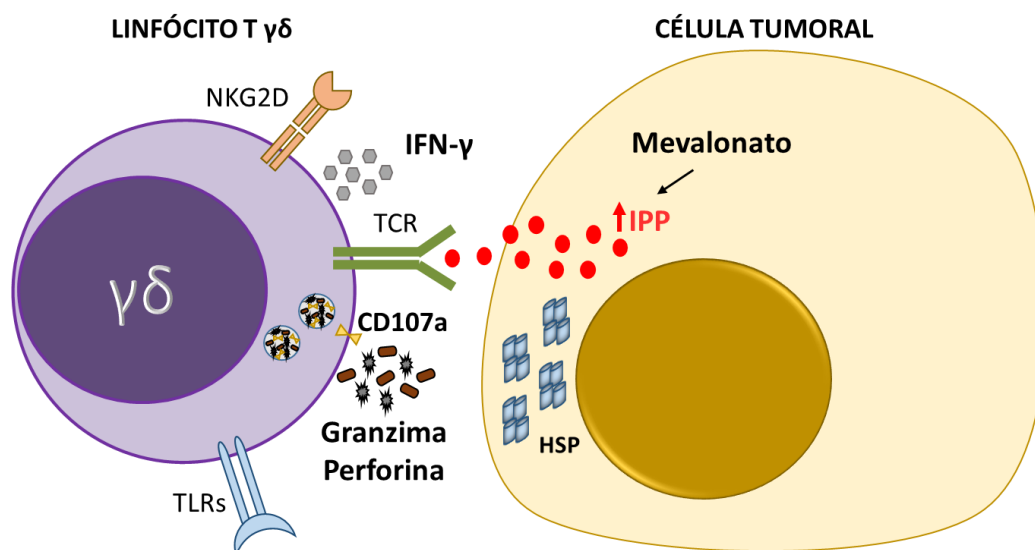


Figura 1.1: Mecanismos de reconhecimento de célula tumoral por linfócitos T $\gamma\delta$. Células tumorais sintetizam, através da via do mevalonato, isopentenil pirofosfato (IPP) que, uma vez liberados, são reconhecidos por linfócitos T $\gamma\delta$ via receptor de célula T (TCR). Tal reconhecimento leva a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ e consequente lise da célula tumoral alvo devido à liberação grânulos citotóxicos (granzima e perforina) e à produção de citocinas, tais como o interferon (IFN)- γ . **TLR** (Receptores do Tipo Toll); **TCR** (Receptores de Células T); **HSP** (Proteínas de Coque Térmico). Adaptado de Dimpu Gogoi & Shubhada V. Chiplunkar (2013).

1.1.1. Subtipos e distribuição de linfócitos T $\gamma\delta$

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são originados a partir de células progenitoras provindas da medula óssea. Durante a recombinação gênica para a formação do TCR, as cadeias γ e δ podem parrear de diferentes formas originando subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ com funções efetoras distintas (Petrie *et al.*, 1992; Dudley *et al.*, 1995). Acredita-se que o pareamento destas cadeias não ocorre de forma aleatória e que os subtipos de linfócitos T apresentam ligações preferenciais de cadeias γ com cadeias δ específicas (Garman *et al.*, 1986). Foi então proposto que estas variações determinassem a classificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ de acordo com os genes utilizados durante a formação das cadeias γ e δ . As nomenclaturas são então baseadas na região variável da cadeia γ ou δ no rearranjo V(D)J, mas variam de acordo com o autor e a espécie animal (Grigoriadou *et al.*, 2002; Chien & Konigshofer, 2007). Para humanos, existem quatro nomenclaturas propostas: a de Porcelli (Porcelli *et al.*, 1991), LeFranc (LeFranc, 2001), WHO-IUIS (*World Health Organization - International Union of Immunological Society*) e HUGO (*Human Genome Organization*, em <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/375>). Nesta dissertação, utilizamos a nomenclatura determinada por Porcelli e colaboradores (**tabela 1.1**).

Segmentos V γ expressos em humanos

Designação proposta por Porcelli <i>et. al</i>	Designação proposta por LeFranc <i>et. al</i>	Designação de WHO-IUIS	Nomenclatura HUGO ^a
V γ 2	V γ 1.2	GV1S2	TRGV2
V γ 3	V γ 1.3	GV1S3	TRGV3
V γ 4	V γ 1.4	GV1S4	TRGV4
V γ 5	V γ 1.5	GV1S5	TRGV5
V γ 8	V γ 1.8	GV1S8	TRGV8
V γ 9	V γ 2	GV2S1	TRGV9

Tabela 1.1: WHO-IUIS: *World Health Organization – International Union of Immunological Society*; HUGO: Human Genome Organization. Adaptado de: Kabelitz & Wesch 2003.

Atualmente, os três subtipos de linfócitos T $\gamma\delta$ mais estudados são: i) Linfócitos T que expressam o gene V δ 2 emparelhado com a cadeia V γ 9 (linfócitos T V γ 9V δ 2), representam a maioria dos linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes e presentes em órgãos linfoides secundários; ii) Linfócitos T $\gamma\delta$ que expressam o gene V δ 1 emparelhado com diferentes elementos V γ , são o subgrupo de linfócitos T $\gamma\delta$ predominante nos epitélios (pele e mucosa); e iii) Linfócitos T $\gamma\delta$ que expressam o gene V δ 3 presentes, em maior porcentagem, no fígado (Hayday, 2000; Mangan *et al.*, 2003). Os linfócitos T V γ 9V δ 2 são o subtipo estudado neste trabalho e apresentam fenótipos distintos de diferenciação funcional. De acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD45RA e CD27, podem ser classificados em quatro subconjuntos: células “naive” (ingênuas), de memória central, de memória efetora e efetora de diferenciação terminal (Dieli *et al.*, 2003). Linfócitos T $\gamma\delta$ “naives” (CD45RA⁺ CD27⁺) e centrais (CD45RA⁻ CD27⁺) circulam no sangue e órgãos linfoides secundários, mas não estão presentes em tecidos periféricos e não apresentam função efetora. Já os linfócitos T $\gamma\delta$ de memória efetora (CD45RA⁻ CD27⁻) e de diferenciação terminal (CD45RA⁺ CD27⁻) circulam entre o sangue e tecidos periféricos, e expressam receptores de quimiocinas que lhes permitem migrar para tecidos inflamados e exercerem funções efetoras (Dieli *et al.*, 2003).

A localização anatômica de linfócitos T $\gamma\delta$ provê um mecanismo de defesa funcional e estratégico. Estas células estão localizadas em tecidos expostos constantemente a sinais de perigo como epiderme, derme, intestino e pulmão, respondendo prontamente a antígenos e atuando, em conjunto com outras células imunes, na resolução dos processos inflamatórios

(Ohga *et al.*, 1990; Ferrick *et al.*, 1995; Lança *et al.*, 2013). O reconhecimento de antígeno por linfócitos T $\gamma\delta$ ainda é um campo de intensa pesquisa. Atualmente, sabe-se que linfócitos T V δ 2 reconhecem intermediários fosforilados não peptídicos das vias não-mevalonato e mevalonato da biossíntese de isoprenóides, denominados fosfoantígenos, dentre eles o isopentenil pirofosfato (IPP), independentemente de processamento, apresentação e reconhecimento do MHC (Tanaka *et al.*, 1995; Eberl *et al.*, 2003).

Os fosfoantígenos são sintetizados em condições fisiológicas por células de mamíferos através da via do mevalonato em baixas concentrações e, após infecções ou transformação tumoral, há um aumento da produção destes fosfoantígenos. Concentrações mais elevadas de fosfoantígenos levam a ativação dos linfócitos T V γ 9V δ 2 (Eberl *et al.*, 2003; Gober *et al.*, 2006). De maneira geral, linfócitos T $\gamma\delta$ “naive” e de memória central respondem prontamente à estimulação de fosfoantígenos, enquanto os linfócitos T $\gamma\delta$ de memória efetora e diferenciação terminal respondem a citocinas homeostáticas como, a interleucina (IL)-15 e podem adquirir funções efetoras altamente diversas na presença de citocinas polarizantes (Caccamo *et al.*, 2005; Sireci *et al.*, 2013).

Linfócitos T $\gamma\delta$ ativados produzem diferentes citocinas, sendo consideradas as principais células produtoras de interferon- γ (IFN- γ) e IL-17 em diferentes modelos (Shibata *et al.*, 2014; Lockhart *et al.*, 2006; Flierl *et al.*, 2008; Serre & Silva-Santos, 2013). Recentemente, tem sido proposto que os linfócitos T $\gamma\delta$ sejam classificados de acordo com suas funções efetoras (produção de IFN- γ ou de IL-17), ao invés da classificação atual baseada nas cadeias V γ formadoras do TCR (Prinz *et al.*, 2013; Serre & Silva-Santos, 2013). A identificação destes subtipos efetores pode ser realizada através da análise de expressão de marcadores de superfície expressos por estas células. A expressão do receptor co-estimulatório CD27 determina a população de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ em células de animais “naive” e ativadas (Ribot *et al.*, 2009), enquanto que a expressão do receptor de quimiocinas CCR6, expresso exclusivamente por linfócitos T $\gamma\delta$ CD27⁻, identifica os linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 (Haas *et al.*, 2009; Ribot *et al.*, 2009) (**figura 1.2**). No entanto, diferentes sinais extracelulares presentes no microambiente inflamado podem induzir à plasticidade funcional destas células (Sireci *et al.*, 1997; Wesch *et al.*, 2001; Ness-Schwickerath *et al.*, 2010; Caccam *et al.*, 211).

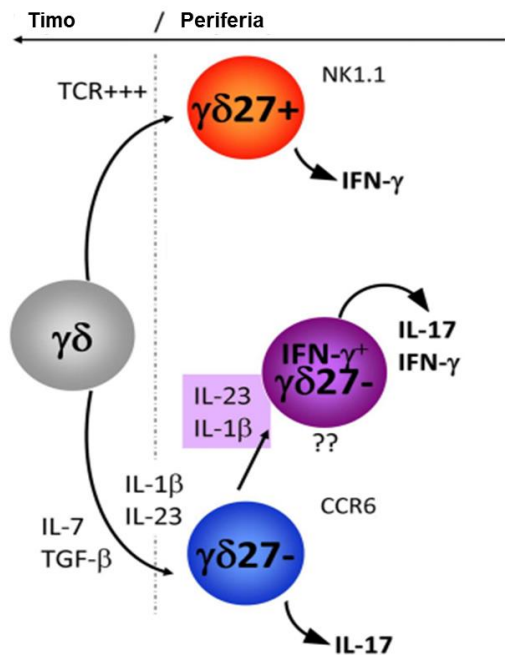


Figura 1.2: Linfócitos T $\gamma\delta$ $\text{IFN-}\gamma^+$ e IL-17^+ . Diferentes sinais extracelulares regulam a produção de $\text{IFN-}\gamma$ e de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$ no timo e na periferia. O padrão da expressão de marcadores associados a linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de $\text{IFN-}\gamma$ (CD27, NK1.1) e de IL-17 (CCR6) está apresentado na figura. **CCR** (receptor de quimiocinas CC); **IFN- γ** (interferon- γ); **IL** (interleucina); **NK** (*Natural Killer*); **TCR** (receptor de célula T); **TGF- β** (fator de crescimento tumoral- β). Adaptado de Serre & Silva Santos (2013).

Por serem classicamente conhecidos como importantes produtores de $\text{IFN-}\gamma$, os linfócitos T $\gamma\delta$ apresentam funções imunomoduladoras e antitumorais relevantes (Ikeda, *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2010). O $\text{IFN-}\gamma$ inibe diretamente o crescimento tumoral induzindo a apoptose e/ou inibindo a proliferação de células tumorais (Bromberg *et al.*, 1996) e inibindo a angiogênese (Sgadari *et al.*, 1996). Ainda, de forma indireta, o $\text{IFN-}\gamma$ pode prejudicar a progressão do tumor induzindo a atividade antitumoral de outras populações celulares como macrófagos (Schreiber, *et al.*, 1986) e células *Natural killer* (NK) (Paolini *et al.*, 2015). Em adição a secreção de $\text{IFN-}\gamma$, ao reconhecerem antígenos associados ao tumor os linfócitos T $\gamma\delta$ secretam também grânulos citotóxicos contendo enzimas citolíticas (granzima e perforina) que apresentam potente atividade antitumoral (Chien. *et al.*, 2014).

1.2. Papel antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$

O câncer é hoje uma das principais causas de morte do mundo (OMS/OPAS). Muitos pacientes apresentam a doença em estágio avançado no momento do diagnóstico, limitando o potencial para o sucesso do tratamento. De acordo com o banco de dados da GLOBOCAN, um projeto da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), foi estimado para o ano

de 2018 cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes em todo o mundo. Para ambos os sexos, o câncer de pulmão seria o câncer mais comumente diagnosticado (11,6% do total de casos) e a principal causa de morte por câncer (18,4% do total de óbitos por câncer). Uma análise publicada por “*CA: A Cancer Journal for Clinicians*” destacou a grande influência da diversidade geográfica na ocorrência de câncer e as variações no perfil e magnitude da doença dentro e entre as regiões do mundo. Esta notável diversidade das doenças neoplásicas foi estruturada pela primeira vez no ano 2000 pelos pesquisadores Hanahan e Weinberg que propuseram um princípio organizador para racionalizar a complexidade da doença neoplásica, conhecido como “As Marcas do Câncer” (*The Hallmarks of Cancer*) (Hanahan & Weinberg, 2000).

“As Marcas do Câncer” compreendem a capacidades biológicas adquiridas pelos tumores durante o desenvolvimento tumoral. Dentre estas está a capacidade do tumor de evadir do sistema imune dificultando a sua erradicação (**figura 1.3**), considerando que a vigilância imunológica monitora constantemente células e tecidos reconhecendo e eliminando a grande maioria das células incipientes do câncer e, conseqüentemente, dos tumores nascentes. Os tumores sólidos que se estabelecem conseguem evitar a detecção do sistema imune ou limitar a extensão da morte imunológica por diferentes mecanismos (por exemplo, através da secreção de fatores imunossupressores que inibem a atividade de linfócitos T citotóxico (CTLs) e células NK infiltrantes) (Yang et al., 2010; Shields et al., 2010).



Figura 1.3: “*Hallmarks of Cancer*”. Capacidades biológicas adquiridas pelos tumores que garantem o surgimento, o estabelecimento e a progressão tumoral. Adaptado de Hanahan & Weinberg (2011).

É bem conhecido que um grande número de células do sistema imune inato e adaptativo participam da vigilância imunológica e do controle de doenças neoplásicas espontâneas. Apesar de a composição e a extensão dos infiltrados imunológicos variarem consistentemente entre os indivíduos, estudos demonstraram que linfócitos T $\gamma\delta$ são recrutados em vários tipos de tumores, sendo um componente importante do infiltrado celular (Todaro *et al.*, 2013; Tosolini *et al.*, 2017).

Uma análise recente de aproximadamente 18.000 transcriptomas de 39 tumores de câncer de colorretal em humanos identificou os linfócitos T $\gamma\delta$ infiltrantes como a assinatura de prognóstico global mais significativa para um desfecho favorável aos pacientes com câncer (Meraviglia *et al.*, 2017). De fato, um grande número de estudos demonstrou que linfócitos T $\gamma\delta$ levam à morte de uma ampla gama de células tumorais *in vitro* (Altincicek *et al.*, 2001; Verjans *et al.*, 2004) e exibem atividade antitumoral em modelos experimentais *in vivo* (Wang *et al.*, 2001). Diante disto, os linfócitos T $\gamma\delta$ têm sido alvo de estudo no desenvolvimento de tratamentos celulares antitumorais, demonstrando resultados promissores em respostas imunoterapêuticas.

A potente atividade antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$ é resultado de características exclusivas que estas células possuem. No microambiente tumoral os linfócitos T $\gamma\delta$ atuam por mecanismos diversos que, em conjunto, prejudicam fortemente o processo tumorigênico. Dentre estes mecanismos, destacam-se: i) regulação das funções biológicas de outros tipos celulares (por exemplo, ativação de linfócitos T $\alpha\beta$ através de apresentação cruzada de antígenos associados ao tumor, processados e apresentados por linfócitos T $\gamma\delta$), ii) atividade citotóxica mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e antitumorais, como o INF- γ e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , e iii) a atividade citotóxica direta contra células tumorais, através da secreção de proteínas citotóxicas, tais como granzima e perforina (Bukowski *et al.*, 1994; Dieli *et al.*, 2003; Martinet L *et al.*, 2009; Martinet L *et al.*, 2010).

Com relação ao mecanismo citotóxico direto dessas células, há a secreção de perforina que é uma proteína efetora formadora de poros armazenada em grânulos citotóxicos, em conjunto com o marcador de degranulação CD107 (LAMP-1) e moléculas de granzima, no interior de linfócitos T. As granzimas são proteases de serina que induzem a apoptose de células-alvo transformadas, defeituosas ou infectadas em cooperação com as moléculas de perforina. Acredita-se que, após o reconhecimento do antígeno na superfície da célula-alvo, através da interação do TCR com o complexo antígeno/MHC, as moléculas armazenadas em suas formas ativas são liberadas por exocitose para exercerem suas funções (Hersperger, 2008;

Brennan *et al.*, 2014). É possível avaliar a degranulação celular através da expressão do marcador CD107a na superfície membranar.

Primeiramente, o marcador de degranulação CD107a passa a ser expresso na superfície de linfócitos, seguido pela expressão de perforinas e granzimas que se agrupam na superfície da membrana plasmática formando um complexo multimérico associado à serglicina. Este complexo forma um canal que possibilita a transferência das enzimas proteolíticas de granzima para o citosol da célula-alvo. Uma vez no citosol, as granzimas atuam na cascata apoptótica ativando caspases, principalmente a caspase 3, que desencadeiam mecanismos proteolíticos indutores de apoptose (Hersperger, 2008; Brennan *et al.*, 2014) (**figura 1.4**). No entanto, em alguns tumores as funções de linfócitos T $\gamma\delta$ são frequentemente desviadas ou prejudicadas por sinais imunossupressores originários deste microambiente. As interações complexas entre células tumorais, microambiente tumoral e células imunes infiltrantes de tumores resultam em um equilíbrio entre os efeitos promotores e controladores (Lo Presti *et al.*, 2017; Lo Presti *et al.*, 2018).

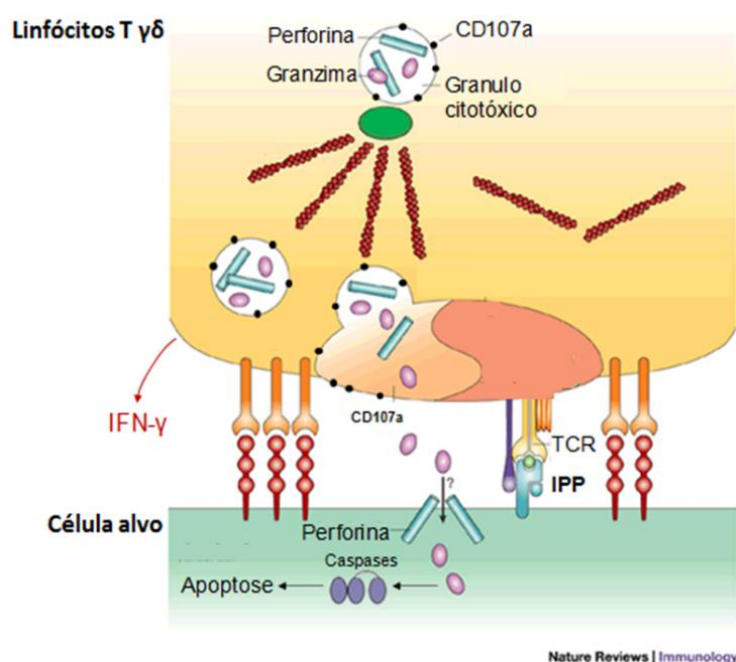


Figura 1.4: Liberação de grânulos citotóxicos através de sinapses imunológicas. Linfócitos T $\gamma\delta$ são ativados após o reconhecimento de metabólitos fosforilados (tal como o IPP) liberados pela célula tumoral. Em seguida, o marcador de degranulação CD107a é expresso na superfície celular e os grânulos citotóxicos migram de seus locais dispersos no citosol em direção à sinapse imunológica formada. O movimento dos grânulos é orquestrado pelo centro organizador dos microtúbulos. A sinapse forma um selo firme que direciona as moléculas citolíticas para a célula-alvo induzindo sua morte por apoptose. Linfócitos T gama delta ativados secretam também a citotóxica antitumoral IFN-gama que contribui para morte da célula tumoral. **CD** (cluster de diferenciação); **IPP** (isopentenil pirofosfato) **IFN- γ** (interferon- γ); **TCR** (receptor de célula T) Adaptado de Liebeman, 2003.

