

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Leila Regina Homem Duarte

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Fernando Aguilhar Arosa
Co-orientador: Mestre André João Gabriel Esgalhado

outubro de 2023

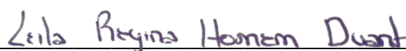
Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Declaração de Integridade

Eu, Leila Regina Homem Duarte, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10199 do 2º Ciclo em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 06 / 10 / 2023



Leila Regina Homem Duarte

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Agradecimentos

Começo por expressar o meu mais sincero agradecimento ao meu orientador Professor Doutor Fernando Arosa. Ao seu conhecimento inegável, à sua prestabilidade, aos seus ensinamentos, à sua ajuda incansável, à sua inteira disponibilidade e até mesmo por toda a paciência para que este trabalho pudesse ser realizado. Nesta caminhada em que nem sempre foi fácil por alguns motivos alheios a todos nós, o professor, esteve sempre lá para nos apoiar e ajudar no que fora necessário, pelo que é no fim desta etapa e no traçar desta meta que lhe escrevo o meu grande obrigada!

Quero também agradecer ao meu co-orientador Mestre André Esgalhado por toda a sua persistência e conhecimento partilhado, por toda a orientação laboratorial fornecida, por todas as suas sugestões enriquecedoras e por todo o seu tempo disponibilizado, mesmo quando este era escasso para ele próprio.

Quanto ao meu parceiro de trabalho de todas as horas, o Hugo, tenho a agradecer-lhe por tudo! A ele devo-lhe um bocadinho desta tese e uma grande parte e anos da minha vida. Foi sempre um apoio como nenhum, esteve sempre presente numa grande parte das conquistas e desafios da minha vida, no bom e no mau, e em praticamente todos estes anos que levo de mestrado. É um apoio incansável, a pessoa que se me perguntassem quem escolheria levar para a vida neste meu percurso académico, certamente seria ele. Obrigada por seres quem és!

À minha família bonita faltam-me as palavras por todo o apoio que me dão, por estarem sempre lá para mim, cada um do seu jeito, mas um jeito que tanto aprecio. Quero agradecer à minha querida mãe pela mulher incrível que é, por me transmitir os valores certos, por me ensinar a ser melhor a cada dia e por me incentivar a lutar todos os dias nesta grande batalha que é a vida. Com 5 filhas incríveis, permitiu que todas nós crescêssemos com os nossos gostos e também defeitos, todas diferentes mas sempre juntas e ao lado desta grande mulher. Às minhas irmãs, Sandra, Cátia, Diana e Salomé, quero agradecer-lhes não só pelo pilar durante esta tese, mas por tudo nesta vida. Sandra, ainda que longe teve sempre a preocupação para comigo. Cátia, por ser a minha segunda mãe, a minha segunda casa, aquela irmã mais velha que cuidou de mim desde pequena e que continuará até ao resto da minha vida. Diana, por todas as suas palavras sábias e ponderadas no tempo certo. Salomé, por todos os bons ralhetes e boas gargalhadas para tudo o que há nesta vida. Agradecer também ao meu padrasto Sérgio, por me ensinar a crescer e por me educar e estimar como

de sua filha se tratasse. Aos últimos membros da família, Guga e Kiara, só tenho a agradecer por serem um mimo diferente na minha vida, por todas as lambidelas menos desejadas, mas por todo o amor que me transmitem. A todos vocês, família, devo-vos tudo e o meu inteiro obrigada!

Aos meus amigos dou-lhes também a minha eterna gratidão. Foram incansáveis neste processo e sem vocês esta conquista não seria possível.

Um agradecimento em especial ao Marcelo por saber lidar exatamente com todas as minhas epifanias que este percurso me causou. Por ser o número um sempre que preciso e por toda a solidariedade nesta difícil batalha. Obrigada de coração!

Quero agradecer também aos meus colegas estagiários do Instituto Hidrográfico da Marinha Portuguesa, João, Marta e Tiago, por todo o apoio incondicional que me têm dado ao longo desta fase atarefada do meu percurso. Agradecer à Filipa, ao Carlos e à Engenheira Carla por terem sido sempre flexíveis e por permitirem a conciliação da minha Dissertação de Mestrado com o meu percurso profissional.

Por fim mas não menos importante, quero agradecer à Universidade da Beira Interior por estes fantásticos anos que foi também a minha casa e ao Instituto Português do Sangue e da Transplantação de Coimbra pelos *buffy-coats* doados que permitiram que este trabalho fosse realizado.

A todos vocês, obrigada!

Resumo

As moléculas de MHC-I e MHC-II são proteínas membranares que funcionam como recetores que ligam e apresentam antigénios peptídicos a populações de linfócitos T CD8⁺ e TCD4⁺, respetivamente, através do recetor clonotípico dos linfócitos T presente na membrana plasmática dos mesmos. A apresentação antigénica entre as moléculas de MHC e os linfócitos T induz a ativação do sistema imunológico contra agressões internas e externas que causam um desequilíbrio da homeostasia tecidual, gerando uma resposta imunológica capaz de repor o microambiente. Sabe-se que as moléculas de MHC-I também apresentam a capacidade de gerar funções não-imunológicas, através de mudanças conformacionais na sua estrutura molecular causadas por uma atividade metabólica aumentada. A mudança de uma conformação fechada (molécula clássica de MHC-I) para uma conformação aberta (molécula não clássica de MHC-I) dá-se pela dissociação da cadeia leve β_2 -microglobulina e/ou o péptido da cadeia pesada transmembranar e pode, portanto, ser crucial para o desenvolvimento de possíveis terapias celulares pela interação *cis* e *trans* com recetores dos linfócitos NK e dos linfócitos T. Esta interação *cis-trans* conduz à ativação destes linfócitos e consecutivamente concebe uma minimização ou um aumento das respostas imunológicas de modo a restabelecer a homeostasia dos tecidos. Considerando o efeito proliferativo conhecido da citocina homeostática IL-15 e o seu efeito na diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em linfócitos T CD8⁺ de memória, pode-se propor que esta citocina possui a capacidade de ativar estes linfócitos e induzir funções não-imunológicas mediante a expressão de recetores de linfócitos NK e sua interação com moléculas de MHC-I abertas. Adicionalmente, é conhecido que as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A apresentam também potentes efeitos na ativação, proliferação e maturação de linfócitos T, pelo que se julgou que as mesmas poderiam sinergicamente ser cruciais na exacerbação do efeito já conhecido da IL-15 e que poderiam proporcionar um impacto significativo nas moléculas de MHC-I abertas para a geração de respostas não-imunológicas, focando-se, assim, o presente estudo.

Para o estudo do efeito das citocinas IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15, isolaram-se células mononucleares do sangue periférico de *buffy-coats* de doadores saudáveis e, por sua vez, isolaram-se a partir destes, linfócitos do sangue periférico humano. Estes foram seguidamente marcados com CFSE e cultivados durante 12 dias na presença de IL-15 e na ausência e presença de IFN- γ e de IL-17A. Após os 12 dias de cultura celular, os PBLs marcados com CFSE foram marcados com os anticorpos primários W6/32 e HC-10, conjugados com o anticorpo secundário GAM PE e marcados com os

anticorpos anti-CD3 (CD3 APC) e anti-CD8 (CD8 PercCP-Cy5.5 ou CD8 β PE Cy.7). Por fim, procedeu-se à sua análise por citometria de fluxo usando características de *forward scatter/side scatter* e realizou-se a análise estatística perante os resultados obtidos.

Os nossos resultados permitiram compreender o potencial da sinergia das citocinas utilizadas em estudo na ativação e expansão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e na consequente expressão de moléculas de MHC-I fechadas e abertas, pelo que se pode constatar que a adição de IL-15 + IFN- γ e de IL-15 + IL-17A induziu ao aumento da expressão de moléculas de MHC-I fechadas e à diminuição da expressão de moléculas de MHC-I abertas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Tais resultados permitiram, por fim, constatar que o efeito induzido pela IL-15 é parcialmente neutralizado pelas citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A, o que pode estar relacionado com a competição pela ligação entre moléculas de CD8 e epitopos de HC-10 na membrana plasmática dos linfócitos T.

Palavras-chave

Moléculas de MHC-I abertas e fechadas; Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ humanos; Ativação e proliferação de Linfócitos T; IL-15; IFN- γ ; IL-17A.

Abstract

MHC-I and MHC-II molecules are membrane proteins that function as receptors binding and presenting peptide antigens to populations of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes, respectively, through the clonotypic receptor of T lymphocytes, present on their plasma membrane. The antigen presentation between MHC molecules and T lymphocytes induces the activation of the immunological system against internal and external aggressions causing an imbalance of tissue homeostasis, generating an immune response capable of restoring the microenvironment. It is known that MHC-I molecules are also capable of non-immunological functions through conformational changes in their molecular structure caused by an increased metabolic activity. The change from a closed conformation (classical MHC-I molecule) to an open conformation (non-classical MHC-I molecule) occurs because of the dissociation of the light β 2-microglobulin chain and/or the peptide of the heavy transmembrane chain, and can therefore be crucial for the development of possible cell therapies by *cis* and *trans* interaction with receptors for NK and T lymphocytes. This *cis-trans* interaction leads to the activation of these lymphocytes, consequently resulting in a decrease or increase of the immune responses in order to restore tissue homeostasis. Considering the known proliferative effect of the IL-15 homeostatic cytokine and its effect on the differentiation of CD8⁺ T lymphocytes into CD8⁺ memory T lymphocytes, it can be proposed that this cytokine has the ability to activate these lymphocytes and induce non-immunological functions, depending on the expression of NK lymphocyte receptors and their interaction with open MHC-I molecules. Additionally, it is known that the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and IL-17A also have significant effects on the activation, proliferation and maturation of T lymphocytes, meaning that they could synergistically be crucial in exacerbating the already known effect of IL-15, and they could provide a significant impact on open MHC-I molecules, resulting in the generation of non-immunological responses.

To study the effect of the IFN- γ and IL-17A cytokines on the activation of human T lymphocytes mediated by IL-15, peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy-coats from healthy donors. Next, peripheral blood lymphocytes were isolated. These were then labelled with CFSE and cultured for 12 days in the presence of IL-15 and in the absence and presence of IFN- γ and IL-17A. After 12 days of cell culture, CFSE-labelled PBL were once again labelled, this time with the primary antibodies W6/32 and HC-10 conjugated with the secondary antibody GAM PE, and with anti-CD3 (CD3 APC) and anti-CD8 (CD8 PercCP-Cy5.5 or CD8 β PE Cy.7) antibodies. At last, cells were analysed by flow

cytometry using forward scatter/side scatter characteristics, and statistical analysis was conducted on the obtained results.

Our results allowed us to understand the potential synergy of the cytokines used in the study, in the activation and expansion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, and in the consequent expression of closed and open MHC-I molecules. It can be stated that the addition of IL-15 + IFN- γ and IL-15 + IL-17A induced an increase in the expression of closed MHC-I molecules and a decrease in the expression of open MHC-I molecules, in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. These results allowed us to verify that the effect induced by IL-15 is partially neutralised by the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and IL-17A, which could be related to a certain competition for the binding between molecules of CD8 and HC-10 epitopes on the plasma membrane of T lymphocytes.

Keywords

Open and closed MHC-I molecules; Human CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes; Activation and proliferation of T lymphocytes; IL-15; IFN- γ ; IL-17A.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Capítulo 1 – Introdução	3
1.1. Complexo <i>Major</i> de Histocompatibilidade e sua estrutura molecular	3
1.2. Processamento antigénico das moléculas de MHC-I e MHC-II.....	4
1.3. Moléculas de MHC-I e sua capacidade de mediar funções imunológicas e não imunológicas.....	6
1.4. Subpopulações de Linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	9
1.5. Citocinas pró-inflamatórias	12
1.5.1. IL-15: origem e estrutura molecular.....	12
1.5.2. Efeitos biológicos da IL-15 nos Linfócitos T.....	13
1.5.3. IFN- γ : origem e estrutura molecular	14
1.5.4. Efeitos biológicos do IFN- γ nos Linfócitos T	15
1.5.5. IL-17A: origem e estrutura molecular	16
1.5.6. Efeitos biológicos da IL-17A nos Linfócitos T	17
1.6. Conclusões	18
Capítulo 2 – Objetivos	21
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	25
3.1. Reagentes	25
3.2. Reconstituição das Citocinas IFN- γ e IL-17A	25
3.3. Isolamento de Células	25
3.4. Contagem de Células.....	26
3.5. Marcação de PBLs com CFSE	26

3.6. Condições de Cultura Celular	27
3.7. Citometria de Fluxo	27
3.8. Estratégia de “Gating”	29
3.9. Análise Estatística.....	31
Capítulo 4 – Resultados.....	35
4.1. Efeito do IFN- γ e da IL-17A na formação de Blastos mediada pela IL-15.....	35
4.2. Efeito do IFN- γ e da IL-17A na % de Linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ ativados pela IL-15.....	38
4.3. Papel do IFN- γ e da IL-17A na Divisão Celular de Linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ ativados pela IL-15.....	40
4.4. Delimitação das 3 subpopulações de Linfócitos T isoladas após marcação com CFSE e ativação com IL-15	43
4.4.1. Estudo da expressão de epitopos de W6/32 (<i>closed conformers</i>) e HC-10 (<i>open conformers</i>) nos Linfócitos T que se dividiram na presença de IFN- γ e de IL-17A.....	44
4.4.2. Estudo da expressão de <i>closed</i> e <i>open conformers</i> em Linfócitos T que mais se dividiram na presença de IFN- γ e de IL-17A.....	47
Capítulo 5 – Discussão	53
Conclusões	57
Referências e Bibliografia	59