Tumores são um tecido complexo, constituídos por células tumorais, células endoteliais e estromais que interagem criando um ambiente inflamatório responsável pela expansão, disseminação e evasão tumoral. Este ambiente possibilita que os tumores escapem do sistema imune do hospedeiro e garanta sua progressão (Kenny *et al.*, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011). O escape do tumor da resposta imune do hospedeiro é promovido por sua capacidade de subverter ativamente a imunidade antitumoral ao interferir no desenvolvimento, diferenciação, migração e função celular, afetando a resposta imune local. Dentre os fatores imunossupressores presentes no microambiente tumoral está o mediador lipídico prostaglandina E₂ (PGE₂), que possui importantes efeitos imunossupressores sobre a atividade citotóxica de linfócitos T durante a progressão tumoral. Dados da literatura demonstram que a PGE₂ é produzida no microambiente tumoral e contribui para a imunossupressão local, favorecendo a progressão tumoral, através, por exemplo, da inibição da proliferação, da produção de citocinas e da ativação de mecanismos efetores por linfócitos T (Martinet L *et al.*, 2009; Martinet L *et al.*, 2010; Mohammadi *et al.*, 2016).

1.3. Prostaglandina E₂

A PGE₂ é um mediador lipídico importante para a manutenção da homeostase e da inflamação. De maneira geral, os mediadores lipídicos são produzidos por uma via biosintética conservada, controlada por enzimas específicas que exercem sua ação sequencial sobre precursores lipídicos liberados da membrana plasmática. Uma das famílias mais importantes de mediadores lipídicos é a família dos prostanóides, composta por prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs). A molécula precursora dos prostanóides é o ácido araquidônico, gerado a partir de fosfolipídios da membrana plasmática por ação da fosfolipase A₂, e posteriormente processado pelas enzimas ciclooxigenases (COX)-1 e -2 (Tilley *et al.*, 2001; Sreeramkumar *et al.*, 2012). A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e é responsável pela produção de PGs de "manutenção", que controlam os processos fisiológicos normais. A COX-2, por sua vez, tem sua expressão induzida e pode ser ativada por uma variedade de estímulos pró-inflamatórios, especialmente durante infecção e inflamação (Harris *et al.*, 2002; Smyth *et al.*, 2009). A ativação de COX-1 e COX-2 resulta na geração de prostaglandina G₂ (PGG₂), posteriormente reduzida no intermediário prostaglandina H₂ (PGH₂) e convertida, por isomerases e oxidoredutases específicas, em tromboxano A₂ (TXA₂) e em diferentes tipos de PGs, dentre elas a PGE₂ (Samuelsson *et al.*, 1978) (**figura 1.5**).

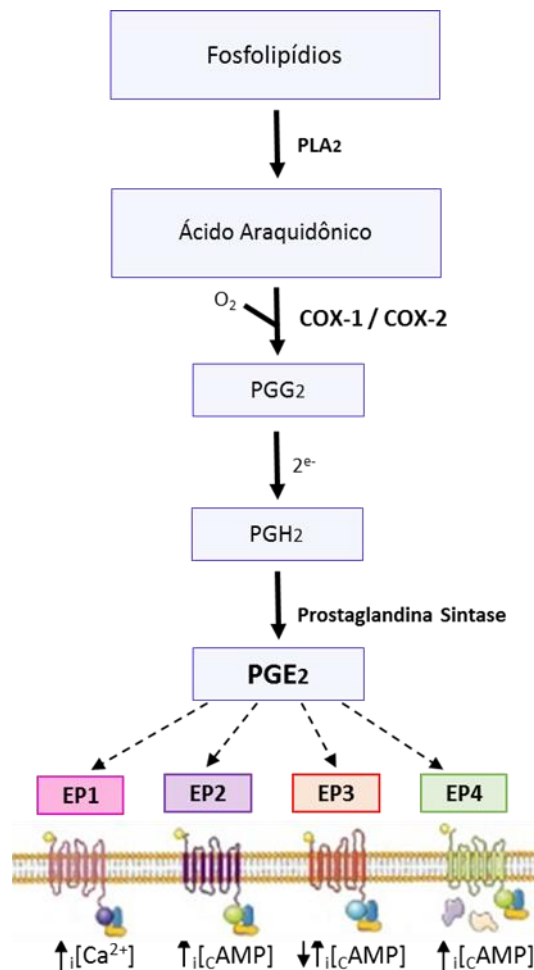


Figura 1.5: Biossíntese de prostaglandina E₂ (PGE₂). COX-1 ou -2 converte o ácido araquidônico, liberado dos fosfolipídios da membrana plasmática por ação da fosfolipase A₂, em PGG₂. PGG₂ é posteriormente convertida em PGH₂ e, por ação de sintases específicas, em PGE₂. A PGE₂ é reconhecida pelos receptores EP1-4 expressos na membrana celular. AMP (adenosina monofosfato); COX (ciclooxigenase); PG (prostaglandina); PLA (fosfolipase A).

Os produtos das enzimas COXs exercem seus efeitos através de receptores acoplados à proteína G, capazes de induzir diferentes vias de sinalização intracelulares. Existem quatro isoformas descritas de receptores da PGE₂ (EP1, EP2, EP3 e EP4), que são expressos por células do sistema imune, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas (Narumiya & Fitzgerald, 2001). O perfil de expressão destes receptores e sua distribuição tecidual é um dos componentes determinantes do efeito biológico exercido por este mediado lipídico. Linfócitos T $\gamma\delta$ expressam as isoformas EP2, EP3 e EP4, no entanto, os efeitos inibitórios gerados pela PGE₂ sobre a citotoxicidade destas células ocorrem principalmente devido à ativação dos receptores dependentes de adenilato ciclase EP2 e EP4 (Martinet *et al.*, 2009; Martinet L *et al.*, 2010).

A PGE₂ é a prostaglandina mais abundante em vários tipos de malignidades humanas e, frequentemente, está associada a prognóstico desfavorável (Pockaj *et al.*, 2004). Este mediador lipídico apresenta um papel pró-tumoral proeminente, estimulando a angiogênese, invasão celular e metástase e inibindo a apoptose de células tumorais (Iniguez *et al.*, 2003; Greenhough *et al.*, 2009). Ainda, a PGE₂ apresenta um papel de destaque na evasão tumoral suprimindo a resposta imune local através da inibição da resposta de diferentes populações celulares, tais como macrófagos, células NK, linfócitos T $\alpha\beta$ e linfócitos T $\gamma\delta$ (Walker & Rotondo, 2004; Martinet *et al.*, 2010; Rodriguez-Vita & Lawrence, 2010).

Efeitos inibitórios da PGE₂ sobre a ativação de linfócitos T foram documentados no início de 1970 (Smith *et al.*, 1971a; Smith *et al.*, 1971b) e, a partir dos anos 80, foi amplamente reconhecido que a PGE₂ exercia um forte papel imunossupressor sobre a ativação e proliferação de linfócitos T (Fischer *et al.*, 1981; Murray & Kollmorgen, 1983). Após esse período, muitos estudos foram iniciados na tentativa de descrever os mecanismos envolvidos neste processo. Trabalhos de pouco mais de 30 anos demonstram que a concentração de PGE₂, assim como o estado de diferenciação da célula alvo e do comprimento de interação PGE₂-célula alvo, são fatores chaves envolvidos no controle dos efeitos imunomodulatórios da PGE₂ sobre a ativação de linfócitos T (Goodwin & Ceuppens, 1983). Foi documentado que, através de diferentes mecanismos, a PGE₂ medeia a indução da atividade supressora de linfócitos T (Fischer *et al.*, 1981) e inibe drasticamente a proliferação destas células (Rojo *et al.*, 1982; Kaufmann *et al.*, 1982). No entanto, a maioria dos estudos realizados para avaliar os efeitos da PGE₂ sobre a modulação da atividade de linfócitos T analisa, majoritariamente, a subpopulação de linfócitos T $\alpha\beta$, e pouco se sabendo sobre os efeitos deste mediador lipídico sobre os linfócitos T $\gamma\delta$. Os poucos relatos na literatura demonstram que a PGE₂ modula negativamente a atividade lítica, expressão do marcador de degranulação CD107a, produção de IFN- γ e TNF- α por células de mastocitoma (Martinet *et al.*, 2010), linfoma (Martinet *et al.*, 2009) e células de adenocarcinoma de ovário (Lavoué *et al.*, 2011). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar quais mecanismos estão envolvidos nestes processos e o impacto desta modulação sobre outras linhagens celulares.

1.3.1. Prostaglandina E₂ e Melanoma

O câncer de melanoma é um tipo de câncer de pele que apresenta altas taxas de mortalidade devido à sua forte agressividade (Siegel *et al.*, 2014). O melanoma é mais frequente em adultos brancos e se desenvolve a partir de mutações gênicas em melanócitos (células produtoras de melanina) na pele ou mucosas em forma de manchas, pintas ou sinais. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos

registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão e é o tipo mais grave, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase (INCA). O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado em sua fase inicial. Nos últimos anos, houve grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor e à introdução dos novos medicamentos imunoterápicos. Apesar do desenvolvimento de imunoterapias ter tido um impacto significativo na letalidade do melanoma (Shtivelman *et al.*, 2014), o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento se faz necessário devido ao fato que este tumor possui mecanismos moleculares e biológicos únicos que favorecem a sua resistência.

A progressão do melanoma está fortemente associada à inflamação crônica, pois as células do melanoma secretam altos níveis de citocinas e prostaglandinas pró-inflamatórias (Hensler & Mueller, 2013; Richmond *et al.*, 2009; Singh & Katiyar, 2011). Estudos demonstram que o nível de expressão de COX-2 em tumores de melanoma está correlacionado com a progressão da doença (Johansson *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2012). Por esse motivo, há interesse substancial nas vias COX-2/PGE₂ como alvos terapêuticos para o melanoma. Dada a importância da sinalização da PGE₂ sobre a modulação das atividades efetoras de linfócitos T e o papel importante que estas células desempenham durante os processos inflamatórios, a utilização em conjunto dessas duas ferramentas tornou-se o foco no desenvolvimento de terapias direcionadas a desordens imunes e são considerados uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. Como o melanoma é um câncer altamente agressivo, abordagens que diminuam sua capacidade metastática ou invasiva podem facilitar o desenvolvimento de uma estratégia eficaz para seu tratamento ou prevenção. Neste contexto, o uso de inibidores da proteína de choque térmico 90 (HSP90, do inglês *Heat Shock Protein 90*) têm trazido resultados efetivos e promissores (Maloney & Workman, 2002).

1.4. Uso de inibidores de HSP90 em terapias antitumorais

A proteína HSP90 é uma chaperona responsável pelo controle da conformação, estabilidade, atividade, disposição intracelular, síntese e degradação proteolítica de numerosas proteínas importantes (denominadas proteínas clientes de HSP90) envolvidas no crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Maloney & Workman, 2002; Richter & Buchner, 2001). Dentre elas, incluem-se proteínas cruciais ao crescimento de células tumorais, tais como proteínas quinases (ERBB2, B-RAF, C-RAF e CDK4), receptores hormonais (receptores androgênicos e estrogênicos) e outras proteínas (mutante p53 e subunidade catalítica da telomerase hTERT) (Isaacs *et al.*, 2003; Maloney & Workman, 2002).

A HSP90 surgiu como um alvo promissor para o desenvolvimento de quimioterápicos para o câncer, por modular simultaneamente múltiplas proteínas oncogênicas. Estudos mostraram que inibidores de HSP90 são capazes de se ligar com cerca de 100 vezes mais afinidade aos complexos de HSP90 que predominam em células tumorais quando comparado com os complexos de HSP90 de células normais (Kamal *et al.*, 2003). Por esse motivo, a HSP90 tem sido o foco para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais. Acredita-se que, como a maioria dos tumores são coordenados simultaneamente por múltiplas vias moleculares, o tratamento com inibidores de HSP90 modula simultaneamente uma ampla faixa de sinalização crucial para as células cancerígenas (Sharp & Workman, 2006). Sabe-se que muitos destes inibidores causam a degradação seletiva de proteínas sinalizadoras importantes envolvidas na proliferação celular, na regulação do ciclo celular e na apoptose de modelos tumorais (Hostein *et al.*, 2001).

Existem diferentes mecanismos pelos quais esses inibidores prejudicam a atividade da HSP90. Os inibidores mais naturais modulam a atividade da HSP90 bloqueando o local de ligação do ATP no domínio N-terminal e prejudicando a atividade da ATPase necessária para o efeito chave da HSP90. Esse é o caso da geldanamicina e seus análogos, dentre os quais destacamos a 17-alilaminogeldanamicina (17-AAG). A 17-AAG, também denominada tanespimicina, é um antibiótico antineoplásico benzoquinona derivado da geldanamicina capaz de inibir seletivamente a HSP90. A 17-AAG vem sendo estudada há anos e, atualmente, está em ensaios clínicos de Fase II / III, demonstrando baixa toxicidade, melhor estabilidade em comparação com outros análogos e potente atividade antitumoral, inclusive contra tumores de melanoma metastático (Solit *et al.*, 2008). Trabalhos demonstram que a 17-AAG diminui o crescimento de linhagens celulares de melanoma *in vitro* e de xenoinxerto de tumor de melanoma humano *in vivo*. Os mecanismos exatos destes efeitos anti-melanoma da HSP90 continuam a ser determinados. Sabe-se que algumas proteínas clientes de HSP90 como BRAF, CRAF, CDK-4, VEGFR, telomerase e IGF são potencialmente relevantes para o processo carcinogênico (Pacey *et al.*, 2012).

1.5. Utilização de linfócitos T $\gamma\delta$ em imunoterapias antitumoral

Os aspectos funcionais da biologia de linfócitos T $\gamma\delta$ descritos anteriormente neste trabalho levaram à sua utilização em imunoterapias anticâncer. A estimulação de linfócitos T V δ 2 com fosfoantígenos naturais ou sintéticos (na presença de IL-2) desencadeia uma expansão rápida, massiva e seletiva destas células (Hiasa *et al.*, 2009). Dados disponíveis demonstram que a

imunoterapia utilizando linfócitos T $\gamma\delta$, quer pela utilização de linfócitos T expandidos *in vivo*, através da administração de compostos que os ativam, ou pela transferência adotiva de linfócitos T $\gamma\delta$ ativados *ex vivo*, mostrou ser bem tolerada, segura e clinicamente benéfica aos pacientes (Buccheri, *et al.*, 2014). No entanto, existem limitações técnicas e funcionais para seu uso em terapias. As limitações técnicas estão relacionadas à hiporesponsividade de linfócitos T $\gamma\delta$ em alguns pacientes ou à anergia induzida por ativação (falta de ativação ou expansão), enquanto as limitações funcionais estão relacionadas à inabilidade de linfócitos T $\gamma\delta$ expandidos *in vivo* ou *in vitro* de alcançarem e infiltrarem os tumores e de exercerem suas funções efetoras no microambiente imunossupressor de tumores (Noguchi *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013). Para superar essas limitações, abordagens imunoterapêuticas vem sendo estudadas.

No decorrer desta introdução destacamos que linfócitos T $\gamma\delta$ possuem características singulares que os tornam um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias antitumorais, porém sua potente atividade citotóxica pode ser afetada por mecanismos imunossupressores. Comumente, a produção de PGE₂ encontra-se aumentada em inúmeros tumores exercendo efeitos inibitórios sobre linfócitos T. Dados da literatura também já revelaram efeitos inibitórios da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células de mastocitoma (Martinet 2010), linfoma (Martinet 2009) e células de adenocarcinoma de ovário (Lavoué 2011). No entanto, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta modulação e os seus efeitos sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra outras linhagens tumorais. A utilização do inibidor seletivo de HSP90 17-AAG foi utilizado como ferramenta no nosso estudo, uma vez que, em adição à sua atividade direta sobre células tumorais, foi demonstrado que este inibidor reduziu a produção de PGE₂ por células de câncer de colorretal (Mohammadi *et al.*, 2016). Já é bem conhecido que inibidores de HSP90 afetam diretamente e simultaneamente a sobrevivência, o crescimento e a proliferação de células tumorais, mas pouco se sabe sobre o envolvimento desta inibição com outros parâmetros, inclusive sobre a imunossupressão tumoral.

A utilização de imunoterapias para o tratamento de pacientes com melanoma vem crescendo e ganhando força como uma opção promissora. Notavelmente, a incidência de câncer de melanoma está aumentando em todo o mundo e, com exceção da cirurgia, os tratamentos disponíveis não garantem altas taxas de cura (Leong *et al.*, 2012; Kaufman *et al.*, 2014; Lipson *et al.*, 2015). Durante o desenvolvimento de um melanoma, o sistema imunológico não apenas protege contra o desenvolvimento do tumor, como também molda as características tumorais emergentes iniciando um processo de "imunodeficiência tumoral". Como mencionado anteriormente, tumores de melanoma são altamente metastáticos e este processo de metástase

geralmente está associado à tolerância imunológica severa (Ascierto *et al.*, 2015). Neste cenário, novas imunoterapias estão sendo investigadas a fim de identificar e caracterizar os diferentes subconjuntos de células cancerígenas de melanoma e projetar tratamentos individualizados para os pacientes. Apesar dos avanços nas pesquisas e utilização das terapias direcionadas, ainda são frequentes os casos de pacientes que apresentam resistência aos tratamentos. Assim, o uso de terapia de combinação para inibir simultaneamente múltiplas vias e de agentes que tenham como alvo o sistema imune estão sendo estudados para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade das terapias contra o melanoma. Diferentes moléculas de linfócitos T têm sido alvo de estudos apresentando resultados interessantes e promissores (Johnson *et al.*, 2014). Diante das informações apresentadas no decorrer desta introdução, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos imunomoduladores da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células de melanoma humano MV3 e o envolvimento da inibição de HSP90 neste processo.

2. Objetivos

Avaliar os efeitos do mediador lipídico, PGE₂, sobre a atividade antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células de melanoma humano MV3 e o envolvimento da chaperona HSP90 neste processo.

2.1. Objetivos específicos:

- 1.** Investigar os efeitos da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ *in vitro*;
- 2.** Investigar, *in vitro*, a produção de PGE₂ por células de melanoma humano MV3 e o efeito do sobrenadante destas células sobre a atividade efetora de linfócitos T $\gamma\delta$;
- 3.** Investigar, *in vitro*, o efeito do sobrenadante de células de melanoma humano MV3 tratadas com 17-AAG sobre a modulação da atividade efetora de linfócitos T $\gamma\delta$.

3. Metodologia

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

Linfócitos T $\gamma\delta$ foram expandidos a partir de uma população de células mononucleares humanas obtidas a partir do sangue de doadores voluntários saudáveis de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos, que não estavam sob o uso de corticoides. Para a coleta do sangue, foram obtidas alíquotas (10-20 ml) de sangue periférico venoso, através de venopunctura (agulha de calibre 23G). As células mononucleares foram isoladas através da centrifugação (400g; 30 minutos) em gradiente de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, EUA), lavadas uma vez com meio RPMI 1640 (Gibco, EUA; 400g; 10 minutos) e posteriormente plaqueadas (2×10^5 /poço) em placas de 96 poços de fundo em “U” em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB; 10%; Sigma-Aldrich, EUA), piruvato de sódio (1mM; Sigma-Aldrich, EUA) e gentamicina (100 μ g/ml; Gibco, EUA). As células mononucleares permaneceram em cultura por sete dias com meio contendo fosfoantígeno isopentenil pirofosfato (IPP; 2-10 μ g/ml; Sigma-Aldrich, EUA) e interleucina-2 (IL-2; 12,2ng/ml; Sigma-Aldrich, EUA) a 37°C, 5% CO₂. No sétimo dia, as células foram recolhidas, lavadas com RPMI 1640 (400g; 10 minutos) e novamente plaqueadas (2×10^5 /poço) em meio RPMI 1640 suplementado com SFB, piruvato de sódio, gentamicina, IPP e IL-2. As células permaneceram em cultura por mais sete dias a 37°C e 5% CO₂. Após os 14 dias, as células foram recolhidas, lavadas com RPMI 1640 (400g; 10 minutos) e a pureza da população avaliada através de citometria de fluxo (FACScalibur; Becton & Dickinson, EUA), conforme descrito a seguir. Para os experimentos posteriores foram utilizadas culturas com pureza $\geq 85\%$ de linfócitos T $\gamma\delta$. 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. Cultura de células de melanoma humano MV3 e obtenção do sobrenadante

A linhagem de células MV3, estabelecidas por van Muijen (1991) e cedidas pelo Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular – UERJ, foi obtida a partir de nódulos linfáticos metastizados de um paciente de 76 anos de idade (sexo masculino) que sofreu de melanoma cutâneo primário amelanótico tipo nodular, Clark IV, na região do queixo. Para os ensaios, células MV3 foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com SFB (10%; Sigma-Aldrich, EUA) e gentamicina (100 μ g/ml; Gibco, EUA) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para a obtenção do sobrenadante, as células MV3 foram plaqueadas

($7,5 \times 10^5$ /poço) em placas de cultura de 6 poços de fundo chato em meio DMEM suplementado com SFB e gentamicina e permaneceram em cultura por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado (405g; 10 minutos) e utilizado nos ensaios posteriores.

3.3. Tratamento de células de melanoma humano MV3 e obtenção do sobrenadante

Células de melanoma humano MV3 foram plaqueadas (5×10^5 /poço) em placas de cultura de 6 poços de fundo chato em meio DMEM suplementado com SFB e gentamicina e permaneceram em cultura por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as células foram lavadas 1x com meio DMEM incompleto e tratadas com 17-demetoxi-17-alilamino geldanamicina (17-AAG; 1µM) por 2 horas. Em seguida, o meio contendo 17-AAG foi substituído por meio DMEM suplementado e as células permaneceram por mais 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O sobrenadante foi recolhido, centrifugado (405g; 10 minutos) e utilizado nos ensaios posteriores.

3.4. Viabilidade de células de melanoma humano MV3

Células MV3 foram plaqueadas (2×10^4 células/poço) em placa de 96 poços de fundo chato e tratadas com 17-AAG (0,25-2 µM) em meio DMEM contendo SFB e gentamicina. Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂ a solução de resazurina (0,1mg/ml; 4h) foi adicionada aos poços 20h após a incubação dos linfócitos e a leitura da fluorescência foi realizada em $\lambda_{em}555$ e $\lambda_{exc}585$ em leitor multimodal M5 (Molecular Devices, EUA). Os valores foram apresentados na forma de porcentagem de células viáveis.

3.5. Estímulo e tratamento de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos

Após o processo de expansão, os linfócitos T $\gamma\delta$ humanos foram lavados uma vez com RPMI 1640 (400g; 10 minutos), plaqueados (2×10^5 /poço) em placas de 96 poços com fundo em “U” em meio RPMI 1640 suplementado com SFB, piruvato de sódio e gentamicina e mantidos em repouso na estufa por 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Após esse período, os linfócitos T $\gamma\delta$ foram divididos em grupos e tratados da seguinte forma: 1) linfócitos T $\gamma\delta$ incubados por uma hora em meio DMEM completo e posteriormente estimulados com IPP (Sigma-Aldrich, EUA; 10µg/ml) por mais duas horas (grupo controle); 2) linfócitos T $\gamma\delta$ pré-tratados com

prostaglandina E₂ (PGE₂; 1μM; Cayman Chemical, EUA) por uma hora e posteriormente estimulados com IPP por mais duas horas; 3) linfócitos T γδ incubados por duas horas com o sobrenadante de células MV3; 4) linfócitos T γδ incubados por duas horas com o sobrenadante de células MV3 tratadas com 17-AAG. Para a análise da produção intracelular das citocinas IFN-γ e IL-17 e da enzima citotóxica perforina, os linfócitos T γδ foram pré-tratados e estimulados ou cultivados com o sobrenadante de células MV3 (tratadas ou não com 17-AAG) na presença da Brefeldina A por 4 horas (10μg/mL; Sigma-Aldrich, EUA).

3.6. Viabilidade celular de linfócitos T γδ humanos

Linfócitos T γδ humanos expandidos foram plaqueados (2x10⁵ células/poço) em placa de 96 poços de fundo chato e estimulados com PGE₂ (0,25-2μM) em meio RPMI 1640 contendo com SFB, piruvato de sódio e gentamicina ou cultivados com o sobrenadante das células de melanoma MV3 (tratadas ou não com 17-AAG) por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. 20μL da solução de resazurina (0,1mg/ml; 4h) foi adicionada por poço 20h após a incubação dos linfócitos. Completadas 24 horas de cultura, a leitura da fluorescência foi realizada em λ_{em}555 e λ_{exc}585 em leitor multimodal M5 (Molecular Devices, EUA).

3.7. Marcação para citometria de fluxo

Para avaliação da pureza e análise da expressão de EP4 e CD107a na superfície celular, os linfócitos T γδ humanos foram cultivados em placa de 96 poços de fundo chato, pré-tratados e estimulados conforme descrito no tópico 3.5. Após 2 horas, as células foram recolhidas, centrifugadas (964g; 10 minutos) e ressuspensas em 100μL de solução de bloqueio (PBS 1x + 0,1% azida sódica + 10% de SFB). Após 30 minutos a 4°C, os linfócitos T γδ foram lavados com PBS 1x (100μL/ependorff; 964g; 10 minutos) e ressuspensos na solução de bloqueio (50μL/ependorff) contendo os anticorpos monoclonais anti-TCR γδ (Biolegend; 1:100), anti-CD3 (Becton Dickson; 1:100), anti-EP4 (Novus Biologicals; 1:100), anti-CD107a (Biolegend; 1:100) conjugados a FITC, PE ou PerCP PE/Cy7. Após 30 minutos a 4°C, esses foram novamente lavados com PBS 1x (100μL/ependorff; 964g; 10 minutos), ressuspensos em PBS/azida sódica e adquiridos no citômetro de fluxo (FACScalibur; Becton & Dickinson, EUA). Como controle negativo de marcação inespecífica, foram utilizados isotipos de anticorpos IgG conjugados aos respectivos fluorocromos sem especificidade de ligação às proteínas das células analisadas.

Para a marcação intracelular das citocinas IFN- γ e IL-17 e de perforina, os linfócitos T $\gamma\delta$, após serem tratados e estimulados na presença da brefeldina A (10 μ g/mL) por 4 horas, foram recolhidos, lavados e fixados com paraformaldeído 4% (100 μ L/eppendorf). Após 20 minutos a 4°C, as células foram novamente lavadas com PBS 1x (100 μ L/eppendorf; 964g; 10 minutos) e ressuspendidas em tampão para permeabilização (PBS 1x + 0,1% azida + 0,1% de saponina + 10% SFB) por 30 minutos a 4°C. Em seguida, essas foram novamente lavadas com PBS 1x (100 μ L/eppendorf; 964g; 10 minutos) e ressuspendidas em PBS/azida contendo os anticorpos anti- IFN- γ (BD Pharmingen; 1:100), anti-IL-17 (Biolegend; 1:100) e anti-perforina (Santa Cruz; 1:100). Após 30 minutos a 4°C, os linfócitos T $\gamma\delta$ foram novamente lavados com PBS 1x e ressuspendidos em PBS/azida contendo os respectivos anticorpos secundários por mais 30 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 1x, transferidas para os tubos próprios para citômetro (poliestireno transparente, fundo redondo, 12x75mm, 5mL) e adquiridas no citômetro de fluxo. Para avaliação das enzimas ciclooxigenase (COX)-1 e 2 os linfócitos T $\gamma\delta$ fixados, permeabilizados, bloqueados e marcados com os anticorpos monoclonais anti-COX-1 e anti-COX-2 purificados e o anticorpo secundário anti-goat IgG conjugado à FITC.

3.8. Estratégia de *gate*

Para análise das células marcadas ao menos 10⁵ células foram adquiridas por amostra no citômetro (FACScalibur; Becton & Dickinson). O percentual da subpopulação de linfócitos T $\gamma\delta$ CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ foi determinada em um *gate* físico delimitado manualmente de acordo com o tamanho e granulosidade (FSC x SSC) utilizando o software FlowJo® (versão 7.6.5). As análises das marcações foram realizadas dentro do *gate* físico em populações com pureza \geq 85% e os dados coletados expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência apresentados como dotplots ou histogramas.

3.9. Ensaio imunoenzimático (EIA)

Células de melanoma humano MV3 (2x10⁵ células/poço), tratadas ou não com 17-AAG, foram cultivadas em placa de 24 poços de fundo chato em meio DMEM suplementado com SFB e gentamicina por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado (405g; 10 minutos) e utilizado para a dosagem do mediador lipídico prostaglandina E₂ (PGE₂) através do *kit* de EIA (Cayman Chemical, USA), conforme instruções

do fabricante. A leitura da fluorescência foi realizada em diferentes intervalos de tempo em $\lambda_{420\text{nm}}$ em leitor multimodal M5 (Molecular Devices, EUA).

3.10. Ensaio de quimiotaxia

Linfócitos T $\gamma\delta$ humanos (5×10^4 células/poço ressuspendidos em 80 μl) após tratamentos e estímulos foram adicionados a *inserts* de cultura (5,0 μm ; Corning) em placas de 96 poços contendo o leucotrieno B₄ (LTB₄; 100 I; 100nM; Cayman) como fator quimiotático. A placa permaneceu em estufa por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂ e, após esse período, as células que migraram para a parte inferior do poço foram contadas em Câmara de Neubauer (Bright-line), em microscópio ótico (20x).

3.11. Dosagem de Granzima B

Linfócitos T $\gamma\delta$ humanos (2×10^5 células/poço) (tratados e estimulados) foram recolhidos, centrifugados (400g; 10 minutos) e o sobrenadante conservado para a realização da dosagem de granzima B. A dosagem foi realizada através do *kit* Granzyme B Activity Fluorometric Assay Kit (Biovision, EUA) conforme especificações do fabricante. A leitura da fluorescência foi realizada em diferentes intervalos de tempo entre $\lambda_{\text{em}380}$ e $\lambda_{\text{exc}500}$ em leitor multimodal M5 (Molecular Devices, EUA).

3.12. Ensaio de *killing* de células tumorais

Células de melanoma MV3 (2×10^5 /poço) foram cultivadas em placa de 24 poços com fundo chato 24 horas antes do ensaio para adesão. Linfócitos T $\gamma\delta$ tratados e estimulados foram transferidos para a placa contendo as células MV3 (relação MV3/ $\gamma\delta$ de 1:5) e incubados por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação o sobrenadante foi recolhido e as células soltas com tripsina/EDTA 1x (Sigma Aldrich). Ambos (sobrenadante e células soltas) foram lavados com PBS 1x (405g; 10 minutos). Em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) diluídos em tampão de ligação para marcação de PI, conforme instruções do fabricante (BD Pharmingen). Ao menos 10^5 células foram adquiridas por amostra no citômetro (FACScalibur; Becton & Dickinson). A análise da morte das células MV3 foi realizada em *gate* físico (FSCxSSC) determinado manualmente de acordo com o tamanho e granulosidade utilizando o software FlowJo® (versão 7.6.5). Os dados coletados foram expressos em porcentagem de células viáveis e apresentados como histogramas.

3.13. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados pelos testes Student-Newman-Keuls ou T-Student através do programa GraphPad Prism 4 para Windows. Foram consideradas significativas diferenças onde $P < 0,05$.

3.14. Consideração sobre Aspectos Éticos

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Fundação Oswaldo Cruz sob a licença CEP nº 346.627. O Laboratório de Farmacologia Aplicada é certificado como nível II pela CTNBio (CQB 342/12).

4. Resultados

4.1. Efeitos da PGE₂ sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$ humanos

4.1.1. Pureza da população de linfócitos T $\gamma\delta$ após expansão

O fosfoantígeno IPP, produzido por células tumorais e diretamente reconhecido por linfócitos T $\gamma\delta$ humanos, foi utilizado no nosso modelo para expandir *in vitro* linfócitos T $\gamma\delta$. Esta é uma técnica estabelecida para a obtenção de linfócitos T $\gamma\delta$ a partir de células mononucleares de sangue humano (Silva-Santos *et al.*, 2015). Após 14 dias de incubação dos linfócitos T $\gamma\delta$ com IPP (10 μ g/ml) e IL-2 (2 μ M) as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 e anti-TCR $\gamma\delta$ e adquiridas em citômetro de fluxo. Como observado na figura 1, obtivemos uma população com pureza de aproximadamente 86% de linfócitos CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ (figura 1).

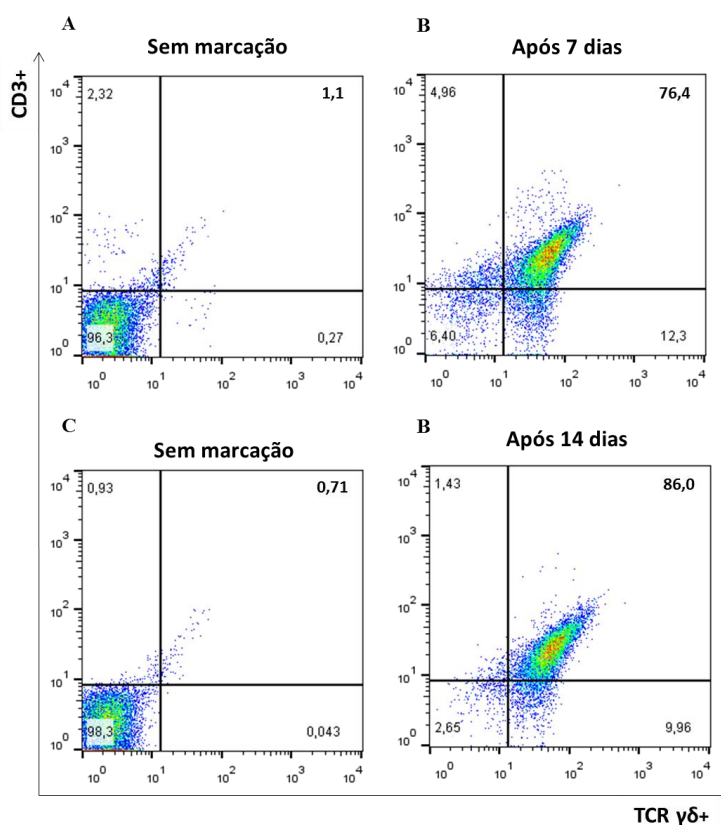


Figura 1. Pureza da população de linfócitos T $\gamma\delta$ após expansão. (A-B) *Dot plots* representativos da análise de células CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ após 7 dias em cultura na presença de IPP (10 μ g/ml) e IL-2 (2 μ M). (C-D) *Dot plots* representativos da análise de células CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ após 14 dias em cultura na presença de IPP (10 μ g/ml) e IL-2 (2 μ M). Resultados representativos do experimento realizado em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.1.2. PGE₂ não induz a morte de linfócitos T $\gamma\delta$

Inicialmente, para garantir que os efeitos da PGE₂ sobre os linfócitos T $\gamma\delta$ não induzem morte celular, foi avaliada a viabilidade destas células após a incubação com PGE₂ pelo ensaio de resazurina. Para tal, linfócitos T $\gamma\delta$ humanos foram incubados com diferentes concentrações de PGE₂ (0,25-2 μ M) por 2 e 24 horas. Os resultados demonstram que a incubação com PGE₂ por 24h não induziu morte celular superior a 20% (**figura 2**), como nas células incubadas com tween 10% (controle positivo de morte), garantindo a confiabilidade dos resultados nos ensaios subsequentes.

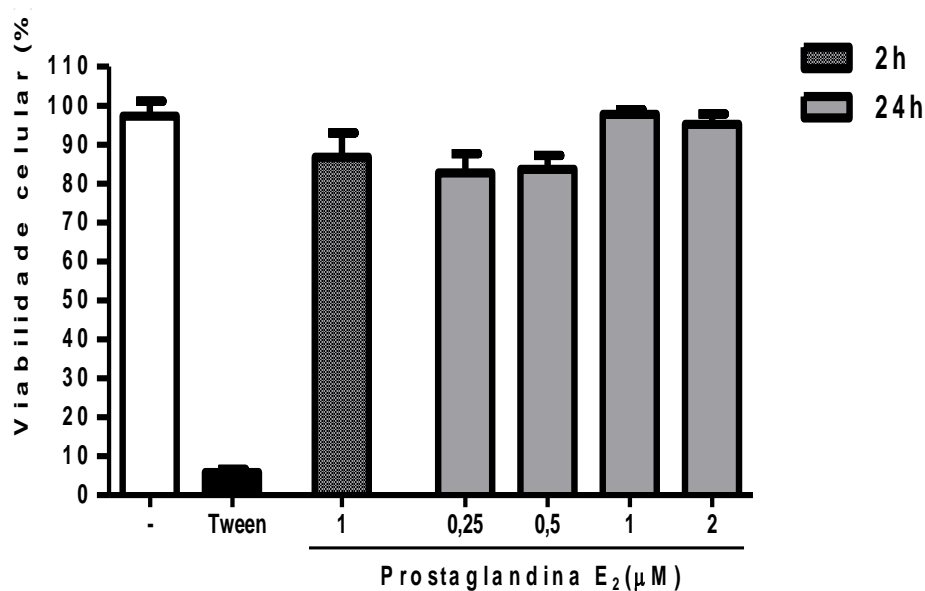


Figura 2. Viabilidade dos linfócitos T $\gamma\delta$ (2×10^5 /poço) após incubação com PGE₂ (0,25-2 μ M) por 2h e 24h. Análise realizada pelo método de redução de resazurina. Linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com tween 10% foram utilizados como controle positivo de morte. A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) ($\lambda_{ex}555$, $\lambda_{em}585$). Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Resultados expressos como média de porcentagem de células viáveis.

4.1.3. Linfócitos T $\gamma\delta$ expressam o receptor de prostaglandina E₂ EP4

Para investigar se PGE₂ exerce efeito direto sobre os linfócitos T $\gamma\delta$, avaliamos a expressão do receptor EP4 por estas células, através de citometria de fluxo. Como demonstrado abaixo, linfócitos T $\gamma\delta$ expressam o receptor EP4 (**figura 3A**), e a incubação com PGE₂ não alterou a sua expressão (**figura 3B**).