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo ilustrativo do processamento antigénico das moléculas de MHC-I (A) e consequente transporte e apresentação antigénica a um linfócito T CD8 ⁺ (B)	5
Figura 2 – Modelo ilustrativo do processamento antigénico das moléculas de MHC-II e consequente transporte e apresentação antigénica a um linfócito T CD4 ⁺	6
Figura 3 – Modelo ilustrativo da formação de homodímeros de α HC.....	8
Figura 4 – Modelo ilustrativo da formação de heterodímeros de α HC.....	9
Figura 5 – Modelo ilustrativo da diferenciação de um linfócito T _N CD8 ⁺ em um linfócito T CD8 ⁺ NK-like.....	11
Figura 6 – Diagrama representativo do procedimento de isolamento de PBMCs a partir de BCs de dadores saudáveis.....	26
Figura 7 – Diagrama ilustrativo da cultura celular de PBLs marcados com CFSE na ausência e presença de IFN- γ e IL-17A	27
Figura 8 – Diagrama ilustrativo da marcação de PBLs marcados com CFSE para análise em citometria de fluxo.....	29
Figura 9 – Estratégia de “Gating” para obtenção da % Total de Blastos e da % Total de Não-Blastos	30
Figura 10 – Estratégia de “Gating” para obtenção da % de Linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ e da % de Divisão Celular dos Linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	30
Figura 11 – Estratégia de “Gating” para obtenção da expressão de closed e open conformers pelos linfócitos T CD4 ⁺ ou T CD8 ⁺ que não se dividiram, que se dividiram e que mais se dividiram	31
Figura 12 – Efeito do INF- γ na expansão de blastos mediada pela IL-15	36
Figura 13 – Efeito do IL-17A na expansão de Blastos mediada pela IL-15.....	38
Figura 14 – Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD4 ⁺ ativados pela IL-15	39
Figura 15 – Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD8 ⁺ ativados pela IL-15	39

Figura 16 – Divisão celular de linfócitos T CD4 ⁺ ativados pela IL-15 na ausência (dot-plots à esquerda) e na presença (dot-plots à direita) de IFN- γ ou de IL-17A.....	41
Figura 17 – Divisão celular de linfócitos T CD8 ⁺ ativados pela IL-15 na ausência (dot-plots à esquerda) e na presença (dot-plots à direita) de IFN- γ ou de IL-17A.....	42
Figura 18 – Determinação das 3 subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ ativados pela IL-15.....	43
Figura 19 – Efeito da IFN- γ na expressão de epitopos de W6/32 (closed conformers) pelos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ que se dividiram ativados pela IL-15	45
Figura 20 – Efeito da IL-17A na expressão de epitopos de W6/32 (closed conformers) pelos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ que se dividiram ativados pela IL-15	45
Figura 21 – Efeito da IFN- γ na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ que se dividiram ativados pela IL-15	46
Figura 22 – Efeito da IL-17A na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ que se dividiram ativados pela IL-15	47
Figura 23 – Efeito do IFN- γ na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ que mais se dividiram ativados pela IL-15.....	48
Figura 24 – Efeito da IL-17A na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ que mais se dividiram ativados pela IL-15.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valores obtidos para o efeito do IFN- γ na % Total de Blastos, % Total de Não-Blastos, % Relativa de Blastos, % Total de Células em Divisão e para o Número de Divisões Celulares mediados pela IL-15 36

Tabela 2 – Valores obtidos para o efeito do IL-17A na % Total de Blastos, % Total de Não-Blastos, % Relativa de Blastos, % Total de Células em Divisão e para o Número de Divisões Celulares mediados pela IL-15 37

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Lista de Acrónimos

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
APS	Solução antibiótica-antimicótica com Anfotericina, Penicilina e Estreptomicina
BCs	<i>Buffy-coats</i> – Concentrados leucocitários de doadores
BSA	Albumina de soro bovino
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i> – Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína
CNX	Calnexina
CRT	Calreticulina
DCs	Células dendríticas
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FBSi	Soro fetal bovino inativado
FoxP3	Fator de transcrição dos linfócitos T reguladores
FSC/SSC	<i>Forward Scatter/Side Scatter</i> – Dispersão Frontal (da luz)/ Dispersão Lateral (da luz)
GAM PE	Anticorpo secundário <i>goat anti-mouse</i>
GATA-3	Proteína-3 de ligação ao GATA
H-2	Antígenos de histocompatibilidade em ratos
HLA	Antígenos de leucócitos em humanos
HSA	Albumina sérica humana
HSi	Solução de albumina sérica humana
IFNGR	Recetor do interferão gama
IFN-I	Interferão do tipo I
IFN-II	Interferão do tipo II
IFN-III	Interferão do tipo III
IFN- γ	Interferão gama
IgG2a	Anticorpo irrelevante
Ii	Cadeia Invariante
IL	Interleucina
ILC3s	Células linfóides inatas tipo 3
IPST, IP	Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
MHC	Complexo <i>Major</i> de Histocompatibilidade
MHC-I	Moléculas de MHC classe I

MHC-II	Moléculas de MHC classe II
MIC-A	Cadeia relacionada ao MHC-I A
MP	Membrana plasmática
NaN ₃	Azida de Sódio
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kB
NH ₄ Cl	Cloreto de Amónio
NKRs	Recetores dos linfócitos NK
PBLs	Linfócitos do sangue periférico humano
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PLC	Complexo de carga de péptido
RE	Retículo endoplasmático
ROR γ t	Recetor de ácido retinóico- γ t
ROR α	Recetor de ácido retinóico- α
SB	<i>Staining Buffer</i>
SEM	Desvio padrão médio
Ser335	Resíduo de serina conservado e localizado na posição 335
TAP	Transportador associado ao processamento de antígeno
T-bet	Fator de transcrição T-box
Tc	Linfócitos T citotóxicos
T _{CM}	Linfócitos T de memória central
TCR	Recetor Clonotípico dos Linfócitos T
T _{EM}	Linfócitos T de memória efetora
T ^{EMRA}	Linfócitos T de memória efetora CD45RA ⁺
Th	Linfócitos T auxiliares
T _N	Linfócitos T <i>naïve</i>
T _{reg}	Linfócitos T reguladores
Tris	Tris base
T _{RM}	Linfócitos T CD8 ⁺ não recirculantes
T _{SCM}	Linfócitos T de memória de células-tronco
Tyr320	Resíduo de tirosina conservado e localizado na posição 320
ULBP	Proteína de ligação a UL
α HC	Cadeia pesada transmembranar α da molécula de MHC classe I
β_2 m	Cadeia leve β_2 -microglobulina da molécula de MHC classe I
γ c	Cadeia γ comum do recetor da IL-15

Capítulo 1 – Introdução

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Complexo *Major* de Histocompatibilidade e sua estrutura molecular

O Complexo *Major* de Histocompatibilidade ou MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) é uma região cromossômica que contém diversos genes responsáveis pela geração de uma resposta imunológica, nomeadamente, genes de MHC classe I (MHC-I) e genes de MHC classe II (MHC-II). As moléculas de MHC-I e MHC-II são proteínas membranares que funcionam como recetores que ligam e apresentam antígenos peptídicos a populações de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, respetivamente, através do recetor clonotípico dos linfócitos T (TCR) presente na membrana plasmática (MP) dos linfócitos T e de células apresentadoras de antígeno (APC) que expressam as moléculas de MHC [1], [2]. A apresentação antigénica das moléculas de MHC aos linfócitos T gera a ativação do sistema imunológico em resposta a alterações da integridade e homeostasia dos tecidos, gerando uma resposta imune adaptativa contra agressões internas (por exemplo, células tumorais) ou agressões externas (por exemplo, infeções) [3]. As moléculas de MHC, codificadas por genes altamente polimórficos, são chamados antígenos de histocompatibilidade em ratos (H-2) e antígenos de leucócitos em humanos (HLA). Tendo por base esse grau de polimorfismo e o padrão de expressão das moléculas de MHC, estas foram posteriormente caracterizadas como moléculas de MHC clássicas e moléculas de MHC não clássicas [1], [4].

As moléculas clássicas do MHC-I em humanos (HLA-A, HLA-B e HLA-C) são estruturas triméricas compostas por uma cadeia pesada transmembranar (α HC) de 45 kDa com 3 domínios extracelulares (α 1, α 2 e α 3), uma cadeia leve β ₂-microglobulina (β ₂m) de 12 kDa ligada não covalentemente à cadeia α HC e um péptido de 8-12 aminoácidos [3], [4]. Os domínios extracelulares α 1 e α 2 são altamente polimórficos e formam um sulco de ligação que permite que o péptido se ligue à cadeia α HC e seja apresentado a linfócitos T CD8⁺. Seguindo do domínio α 3 que se encontra conservado, a cadeia α HC possui um domínio transmembranar seguido de uma cauda citoplasmática intracelular contendo motivos de tirosina e serina [5]–[7]. As moléculas não clássicas do MHC-I diferem das moléculas de MHC-I clássicas na medida em que podem não possuir a cadeia β ₂m (por exemplo, a cadeia relacionada ao MHC-I A (MIC-A)) e/ou o péptido (por exemplo, HFE), não possuir o domínio α 3 (por exemplo, a proteína de ligação a UL (ULBP)), apresentarem menos polimorfismo nos domínios α 1 e α 2 no terminal N (por exemplo, HLA-E, HLA-F e HLA-G) ou serem moléculas que se ligam a glicolípido em vez de péptidos (por exemplo, CD1) [3].

As moléculas clássicas do MHC-II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) são estruturas compostas por uma cadeia pesada alfa (α) de 33-35 kDa e uma cadeia pesada beta (β) de 25-30 kDa ligadas não-covalentemente entre si com 2 domínios extracelulares cada ($\alpha 1$ e $\alpha 2$, para a cadeia α ; $\beta 1$ e $\beta 2$, para a cadeia β) e um péptido de 15-30 aminoácidos. Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ são altamente polimórficos e formam o sulco de ligação do péptido que é apresentado a linfócitos T CD4⁺ [4], [8]–[10]. Diferentemente das moléculas de MHC-I clássicas, as moléculas de MHC-II clássicas possuem 2 domínios transmembranares, um referente a cada cadeia α e β , e seguidamente uma cauda citoplasmática intracelular contendo também motivos de tirosina [8], [11]. As moléculas de MHC-II não clássicas diferem das moléculas de MHC-II clássicas na medida em que não possuem um péptido antigénico e apresentam um grau de polimorfismo inferior nos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ no terminal N (HLA-DM e HLA-DO) [9], [11].

1.2. Processamento antigénico das moléculas de MHC-I e MHC-II

O processamento antigénico das moléculas de MHC-I ocorre pela via citosólica, onde a apresentação de antígenos peptídicos por parte destas moléculas só ocorre se os seus componentes forem montados no lúmen do retículo endoplasmático (RE) de todas as células nucleadas, tendo como recurso chaperonas moleculares como a calreticulina (CRT), a ERp57 e a molécula acessória tapasina (ver **Figura 1**). Assim sendo, após a síntese e transporte até o lúmen do RE, a cadeia α HC das moléculas de MHC-I é estabilizada com recurso à proteína calnexina (CNX). Sucessivamente, a CNX é substituída pela CRT e a ERp57, facilitando a ligação da cadeia α HC à cadeia β_2m através de mudanças conformacionais. Em seguida, os antígenos peptídicos do MHC-I derivados de proteínas endógenas que foram degradadas por proteossomas no citosol são transportados para o RE pelo transportador associado ao processamento de antígeno (TAP) como parte do complexo de carga de péptido (PLC), que também contém o editor de péptidos tapasina, responsável pelo permanente contacto entre a cadeia α HC e o péptido [4], [12]–[14]. Posto isto, os péptidos ligam-se ao sulco de ligação formado pelos domínios extracelulares $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e a molécula de MHC-I dissocia-se do PLC e migra através do complexo de Golgi até à MP da célula APC onde irá ocorrer a apresentação antigénica aos linfócitos T CD8⁺ ou a interação com recetores presentes em linfócitos NK [2]. As moléculas que não conseguem formar completamente o PLC e, portanto, não adquirem a conformação correta, são enviadas de novo para o citosol onde são degradadas [15].

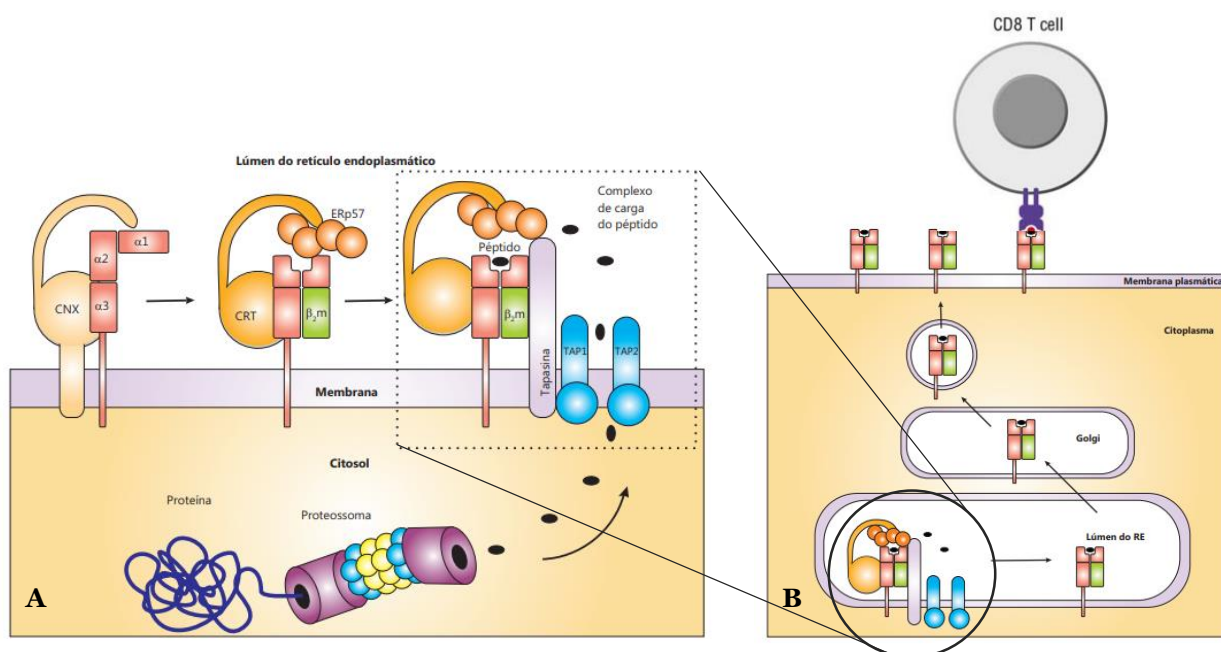


Figura 1 – Modelo ilustrativo do processamento antigénico das moléculas de MHC-I (A) e consequente transporte e apresentação antigénica a um linfócito T CD8⁺ (B). No lúmen do RE, a cadeia α HC é estabilizada por CNX que em seguida é substituída pela CRT e ERp57 para a ligação da β_2m . A tapasina juntamente com TAP1 e TAP2 ligam-se ao complexo anteriormente formado constituindo assim o PLC. Após a ligação dos peptídeos ao PLC, a molécula de MHC-I dissocia-se deste e migra através do complexo de Golgi até à MP da APC onde é apresentada a um linfócito T CD8⁺. Adaptado de [3].