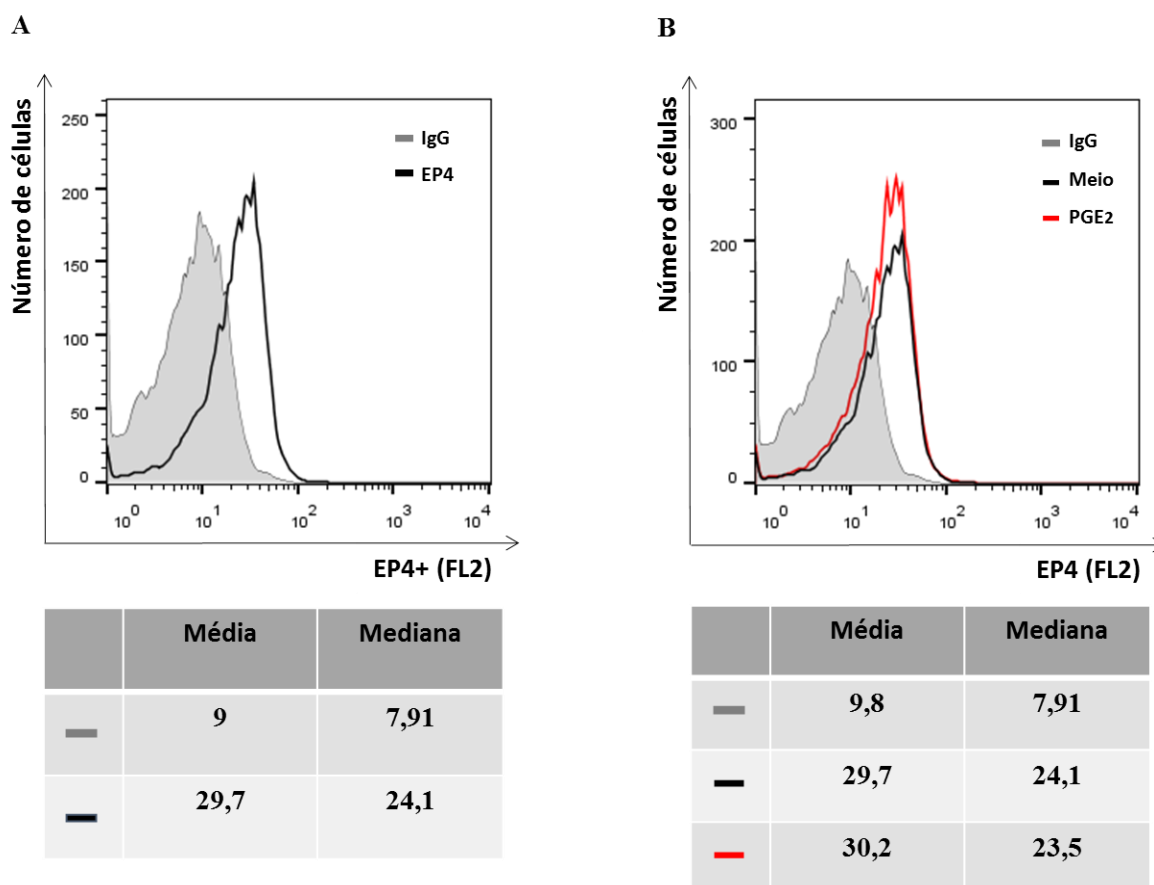


Figura 3. Análise da expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$. (A) Histograma da análise da expressão de EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$ em repouso. (B) Histograma representativo da análise da expressão de EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com PGE₂ (1 μ M; 1h) e estímulo com IPP (10 μ g/ml; 2h). Tabelas contendo média \pm EPM e mediana \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ EP4⁺. Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.1.4. PGE₂ diminui o *killing* de células de melanoma por linfócitos T $\gamma\delta$

Para investigar os efeitos da PGE₂ sobre a atividade citotóxica dos linfócitos T $\gamma\delta$, avaliamos a capacidade desses em matar células tumorais de melanoma humano MV3 (ensaio de *killing*), através de citometria de fluxo. Para tal, após a expansão, os linfócitos T $\gamma\delta$ que estavam em repouso por 24 horas foram novamente incubados com meio (grupo controle) ou com PGE₂ (1 μ M) por 1 hora. Transcorrido esse período, ambos os grupos foram estimulados com IPP (10 μ g/ml) e cocultivados com células de melanoma humano MV3. Após 4 horas, avaliamos a marcação de PI (morte celular) nas células tumorais MV3 delimitadas em um *gate* físico (FSC x SSC) de acordo com o tamanho e granulosidade (**figura 4 A-C**). Os resultados demonstram que a incubação de linfócitos T $\gamma\delta$ com PGE₂ reduziu a atividade citotóxica destas células, como observado na **figura 4 (D-E)**.

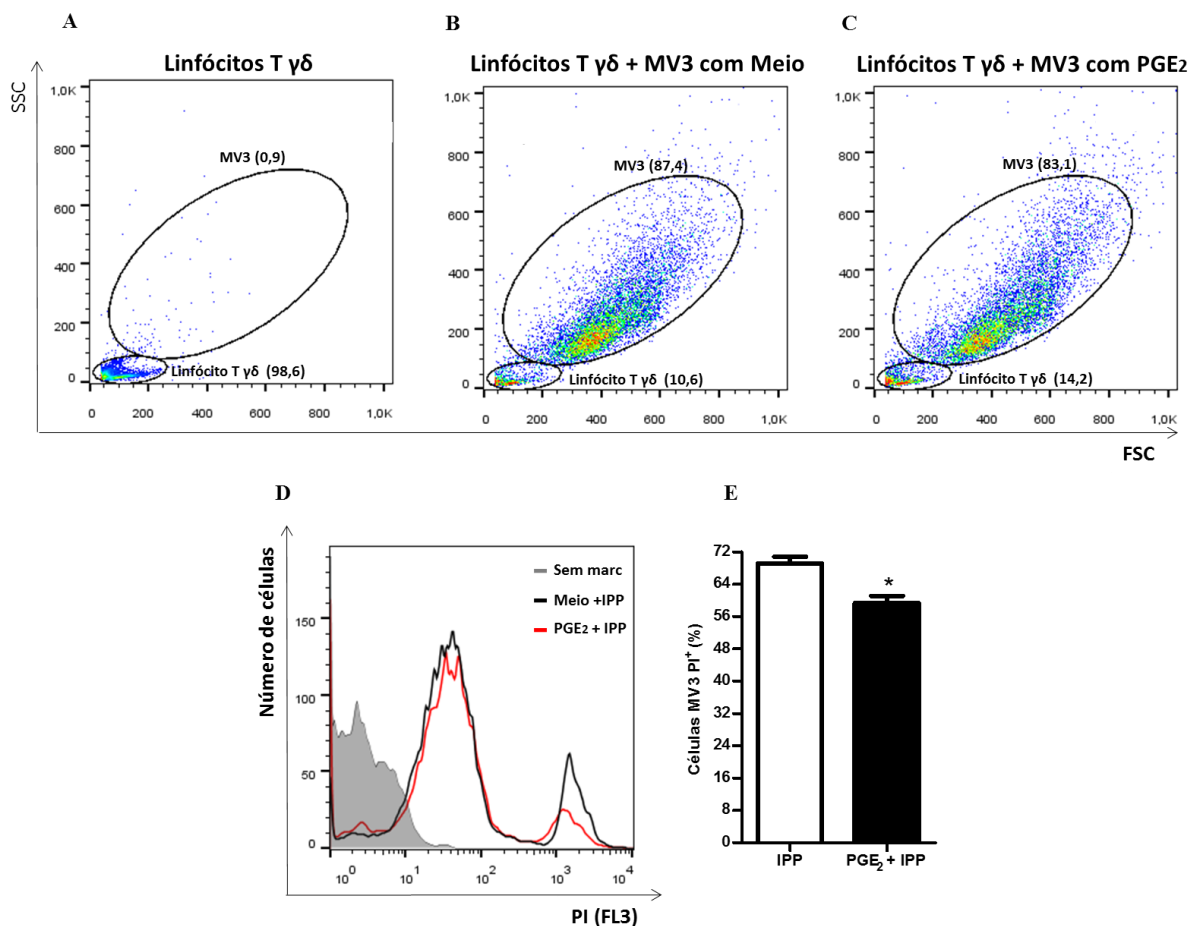


Figura 4. Ensaio de *killing* de células de melanoma humano MV3 por linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com meio ou PGE₂ (1 μ M; 1h) e estimulados com IPP (10 μ g/ml). (A-C) *Dot plots* representativos dos *gates* físicos (FSC x SSC), determinados manualmente de acordo com o tamanho e granulosidade, utilizados para a análise de células MV3 PI⁺. (D) Histogramas representativos da análise de células MV3 PI⁺. (E) Resultados expressos como média \pm EPM de células MV3 PI⁺. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.1.5. PGE₂ modula negativamente a produção de INF- γ por linfócitos T $\gamma\delta$

Considerando o efeito da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$, avaliamos o perfil de produção de INF- γ por essas células, através da marcação intracelular desta citocina em linfócitos T $\gamma\delta$ por citometria de fluxo. Para tal, após a expansão, os linfócitos T $\gamma\delta$ que estavam em repouso por 24 horas foram novamente incubados com meio (grupo controle) ou com PGE₂ (1 μ M) por 1 hora. Transcorrido esse período, ambos os grupos foram estimulados com IPP (10 μ g/ml) por mais 4 horas e marcados com o anticorpo anti-INF γ . Os resultados demonstram que a incubação com PGE₂ diminuiu significativamente o número de linfócitos T $\gamma\delta$ INF- γ ⁺ (**figura 5**). Além disso, este mediador lipídico levou à redução da intensidade de marcação (INF- γ , FL-2) por célula (**figura 5 D**). Vale ressaltar que a PGE₂ também diminuiu a granulosidade da população de linfócitos T $\gamma\delta$, como demonstrado no parâmetro de SSC-H (**Figura 5 A-C**).

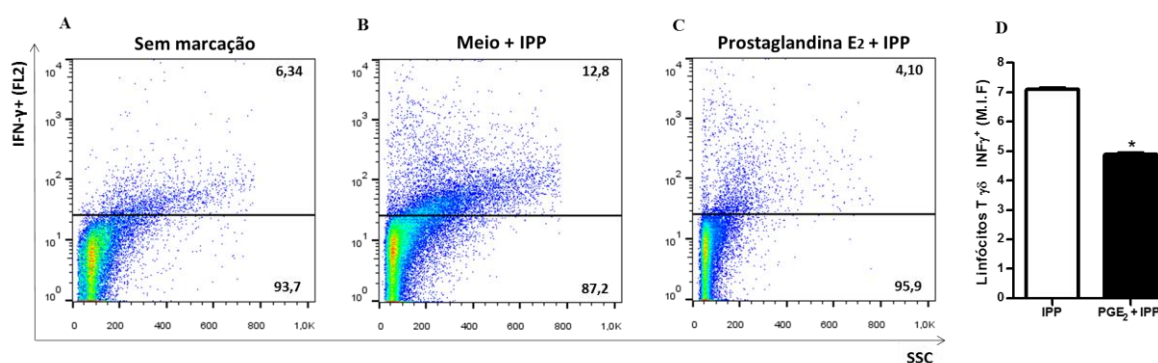


Figura 5. Avaliação de IFN- γ intracelular em linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com meio ou PGE₂ (1 μ M; 1h) e estimulados com IPP (10 μ g/ml). (A-C) *Dot plots* representativos da análise da quantificação intracelular de IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$. (D) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ IFN- γ ⁺. Diferenças estatísticas (P<0,05) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.1.6. Efeito da PGE₂ sobre a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$

Dando continuidade, investigamos se a PGE₂ modula a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$. Para tal, avaliamos a expressão do marcador de degranulação CD107a, produção de perforina e liberação de granzima B por essas células, através de citometria de fluxo e ensaio de EIA, respectivamente. Os resultados demonstram que a incubação com PGE₂ diminuiu significativamente o número de linfócitos T que expressam CD107a (**figura 6 A-C**) e a intensidade de marcação (CD107a, FL-3) por célula (**figura 6D**), o que pode estar associado à

redução da capacidade da função efetora destes linfócitos T $\gamma\delta$. Apesar de não observamos diminuição significativa da produção de perforina (**figura 7 A-B**), houve redução significativa da liberação de granzima B (**figura 7C**) por estas células.

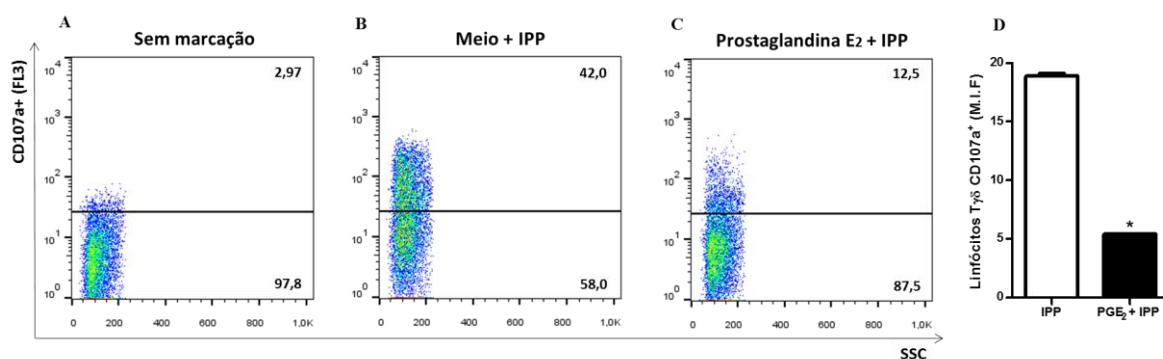


Figura 6. Avaliação da expressão de CD107a por linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com meio ou PGE₂ (1 μ M; 1h) e estimulados com IPP (10 μ g/ml). (A-C) *Dot plots* representativos da análise da expressão de CD107a por linfócitos T $\gamma\delta$. (D) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ CD107a+. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

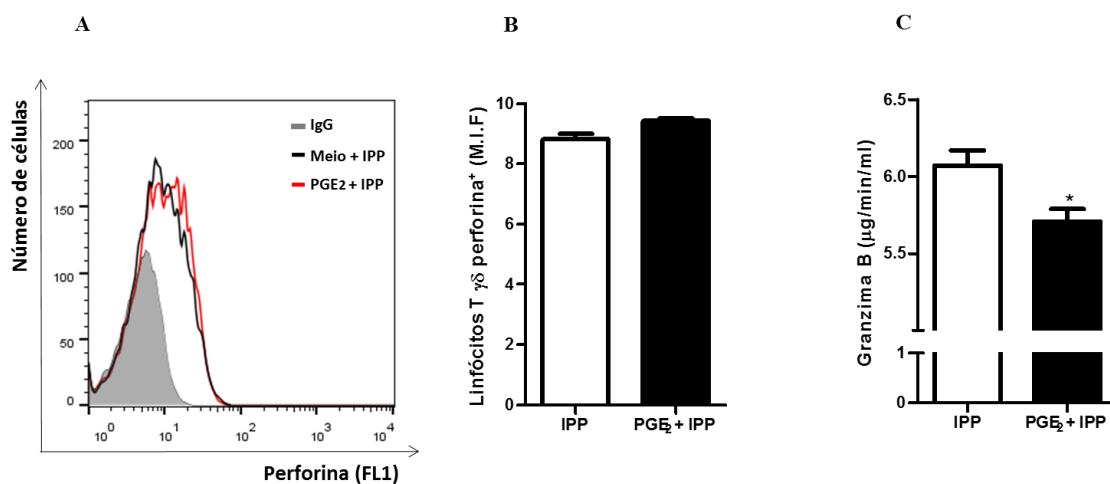


Figura 7. Avaliação da expressão de perforina intracelular e liberação de granzima B por linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com meio ou PGE₂ (1 μ M; 1h) e estimulados com IPP (10 μ g/ml). (A) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de perforina por linfócitos T $\gamma\delta$. (B) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ perforina+. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®] (C) Dosagem de granzima B no sobrenadante de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com meio ou PGE₂ (1 μ M; 1h) e estimulados com IPP (10 μ g/ml). Análise realizada através do kit Granzyme B Activity Fluorometric Assay Kit (Biovision). A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) ($\lambda_{ex}380$, $\lambda_{em}500$). Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.1.7. Efeito da PGE₂ sobre a migração de linfócitos T $\gamma\delta$

Afim de investigar se a PGE₂, além de possuir efeitos diretos sobre a citotoxicidade de linfócitos T $\gamma\delta$, também seria capaz de modular atividade migratória dessas células e, assim, modular sua migração, realizamos o ensaio de quimiotaxia. Como demonstrado abaixo, o tratamento com PGE₂ reduziu significativamente o número de linfócitos T $\gamma\delta$ que migraram em direção ao fator quimiotático LTB₄, quando comparado com o grupo controle (meio) (**figura 8**). O grupo de linfócitos T $\gamma\delta$ migrando em direção ao meio RPMI (sem adição de LTB₄) foi utilizado com controle negativo do ensaio.

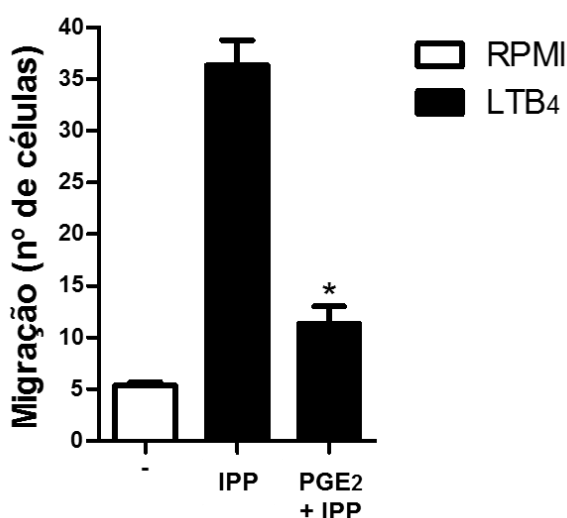


Figura 8. Ensaio de quimiotaxia de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com meio ou PGE₂ (1 μ M; 1h) e estimulados com IPP (10 μ g/ml). Quantificação do número de células que migraram em direção ao fator quimiotático LTB₄ (100nM). Migração de linfócitos T $\gamma\delta$ em direção ao meio RPMI foi utilizado como controle negativo. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2. Efeitos do sobrenadante de células de melanoma humano MV3 sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$

4.2.1. Células MV3 produzem PGE₂

Neste bloco de resultados, investigamos o efeito do sobrenadante de células de melanoma humano MV3 sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$. Primeiramente, avaliamos a produção de PGE₂ por células MV3 através da quantificação deste mediador no sobrenadante

da cultura e expressão das enzimas ciclooxigenase COX-1 e COX-2, que participam da via de síntese deste mediador lipídico, por estas células, através dos ensaios de EIA e citometria de fluxo, respectivamente. Os resultados demonstram a presença de PGE₂ no sobrenadante de células MV3 após 2 e 24h de cultivo (**tabela 1**), e que estas células expressam COX-1 e -2 (**figura 9 A e B**).

Tabela 1. Quantificação de PGE₂ células de melanoma humano MV3

	2h	24h
PGE ₂ (pg/ml)	239,3 ± 5,2	438,9 ± 58,4

Resultados expressos como média ± EPM de três experimentos independentes feitos em triplicata.