O processamento antigénico das moléculas de MHC-II ocorre pela via endocítica e trata-se de um processo especializado. Tal como verificado pela **Figura 2**, o processamento antigénico das moléculas de MHC-II no RE começa com a estabilização da molécula de MHC-II não clássica através da ligação da Cadeia Invariante (Ii), o que impede a ligação de peptídeos ao sulco de ligação. Seguidamente, o complexo formado é transportado até um compartimento endossomal geralmente denominado por MIIC, onde a cadeia Ii é degradada em fragmentos proteicos. Um desses fragmentos, o CLIP, liga-se ao sulco de ligação do peptídeo da molécula de MHC-II formando um complexo temporário, pois devido à atividade proteolítica de catepsinas (geralmente as catepsinas L e S) e outras enzimas lisossomais, peptídeos endossomais produzem diretamente com o CLIP pela associação com a molécula de MHC-II. Os peptídeos gerados que apresentam maior afinidade conseguem, assim, libertar o CLIP da molécula de MHC-II não clássica e irão estabilizar a molécula através da sua ligação. Após esta ligação, a molécula de MHC-II passa a ser uma molécula de MHC-II clássica e é seguidamente transportada até à MP da célula APC, onde ocorrerá a apresentação antigénica a linfócitos T CD4⁺ [2], [9], [11], [16].

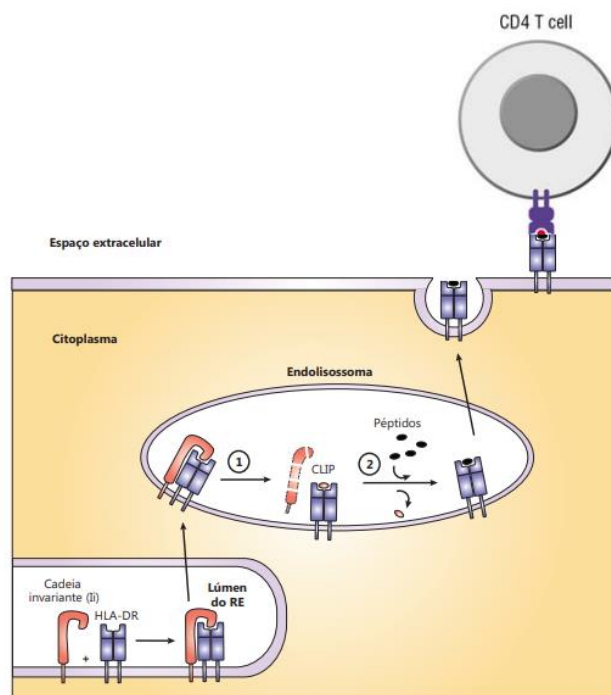


Figura 2 – Modelo ilustrativo do processamento antigénico das moléculas de MHC-II e consequente transporte e apresentação antigénica a um linfócito T CD4⁺. No lúmen do RE, a molécula de MHC-II é estabilizada pela cadeia Ii, através da sua associação. Após a ligação da cadeia Ii, o complexo formado migra até os endolisossomas onde a cadeia Ii é degradada, permitindo a ligação de CLIP à molécula de MHC-II ①. Péptidos endolisossomais gerados a partir de atividade proteolítica endossomal competem com o CLIP pela associação com a molécula de MHC-II ②. Após a ligação dos péptidos com maior afinidade para a molécula de MHC-II, a molécula migra até à MP da APC onde é apresentada a um linfócito T CD4⁺. Adaptado de [3].

1.3. Moléculas de MHC-I e sua capacidade de mediar funções imunológicas e não imunológicas

As funções imunológicas das moléculas de MHC-I estão maioritariamente restritas às moléculas de MHC clássicas e à sua conformação fechada (isto é, quando a cadeia α HC, a cadeia β_2m e o péptido fazem parte da estrutura) de maneira a desencadarem uma resposta imunológica mediada pela ativação de linfócitos T CD8⁺ e NK e a sua subsequente proliferação e expansão celular [4], [16]. Contudo, através de diversos estudos realizados durante as décadas de 1980, 1990 e 2000, foi possível verificar que, contrariamente às moléculas de MHC-II, as moléculas de MHC-I clássicas apresentam a capacidade de gerar funções não-imunológicas mediante mudanças conformacionais na sua estrutura molecular [6], [7], [17]. Tendo por base diversos estudos elaborados sobre a conformação das moléculas de MHC-I, as moléculas triméricas de MHC-I em conformação fechada na superfície celular passaram então a ser conhecidas como moléculas de MHC-I fechadas (do

inglês “*closed conformers*”) [7]. No entanto, após mudanças fisiológicas provocadas por uma atividade metabólica aumentada (por exemplo, ativação, proliferação e diferenciação celular), uma fração dos *closed conformers* apresenta a capacidade de dissociação da β_2m da cadeia trimérica αHC e/ou a dissociação do péptido, gerando uma cadeia αHC livre. Estas moléculas são então denominadas de moléculas de MHC-I abertas (do inglês “*open conformers*”) [6], [7]. O termo “*open conformers*” destaca o facto de que a dissociação do péptido e da cadeia β_2m da cadeia αHC deixa o domínio $\alpha 1$ livre para se desdobrar e adotar a conformação aberta. O domínio $\alpha 1$ pode então interagir com quaisquer sequências de aminoácidos terminais próximas e, eventualmente, afetar a conformação estrutural do domínio $\alpha 2$, que inclui a ligação de péptidos [7].

O estudo dos *open conformers* teve também um impulso significativo ao identificar no domínio citoplasmático da cadeia αHC os motivos conservados de tirosina e serina, responsáveis por desempenhar papéis essenciais na biologia das moléculas de MHC-I. Enquanto o motivo que contém um resíduo de tirosina conservado localiza-se na posição 320 (Tyr320) na sequência de aminoácidos e é codificado pelo exão 6 em todos os alelos HLA-A e HLA-B, o motivo que contém dois resíduos de serina conservados localizam-se na posição 332 e 335 (Ser335) e são codificados pelo exão 7 em todos os alelos HLA-I [7], [18], [19]. Estudos relatados usando linhagens humanas mostraram que a aquisição da conformação aberta por parte das moléculas de MHC-I estava então correlacionada com a aquisição de um epitopo crítico no domínio citoplasmático, provavelmente resultante da desfosforilação de Ser335. Dados estes resultados, foi possível constatar que a Ser335 encontra-se fosforilada em *closed conformers* e desfosforilada em *open conformers* [18]. Posteriormente, estudos *in vitro* efetuados pelo nosso grupo de investigação, revelaram que os motivos de Tyr320 encontravam-se desfosforilados em *closed conformers* e fosforilados em *open conformers* por uma quinase Src, provavelmente Lck [20]. Na totalidade destes relatos, é-nos possível afirmar que a fosforilação/desfosforilação de Tyr320 e Ser335 nas moléculas de MHC-I na superfície celular é, portanto, uma característica bioquímica que distingue os *closed conformers* dos *open conformers* e que, possivelmente, correlaciona-se com a localização e tráfego intracelular da molécula de MHC-I [6], [7], [19].

Mediante os estudos apresentados, sabe-se assim que as funções não imunológicas características dos *open conformers* expressos na MP de células metabolicamente ativas dependem do destino das cadeias αHC . Analisando a literatura, apenas três destinos principais podem ser descritos, nomeadamente: i) a auto-associação em *cis* e formação de homodímeros de αHC ; ii) a *cis* associação dos *open conformers* com outros recetores de superfície formando heterodímeros de αHC ; e iii) a libertação das moléculas de MHC-I abertas da MP e, conseqüente, formação de *open conformers* solúveis.

Relativamente aos homodímeros de α HC formados, alguns estão associados de forma não covalente, enquanto outros são resultado da formação de pontes de dissulfeto entre cisteínas não pareadas localizadas ao longo da sequência da cadeia α HC (ver **Figura 3**) [20]–[22]. Após a análise da literatura, acredita-se que a formação de homodímeros de MHC-I pode fortalecer o reconhecimento de antígenos por parte dos linfócitos T CD8⁺ através da formação de uma sinapse imunológica mais estável, sugerindo que a reorganização de moléculas de MHC-I na MP de APCs pode modular a sensibilidade do reconhecimento de linfócitos T [23]–[25]. Sabe-se também que os homodímeros da superfície celular têm implicações essenciais nas respostas autoimunes e podem *trans* interagir com diversos recetores dos linfócitos NK (NKR) e o TCR de linfócitos T de maneira a minimizarem ou aumentarem respostas imunológicas [21], [22], [26], [27].

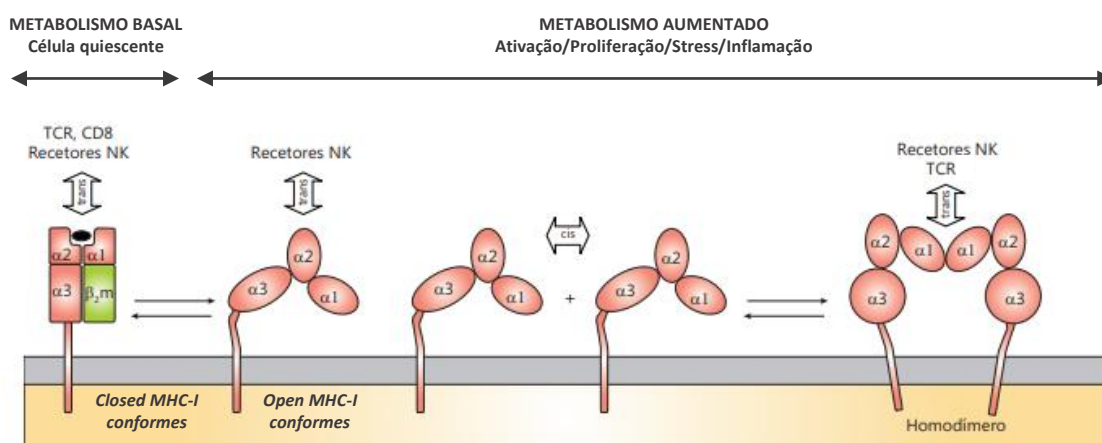


Figura 3 – Modelo ilustrativo da formação de homodímeros de α HC. Na MP de células metabolicamente ativas (por exemplo, linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas) pode ocorrer a dissociação da cadeia β_{2m} e/ou péptido da cadeia α HC na molécula de MHC-I, formando uma cadeia α HC livre que poderá se auto-associar em *cis* e formar homodímeros de α HC. Os dímeros resultantes possuem a capacidade de *trans* interagir com NKR e o TCR. Adaptado de [3].

A interação de *open conformers* de MHC-I em *cis* também pode ocorrer com outros recetores de superfície resultando na formação de heterodímeros α HC que regulam a internalização e sinalização mediada pela ligação recetor-ligante, conforme ilustrado na **Figura 4**. O recetor da insulina [28], o fator de crescimento epidérmico (EGF) [29] e as interleucinas 2 e 15 (IL-2 e IL-15) [30], [31] são exemplos de recetores capazes de *cis* interagir fisicamente com as moléculas de MHC-I [7]. Diversos imunorrecetores de superfície também foram relatados na interação *cis* com as moléculas de MHC-I, incluindo CD8 $\alpha\beta$ [20], CD82 [7] e uma variedade de NKR, como KIR, LILR e CD94/NKG2 [17]. Os heterodímeros de α HC foram relacionados com a modulação da citotoxicidade de linfócitos NK, na ativação de mastócitos, no desenvolvimento de osteoclastos e também na evasão do

cancro e função neuronal [7]. Sabe-se, portanto, que enquanto os homodímeros de α HC possuem principalmente funções fisiológicas relacionadas com a regulação das respostas imunes sistêmicas, os heterodímeros de α HC possuem principalmente funções não imunológicas relacionadas com a fisiologia da célula.

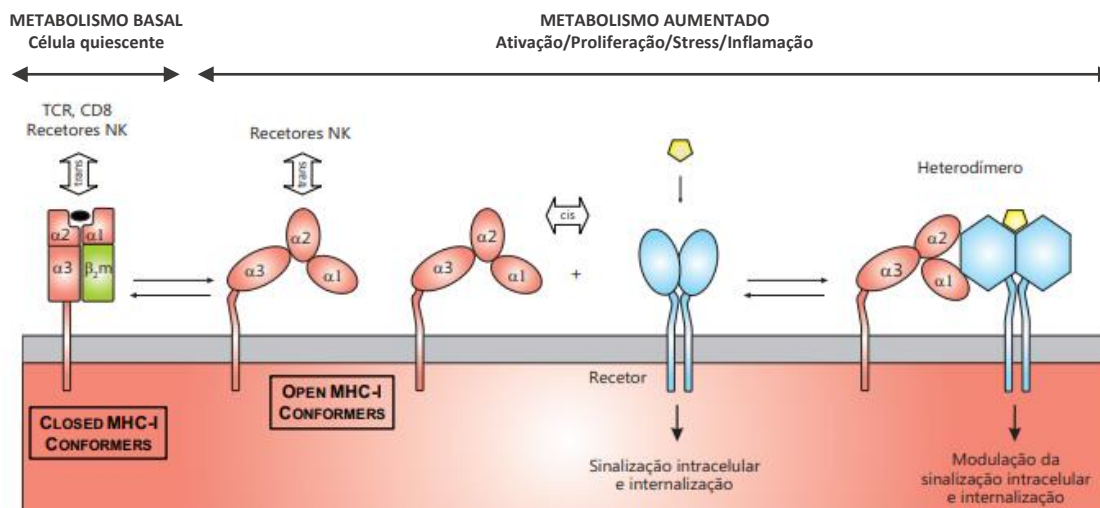


Figura 4 – Modelo ilustrativo da formação de heterodímeros de α HC. Na MP de células metabolicamente ativas (por exemplo, linfócitos em divisão, hepatócitos e macrófagos) pode ocorrer a dissociação da cadeia β_2m e/ou péptido da cadeia α HC na molécula de MHC-I, formando uma cadeia α HC livre que poderá se associar em cis com outros receptores de superfície (por exemplo, receptores de citocinas e hormonais) e formar heterodímeros de α HC. Os dímeros resultantes modulam os sinais intracelulares transmitidos pelo recetor após interação com o seu ligando. Adaptado de [3].

As moléculas de MHC-I quer na conformação fechada quer na conformação aberta podem também ser encontradas em formas solúveis, nomeadamente, em vários fluidos corporais e em sobrenadantes de culturas celulares de linfócitos T ativados como resultado de clivagem e/ou desprendimento, capacitando estas moléculas de propriedades imunorreguladoras [14], [32], [33]. Estas são moléculas circulantes *de novo* capazes de *trans* interagir com outros receptores e induzir a formação de anticorpos específicos, com implicações para a rejeição de enxertos e crescimento neuronal [7].

1.4. Subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Após ativação celular, os linfócitos T sofrem processos de expansão e contração celular, que permite que uma fração dos linfócitos se diferencie e passe a adquirir características fenotípicas e funcionais. Resultante dos processos de diferenciação ocorre a geração de linfócitos T efetores, reguladores (T_{reg}) e de memória, a partir de linfócitos T *naïve* (T_N), isto

é, linfócitos T originados no timo que nunca tiveram em contacto com o seu antígeno peptídico. Os linfócitos T efetores são células encontradas em ambientes de estimulação antigénica ativa (por exemplo, infeção viral primária) e apresentam a capacidade de eliminar vírus ou tumores por diferentes funções efetoras. Sabe-se que os linfócitos T_N CD4⁺ podem diferenciar-se em linfócitos T auxiliares (Th, do inglês “*helper*”), nomeadamente em linfócitos Th1, Th2 e Th17, e em linfócitos T_{reg} CD4⁺, mediante o microambiente celular em que se encontrem e da presença de diferentes citocinas. Em relação aos linfócitos T_N CD8⁺, estes podem diferenciar-se em linfócitos T citotóxicos (Tc), nomeadamente em linfócitos Tc1, Tc2 e Tc17, e também em linfócitos T_{reg} CD8⁺, de igual forma mediante do microambiente encontrado e das moléculas efetoras presentes no mesmo. Os linfócitos T efetores por sua vez dão origem a linfócitos T de memória e estes permanecem presentes em circulação na ausência de estimulação antigénica e têm a capacidade de se expandir rapidamente após um desafio secundário [34]–[36]. Tendo por base diversos estudos elaborados nas últimas décadas com principal foco na expressão de CCR7, CD27, CD28, CD62L, CD95 e CD45RA e outros recetores, sabe-se, portanto, que o compartimento dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ periféricos circulantes pode ser subdividido em cinco grandes pools: linfócitos T_N, linfócitos T de memória central (T_{CM}), linfócitos T de memória efetora (T_{EM}), e ainda no caso dos linfócitos T CD8⁺, um pool de linfócitos T de memória de células-tronco (T_{SCM}) e de linfócitos T de memória efetora CD45RA⁺ (T_{EMRA}) [34], [35], [37], [38]. Além da identificação precisa dos linfócitos T_N (CCR7⁺ CD27⁺ CD28⁺ CD45RA⁺ CD62L⁺ CD95⁻), sabe-se que a expressão diferencial destes 6 recetores permite a distinção entre os numerosos subconjuntos de linfócitos T [34]. Dos cinco principais pools de linfócitos T circulantes, os linfócitos T_N, T_{SCM} e T_{CM} expressam positivamente os recetores CD27, CD28, CCR7 e CD62L diferindo entre eles nos níveis de expressão de CD95 e CD45RA [38]. Estes, ao expressarem constitutivamente os recetores CCR7 e CD62L, possuem a habilidade de migração preferencial para órgãos linfóides secundários, onde podem ser ativados por antígenos processados e apresentados por moléculas de MHC expressos por células dendríticas (DCs) recém-chegadas de tecidos periféricos e se diferenciar em linfócitos T_{EM} e T_{EMRA} [39]. Em contrapartida, os linfócitos T_{EM} e T_{EMRA} foram descritos como CD28 negativos, sem o “sinal 2” de ativação e independentes de TCR, uma vez que não expressam o recetor CD28 e respondem fracamente ao TCR [40]–[43]. Estes linfócitos T de memória efetora diferem também dos linfócitos T de memória central na medida em que também não expressam os recetores CCR7 e CD62L e respondem fracamente ao recetor CD27. Em suma, os linfócitos T_{EMRA} diferem dos linfócitos T_{EM} pela expressão positiva de CD45RA [34], [38], [39].

No que diz respeito aos linfócitos T_{EM} e T_{EMRA} CD8⁺, estudos elaborados demonstraram que os mesmos foram também correlacionados com a expressão de NKRs, incluindo CD56,

CD94/NKG2A, KIR, LILR e NKp46 [44]–[47]. A prevalência destes subconjuntos de linfócitos T CD8⁺ diferenciados, também conhecidos como linfócitos T CD8⁺ CD28⁻, T CD8⁺ KIR⁺, T CD8⁺ NK-like ou T CD8⁺ inatos, em tecidos e órgãos não linfóides, incluindo o cérebro, ou em tecidos periféricos onde uma fração permanece como um conjunto de linfócitos T CD8⁺ não recirculantes (T_{RM}), deve-se à expressão de CD69 e CD103 [48]–[50]. Estes foram inicialmente descritos como disfuncionais e que apenas contribuíam para a imunossenescência e suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, dado que respondem fracamente ao TCR e apresentam uma capacidade proliferativa limitada [43], [51]. Todavia, dadas as evidências acumuladas ao longo dos anos, constatou-se que a expressão dos NKR por estes subconjuntos de linfócitos permite que os mesmos detetem mudanças no nível de *closed* e *open conformers* e, conseqüentemente, detetar mudanças no estado de stress e inflamação do ambiente (ver **Figura 5**). O impacto que o envolvimento de KIR, LILR e NKG2A têm na sobrevivência dos linfócitos T CD8⁺ NK-like e na secreção de citocinas é, assim, de suma importância para a homeostase do tecido seja em condições normais ou patológicas [40], [52], dado que diversas citocinas libertadas pelos linfócitos T CD8⁺ NK-like (por exemplo, IFN- γ) após sinais mediados pelos NKR, podem mediar a resolução da inflamação e a cicatrização tecidual subsequente, modulando por fim o crescimento e a proliferação de células epiteliais e de outros tecidos [53].

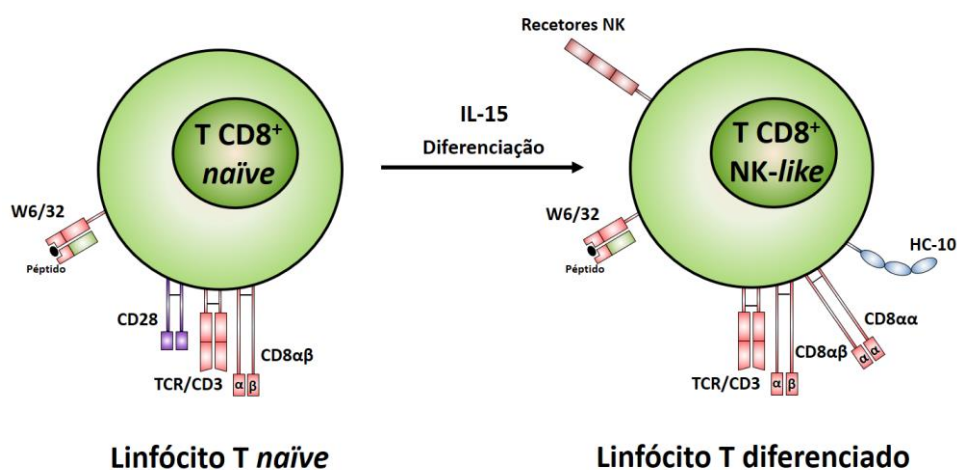


Figura 5 – Modelo ilustrativo da diferenciação de um linfócito T_N CD8⁺ em um linfócito T CD8⁺ NK-like. A diferenciação de um linfócito T_N CD8⁺ em um linfócito T CD8⁺ NK-like é caracterizada pela expressão de novos receptores e moléculas, como NKR e moléculas de MHC-I abertas (*open conformers*), pela expressão de uma nova cadeia CD8, a cadeia CD8 α , e pela não expressão do receptor CD28. W6/32 – anticorpo monoclonal característico da expressão de *closed conformers*; HC-10 – anticorpo monoclonal característico da expressão de *open conformers*. Figura elaborada pela discente.

1.5. Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas pró-inflamatórias são moléculas pleiotrópicas com papéis importantes nas respostas inflamatórias no nosso sistema imunológico. Estas são ativadas durante situações em que ocorre inflamação, infecção e/ou alterações imunológicas e estão envolvidas principalmente na reparação de tecidos danificados e na restauração da homeostasia [54]. As citocinas podem atuar nas células que as secretam (ação autócrina), em células próximas (ação parácrina) ou, em alguns casos, em células distantes (ação endócrina) e são redundantes no que diz respeito à sua atividade, já que funções semelhantes podem ser estimuladas por diferentes citocinas. Elas são frequentemente produzidas em cascata, pois uma citocina estimula suas células-alvo a produzir citocinas adicionais [55]. As citocinas pró-inflamatórias têm sido reconhecidas como produtoras de APCs potentes em induzir respostas robustas de linfócitos T na imunidade protetora [48], no entanto, o campo dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na presença e ausência de diversos tipos de citocinas merece mais investigação. Tendo isto em conta, o presente estudo foca-se em analisar a resposta de linfócitos T cultivados com a citocina homeostática/pró-inflamatória IL-15, na ausência ou presença das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A.

1.5.1. IL-15: origem e estrutura molecular

Descoberta em 1994 por Grabstein et al. [56], a IL-15 é uma citocina pró-inflamatória conhecida pelo seu papel crucial na ativação, proliferação, maturação e sobrevivência de linfócitos T, B e NK [57], [58]. A IL-15 é uma citocina de 14 a 15 kDa pertencente à família de citocinas 4 α -hélice, que liga-se a um recetor trimérico específico que consiste na cadeia β de IL-2, IL-2/IL-15R β (ou CD122), na cadeia γ comum (γ_c) também compartilhada com as citocinas IL-2, IL-4, IL-9 e IL-21, e na cadeia α , IL-15R α [58]–[61]. O recetor IL-15R α contém uma cauda citoplasmática, um domínio transmembranar, uma haste, uma região de dobradiça e um domínio “sushi”, que é necessário para a ligação de citocinas. A função biológica da IL-15 é então atribuída à mediação do domínio “sushi” (1-65 aminoácidos) contido no recetor IL-15R α e é responsável pela interação com a mesma [60], [62], [63]. O gene IL-15 humano é mapeado no cromossoma 4 e a sua sequência de DNA consiste em 6 exões codificadores de proteínas e 5 intrões associados [57]. Sabe-se que a expressão de mRNA de IL-15 é significativamente observada em vários tecidos e células, contudo, a detecção da proteína IL-15 é rigorosamente controlada e expressa essencialmente em monócitos, macrófagos e DCs [57], [64]–[66]. Esta discrepância entre a expressão do transcrito da IL-15 e a sua proteína é essencialmente devido à transcrição e tradução

complexa e tráfego intracelular da proteína que culmina em níveis quase imperceptíveis da mesma em sobrenadantes de cultura de células [65], [67].

1.5.2. Efeitos biológicos da IL-15 nos Linfócitos T

Ainda que as citocinas IL-2 e IL-15 compartilhem várias funções devido aos recetores por elas compartilhados, elas exibem diferentes contribuições na resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, nomeadamente na sua expansão, proliferação e sobrevivência. A IL-15 induz fortes sinais proliferativos através das vias de sinalização JAK/STAT e Ras/MAPK e previne a morte celular de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pelo aumento das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-XI e pela diminuição das proteínas pró-apoptóticas Bim e Puma através da ativação da via PI3K [57], [61], [66]. Embora a IL-15 tenha a capacidade de induzir a proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4⁺, ela não é expressa por estes linfócitos, pelo que a sua influência nos mesmos passa pela ação autócrina da *trans* apresentação por outros tipos de células, como DCs e macrófagos [66], [68], [69]. A geração e homeostase dos linfócitos T CD4⁺ permanecem intactas na ausência de IL-15. Todavia, estudos recentes relataram a descoberta inesperada de que a sinalização de IL-15 pode desempenhar um papel na geração e função de linfócitos T CD4⁺ efetores pela indução da libertação de outras citocinas por parte dos mesmos. Esta citocina é então conhecida por evocar uma resposta imune pelos linfócitos Th1 através da libertação de IFN- γ e TNF- α , por desencadear respostas a partir de linfócitos Th2 através da libertação de IL-4 e IL-5 e pela diferenciação de linfócitos Th17 através da produção de IL-17 [57], [66], [68], [69]. Para além da diferenciação de linfócitos T_N CD4⁺ em linfócitos T CD4⁺ efetores, a IL-15 tem também a capacidade de induzir a diferenciação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ de memória (linfócitos T_{EM} CD4⁺), embora com menos intensidade [70], [71].