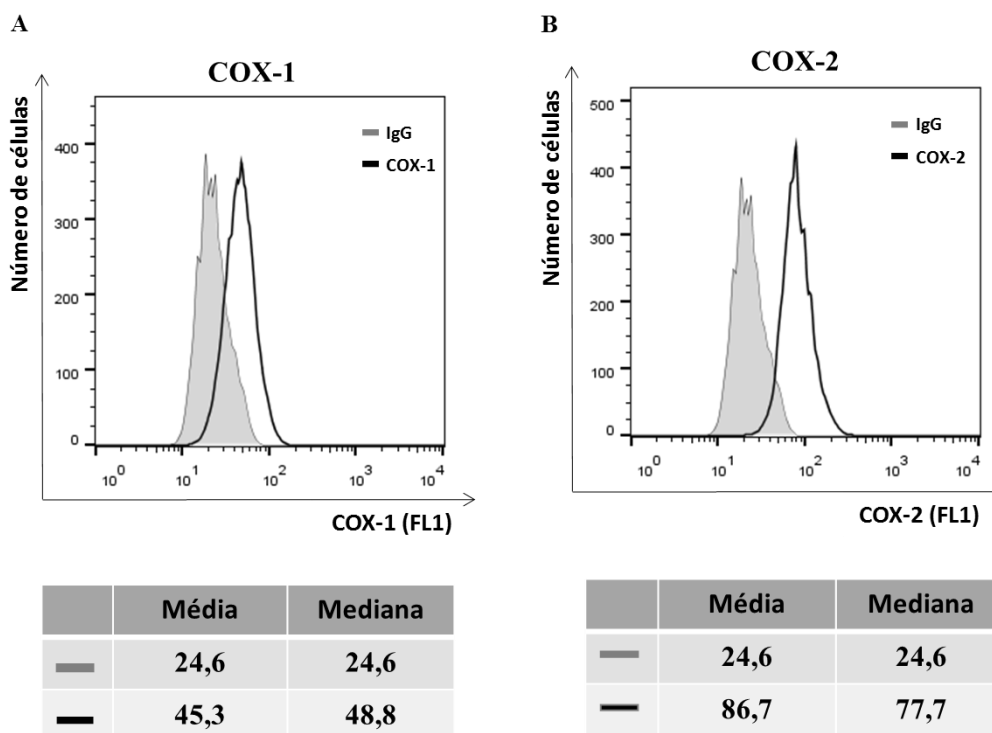


Figura 9. Quantificação intracelular das enzimas ciclooxigenases 1 e 2 em células de melanoma humano MV3. (A) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de COX-1 em células de melanoma humano MV3. (B) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de COX-2 em células de melanoma humano MV3. Tabelas contendo média e mediana de intensidade de fluorescência. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1®. Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2.2. Sobrenadante de células MV3 não induz a morte de linfócitos T $\gamma\delta$

Com o objetivo de avaliar os efeitos do sobrenadante de células de melanoma humano MV3 (contendo PGE₂) sobre os linfócitos T $\gamma\delta$, avaliamos inicialmente a viabilidade destes linfócitos após a incubação com sobrenadante de células MV3, por 2 e 24 horas, pelo método de resazurina. Como demonstrado na **figura 10**, a incubação com o sobrenadante não induziu a morte de linfócitos T $\gamma\delta$ (como observado no grupo controle positivo de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com tween 10%), garantindo a viabilidade dos mesmos nos ensaios subsequentes.

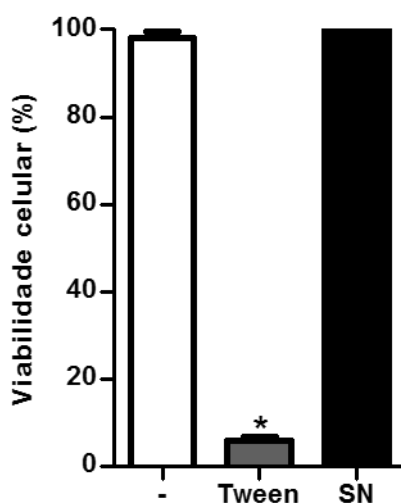


Figura 10. Viabilidade dos linfócitos T $\gamma\delta$ (2×10^5 /poço) após incubação com sobrenadante de células de melanoma humano MV3 (SN MV3) por 24h. Análise realizada pelo método de redução de resazurina. Linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com tween 10% foram utilizados como controle positivo. A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) (λ_{ex} 555, λ_{em} 585). Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados expressos como média de porcentagem. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2.3. Efeito do sobrenadante de células MV3 na expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$

Para investigar se o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 altera a expressão do receptor de PGE₂, EP4, na superfície de linfócitos T $\gamma\delta$ realizamos o ensaio de citometria de fluxo. Como demonstrado na **figura 11**, a incubação de linfócitos T $\gamma\delta$ com o sobrenadante de células MV3 reduz a expressão de EP4 por estas células (M.I.F), no entanto ainda há receptores presentes em sua superfície disponíveis para que a PGE₂, presente no sobrenadante de células MV3, se ligue e exerça seus efeitos.

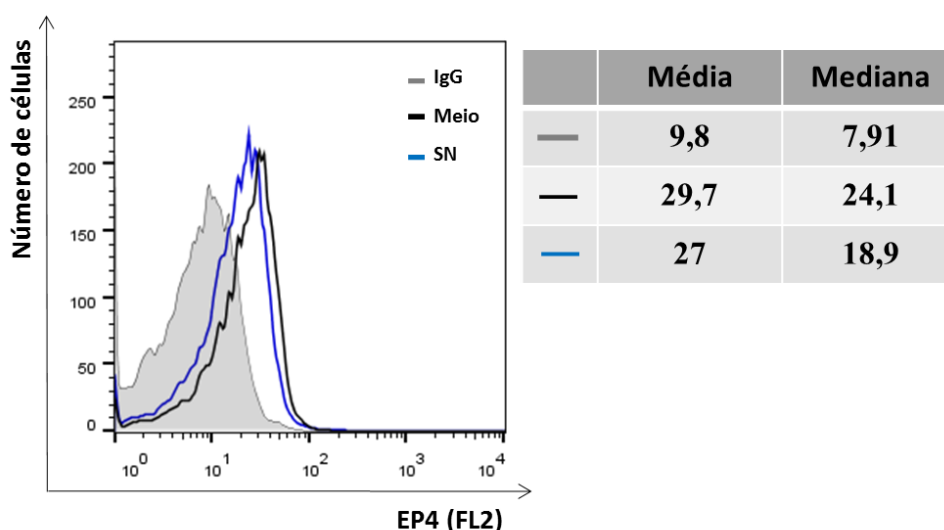


Figura 11. Análise da expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com meio ou sobrenadante de células MV3. Histograma representativo da análise da expressão de EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$. Tabela contendo média \pm EPM e mediana \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ EP4⁺. Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.2.4. Sobrenadante de MV3 diminui o *killing* de células de melanoma por linfócitos

T $\gamma\delta$

Para avaliar o efeito do sobrenadante sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ realizamos o ensaio de *killing*. Para tal, após a expansão, os linfócitos T $\gamma\delta$ que estavam em repouso por 24 horas foram novamente incubados com meio (grupo controle) ou com o sobrenadante de células MV3 por 1 hora. Transcorrido esse período, ambos os grupos foram cocultivados com células de melanoma humano MV3. Após 4 horas, avaliamos a marcação de PI (morte celular) nas células tumorais MV3 delimitadas em um *gate* físico (FSCxSSC) de acordo com o tamanho e granulosidade (**figura 12 A-C**). Os resultados demonstram que linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com o sobrenadante de células MV3 apresentam uma menor capacidade de indução de morte das células tumorais (**figura 12 D-E**), sugerindo que o sobrenadante de células MV3 é capaz de modular negativamente a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$.

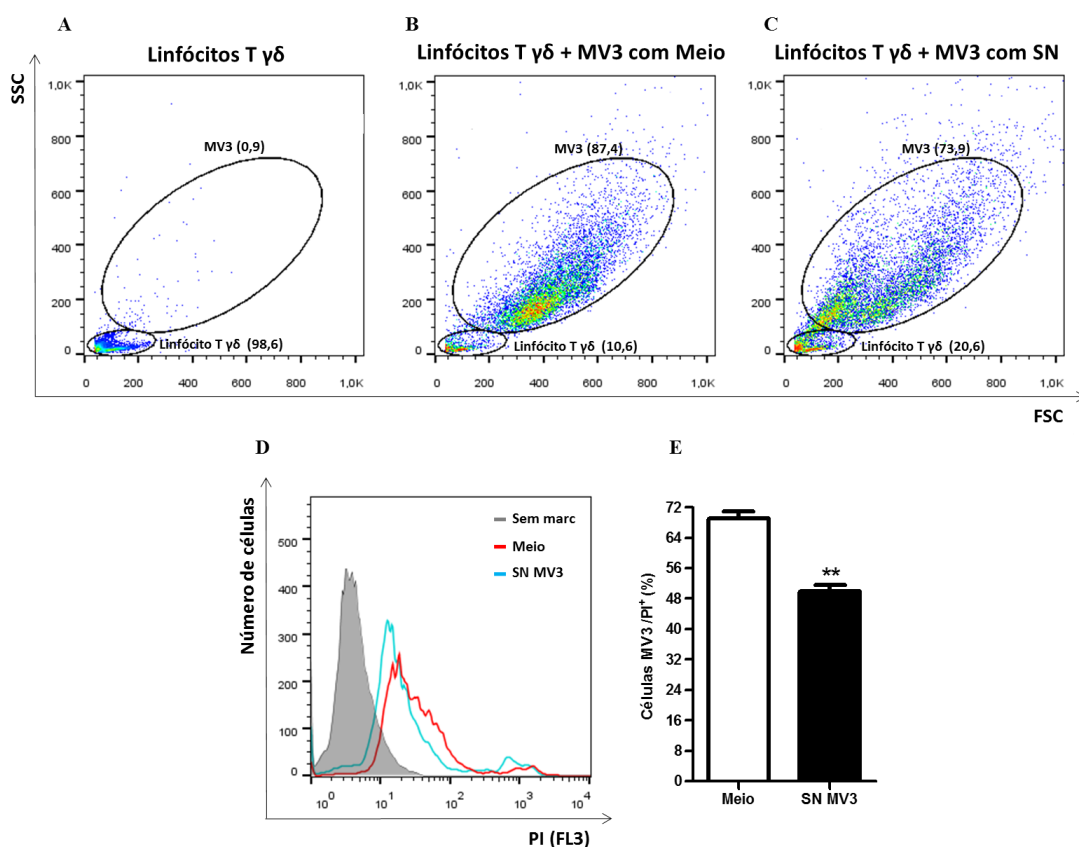


Figura 12. Ensaio de *killing* de células de melanoma humano MV3 por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com meio ou sobrenadante de células MV3 (1h). (A-C) *Dot plots* representativos dos *gates* físicos (FSC x SSC), determinados manualmente de acordo com o tamanho e granulosidade, utilizados para a análise de células MV3 PI+. (D) Histograma representativos da análise de células MV3 PI+. (E) Resultados expressos como média \pm EPM de células MV3 PI+. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.2.3. Sobrenadante de células MV3 modula negativamente a produção de IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$

Em seguida, avaliamos a produção de IFN- γ intracelular de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados novamente com meio (grupo controle) ou com sobrenadante de células de melanoma humano MV3 (por uma hora), através de citometria de fluxo. Os resultados demonstram que o sobrenadante diminuiu significativamente o número de linfócitos T $\gamma\delta$ IFN- γ^+ , quando comparado com o grupo controle (**figura 13 A-D**). Assim como observado com a PGE₂, o sobrenadante levou também à redução da intensidade de marcação (IFN- γ , FL-2) por célula (**figura 13 D**) e diminuiu a granulosidade da população (**Figura 13 A-C**).

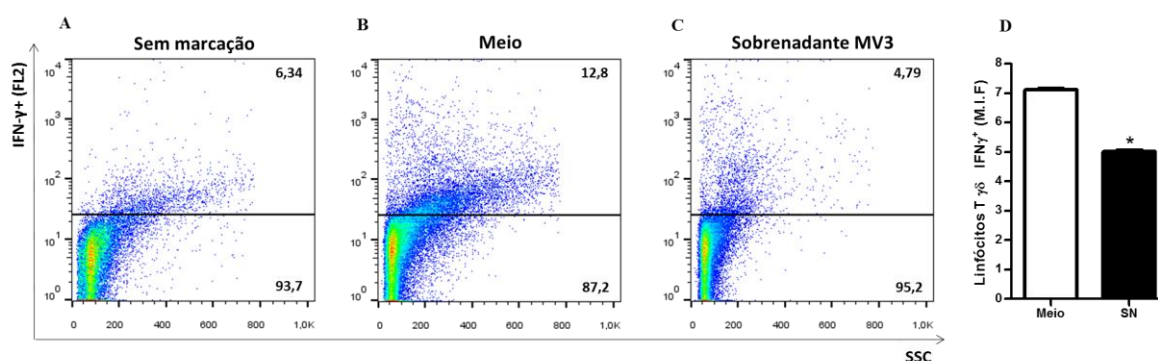


Figura 13. Quantificação de IFN- γ intracelular de linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com meio ou sobrenadante de células MV3 (1h). (A-C) *Dot plots* representativos da análise da quantificação intracelular de IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$. (D) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ IFN- γ^+ . Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.2.4. Efeitos do sobrenadante de células MV3 sobre a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$

Para investigar os efeitos do sobrenadante de células de melanoma humano MV3, contendo PGE₂, sobre a degranulação de linfócitos T $\gamma\delta$ avaliamos a expressão do marcador de degranulação CD107a, produção de perforina e liberação de granzima B por estas células, através de citometria de fluxo e ensaio de EIA, respectivamente. Os resultados demonstram que a incubação com o sobrenadante de células MV3 diminuiu levemente o número de linfócitos T $\gamma\delta$ que expressam CD107a (**figura 14 A-C**) em sua superfície e a intensidade de marcação (CD107a, FL-3) por célula (**figura 14 D**). Tal fenômeno pode estar associado à redução da função efetora destes linfócitos T $\gamma\delta$. No entanto, não observamos diminuição significativa da produção de perforina e da liberação de granzima B por estas células (**figura 15 A-C**).

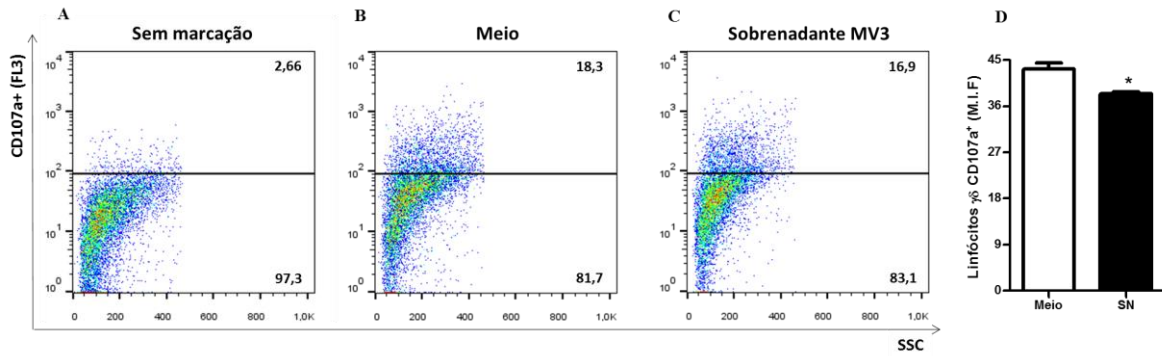


Figura 14. Quantificação da expressão de CD107a por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com meio ou sobrenadante de células MV3 (1h). (A-C) *Dot plots* representativos da análise da expressão de CD107a por linfócitos T $\gamma\delta$. (D) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ CD107a+. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

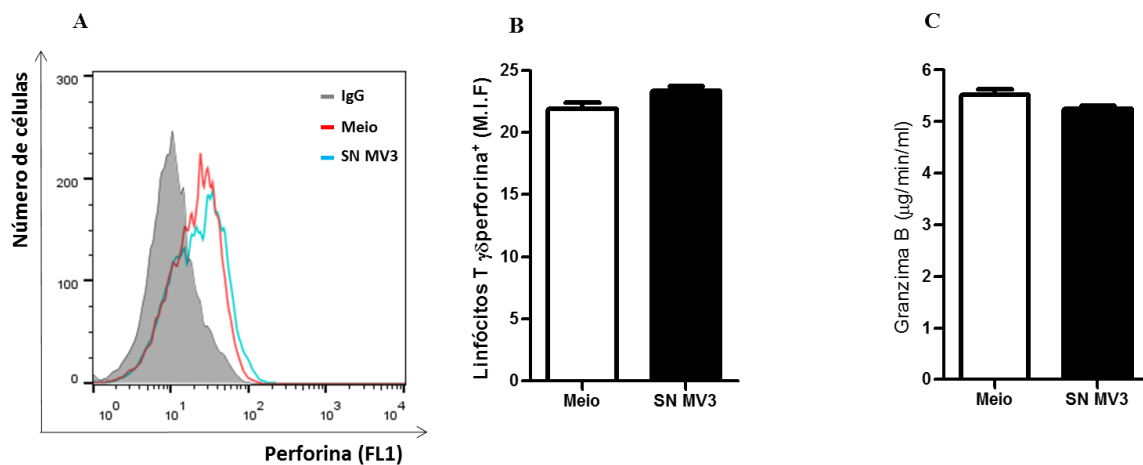


Figura 15. Quantificação de perforina intracelular e liberação de granzima B por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com meio ou sobrenadante de células MV3. (A) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de perforina por linfócitos T $\gamma\delta$. (B) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ perforina+. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®] (C) Dosagem de granzima B no sobrenadante de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com o sobrenadante de células MV3. Análise realizada através do kit Granzyme B Activity Fluorometric Assay Kit (Biovision). A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) ($\lambda_{ex} 380$, $\lambda_{em} 500$). Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2.5. Efeito do sobrenadante de células MV3 sobre a migração de linfócitos T $\gamma\delta$

Afim de investigar se o sobrenadante de células de melanoma humano MV3, contendo PGE₂, além de possuir efeitos sobre a atividade de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células tumorais MV3, também seria capaz de modular a atividade migratória destas células e assim diminuir sua migração para o microambiente tumoral, realizamos o ensaio de quimiotaxia. Como demonstrado abaixo, a incubação de linfócitos T $\gamma\delta$ com o sobrenadante de células MV3 não alterou significativamente o número de linfócitos T $\gamma\delta$ que migraram em direção ao fator quimiotático LTB₄ quando comparado com o grupo controle (meio) (**figura 16**). O grupo de linfócitos T $\gamma\delta$ migrando em direção ao meio RPMI (sem adição de LTB₄) foi utilizado com controle negativo do ensaio.