Contrariamente à IL-2, a IL-15 não tem impacto direto na atividade dos linfócitos T_{reg}, mas pode prejudicar as funções destes linfócitos por meio da atuação em linfócitos T CD4⁺ e TCD 8⁺ efetores em determinadas situações, nomeadamente ao modular a expressão do fator de transcrição dos linfócitos T_{reg} (FoxP3) e induzindo, assim, a função supressiva dos mesmos [58], [68]. Também foi indicado que a presença de IL-15 induzia os linfócitos T CD8⁺ a produzir perforina e granzima B, o que sugere a tendência da IL-15 para alterar o fenótipo destes linfócitos para um fenótipo citotóxico e apresentar um potencial anti-apoptótico aumentado [59], [72]–[74]. Com base em estudos realizados pelo nosso grupo de investigação, verificou-se que todos os diferentes subconjuntos de linfócitos T CD8⁺ isolados e expandidos na presença de 10 ng/mL de IL-15 tiveram a capacidade de responder a esta citocina, o que sugere uma influência genérica da mesma na homeostase dos linfócitos

T CD8⁺ humanos [59], [72]. Outras experiências realizadas com linfócitos T demonstraram também que moléculas de MHC-I associavam-se em *cis* com o recetor IL-15R α , demonstrando que o resultado desta interação está provavelmente relacionado ao papel da IL-15 na diferenciação e sobrevivência de linfócitos T CD8⁺ [31], [40]. Também em outros estudos realizados, foi relatado que em ratos transgênicos IL-15^{-/-}, o número de linfócitos T CD8⁺ com um fenótipo de memória se dividiam após a injeção de IL-15 [64], [75], [76]. Estes estudos sugerem que a IL-15 encontra-se intimamente ligada com a proliferação dos linfócitos T CD8⁺ e, conseqüentemente, com a diferenciação dos mesmos para um fenótipo do tipo memória efetor (linfócitos T_{EM} CD8⁺ e T_{EMRA} CD8⁺) [31], [36], [58], [61], [72], [73]. Tal afirmação é também confirmada com a realização de um estudo em que linfócitos T_N CD8⁺ expandidos na presença de IL-15 mostraram diferenciarem-se em linfócitos independentes de TCR, nomeadamente em linfócitos T CD8⁺ NK-like mediante a expressão do recetor CD45RA, a não expressão do recetor CD28 e a expressão de NKRs ativadores e inibidores (por exemplo, CD56, KIR, NKG2A, NKG2D e NKp46) [59], [72], [73]. Estes estudos em conjunto sugerem também que a IL-15 mimetiza a estimulação do TCR na expansão destes linfócitos, tornando-os independentes do seu recetor clonotípico [36], [59]. Com isto, é possível constatar que a IL-15 induz a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em linfócitos T CD8⁺ NK-like, ativando a sua proliferação e, conseqüentemente, as suas funções citotóxicas mediante a expressão de NKRs na sua superfície celular. Estes NKRs por sua vez podem interagir em *cis-trans* com *open conformers* e induzir diferentes funções não imunológicas.

1.5.3. IFN- γ : origem e estrutura molecular

O interferão gama (IFN- γ) foi identificado por Wheelock [77] há quase 60 anos em estudos de resistência celular à infecção viral e é hoje conhecido por representar um membro distinto da família IFN e desempenhar papéis críticos não apenas na orquestração das respostas imunes inatas e adaptativas contra vírus, bactérias e tumores, mas também na promoção da imunomodulação através de processos inflamatórios e/ou anti-proliferativos [78], [79]. Este é o único interferão do tipo II (IFN-II) dentro da família IFN, que inclui também IFNs tipo I (IFN-I) e tipo III (IFN-III) [78], [80], [81]. As proteínas IFN- γ em humanos são codificadas por genes únicos de 6 kb compostos por 4 exões e 3 intrões localizados no cromossoma 12. O IFN- γ é um homodímero ligado de forma não covalente que consiste em dois polipéptidos idênticos de 17 kDa, tendo estes aproximadamente 160 aminoácidos na sua sequência de DNA. Estes polipéptidos associam-se de forma helicoidal e antiparalela, formando uma molécula compacta e globular, e exibindo um eixo duplo de simetria. A molécula madura sofre glicosilação levando a que cada subunidade madura exiba um peso

molecular de 25 kDa e o homodímero por elas formado cerca de 50 kDa [78], [79], [82]. Ambos os terminais amino e carboxil do polipéptido IFN- γ são necessários para a ligação ao recetor IFN- γ (IFNGR) e indução de respostas biológicas [83]. Este recetor é composto por duas subunidades (IFNGR1 e IFNGR2) que apresentam altos graus de especificidade em sua capacidade de interagir entre si, bem como com seu ligante cognato. Os recetores IFNGR1 e IFNGR2 são codificados por genes de 25 kb e 17 kb, respetivamente, e ambos são compostos por 7 exões. A proteína IFNGR1 é responsável pela maior parte da ligação do ligante de uma maneira específica da espécie. Todavia, a proteína IFNGR2 é responsável pelo aumento da afinidade de ligação do ligante às células que expressam o recetor e pela indução de respostas biológicas [81], [82], [84]. O IFN- γ é essencialmente produzido por linfócitos NK e linfócitos T NK-*like* na resposta inata e ainda por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na resposta adaptativa. Embora todos os linfócitos T CD8⁺ sejam programados para produzir IFN- γ na ativação, apenas os linfócitos T CD4⁺ diferenciados em Th1 produzem IFN- γ de forma eficiente [80], [82], [85], [86]. Ainda assim, o IFN- γ pode ainda ser expresso por outros tipos celulares, nomeadamente, monócitos, macrófagos, DCs e linfócitos B [81], [84], [87].

1.5.4. Efeitos biológicos do IFN- γ nos Linfócitos T

Tal como a IL-15, o IFN- γ também induz fortes sinais proliferativos através das vias de sinalização JAK/STAT e Ras/MAPK, induzindo, assim, a proliferação e maturação celular de determinadas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ [84]. Sabe-se que, a IL-12 é a citocina chave necessária para impulsionar a ativação dos linfócitos Th1. Contudo, a sinalização de IFN- γ é igualmente necessária para uma máxima produção do próprio IFN- γ e para a estabilização do fenótipo Th1. Desta forma, verificamos que o IFN- γ estabelece um ciclo de feedback positivo para a sua própria produção pela mediação dos linfócitos Th1 e que estabelece o fenótipo Th1 pela indução da sinalização da IL-12 [81], [84]–[86]. Contrariamente ao verificado nos linfócitos Th1, sabe-se que o IFN- γ induz um efeito anti-proliferativo nos linfócitos Th2, uma vez que esta citocina regula negativamente a expressão do recetor IFNGR2 em subpopulações Th2. Consequentemente, ocorre a inibição da proliferação celular, a indução de efeitos pró-apoptóticos e a tendência da mudança de fenótipo Th2 para Th1 [81], [82], [85]. Em suma, outros estudos elaborados demonstraram também que o fator de transcrição T-box (T-bet) suprime a diferenciação de linfócitos T_N CD4⁺ em linfócitos Th2 e Th17 ao inibir a proteína-3 de ligação ao GATA (GATA-3, fator de transcrição característico da transcrição destes fenótipos) e ao redirecionar o mesmo para locais de ligação específicos de moléculas relacionadas a Th1, como IL-12 e IFN- γ [86], [87]. O facto do IFN- γ inibir a secreção de IL-17, que é a principal citocina responsável pela

geração de linfócitos Th17, é também uma causa para a supressão da diferenciação no fenótipo Th17 em linfócitos T CD4⁺ [84], [86], [88]. Por sinal, foi também verificado um efeito anti-proliferativo nos linfócitos T_{reg} CD4⁺, o que pode dever-se ao facto desta subpopulação possuir uma semelhante linhagem de desenvolvimento que os linfócitos Th17 e pela inibição da produção desta subpopulação devido à diferenciação no fenótipo Th1 [84], [86], [87].

Similarmente, a sinalização de IFN- γ regula diretamente diversos aspetos da biologia dos linfócitos T CD8⁺, principalmente na geração de capacidades citotóxicas e, portanto, na diferenciação dos mesmos em linfócitos T CD8⁺ efetores. A sinalização de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ resulta assim na regulação positiva do recetor de IL-2, de T-bet e de granzimas, sendo a IL-2 crucial para a geração de linfócitos Tc CD8⁺ e as granzimas responsáveis por mediar a citólise das células alvo [84], [89]. De facto, estudos efetuados utilizando a proteína recombinante de IFN- γ demonstraram que a capacidade citotóxica mediada pelos linfócitos T CD8⁺ apenas era alcançada com eficiência aquando da exposição a esta citocina, o que sugere a tendência do IFN- γ na ativação celular de linfócitos Tc CD8⁺ [82], [84], [86]. Curiosamente, o aumento dos níveis séricos de moléculas de MHC-I solúveis foi associado à ativação celular dos linfócitos Tc CD8⁺ e a altos níveis de IFN- γ , pelo que a regulação positiva na expressão de moléculas de MHC-I induzida por IFN- γ pode ter como resultado imediato a indução de uma mudança de conformação fechada para conformação aberta, favorecendo a sua libertação subsequente no meio extracelular [7], [88].

1.5.5. IL-17A: origem e estrutura molecular

A IL-17, mais conhecida como IL-17A, foi clonada em 1993 por Rouvier et al. [90] e é atualmente conhecida tanto pelo seu papel na defesa do hospedeiro contra infeções bacterianas e fungos, na regeneração e reparação tecidual, na reprogramação metabólica de tecidos linfóides, na indução de neutrófilos, como na patologia autoimune, na hipersensibilidade e na progressão de tumor [91]–[94]. Originalmente chamada de CTLA-8, a IL-17A é uma citocina pró-inflamatória fundadora de uma família de 6 citocinas estruturalmente relacionadas (IL-17 de A a F). A IL-17A e a IL-17F são as mais intimamente relacionadas e são co-expressas em genes ligados. Em relação aos seus recetores, a família IL-17R compreende cinco subunidades de recetores (IL-17R de A a E). O IL-17RA é o membro fundador da família IL-17R e é um co-recetor usado por vários outros ligantes da família IL-17. IL-17A e IL-17F existem como homodímeros ou como um heterodímero e todas as formas da citocina induzem sinais através de um complexo dimérico obrigatório

entre IL-17RA e IL-17RC [91], [92], [95]. Os membros da família IL-17R são definidos pela conservação de um motivo na cauda citoplasmática conhecido como domínio SEFIR (SEF/IL-17R) e um domínio SEFEX denominado de “extensão SEFIR” e necessário para a função da sinalização de IL-17RA [91]–[94], [96]. Adicionalmente, a cauda citoplasmática de IL-17RA contém um outro domínio distal ao complexo SEFIR-SEFEX, que se encontra associado à regulação negativa da sinalização e é denominado de CBAD [91], [92], [95]. Em 2005, a IL-17A ganhou um maior destaque com a descoberta da população de linfócitos Th17 característica da expressão desta citocina, pelo que desde então uma infinidade de literatura tem-se dedicado a compreender os mecanismos que direcionam ao desenvolvimento, diferenciação e regulação desta linhagem [97]–[99]. Embora os linfócitos Th17 sejam tipicamente considerados a principal fonte de IL-17, foi demonstrado que determinados linfócitos T CD8⁺ também produzem esta citocina, os quais são denominados de “Tc17”. Além disso, diversos subconjuntos imunes são também capazes de a produzir, incluindo linfócitos NKT, células linfoides inatas tipo 3 (ILC3s) e células mieloides, incluindo neutrófilos e microglia [91], [93], [94].

1.5.6. Efeitos biológicos da IL-17A nos Linfócitos T

Assim como a IL-15 e o IFN- γ , a IL-17A pode induzir à ativação dos linfócitos T pelas vias de sinalização JAK/STAT e Ras/MAPK, o que sugere uma sinergia entre estas citocinas para a proliferação celular quer de linfócitos T CD4⁺ quer de linfócitos T CD8⁺ [89], [91], [93]. A IL-17A atua indiretamente nas subpopulações de linfócitos T, já que, através da ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), pode mediar as respostas biológicas causadas mediante a produção de diferentes citocinas (como IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β), de quimiocinas (como CXCL-1 e CXCL-2) e de péptidos antimicrobianos [89], [93], [94], [100], [101]. Tal como o nome indica, a IL-17A induz de forma similar a diferenciação de linfócitos T_N CD4⁺ e T_N CD8⁺ em linfócitos Th17 e Tc17, respetivamente. Estes, por sua vez, são caracterizados pela expressão do fator de transcrição ROR γ t e ROR α (receptores de ácido retinóico- γ t e α) e pela ativação celular mediada pela IL-23 [91], [94], [102]. Somente a presença da IL-17A no microambiente celular pode por si só induzir a diferenciação de outras subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, nomeadamente linfócitos Th1, Th2, Tc1, Tc2 e T_{reg}, em linfócitos de fenótipo Th17 e Tc17, o que nos indica a tendência para a geração destes linfócitos IL-17⁺ independentemente do fenótipo da célula precursora. Tal como referido para o IFN- γ , a ativação celular dos linfócitos Th17 e Tc17 causada pela presença de IL-17A, induz um feedback positivo na produção da mesma, pelo que um aumento da ativação celular irá consequentemente induzir ao aumento da produção da própria IL-17A [93], [103], [104]. Embora o fenótipo Tc17 mantenha a produção de IL-17A

pela presença da mesma, os linfócitos Tc17 apresentam também a capacidade de produção de IFN- γ , o que pode consecutivamente conduzir à mudança de fenótipo para Tc2 [103]–[105]. Em suma, sabe-se que a IL-17A pode induzir um efeito anti-proliferativo em linfócitos T_{reg} aquando da presença de TGF- β e IL-6 e induzir um efeito proliferativo nos mesmos aquando da presença de somente TGF- β . Tal é possível uma vez que o TGF- β induz FoxP3 a produzir T_{reg} e regula negativamente ROR γ t, mas aquando da presença de IL-6, o FoxP3 é suprimido, resultando na regulação positiva de ROR γ t, na própria produção de IL-17A e, consequentemente, na indução de linfócitos Th17 [106]–[108].

1.6. Conclusões

Ao fazermos esta revisão da literatura, verificamos que as citocinas IL-15, IFN- γ e IL-17A partilham as mesmas vias de sinalização e que atuam juntamente num microambiente inflamatório e sempre com o objetivo de induzirem a uma resposta imune necessária. Desta forma, é-nos possível constatar que a sinalização cooperativa entre citocinas é biologicamente relevante no ambiente lesado ou autoimune, onde inúmeros efetores pró-inflamatórios são produzidos e têm potencial para interagir. Assim, é imperativo que o equilíbrio precário entre os lados patogénico e protetor das sinalizações de IL-15, IFN- γ e IL-17A seja mantido, pelo que o estudo sinérgico destas mesmas citocinas em contexto imune é crucial para o esclarecimento do microambiente cruzado de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e na subsequente expressão de *closed* e *open conformers*, focando-se, assim, o presente estudo.

Capítulo 2 – Objetivos

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 2 – Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação e proliferação de linfócitos T humanos mediada por IL-15 e a consequente expressão de moléculas de MHC em conformação fechada e aberta. Para este propósito, a análise da resposta proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ fora estudada recorrendo à utilização de *buffy-coats* doados por doadores saudáveis, onde populações de linfócitos T foram isoladas de células mononucleares do sangue periférico, cultivadas com IL-15 na ausência e presença de IFN- γ e IL-17A e, posteriormente, foram marcadas com os anticorpos monoclonais W6/32 e HC-10, seguido da marcação com anticorpos contra os recetores CD3 e CD8.

Neste contexto, os objetivos em específico foram os seguintes:

- Análise do efeito do IFN- γ e da IL-17A no nível proliferativo mediado por IL-15 de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes em populações isoladas de linfócitos do sangue periférico humano;
- Relação entre o efeito proliferativo de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mediado por IL-15 e a expressão de *closed* e *open conformers* em linfócito T ativados;
- Comparação do efeito proliferativo e da expressão de *closed* e *open conformers* pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mediados por IL-15 na ausência e presença das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A.

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

A albumina de soro bovino (BSA), a albumina sérica humana (HSA), o Tris base (Tris), o Cloreto de Amónio (NH_4Cl), o Meio RPMI-1640 e a solução antibiótica-antimicótica contendo Anfotericina, Penicilina e Estreptomicina (APS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). O lymphoprep foi obtido da STEMCELL Technologies (Grenoble, França). A Azida de Sódio (NaN_3) foi obtida da Amresco (Solon, EUA). O kit de proliferação celular *CellTrace™ Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE), o anticorpo W6/32 e o anticorpo HC-10 foram obtidos da eBioscience (San Diego, EUA), enquanto o anticorpo GAM PE, o anticorpo anti-CD8 (CD8 Per CP-Cy5.5 e CD8 β PeCy.7), o anticorpo anti-CD3 (CD3 APC) e o anticorpo irrelevante (IgG2a) foram obtidos da Immunotools (Alemanha). As citocinas rhIL-15, rhIL-17A e os ProDots rhIFN- γ foram obtidos da R&D Systems/Bio-techne (Estados Unidos). Os *buffy-coats* (BCs) de doadores saudáveis utilizados no presente estudo foram fornecidos pelo Centro de Sangue e da Transplantação de Coimbra (IPST, IP).

3.2. Reconstituição das Citocinas IFN- γ e IL-17A

A reconstituição do IFN- γ foi efetuada para 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de água desmineralizada filtrada e a reconstituição da citocina IL-17A foi efetuada para 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 1X Tampão Fosfato-Salino (PBS) com 0,1% de HSA. Posteriormente, para ambas as citocinas, prepararam-se alíquotas contendo 1 μL de citocina e 1 mL de meio RPMI filtrado e suplementado com 5% de solução de albumina sérica humana (HSi) e 1% de APS por forma a obter-se uma solução com concentração final de citocina de 100 ng/mL em cada alíquota.

3.3. Isolamento de Células

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas de BCs após centrifugação com lymphoprep a 800g (RCF) durante 30 minutos. Estas foram lavadas duas vezes com 1X PBS e com solução de lise de eritrócitos (10 mM Tris, 150 mM NH_4Cl , pH = 7,4) durante 10 minutos a 37°C, onde posteriormente foram novamente lavadas com 1X PBS e filtradas, tal como ilustrado na **Figura 6**. Os linfócitos do sangue periférico humano (PBLs) foram então isolados a partir da incubação da suspensão celular de PBMCs,

calculada para um total de 100 milhões de células em 2 placas de cultura celular contendo meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (FBSi), durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Os PBLs isolados foram posteriormente lavados para o cálculo do número de células viáveis e marcados com CFSE.

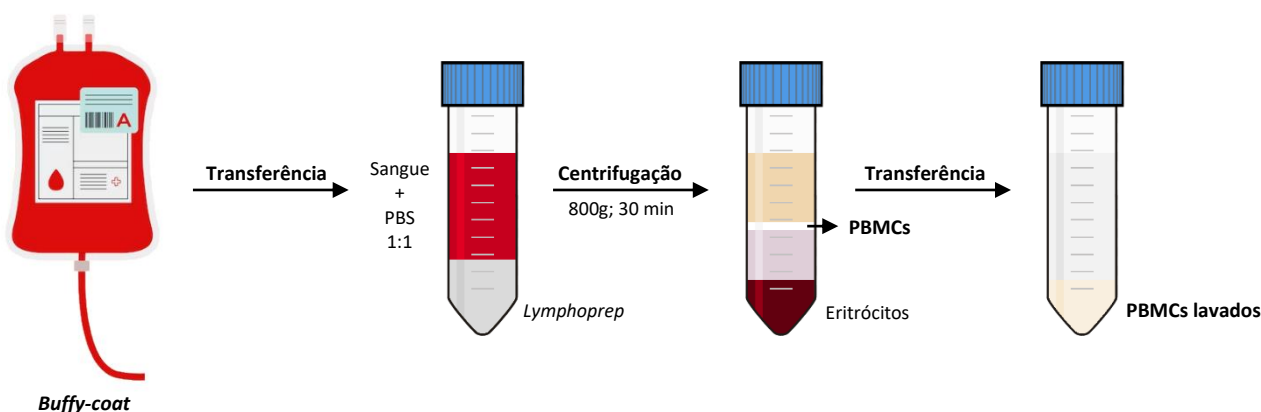


Figura 6 – Diagrama representativo do procedimento de isolamento de PBMCs a partir de BCs de doadores saudáveis. Foram recolhidos de um BC cerca de 15 mL de sangue total para cada um de 2 tubos falcon de 50 mL e posteriormente adicionados 15 mL de 1X PBS a cada um dos 2 tubos. Após ressuspensão, a solução de Sangue + 1X PBS na proporção de 1:1 foi cuidadosamente transferida para 2 novos tubos falcon de 50 mL com 15 mL de Lymphoprep previamente adicionado e centrifugada a 800g durante 30 minutos. Os anéis de PBMCs resultantes da centrifugação foram transferidos e unidos num único tubo falcon de 50 mL, onde procedeu-se à sua lavagem e respetiva purificação para obtenção de PBLs após a sua incubação.

3.4. Contagem de Células

Por forma a realizar-se a contagem de células, preparou-se uma solução contendo 10 μ L de suspensão celular e 90 μ L de Azul Tripiano. Desta solução foram transferidos 10 μ L para cada um dos lados de uma câmara de Neubauer, procedeu-se à contagem das células nos diferentes quadrantes e realizou-se a sua média. Seguidamente, estimou-se o número de células por mL de suspensão (1) e o número total de células na respetiva suspensão celular (2), através das seguintes fórmulas:

$$N^{\circ} \text{ de Células / mL} = \text{média do } n^{\circ} \text{ de células dos quadrantes} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad (1)$$

$$N^{\circ} \text{ Total de Células} = N^{\circ} \text{ de Células / mL} \times \text{Volume da suspensão celular} \quad (2)$$

3.5. Marcação de PBLs com CFSE

Após a contagem do número de células, marcou-se cerca de 20 milhões de PBLs com CFSE a uma concentração final de 5 mM durante 5 minutos, com mistura ocasional e ao abrigo da

luz. De seguida, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI suplementado com 10% de FBSi e ressuspensas em 2 mL de meio de cultura (meio RPMI suplementado com 5% de HSi e 1% de APS).

3.6. Condições de Cultura Celular

Numa placa de 24 poços, cultivou-se cerca de 1 milhão de PBLs marcados com CFSE em cada poço de cultura celular e perfez-se com meio RPMI filtrado e suplementado com 5% de HSi e 1% de APS até um volume final de 1 mL por poço. A cultura celular foi incubada a 37°C, 5% CO₂ durante 12 dias, em que no dia 0 e 6 de cultura celular foram adicionadas as citocinas IL-15, IFN- γ e IL-17A em diferentes condições de estudo (adição de 1 e 10 μ L de citocina no dia 0 e 6 de cultura celular) e tal como verificado na **Figura 7**. Ainda no dia 6 de cultura celular, foram repostos a cada poço de cultura celular 200 μ L de meio RPMI filtrado e suplementado com 5% de HSi e 1% de APS e 10 μ L de IL-15.

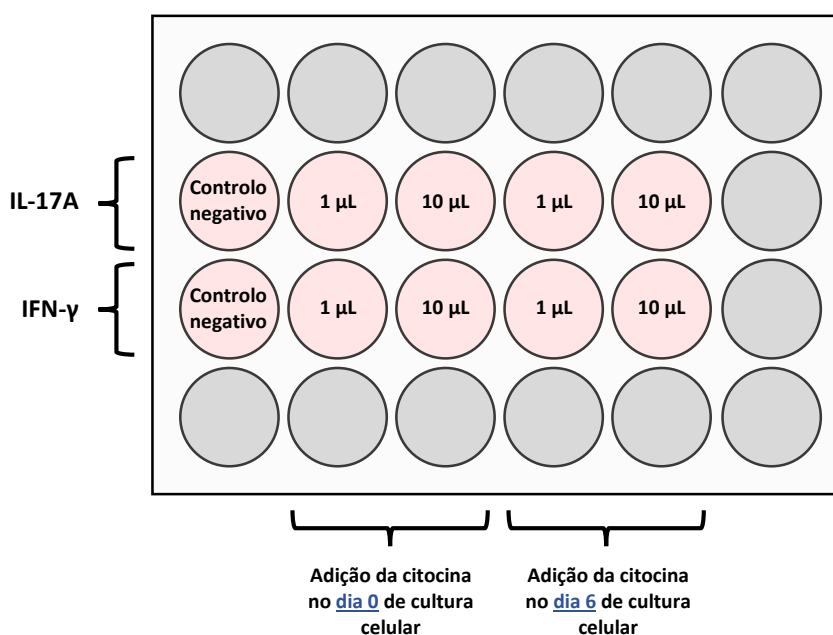


Figura 7 – Diagrama ilustrativo da cultura celular de PBLs marcados com CFSE na ausência e presença de IFN- γ e IL-17A. A cultura celular foi efetuada numa placa de 24 poços e incubada durante 12 dias a 37°C, 5% de CO₂. Em todos os poços de cultura celular foram adicionados 10 μ L de IL-15 no dia 0 de cultura celular e também no dia 6. O controlo negativo apenas contém a citocina IL-15. Após os 12 dias de incubação celular, as células foram centrifugadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.7. Citometria de Fluxo

Para a análise por citometria de fluxo, cultivou-se em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços de fundo redondo cerca de 0,5 milhões de células da suspensão celular de PBLs

marcados com CFSE cultivada durante 12 dias na presença das citocinas IL-15, IFN- γ e IL-17A e procedeu-se às diferentes marcações com os anticorpos de interesse a uma temperatura de 4°C, durante 30 minutos de incubação para cada marcação. Para o estudo da expressão de *closed conformers* marcaram-se as células com o anticorpo primário W6/32, enquanto para o estudo da expressão de *open conformers* marcaram-se as células com o anticorpo primário HC-10. Como controlo negativo fez-se a marcação das células cultivadas na presença de somente IL-15 em 3 poços com IgG2a, W6/32 e HC-10 separadamente, enquanto como controlo positivo, foram cultivadas células na presença de IL-15 + IFN- γ e IL-15 + IL-17A, contendo unicamente *Staining Buffer* (SB) (1X PBS, 0,2% de BSA e 0,1% de NaN₃), tal como ilustrado na **Figura 8**. Tanto no controlo negativo como no estudo da expressão de *closed* e *open conformers* na presença das citocinas IFN- γ e IL-17A, foi posteriormente necessária uma marcação com um anticorpo secundário *goat anti-mouse* (GAM PE), uma vez que os anticorpos IgG2a, W6/32 e HC-10 não se encontravam conjugados. Seguidamente, marcaram-se todas as células com anticorpos anti-CD3 (CD3 APC) e anti-CD8 (CD8 PerCP-Cy5.5 ou CD8 β PE Cy.7), com exceção das células cultivadas para controlo positivo. Entre cada marcação com os anticorpos de interesse, as células foram lavadas 3 vezes com SB e centrifugadas a 150g durante 2 minutos e a 4°C. Após a última marcação, as células foram lavadas 2 vezes com SB e, posteriormente, 1 vez com 1X PBS e foram recolhidas e transferidas para tubos de citometria para um volume final de 500 μ L de suspensão celular por tubo.