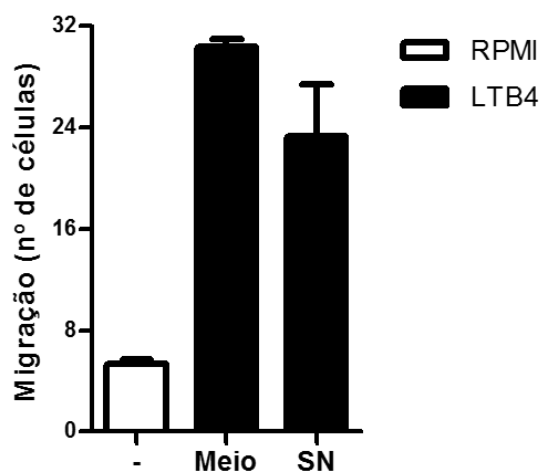


Figura 16. Ensaio de quimiotaxia de linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com meio ou sobrenadante de células MV3. Quantificação do número de células que migraram em direção ao fator quimiotático LTB₄ (100nM). Migração de linfócitos T $\gamma\delta$ em direção ao meio RPMI foi utilizado como controle negativo. Resultados expressos como média \pm EPM. Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3. Envolvimento da chaperona HSP90 sobre a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$

4.3.1. O inibidor de HSP90 17-AAG não afeta a viabilidade de células MV3

Inibidores da chaperona HSP90 tem sido amplamente estudados como ferramentas potenciais no tratamento contra o câncer, uma vez que esta chaperona é responsável pelo enovelamento e pela estabilidade de diversas proteínas pró-tumorais. Apesar de não ser descrito na literatura que COXs são proteínas clientes da chaperona HSP90, avaliamos se a inibição da HSP90 poderia afetar indiretamente a produção de PGE₂ pelas células de melanoma humano MV3. Inicialmente, avaliamos a viabilidade das células MV3 após incubação com o inibidor de HSP90, 17-AAG, através do ensaio de resazurina. Nossos resultados demonstram que o tratamento com 17-AAG não afetou, em nenhuma das concentrações (0,25-2 μ M), o número de células viáveis 24 horas após o tratamento (**figura 17**). Assim, a dose de 1 μ M de 17-AAG foi utilizada nos tratamentos posteriores, uma vez que é a concentração amplamente utilizada na literatura e não induziu morte celular no nosso modelo.

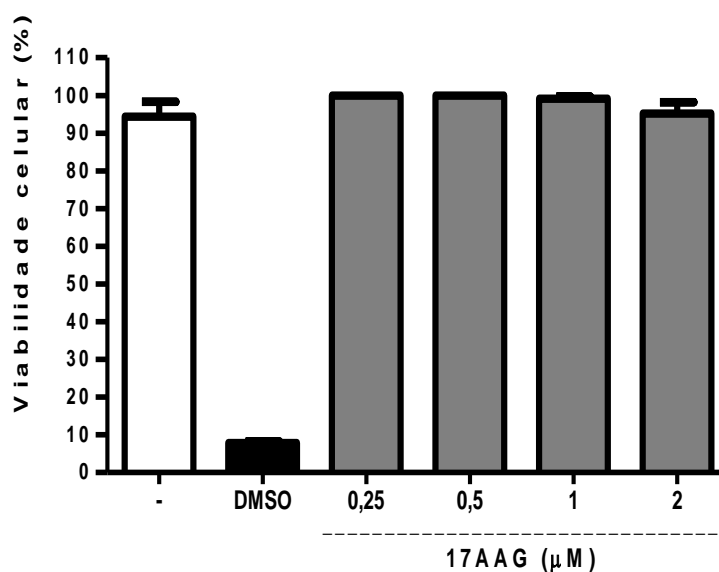


Figura 17. Viabilidade das células de melanoma humano MV3 ($1,5 \times 10^4$ /poço) após tratamento com 17-AAG (0,25-2 μ M) por 24 horas. Células MV3 incubadas com DMSO (10%) foram utilizadas como controle positivo. Análise realizada pelo método de redução de resazurina. A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) ($\lambda_{ex}555$, $\lambda_{em} 585$). Resultados expressos como média de porcentagem. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3.2. O tratamento de células MV3 com 17-AAG diminui a liberação de PGE₂

Observamos que o tratamento de células de melanoma humano MV3 com 17-AAG (1 μ M) reduziu significativamente a produção de PGE₂ após 2 e 24 horas (**figura 18 A e B, respectivamente**). Vale ressaltar que, ambos os sobrenadantes foram recolhidos após 24 horas de cultivo. Estes dados confirmam a importância da HSP90 para a produção de PGE₂.

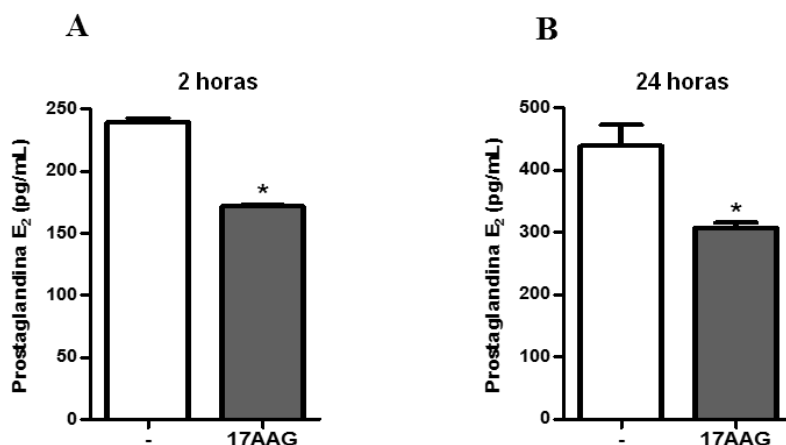


Figura 18. Quantificação de PGE₂ produzido por células de melanoma humano MV3 (2×10^5 /poço) após tratamento 17-AAG (1 μ M). (A) Resultados expressos como média \pm EPM após 2 horas de tratamento. (B) Resultados expressos como média \pm EPM após 24 horas de tratamento. Ambos os sobrenadantes foram recolhidos após 24 horas de cultivo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM e as diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3.3. Efeito da 17-AAG sobre a expressão de proteínas por células MV3

Nossos resultados demonstram que o tratamento de células de melanoma humano MV3 com 17-AAG não altera a expressão das enzimas COX-1 e COX-2 (**figura 19 A e B**). A avaliação da expressão da chaperona HSP70 foi realizada como controle de atividade da 17-AAG uma vez que inibidores de HSP90 (ligantes da porção N-terminal) induzem a expressão de HSP70 em resposta à indução de choque térmico (**figura 19 C**).

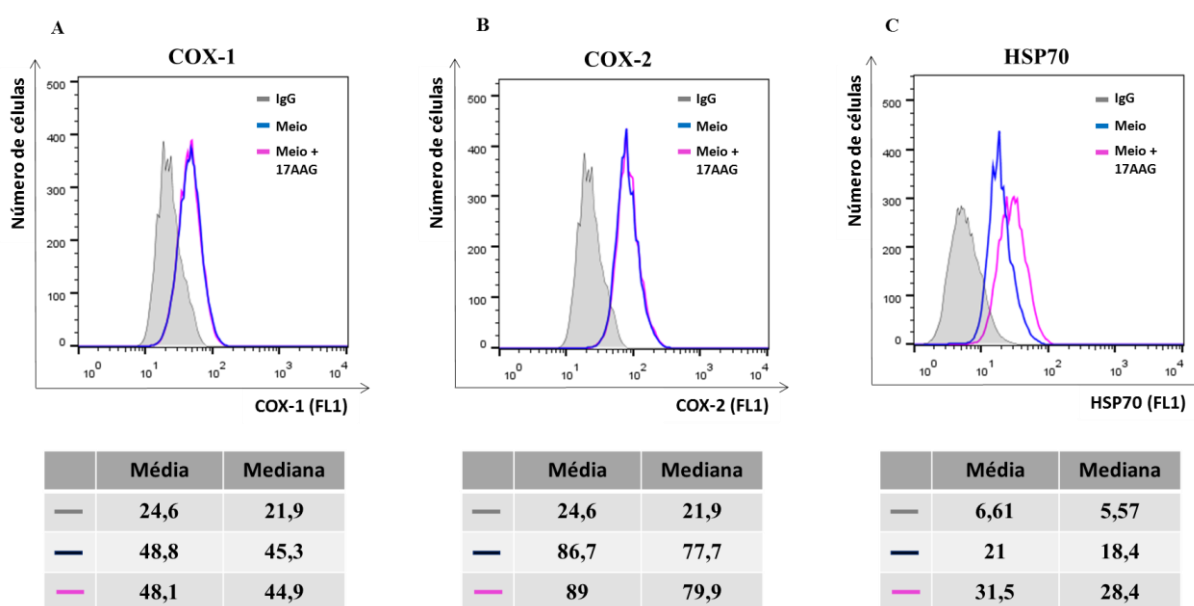


Figura 19. Expressão de COX-1, COX-2 e HSP70 após tratamento de células de melanoma humano MV3 com 17-AAG (1 μ M) por 2 horas. (A) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de COX-1 por células MV3. (B) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de COX-2 por células MV3. (C) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de HSP70 por células MV3. Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.3.4. Sobrenadante de células MV3 tratadas com 17-AAG não induz a morte de linfócitos T $\gamma\delta$

Em seguida investigamos se o sobrenadante de células de melanoma humano MV3, contendo níveis reduzidos de PGE₂ devido ao tratamento com o inibidor de HSP90 17-AAG (1 μ M), afeta a viabilidade de linfócitos T $\gamma\delta$. Nossos resultados demonstram que a incubação de linfócitos T $\gamma\delta$ com o sobrenadante de células MV3 tratadas com 17-AAG (2 e 24 horas) não induziu a morte destes linfócitos. Como controle positivo de morte, linfócitos T $\gamma\delta$ foram incubados com tween 10% por 24 horas, o qual induz morte celular (**figura 20**).

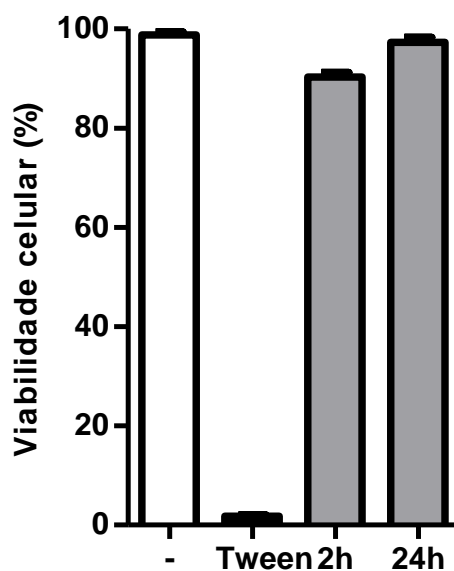


Figura 20. Viabilidade de linfócitos T $\gamma\delta$ (2×10^5 /poço) após incubação com o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 previamente tratadas com 17-AAG (1 μ M) por 2 e 24h. Análise realizada pelo método de redução de resazurina. Linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com tween 10% foram utilizados como controle positivo. A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) (λ_{ex} 555, λ_{em} 585). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3.5. Efeito do sobrenadante de células MV3 pré-tratadas com 17-AAG na expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$

Para investigar se o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 altera a expressão do receptor de PGE₂, EP4, na superfície de linfócitos T $\gamma\delta$ realizamos o ensaio de citometria de fluxo. Como observado na **figura 21**, o sobrenadante de células MV3 pré-tratadas com 17-AAG exerce um efeito semelhante ao do sobrenadante de células MV3 não tratadas (**tópico 4.2.3, figura 11**) sobre a expressão de EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$.

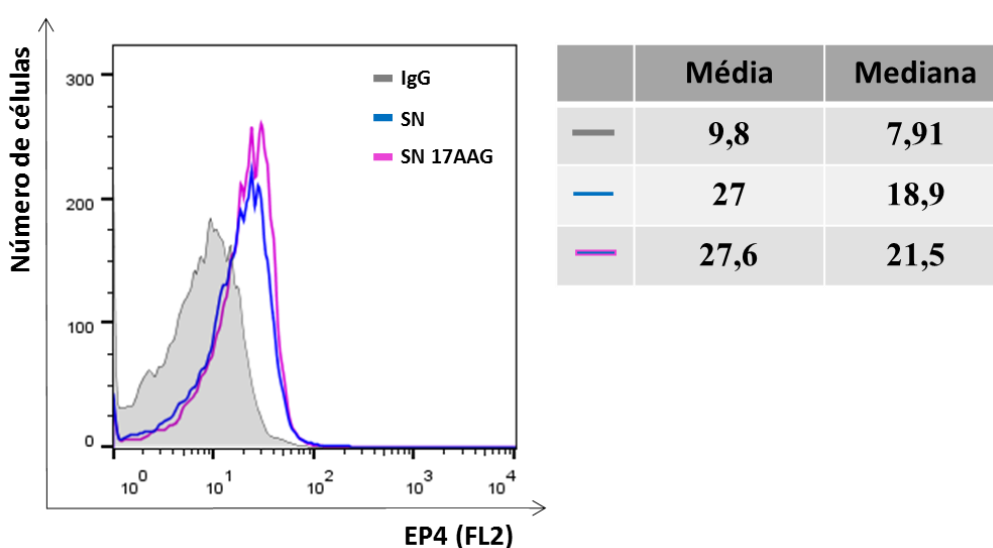


Figura 21. Análise da expressão do receptor EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 pré-tratadas com 17-AAG. Histograma representativo da análise da expressão de EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$. Tabela contendo média \pm EPM e mediana \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ EP4⁺. Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

4.3.6. Efeitos do sobrenadante de células MV3 pré-tratadas com 17-AAG sobre a atividade citotóxica e migratória de linfócitos T $\gamma\delta$

A fim de investigar se a incubação dos linfócitos T $\gamma\delta$ com o sobrenadante de células de melanoma humano MV3, contendo níveis reduzidos de PGE₂ devido ao tratamento com 17-AAG (1 μ M), modula a atividade citotóxica dessas células avaliamos: i) a capacidade de indução de morte das células tumorais MV3, ii) a produção de INF- γ e iii) a degranulação (CD107a, granzima e perforina) de linfócitos T $\gamma\delta$ após a incubação com o sobrenadante de células MV3 tratadas, ou não, com 17-AAG. Como demonstrado a seguir, linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com o sobrenadante de células MV3 tratadas apresentaram um leve aumento da capacidade de induzir a morte das células tumorais MV3 (**figura 22 A-B**). Ainda, houve também aumentos sutis na produção de INF- γ e expressão do marcador de degranulação CD107a, **figuras 23 (A-D)** e **24 (A-D)**, respectivamente. No entanto, não observamos alterações na produção de perforina (**figura 24 E-F**) e liberação de granzima (**figura 24 G**) por linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com o sobrenadante de células MV3 tratadas. Ainda, avaliamos o efeito do sobrenadante de células MV3 tratadas, ou não, com 17-AAG sobre a capacidade migratória de linfócitos T $\gamma\delta$. Nossos resultados demonstram que a incubação de linfócitos T $\gamma\delta$ com o sobrenadante de células MV3 tratadas aumentou significativamente o número de linfócitos T $\gamma\delta$ que migraram em direção ao fator quimiotático LTB₄ quando comparado com o grupo controle (linfócitos T $\gamma\delta$ incubados apenas com o sobrenadante das células MV3) (**figura 25**).

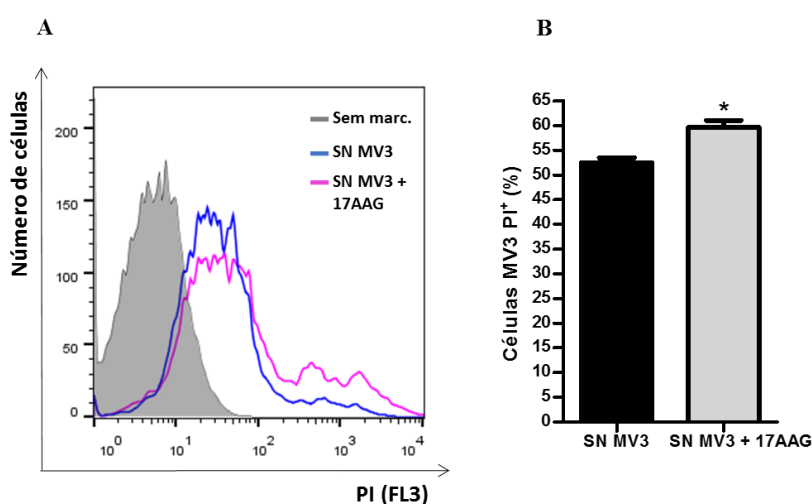


Figura 22. Ensaio de *killing* de células de melanoma humano MV3 por linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com o sobrenadante de células MV3 tratadas, ou não, com 17-AAG (1 μ M) por 2 horas. (A) Histograma representativos da análise de células MV3 PI⁺. (B) Resultados expressos como média \pm EPM de células MV3 PI⁺. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®]

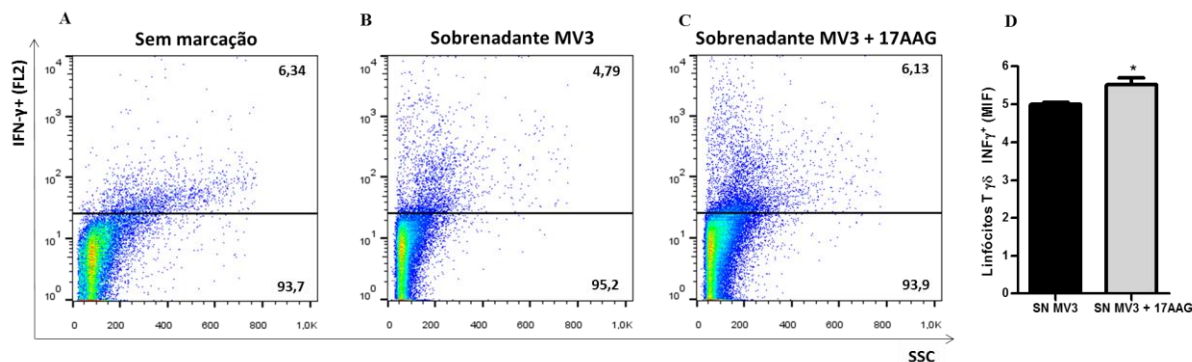


Figura 23. Quantificação de IFN- γ intracelular de linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com o sobrenadante de células MV3 tratadas, ou não, com 17-AAG (1 μ M) por 2 horas. (A-C) *Dot plots* representativos da análise da quantificação intracelular de IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$. (D) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ IFN- γ +. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises

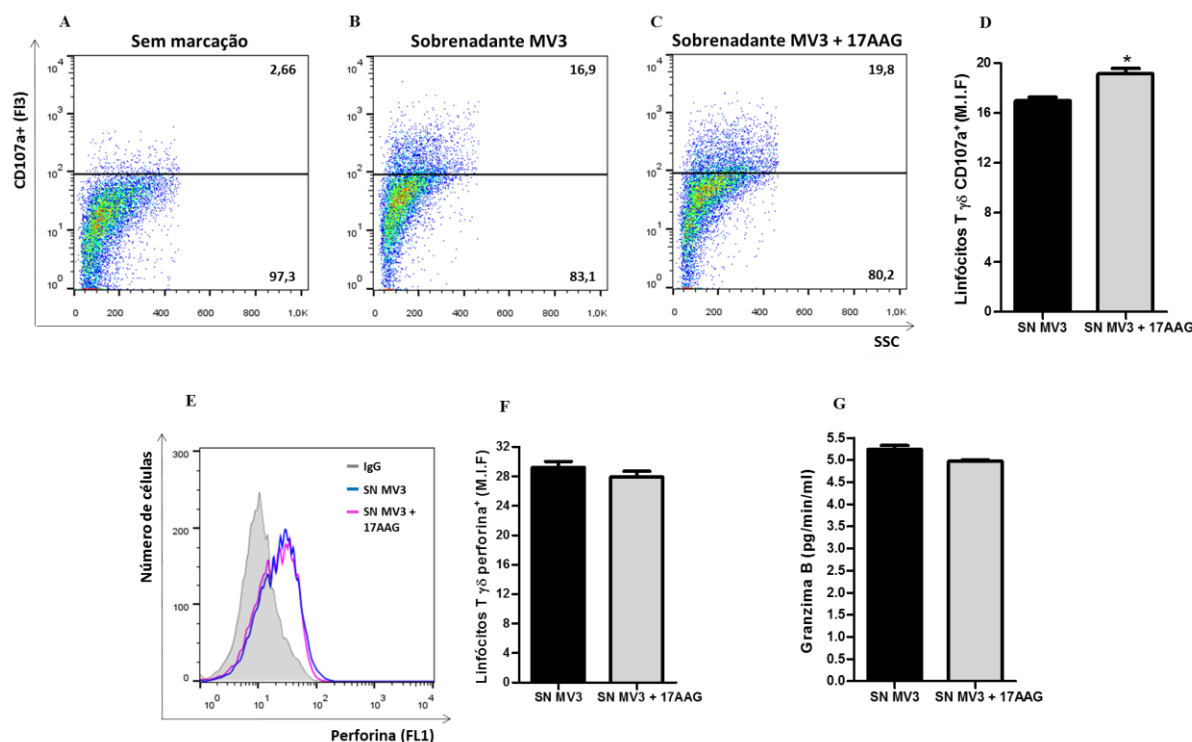


Figura 24. Análise de degranulação e migração de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 tratadas, ou não, com 17-AAG (1 μ M) por 2 horas. (A-C) *Dot plots* representativos da análise da expressão de CD107a por linfócitos T $\gamma\delta$. (D) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ CD107a+. (E) Histograma representativo da análise da quantificação intracelular de perforina por linfócitos T $\gamma\delta$. (F) Resultados expressos como M.I.F. (mediana de intensidade de fluorescência) \pm EPM de linfócitos T $\gamma\delta$ perforina+. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) e as análises realizadas no programa FlowJo 5.1[®] (G) Dosagem de granzima B no sobrenadante de linfócitos T $\gamma\delta$ incubados com o sobrenadante de células MV3 tratadas com 17-AAG. Análise realizada através do kit Granzyme B Activity Fluorometric Assay Kit (Biovision). A leitura foi realizada em leitor multimodal M5 (Molecular Devices) ($\lambda_{ex}380$, $\lambda_{em}500$).