Para cada amostra, pelo menos 20 000 eventos foram adquiridos usando características de *forward scatter/side scatter* (FSC/SSC) em um citómetro de fluxo BD Biosciences Accuri C6 e analisados no software BD Accuri C6.

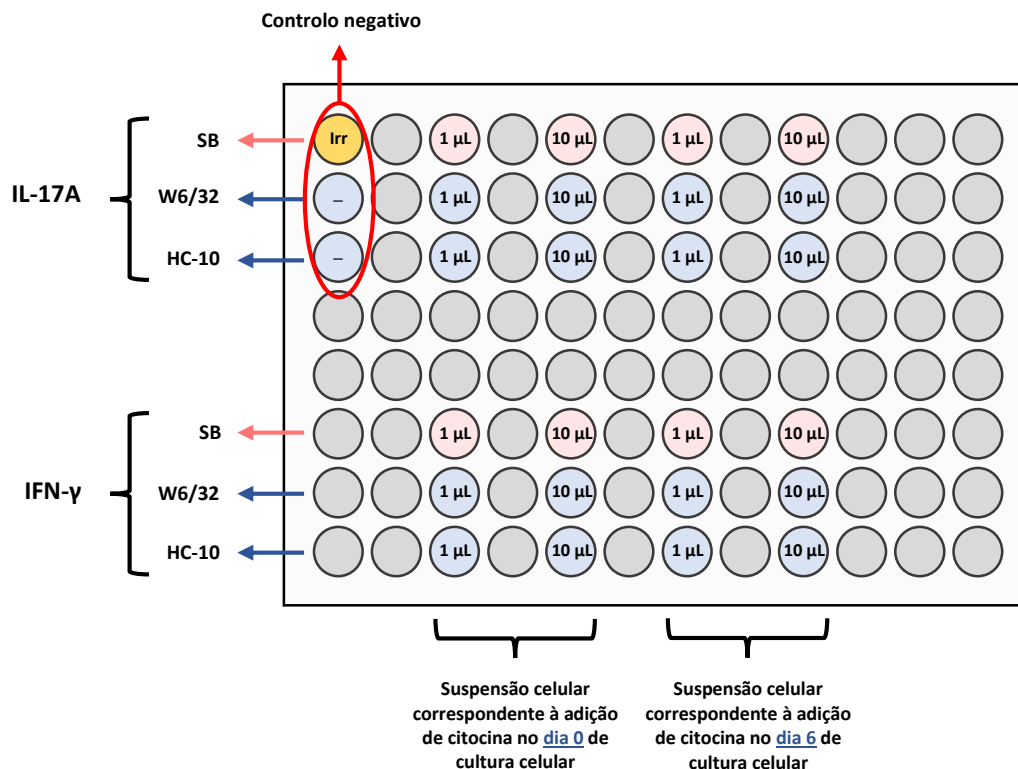


Figura 8 – Diagrama ilustrativo da marcação de PBLs marcados com CFSE para análise em citometria de fluxo. A cultura celular foi efetuada numa placa de 96 poços de fundo redondo, onde as marcações com os anticorpos de interesse foram efetuadas a 4°C durante 30 minutos de incubação para cada marcação. Todos os poços que se encontram a rosa contêm apenas SB, enquanto os poços que se encontram a azul foram marcados com CD3 APC e CD8 PerCP-Cy5.5 ou CD8 β Pe Cy.7. Após a última marcação, as células foram lavadas e, posteriormente, analisadas por citometria de fluxo. O controlo negativo foi cultivado apenas na presença da citocina IL-15. Irr = anticorpo irrelevante, IgG2a; SB = Staining Buffer; – = controlo negativo.

3.8. Estratégia de “Gating”

Na citometria de fluxo, o termo “*Gating Strategy*” é utilizado por forma a identificar e selecionar subpopulações específicas de células com base nas suas características de dispersão da luz e de emissão de fluorescência. Esta estratégia foi utilizada para a obtenção dos valores da % Total de Blastos, da % de Total de Não-Blastos, da % de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e da % de Divisão Celular destes mesmos linfócitos (**Figura 9 e 10**).

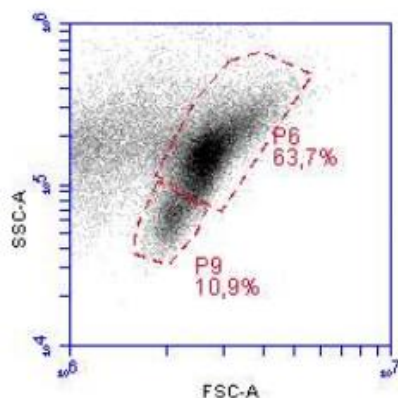


Figura 9 – Estratégia de “Gating” para obtenção da % Total de Blastos e da % Total de Não-Blastos. A região P6 delimita a % Total de Blastos enquanto a região P9 delimita a % Total de Não-Blastos. Esta estratégia é semelhante tanto para a expressão de closed conformers (W6/32) como para a expressão de open conformers (HC-10).

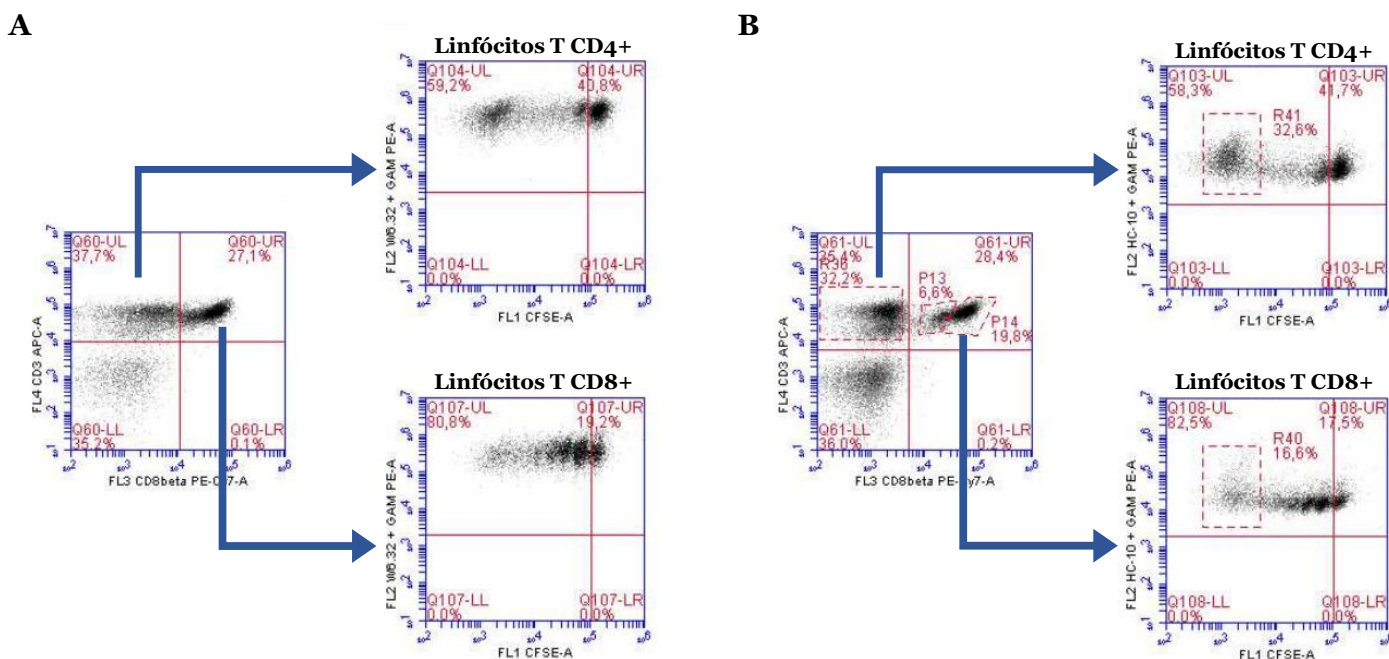


Figura 10 – Estratégia de “Gating” para obtenção da % de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e da % de Divisão Celular dos Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. (A) Estratégia de “Gating” referente à expressão de closed conformers (W6/32). (B) Estratégia de “Gating” referente à expressão de open conformers (HC-10). Os quadrantes Q60-UL e Q61-UL representam a % de Linfócitos T CD4⁺. Os quadrantes Q60-UR e Q61-UR representam a % de Linfócitos T CD8⁺. Os quadrantes Q104-UL e Q103-UL representam a % de Divisão Celular dos Linfócitos T CD4⁺. Os quadrantes Q107-UL e Q108-UL representam a % de Divisão Celular dos Linfócitos T CD8⁺.

Esta estratégia foi também utilizada para a obtenção dos valores referentes à expressão de *closed* e *open conformers* (unidades MFI – Intensidade Média de Fluorescência) pelos

linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que não se dividiram, que se dividiram e que mais se dividiram, sendo estes valores retirados dos mesmos quadrantes onde é obtida a % de Divisão Celular dos Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, tal como se pode verificar na **Figura 11**.

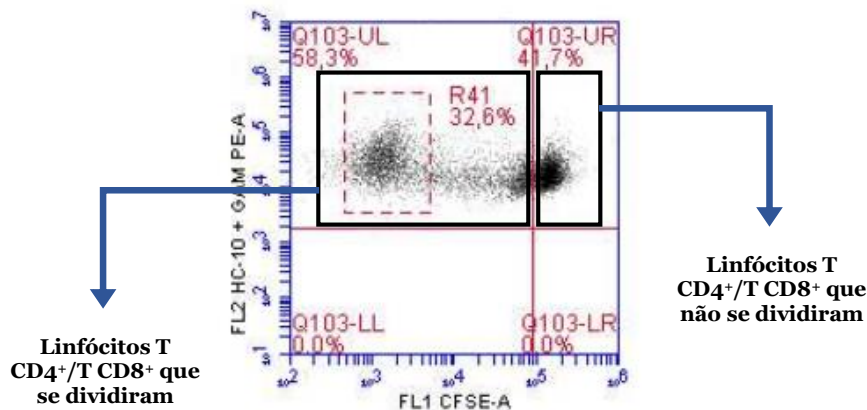


Figura 11 – Estratégia de “Gating” para obtenção da expressão de *closed* e *open conformers* pelos linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ que não se dividiram, que se dividiram e que mais se dividiram. A análise do quadrante Q103-UL permite a obtenção de MFI dos linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ que se dividiram. A análise do quadrante Q103-UR permite a obtenção de MFI dos linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ que não se dividiram. A análise da região R41 permite a obtenção de MFI dos linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ que mais se dividiram. A estratégia de “Gating” para a delimitação das subpopulações de linfócitos T que não se dividiram, que se dividiram e que mais se dividiram é efetuada de forma semelhante quer para os linfócitos T CD4⁺ como para os linfócitos T CD8⁺.

3.9. Análise Estatística

Para a análise da expressão de *closed* e *open conformers*, os dados obtidos na citometria de fluxo foram tratados previamente, sendo que para todos os valores em estudo foi efetuada uma normalização dos valores correspondentes à adição de IL-15 comparando os linfócitos T que se dividiram com os que não se dividiram (3) e os linfócitos T que mais se dividiram com os que não se dividiram (4), tal como verificado, respetivamente, nas seguintes equações:

$$\text{Valor MFI das células que se dividiram normalizado} = \frac{\text{Valor MFI das células que se dividiram}}{\text{Valor MFI das células que não se dividiram}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Valor MFI das células que mais se dividiram normalizado} = \frac{\text{Valor MFI das células que mais se dividiram}}{\text{Valor MFI das células que não se dividiram}} \times 100 \quad (4)$$

Foi também efetuada uma normalização dos valores correspondentes à adição de IL-15 + IFN- γ e IL-15 + IL-17A com o valor corresponde à adição de somente IL-15 (5), tal como especificado na seguinte fórmula:

$$\text{Valor MFI normalizado} = \frac{\text{Valor MFI de IL-15 + IFN-}\gamma\text{/IL-17A}}{\text{Valor MFI de IL-15}} \times 100 \quad (5)$$

A fórmula (5) aplica-se tanto para a análise de MFI das células que se dividiram como para as células que mais se dividiram.

A análise estatística para todos os dados obtidos e normalizados foi realizada usando o software Graph Pad Prism 8. As diferenças entre as médias dos grupos foram determinadas pelo teste ANOVA de 1 fator com correlação para comparações múltiplas. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

Capítulo 4 – Resultados

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 4 – Resultados

4.1. Efeito do IFN- γ e da IL-17A na formação de Blastos mediada pela IL-15

Tendo em conta o principal objetivo deste trabalho, isto é, o estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A em PBLs expandidos e mediados pela IL-15, foi feita uma análise inicial no que diz respeito à ativação e proliferação celular de linfócitos T ativados. Posto isto, foi então obtido a % Total de Blastos, a % Total de Não-Blastos, a % Relativa de Blastos, a % Total de Células em Divisão e o número de divisões celulares. A % Relativa de Blastos foi obtida de acordo com a fórmula (6):

$$\% \text{ Relativa de Blastos} = \frac{\% \text{ Total de Blastos}}{\% \text{ Total de Blastos} + \% \text{ Total de Não-Blastos}} \times 100 \quad (6)$$

Os valores referentes ao estudo comparativo entre a adição de somente IL-15 com a adição de IL-15 + IFN- γ encontram-se registados na **Tabela 1** e a análise estatística é possível visualizar-se através da **Figura 12**. Através da análise dos mesmos, é possível verificar que a adição de IFN- γ induz a uma diminuição significativa da % Total de Blastos, e tendo em conta que esta é inversamente proporcional à % Total de Não-Blastos, era de se esperar um aumento significativo na % Total de Não-Blastos e, segundo a fórmula (6), uma diminuição igualmente significativa na % Relativa de Blastos, tal como fora verificado. Ainda pela análise da **Tabela 1** é possível constatar que a adição de IFN- γ às culturas celulares induz um ligeiro aumento na % Total de Células em Divisão embora não significativo. Já o número de divisões celulares após a adição desta citocina diminuiu comparativamente com somente a adição de IL-15, contudo, de forma também não significativa.