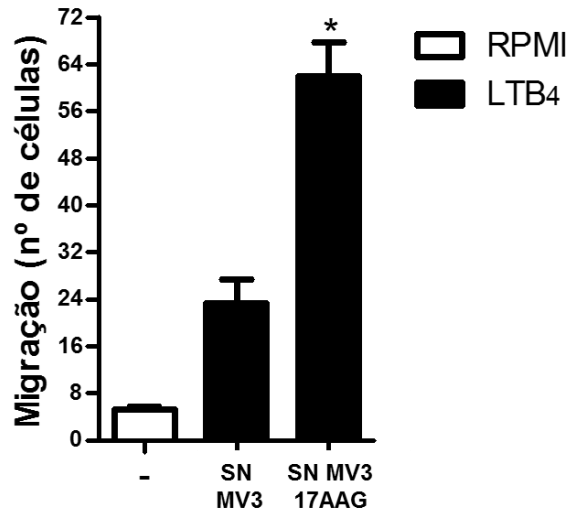


Figura 25. Ensaio de quimiotaxia de linfócitos T $\gamma\delta$ após incubação com o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 tratadas, ou não, com 17-AAG. Quantificação do número de células que migraram em direção ao fator quimiotático LTB₄ (100nM). Migração de linfócitos T $\gamma\delta$ em direção ao meio RPMI foi utilizado como controle negativo. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o grupo tratado e o não tratado estão indicadas por (*). Resultados representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5. Discussão

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são um subtipo de linfócitos T citotóxicos que apresenta características antitumorais únicas e promissoras no campo da imunoterapia. No entanto, no microambiente tumoral, suas funções podem ser moduladas positivamente ou negativamente, devido à plasticidade funcional destas células e à capacidade dos tumores de criarem um microambiente imunossupressor que possibilita sua evasão do sistema imune (Holtmeier & Kabelitz, 2005; Paul *et al.*, 2014; Elena Lo Presti *et al.*, 2018). Neste cenário, a compreensão dos mecanismos moduladores de linfócitos T $\gamma\delta$ no sítio tumoral é de extrema importância. Neste trabalho, identificamos o mediador lipídico PGE₂ como modulador de linfócitos T $\gamma\delta$, reduzindo sua atividade citotóxica contra células de melanoma humano MV3.

É bem estabelecido que a PGE₂ desempenha um papel pró-tumoral proeminente, estimulando o crescimento, a metástase, a angiogênese e a evasão tumoral (Nakanishi & Rosenberg, 2013). Por esse motivo, este mediador lipídico vem sendo estudado como um alvo em potencial em terapias contra o câncer, demonstrando resultados promissores (Wilson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). Estudos prévios observaram o envolvimento da PGE₂ com a imunossupressão local, exercendo efeitos inibitórios importantes sobre as atividades de linfócitos T $\alpha\beta$ (Fischer *et al.*, 1981; Rojo *et al.*, 1982; Kaufmann *et al.*, 1982). No entanto, os efeitos deste mediador sobre a atividade de linfócitos T $\gamma\delta$ são pouco conhecidos.

A PGE₂ é reconhecida por receptores EP acoplados à proteína G, os quais se apresentam em isoformas distintas (EP1-4). Os efeitos inibitórios gerados pela PGE₂ sobre a citotoxicidade destas células ocorrem principalmente devido à ativação dos receptores dependentes de adenilato ciclase EP2 e EP4 (Nataraj *et al.*, 2001; Boniface *et al.*, 2009; Martinet *et al.*, 2009). Trabalhos publicados por Martinet e colaboradores (2009; 2010) demonstram que linfócitos T $\gamma\delta$ expressam em sua superfície os receptores de PGE₂ EP2, EP3 e EP4. Corroborando com esses dados, neste estudo também observamos a expressão de EP4 por linfócitos T $\gamma\delta$. Adicionalmente, nos certificamos que este receptor continuava sendo expresso mesmo após incubação com PGE₂ exógena ou sobrenadante de células MV3, uma vez que a isoforma EP4 pode sofrer internalização e/ou dessensibilização devido a sua estrutura molecular (Desai *et al.*, 2000).

De acordo com a literatura a PGE₂ modulada negativamente a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$. No entanto, diferentemente dos linfócitos T $\alpha\beta$ que já vem sendo estudado a

anos e diversos mecanismos pelos quais a PGE₂ age sobre estas células já foram elucidados, (Fischer *et al.*, 1981; Gemsa *et al.*, 1982; Goodwin & Ceuppens, 1983; Maca, 1983), pouco se sabe sobre os efeitos e mecanismos envolvidos na modulação das funções efetoras dos linfócitos $\gamma\delta$ por este mediador lipídico. No presente estudo demonstramos que a PGE₂ modula negativamente a capacidade dos linfócitos T $\gamma\delta$ de matar células de melanoma humano MV3. Dados similares do envolvimento da PGE₂ com a redução da capacidade de lise de células tumorais por linfócitos T $\gamma\delta$ foram observados em outras linhagens celulares tumorais, como em células de mastocitoma (Martinet *et al.*, 2010), linfoma (Martinet *et al.*, 2009) e células de adenocarcinoma de ovário (Lavoué *et al.*, 2011). Estes dados em conjunto demonstram um papel da PGE₂ sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra diferentes células tumorais.

A liberação de IFN- γ e de grânulos citotóxicos são mecanismos cruciais na atividade de linfócitos T $\gamma\delta$ contra tumores (Chien. *et al.*, 2014). A citocina antitumoral IFN- γ diminui o crescimento de tumores induzindo a interrupção do ciclo celular e apoptose das células tumorais (Ling & Jian, 2018); enquanto a liberação de grânulos citotóxicos por linfócitos T $\gamma\delta$ causam a morte da célula alvo por apoptose. O marcador CD107a está envolvido no processo de degranulação, sendo expresso na superfície dos linfócitos T antes da liberação das moléculas citotóxicas granzima e perforina (Lieberman, 2003). Como demonstrado neste trabalho, a incubação com PGE₂ exógena reduziu significativamente a produção intracelular de IFN- γ e a expressão do marcador de degranulação CD107a nos linfócitos T $\gamma\delta$, mecanismo pelo qual reduziu significativamente a capacidade destas células em matarem as células MV3. Trabalhos publicados por Martinet e colaboradores (2009 e 2010) corroboram com os resultados observados neste estudo. O grupo observou que ao adicionarem PGE₂ exógena à cultura de linfócitos T $\gamma\delta$ purificados de tecidos frescos ou de linfócitos T V γ 9V δ 2 de linhagem, ocorreu a redução significativa da citotoxicidade destas células, diminuindo, além da atividade lítica, a expressão do marcador de degranulação CD107a e a liberação das citocinas antitumorais INF- γ e TNF- α (Martinet *et al.*, 2009; Martinet *et al.*, 2010).

Linfócitos T $\gamma\delta$ maduros saem do timo com funções efetoras pré-determinadas, se distribuem especificamente em diferentes tecidos e são atraídos, por moléculas quimiotáticas (por exemplo, o mediador lipídico LTB₄), para o sítio inflamado onde exercem suas funções efetoras. No microambiente tumoral, os linfócitos T $\gamma\delta$ iniciam suas atividades antitumorais após serem ativados por metabólitos fosforilados secretados pelo próprio tumor (Paul *et al.*, 2014; Shawn *et al.*, 2014). Neste trabalho observamos que a PGE₂, além de reduzir a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ contra as células tumorais, também modula negativamente a sua capacidade migratória. Vale ressaltar que os poucos trabalhos publicados avaliam

prioritariamente os efeitos da PGE₂ sobre a modulação da atividade citotóxica dos linfócitos T $\gamma\delta$ e não foi encontrado na literatura relatos sobre os efeitos da PGE₂ na capacidade migratória destas células. No entanto, este é um ponto importante a ser estudado, uma vez que os linfócitos T $\gamma\delta$ precisam alcançar o tumor para então serem ativados e modulados pela PGE₂.

Diversos trabalhos da literatura demonstram que diferentes tipos de tumores apresentam níveis aumentados de PGE₂ e relacionam este aumento com a invasividade do tumor e pior prognóstico da doença (Tsuji *et al.*, 1997; Ristimaki *et al.*, 2002; Pockaj *et al.*, 2004). Foi demonstrado por Pockaj e colaboradores em 2004, que a região de sítios primários de tumores de mama apresenta maiores concentração de PGE₂ quando comparado com o tecido saudável adjacente, e os tecidos de nódulos linfáticos metastizados por este tumor apresentam níveis ainda mais elevados deste mediador lipídico. Tal aumento está correlacionado com a redução das funções efetoras de linfócitos T, redução das concentrações de citocinas secretadas por linfócitos Th1 e aumento das concentrações de citocinas secretadas por linfócitos Th2 (Pockaj *et al.*, 2004). De fato, também observamos *in vitro* que células tumorais de melanoma humano MV3 expressam as enzimas ciclooxigenases (COX)-1 e -2 (responsáveis pela síntese da PGE₂) e secretam PGE₂ no sobrenadante. Ainda, foi apresentado os efeitos inibitórios (apesar de sutis) deste sobrenadante sobre a atividade citotóxica dos linfócitos T $\gamma\delta$, reduzindo a capacidade de matar as células MV3, a produção de IFN- γ , bem como a expressão do marcador CD107a. É indiscutível que o sobrenadante de células tumorais é composto por diversos mediadores que possuem tanto efeitos antitumorais quanto pró-tumorais. No entanto, Lavoué e colaboradores (2011) demonstram um papel de destaque da PGE₂ contida no sobrenadante ascítico da cavidade peritoneal de pacientes com adenocarcinoma ovariano sobre a modulação negativa da atividade citotóxica de linfócitos T V γ 9V δ 2. Após quantificarem a presença de mediadores solúveis VEGF, IL-10, IL-6 e PGE₂ no sobrenadante ascítico, foi observado que a PGE₂ sozinha, mas não TGF- β , VEGF, IL-10 ou IL-6, reduziu, de maneira dose-dependente, a expressão do marcador CD107a, bem como as propriedades líticas de linfócitos T V γ 9V δ 2 contra células de ovário. Este efeito foi atenuado após a adição de inibidores da via de PGE₂ (Lavoué *et al.*, 2012). Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste estudo e fortalecem para um possível envolvimento da PGE₂ na redução das atividades dos linfócitos T $\gamma\delta$.

A HSP90 é uma chaperona altamente expressa por células tumorais que dependem dessa para o enovelamento e atividade de inúmeras proteínas (Sharp & Workman, 2006; Tsutsumi & Neckers, 2007; Faingold *et al.*, 2008). Neste estudo, observamos que a inibição da atividade de HSP90 em células de melanoma humano MV3 utilizando a 17-AAG reduziu os níveis de PGE₂

presentes no seu sobrenadante. Resultados similares foram encontrados pela primeira vez por Mohammadi e colaboradores (2016) que relataram efeitos inibitórios da 17-AAG sobre a secreção de PGE₂ por células de carcinoma de colorretal HT-29 após indução com Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA), um potente ativador de NF-κB – regulador transcricional da expressão induzida de diversos genes, incluindo genes responsáveis pela codificação de COX-2 e HSP90 (Lim *et al.*, 2001; Ammirante *et al.*, 2008). O grupo relatou ainda que tal inibição (da produção de PGE₂) ocorria via modulação negativa da enzima de síntese COX-2 e modulação positiva da enzima de degradação 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase (15-PGDH).

As enzimas COX-2 e 15-PGDH são mutuamente reguladas no tecido tumoral. Trabalhos demonstram um aumento concomitante da expressão de COX-2 com redução da expressão de 15-PGDH em diversos tipos de tumores (Na *et al.*, 2011). No nosso modelo, avaliamos a expressão das enzimas COX-1 e -2, as quais não foram moduladas após o tratamento com 17-AAG. À frente disso, hipotetizamos que três questões podem explicar este resultado: i) o efeito inibitório da 17-AAG sobre os níveis de PGE₂ por células de melanoma humano MV3 está relacionado, principalmente, com a modulação positiva da enzima de degradação 15-PGDH, ii) para investigar os mecanismos pelos quais tal efeito está acontecendo se faz necessária utilização de ativadores potentes da via, como o uso de PMA e/ou iii) o tratamento com 17-AAG modula a atividade destas enzimas sem alterar a expressão das mesmas. No entanto, independente do mecanismo envolvido nesta inibição, parece que ao induzir tal efeito tendemos a reverter sutilmente os impactos inibitórios deste mediador lipídico sobre a atividade antitumoral dos linfócitos T γδ. A utilização de inibidores seletivos da via de síntese da PGE₂, como os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), resultaria em efeitos mais específicos, porém, o uso de inibidores de HSP90 modula simultaneamente diferentes vias de sinalização relacionadas ao processo tumorigênico. Neste contexto, o desenvolvimento de uma terapia capaz de afetar diretamente o crescimento e proliferação da célula tumoral (dados interessantes para serem investigados em um próximo estudo) e, concomitantemente, reverter a imunossupressão local gerada pelo tumor apresentaria grande relevância no tratamento de pacientes portadores da doença.

É importante ressaltar que, apesar de efeitos evidentes sobre a modulação da expressão de CD107a (molécula expressa primariamente na superfície de linfócitos T durante o processo de degranulação) terem sido observados, as análises dos grânulos citotóxicos de granzima e perforina, não evidenciaram resultados tão perceptíveis. De fato, há dificuldades na detecção destas moléculas devido à período de tempo de estímulo, estabilidade e/ou degradação e

conformação estrutural durante o processo de maturação dos grânulos. Diante disso, alguns trabalhos desenvolveram protocolos adicionais para ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência que facilitam, por exemplo, a detecção de moléculas de perforina (Hersperger, 2008; Brennan *et al.*, 2014).

Em suma, observamos que tanto a PGE₂ exógena quanto o sobrenadante de células de melanoma humano MV3 contendo PGE₂ modulam negativamente a atividade antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$ e que a atividade chaperona da HSP90 é importante para a secreção de PGE₂ por células tumorais. Ainda, demonstramos que a inibição da atividade da HSP90 de células MV3 (através do tratamento com o inibidor 17-AAG) reduz os níveis de PGE₂ no sobrenadante destas células. Este sobrenadante (contendo níveis reduzidos de PGE₂) possui um efeito imunomodulador reduzido sobre a atividade citotóxica de linfócitos T $\gamma\delta$ quando comparado ao sobrenadante de células MV3 não tratadas. Acreditamos que este estudo gerou informações relevantes sobre o conhecimento da resposta imune antitumoral, confirmando dados já publicados e apresentando novos resultados sobre os efeitos moduladores da PGE₂ sobre a atividade de linfócitos T $\gamma\delta$ contra células de melanoma humano, o que pode contribuir para a otimização de imunoterapias.

6. Conclusão

A atividade antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$ é modulada negativamente pelo mediador lipídico PGE₂ produzido por células de melanoma humano MV3. A chaperona HSP90 é importante para a produção de PGE₂ e sua inibição implica na redução da atividade imunomoduladora de células MV3 sobre a citototoxicidade de linfócitos T $\gamma\delta$ contra tumores.

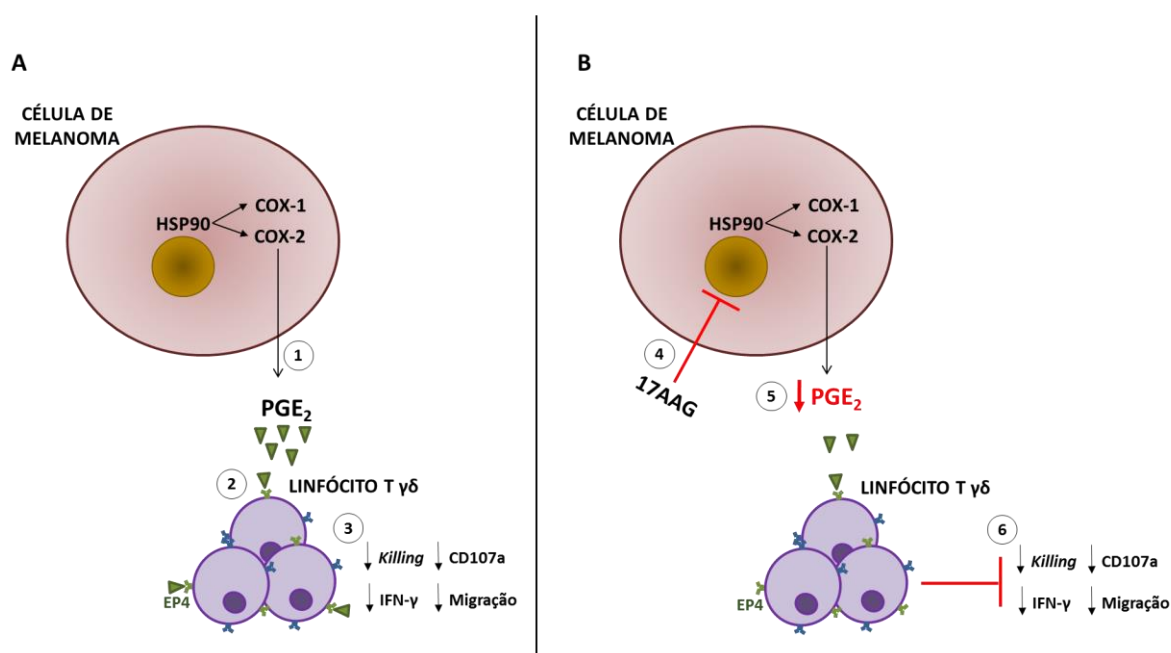


Figura 5.1. Efeitos da PGE₂ sobre a atividade antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$. (A) [1] Células de melanoma humano MV3 sintetizam PGE₂ via a ação das enzimas COX-1 e COX-2, cuja expressão é indiretamente modulada pela chaperona HSP90. [2] PGE₂ interage com receptores EP4 expressos por linfócitos T $\gamma\delta$, [3] modulando negativamente a capacidade de *killing*, a produção IFN- γ , a expressão do marcador de degranulação CD107a e a migração destas células. (B) [4] Tratamento de células MV3 com o inibidor de HSP90 (17-AAG) [5] reduz a produção de PGE₂ e, consequentemente [6] o seu efeito imunossupressor sobre a atividade antitumoral de linfócitos T $\gamma\delta$. **COX** (ciclooxigenase); **CD** (cluster de diferenciação); **HSP** (*heat shock protein*); **IFN** (interferon); **PG** (prostaglandina).

7. Referências

1. Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9:679-705.
2. Altincicek B, Moll J, Campos N, Foerster G, Beck E, Hoeffler JF, Grosdemange-Billiard C, Rodriguez-Concepcion M, Rohmer M, Boronat A, Eberl M, Jomaa H: Cutting edge: Human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol.* 2001;166:3655–3658
3. Ascierto A., Atkins M., Bifulco C. Future perspectives in melanoma research: meeting report from the “melanoma bridge”: Napoli, December 3rd–6th 2014. *Journal of Translational Medicine.* 2015;30(13):p. 374
4. Banerji U, O'Donnell A, Scurr M, Pacey S, Stapleton S, Asad Y, Simmons L, Maloney A, Raynaud F, Campbell M, Walton M, Lakhani S, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23, 4152–4161
5. Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M. IL-21 enhances the potential of human gammadelta T cells to provide B-cell help. *Eur J Immunol.* 2012;42:110–119
6. Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, et al. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J Immunol.* 1997; 159:3723–3730
7. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med.* 2009; 206(3):535-48
8. Born WK, O'Brien RL. Antigen-restricted gammadelta T-cell receptors?. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009; 57(2):129-35
9. Brennan AJ, House IG, Oliaro J, Ramsbottom KM, Hagn M, Yagita H, et al. A method for detecting intracellular perforin in mouse lymphocytes. *J Immunol.* 2014; 193(11):5744-50
10. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE. "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; no. 93 (15):7673-8

11. Buccheri S, Guggino G, Caccamo N, Li Donni P, Dieli F. Efficacy and safety of $\gamma\delta$ T cell-based tumor immunotherapy: a meta-analysis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014; 28:81–90
12. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB: Recognition and destruction of virus-infected cells by human γ CTL. *J Immunol*. 1994; 153:5133–5140
13. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood*. 2011; 118:129–38
14. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, Angelini D, Borsellino G, Poccia F, et al. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human V γ 9V δ 2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol*. 2005; 35:1764–72
15. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14:511-32
16. Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev*. 2007 Feb;215:46-58
17. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32:121-55
18. Dalton JE, Pearson J, Scott P, Carding SR. The interaction of gamma delta T cells with activated macrophages is a property of the V gamma 1 subset. *J Immunol*. 2003; 171:6488–6494
19. Desai S, April H, Nwaneshiudu C, Ashby B. Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol Pharmacol*. 2000; 58(6):1279-86
20. Dieli F, Gebbia N, Poccia F, Caccamo N, Montesano C, Fulfaro F, Arcara C, Valerio MR, Meraviglia S, Di Sano C, Sireci G, Salerno A: Induction of γ T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood*. 2003; 102: 2310–2311
21. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, et al. Differentiation of effector/memory V δ 2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med*. 2003; 198:391–7

22. Dodd J, Riffault S, Kodituwakku JS, et al. Pulmonary V gamma 4+ gamma delta T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease. *J Immunol.* 2009; 182:1174–1181
23. Dudley EC, Girardi M, Owen MJ, Hayday AC. Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr. Biol.* 1995; 5:659–669
24. Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas AK, Wiesner J, Jomaa H. Microbial isoprenoid biosynthesis and human $\gamma\delta$ T cell activation. *FEBS Lett.* 2003; 544:4–10
25. Lo Presti E, Pizzolato G, Corsale AM, Caccamo N, Sireci G, Dieli F, Meraviglia, S. $\gamma\delta$ T Cells and Tumor Microenvironment: From Immunosurveillance to Tumor Evasion. *Front Immunol.* 2018; 9: 1395
26. Lo Presti E, Pizzolato G, Gulotta E, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, Meraviglia S. Current Advances in $\gamma\delta$ T Cell-Based Tumor Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017; 8: 1401
27. Adams EJ, Gu S, Luoma AM. Human gamma delta T cells: evolution and ligand recognition. *Cell Immunol.* 2015 Jul; 296(1): 31–40
28. Faingold D, Marshall, JC, Anteck, E, Di Cesare, S, Odashiro, AN, Bakalian S, Fernandes BF, Burnier MN Jr. Immune expression and inhibition of heat shock protein 90 in uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(3):847-55
29. Fang H, Welte T, Zheng X, et al. gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59:71–80
30. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature.* 1995; 373(6511):255-7
31. Fischer A, Durandy A, Griscelli C. Role of prostaglandin E2 in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity. *J Immunol.* 1981; 126: 1452–1455
32. Fischer A, Durandy A, Griscelli C. Role of prostaglandin E2 in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity. *J Immunol.* 1981; 126(4):1452-5
33. Flierl MA, Rittirsch D, Gao D, Hoesel LM, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ferrara JL, Ward PA. "Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis." *FASEB J.* 2008; no. 22 (7):2198-205

34. Folha informativa Câncer. Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Disponível em: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839. Acesso: 21/01/2019
35. Garman, RD, Doherty PJ, Raulat, DH. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell*. 1986; no. 45 (5):733-42.7
36. Gemsa D, Leser HG, Deimann W, Resch K. Suppression of T lymphocyte proliferation during lymphoma growth in mice: role of PGE2-producing suppressor macrophages. *Immunobiology*. 1982; 161(3-4):385-91
37. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015; 21:938–45
38. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor $\gamma\delta$ T cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003; 197:163–8
39. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G: Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003; 197:163–168
40. Goetz MP, Toft D, Reid J, Ames M, Stensgaard B, Safgren S, Adjei AA, Sloan J, Atherton P, Vasile V, Salazaar S, Adjei A, et al. Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol*. 2005; 23, 1078–1087
41. Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res*. 2010; no. 70 (24):10024-7
42. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol*. 1983; 3(4):295-315
43. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377–386
44. Grigoriadou K, Boucontet L, Pereira PT. Cell receptor-gamma allele-specific selection of V gamma 1/V delta 4 cells in the intestinal epithelium. *J Immunol*. 2002; 169(7):3736-43

45. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:6879–84
46. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11:637-85
47. Haas JD, González FH, Schmitz S, Chennupati V, Föhse L, Kremmer E, Förster R, Prinz I. CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma producing gamma delta effector T cells. *Eur J Immunol*. 2009; no. 39 (12):3488-97
48. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-74
49. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
50. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*. 2002; 23: 144–150
51. Hayday AC. $\gamma\delta$ T cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:975–1026
52. Hensler S, Mueller MM. Inflammation and skin cancer: old pals telling new stories. *Cancer journal*. 2013; 19:517–24
53. Hersperger AR, Makedonas G, Betts MR. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A*. 2008; 73(11):1050-7
54. Hiasa A, Nishikawa H, Hirayama M, Kitano S, Okamoto S, Chono H, et al. Rapid $\alpha\beta$ TCR-mediated responses in $\gamma\delta$ T cells transduced with cancer-specific TCR genes. *Gene Ther*. 2009; 16:620–8
55. Holtmeier W, Kabelitz D. Gamma delta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy*. 2005; 86:151-83
56. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res*. 2001; 61, 4003–4009
57. 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>

58. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; no. 13 (2):95-109
59. Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 2003; 9: 73–78
60. Isaacs JS, Xu W, Neckers, L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2003; 3, 213–217
61. Murray JL, Kollmorgen GM. Inhibition of lymphocyte response by prostaglandin-producing suppressor cells in patients with melanoma. *Journal of Clinical Immunology.* 1983; Volume 3, Issue 3, pp 268–276
62. Johansson CC, Egyhazi S, Masucci G, Harlin H, Mougiakakos D, Poschke I, Nilsson B, Garberg L, Tuominen R, Linden D, et al. Prognostic significance of tumor iNOS and COX-2 in stage III malignant cutaneous melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy: CII.* 2009; 58:1085–94
63. Johnson D. B., Keiran S. Smalley M., Jeffrey A., Sosman A. Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research.* 2014;20(16):4186–4192
64. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003; 425, 407–410
65. Serre K, Silva-Santos B. Molecular Mechanisms of Differentiation of Murine Pro-Inflammatory $\gamma\delta$ T Cell Subsets. *Front Immunol.* 2013; 4: 431
66. Kaufman K. L., Mactier S., Armstrong N. J., *et al.* Surface antigen profiles of leukocytes and melanoma cells in lymph node metastases are associated with survival in AJCC stage III melanoma patients. *Clinical & Experimental Metastasis.* 2014;31(4):407–421
67. Kaufmann SH, Simon MM, Hahn H. Regulatory interactions between macrophages and T-cell subsets in *Listeria monocytogenes*-specific T-cell activation. *Infect Immun.* 1982; 38: 907–913
68. Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci.* 2007;12:3468-74
69. Lança T, Costa MF, Gonçalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, and SilvaSantos B. "Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic $\gamma\delta$ T lymphocytes to tumor beds." *J Immunol.* 2013; no. 190 (12):6673-80

70. Lavoué V, Cabillic F, Toutirais O, Thedrez A, Dessarthe B, de La Pintièrre CT, et al. Sensitization of ovarian carcinoma cells with zoledronate restores the cytotoxic capacity of V γ 9V δ 2 T cells impaired by the prostaglandin E2 immunosuppressive factor: implications for immunotherapy. *Int J Cancer*. 2012; 131(4):E449-62
71. Lefranc, M. P. Nomenclature of the human T cell receptor genes." *Curr Protoc Immunol*. 2001; no. Appendix 1:Appendix 10
72. Leong S. P., Mihm M. C., Jr., Murphy G. F., et al. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2012;29(7):775–796
73. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3(5), 361–370
74. Lilja A, Weeden CE, McArthur K, Nguyen T, Donald A, Wong ZX, et al. HSP90 inhibition suppresses lipopolysaccharide-induced lung inflammation in vivo. *PLoS One*. 2015; 10(1):e0114975
75. Lipson E. J., Sharfman W. H., Chen S., et al. Safety and immunologic correlates of melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:p. 214
76. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med*. 2018; 7(9): 4509–4516
77. Lo Presti E, Pizzolato G, Gulotta E, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, Meraviglia S. Current Advances in $\gamma\delta$ T Cell-Based Tumor Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017; 8:1401
78. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. "IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection." *J Immunol*. 2006; no. 177 (7):4662-9
79. Maca RD. The effects of prostaglandins on the proliferation of cultured human T lymphocytes. *Immunopharmacology*. 1983; 6(4):267-77
80. Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: The story unfolds. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2002; 2, 3–24
81. Mangan BA, Dunne MR, O'Reilly VP, Dunne PJ, Exley MA, O'Shea D, et al. CD1d restriction and T1/T2/T17 cytokine secretion by human V δ 3 T cells. *J Immunol*. 2013; 191:30–4

82. Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournié JJ, Poupot R. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2009; 39(3):752-62
83. Martinet L, Jean C, Dietrich G, Fournié JJ, Poupot R. 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.* 2010; 80(6):838-45
84. Meraviglia S, Lo Presti E, Tosolini M, La Mendola C, Orlando V, Todaro M, et al. Distinctive features of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes in human colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2017; 6(10):e1347742
85. Meyer S, Fuchs TJ, Bosserhoff AK, Hofstadter F, Pauer A, Roth V, Buhmann JM, Moll I, Anagnostou N, Brandner JM, et al. A seven-marker signature and clinical outcome in malignant melanoma: a large-scale tissue-microarray study with two independent patient cohorts. *PloS one.* 2012; 7:e38222
86. Mohammadi A, Yaghoobi MM, Gholamhoseinian Najar A, Kalantari-Khandani B, Sharifi H, Saravani M. HSP90 Inhibition Suppresses PGE2 Production via Modulating COX-2 and 15-PGDH Expression in HT-29 Colorectal Cancer Cells. *Inflammation.* 2016; 39(3):1116-23.
87. Morita CT, Mariuzza RA, Brenner MB. Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol.* 2000; 22(3):191-217
88. Moser B, Eberl M. gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007; 215:89–102
89. Na HK, Park JM, Lee HG, Lee HN, Myung SJ, Surh YJ. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy. *Biochemical Pharmacology.* 2001; 82: 1352–60
90. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE₂ in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(2):123-37
91. Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001; 108(1):25-30
92. Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, Coffman TM. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest.* 2001; 108(8):1229-35

93. Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *J Immunol.* 2010; 184:7268–80
94. Noguchi A, Kaneko T, Kamigaki T, Fujimoto K, Ozawa M, Saito M. Zoledronate-activated V γ 9 $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapy is feasible and restores the impairment of $\gamma\delta$ T cells in patients with solid tumors. *Cytotherapy.* 2011; 13:92–7
95. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* 1998; 143, 901–910
96. Ohga S, Yoshikai Y, Takeda Y, Hiromatsu K, Nomoto K. 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.* 1990; 20(3):533-8
97. Pacey S, Gore M, Chao D, Banerji U, Larkin J, Sarker S, et al. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs.* 2012 Feb;30(1):341-9
98. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, et al. Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone hsc70. *Mol. Cell.* 2002; 10, 1307–1318
99. Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, Santoni A. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; no. 26 (2):113-20
100. Pearl LH, Prodromou C. Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv. Protein Chem.* 2001; 59, 157–186
101. Petrie HT, Scollay R, Shortman K. 1992. Commitment to the T cell receptor-alpha beta or -gamma delta lineages can occur just prior to the onset of CD4 and CD8 expression among immature thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 1992. 22:2185–2188
102. Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, Gray RJ, Hernandez JL, Gendler SJ, Mukherjee P. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2004; 11(3):328-39
103. Porcelli S, Brenner MB, Band H. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol Rev.* 1991;120:137-83
104. Prinz I, Silva-Santos B, Pennington DJ. Functional development of $\gamma\delta$ T cells. *Eur J Immunol.* 2013; 43(8):1988-94

105. Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:175-207
106. Ribot JC, deBarros 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 gamma delta T cell subsets. *Nat Immunol.* 2009; no. 10 (4):427-36
107. Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment cell & melanoma research.* 2009; 22:175–86
108. Richter K, Buchner J. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol.* 2001; 188, 281–290
109. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002. 62:632–5
110. Rodriguez-Vita J, Lawrence T. The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(1):61-5
111. Rojo JM, Portoles MP, Barasoain I, Portoles A. Exogenous additions of prostaglandins variably alter the blastogenic response of B and T lymphocytes from different mice lymphoid organs. *Immunopharmacology* 1982; 4: 95–104
112. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 1984; 312(5989):36-40
113. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature.* 1984; 309(5971):757-62
114. Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamberg M, Hammarstrom S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem.* 1978; 47: 997–1029
115. Schreiber RD, Celada A, Buchmeier N. The role of interferon-gamma in the induction of activated macrophages. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1986; no. 137C (2):203-6
116. Serre K, Silva-Santos B. Molecular Mechanisms of Differentiation of Murine ProInflammatory $\gamma\delta$ T Cell Subsets. *Front Immunol.* 2013;4:431.

117. Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, Pike SE, Farber JM, Koniaris LG, Vanguri P, Burd PR, Sheikh N, Gupta G, Teruya-Feldstein J, Tosato G. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; no. 93 (24):13791-6
118. Sharp S, Workman P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res*. 2006; 95:323-48
119. Fahl SP, Coffey F, Wiest DL. Origins of $\gamma\delta$ T Cell Effector Subsets: A Riddle Wrapped in an Enigma. *J Immunol*. November 1, 2014; 193 (9) 4289-4294
120. Shibata K, Yamada H, Nakamura M, Hatano S, Katsuragi Y, Kominami R, Yoshikai Y. IFN- γ -producing and IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells differentiate at distinct developmental stages in murine fetal thymus. *J Immunol*. 2014; no. 192 (5):2210-8
121. Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, Flaherty KT, Fisher DE. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget*. 2014; 5:1701–52
122. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014; 64:9–29
123. Singh T, Katiyar SK. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. *PloS one*. 2011; 6:e25224
124. Sireci G, Champagne E, Fournié JJ, Dieli F, Salerno A. Patterns of phosphoantigen stimulation of human V γ 9V δ 2 T cell clones include T0 cytokines. *Hum Immunol*. 1997; 58:70–82
125. Sireci G, Meraviglia S, Stassi G, Dieli F. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human $\gamma\delta$ T cells. *Cell Mol Immunol*. 2013; 10:30 4
126. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2015; Nov;15(11):683-91
127. Smith JW, Steiner AL, Newberry Jr WM, Parker CW. Cyclic adenosine 3 ϕ ,5 ϕ -monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation. *J Clin Invest*. 1971; 50: 432–441.
128. Smith JW, Steiner AL, Parker CW. Human lymphocytic metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin. *J Clin Invest*. 1971; 50: 442–448

129. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res.* 2009; 50(Suppl): S423–S428
130. Sourav P, Singh AK, Shilpi, Lal G. Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in inflammation and tolerance. *Int Rev Immunol.* 2014; 33(6):537-58
131. Sreeramkumar V, Fresno M, Cuesta N. Prostaglandin E₂ and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol.* 2012; 90(6):579-86
132. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 2007; 282(16):11613-7
133. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature.* 1995; 75:155–8
134. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest.* 2001; 108:15–23
135. Todaro M, Orlando V, Cicero G, Caccamo N, Meraviglia S, Stassi G, et al. Chemotherapy sensitizes colon cancer initiating cells to V γ 9V δ 2 T cell-mediated cytotoxicity. *PLoS One.* 2013; 8:e65145
136. Tonegawa S, Berns A, Bonneville M, et al. Diversity, development, ligands, and probable functions of gamma delta T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989; 54(1):31–44
137. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers ML, Vermijlen D, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCR V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology.* 2017; 6:e1284723
138. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human coloncancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3336–40
139. Tsutsumi S, Neckers L. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci.* 2007; 98(10):1536-9
140. Verjans GM, Roest RW, Van Der KA, Van Dijk G, Van Der Meijden WI, Osterhaus AM. Isopentenyl pyrophosphate-reactive V9V2 T helper 1-like cells are the major / T cell subset recovered from lesions of patients with genital herpes. *J Infect Dis.* 2004; 190:489–493
141. Sreeramkumar V, Fresno M, Cuesta N. Prostaglandin E₂ and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol.* 2012; 90(6): 579–586

142. Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology*. 2004; 111(3):298-305
143. Wang D, Buchanan FG, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res*. 2005; 65(5):1822–9
144. Wang L, Kamath A, Das H, Li L, Bukowski JF: Antibacterial effect of human V2V2 T cells in vivo. *J Clin Invest*. 2001; 108:1349–1357
145. Wang M, Yin B, Wang HY and Wang RF. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2014; 6(12):1265-78
146. Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut*. 2006; 55(1):115-22
147. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells toward T1- or T2-phenotype. *Cell Immunol*. 2001; 212:110–7
148. WHOIUIS. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHOIUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. *Immunogenetics*. 1995; no. 42 (6):451-3
149. Wilson JW, Potten CS. The effect of exogenous prostaglandin administration on tumor size and yield in Min/+ mice. *Cancer research*. 2000; 60(16):4645–53
150. Zheng J, Guo Y, Ji X, Cui L, He W. A novel antibody-like TCR $\gamma\delta$ -Ig fusion protein exhibits antitumor activity against human ovarian carcinoma. *Cancer Lett*. 2013; 341:150–8