Tabela 1 – Valores obtidos para o efeito do IFN- γ na % Total de Blastos, % Total de Não-Blastos, % Relativa de Blastos, % Total de Células em Divisão e para o Número de Divisões Celulares mediados pela IL-15. Os valores encontram-se representados pela média das 4 experiências realizadas (n = 4) e pelo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como P < 0,05.

Parâmetro em Análise	IL-15	IL-15 + IFN- γ (a)		IL-15 + IFN- γ (b)	
	10 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL
% Total de Blastos	66,4 \pm 4,7	53,1 \pm 3,6 *	50,8 \pm 3,5 *	51,1 \pm 6,4 *	49,1 \pm 3,5
		P = 0,0347	P = 0,0450	P = 0,0490	ns
% Total de Não-Blastos	8,7 \pm 1,3	10,1 \pm 1,2 *	10,8 \pm 1,7 *	12,4 \pm 2,2	10,3 \pm 1,2
		P = 0,0221	P = 0,0330	ns	ns
% Relativa de Blastos	88,4 \pm 1,5	83,9 \pm 2,1 *	82,6 \pm 2,2 *	80,0 \pm 4,3	82,6 \pm 1,3 *
		P = 0,0111	P = 0,0243	ns	P = 0,0151
% Total de Células em Divisão	78,9 \pm 1,0	83,0 \pm 2,8	80,8 \pm 2,2	79,7 \pm 4,8	81,3 \pm 2,1
		ns	Ns	ns	ns
Número de Divisões Celulares	7,0 \pm 0,0	6,8 \pm 0,3	6,3 \pm 0,3	6,3 \pm 0,3	6,3 \pm 0,3
		ns	Ns	ns	ns

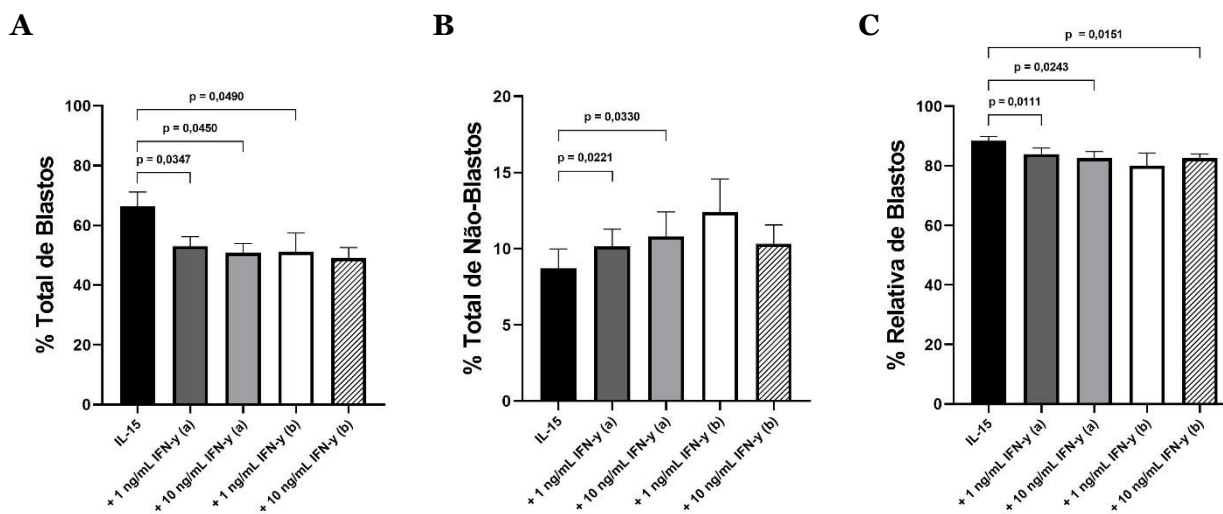
(a) – adição de IFN- γ no dia 0 de cultura celular de PBLs;

(b) – adição de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs;

P – *p value*;

ns – sem significância estatística;

* – significância estatística entre a adição de IL-15 e a adição de IL-15 + IFN- γ .



No que diz respeito aos valores referentes ao estudo comparativo entre a adição de somente IL-15 com a adição de IL-15 + IL-17A é possível a sua observação através da **Tabela 2** e da **Figura 13**. Através da análise destes, é possível verificar-se que a adição de IL-17A induz um efeito na ativação e proliferação celular semelhante à adição de IFN- γ . Assim, a IL-17A induz a uma diminuição significativa da % Total de Blastos, ao aumento significativo da % Total de Não-Blastos e a uma diminuição igualmente significativa na % Relativa de Blastos. Em suma, pela análise da **Tabela 2**, verificou-se que a adição de IL-17A induz a um ligeiro aumento na % Total de Células em Divisão e a uma diminuição do número de divisões celulares comparativamente com somente a adição de IL-15, embora sem significância estatística.

Tabela 2 – Valores obtidos para o efeito do IL-17A na % Total de Blastos, % Total de Não-Blastos, % Relativa de Blastos, % Total de Células em Divisão e para o Número de Divisões Celulares mediados pela IL-15. Os valores encontram-se representados pela média das 4 experiências realizadas (n = 4) e pelo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como P < 0,05.

Parâmetro em Análise	IL-15	IL-15 + IL-17A (a)		IL-15 + IL-17A (b)	
	10 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL
% Total de Blastos	67,1 \pm 4,2	54,9 \pm 3,1 *	54,0 \pm 2,8 **	52,3 \pm 4,5 *	50,6 \pm 6,5
		P = 0,0363	P = 0,0064	P = 0,0242	ns
% Total de Não-Blastos	9,1 \pm 1,1	10,7 \pm 1,5	9,6 \pm 1,2	11,5 \pm 1,8	11,7 \pm 1,6 *
		ns	Ns	ns	P = 0,0460
% Relativa de Blastos	88,0 \pm 1,4	83,6 \pm 2,5	84,9 \pm 1,6 *	81,7 \pm 3,5	80,6 \pm 4,1
		ns	P = 0,0375	ns	ns
% Total de Células em Divisão	78,2 \pm 1,7	82,2 \pm 3,8	79,5 \pm 3,7	80,4 \pm 4,4	79,9 \pm 5,1
		ns	Ns	ns	ns
Número de Divisões Celulares	7,0 \pm 0,0	6,5 \pm 0,3	6,0 \pm 0,4	6,7 \pm 0,3	6,7 \pm 0,3
		ns	Ns	ns	ns

(a) – adição de IL-17A no dia 0 de cultura celular de PBLs;

(b) – adição de IL-17A no dia 6 de cultura celular de PBLs;

P – *p value*;

ns – sem significância estatística;

* e ** – significância estatística entre a adição de IL-15 e a adição de IL-15 + IL-17A.

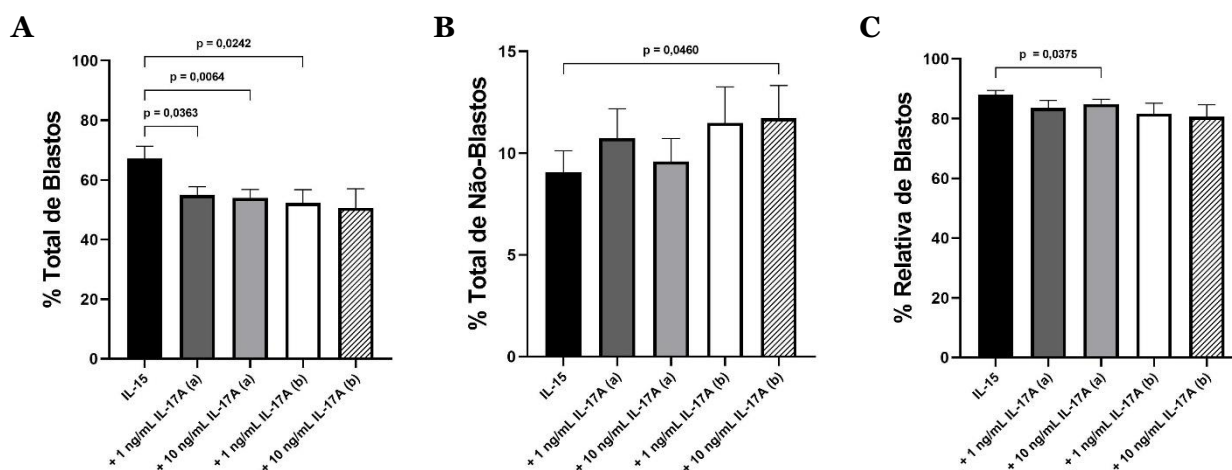


Figura 13 – Efeito do IL-17A na expansão de Blastos mediada pela IL-15. (A) % Total de Blastos aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + IL-17A. (B) % Total de Não-Blastos aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + IL-17A. (C) % Relativa de Blastos aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + IL-17A. O estudo foi feito com a adição de 10 ng/mL de IL-15 em todas as culturas celulares e com a adição ocasional de 1 e 10 ng/mL de IL-17A no dia 0 ou no dia 6 de cultura celular de PBLs. Os valores foram obtidos pela média da percentagem referente a 4 experiências realizadas ($n = 4$) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como $P < 0,05$. (a) – adição de IL-17A no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IL-17A no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – *p value*.

4.2. Efeito do IFN- γ e da IL-17A na % de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados pela IL-15

Tal como referido nos Materiais e Métodos e demonstrado na respetiva **Figura 10** dos mesmos, a obtenção da % de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi efetuada com recurso a uma estratégia denominada de Estratégia de “Gating”. Esta estratégia permitiu-nos observar que embora a adição de IL-15 + IL-17A induza um aumento da % de Linfócitos T CD4⁺, quer aquando da marcação com W6/32 (*closed conformers*) quer aquando da marcação com HC-10 (*open conformers*), e induza uma diminuição da % de Linfócitos T CD8⁺ que expressam W6/32 e um aumento da % Linfócitos T CD8⁺ que expressam HC-10, este aumento não fora estatisticamente significativo. No que diz respeito à adição de IL-15 + IFN- γ , verificou-se que a mesma pode induzir um aumento não significativo da % de Linfócitos T CD4⁺ (devido ao elevado valor SEM) aquando da marcação com W6/32 e a uma diminuição significativa aquando da marcação com HC-10 (após a adição de 10 ng/mL de IFN- γ no dia 0 da cultura celular de PBLs) (ver **Figura 14**). Contrariamente ao verificado para a % de Linfócitos T CD4⁺, verificou-se que a adição de IL-15 + IFN- γ pode induzir uma ligeira diminuição da % de Linfócitos T CD8⁺ aquando da marcação com W6/32 e um ligeiro aumento aquando da marcação com HC-10, embora também sem significância estatística (ver **Figura 15**).

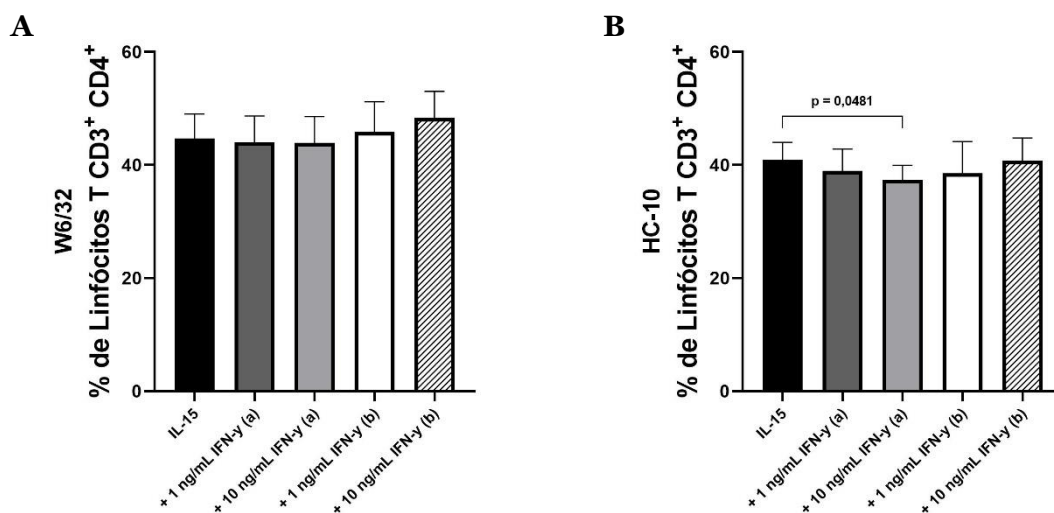


Figura 14 – Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD4⁺ ativados pela IL-15. (A) Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD4⁺ aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ e posterior marcação com W6/32. (B) Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD4⁺ aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ e posterior marcação com HC-10. Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE, as células foram marcadas com W6/32 + GAM PE e com HC-10 + GAM PE. Posteriormente, estas foram marcadas com os anticorpos CD3 APC e CD8 PerCP-Cy5.5 ou CD8 β PE Cy.7 e analisadas por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram obtidos pela média da percentagem referente a 4 experiências realizadas (n = 4) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como P < 0,05. (a) – adição de IFN- γ no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

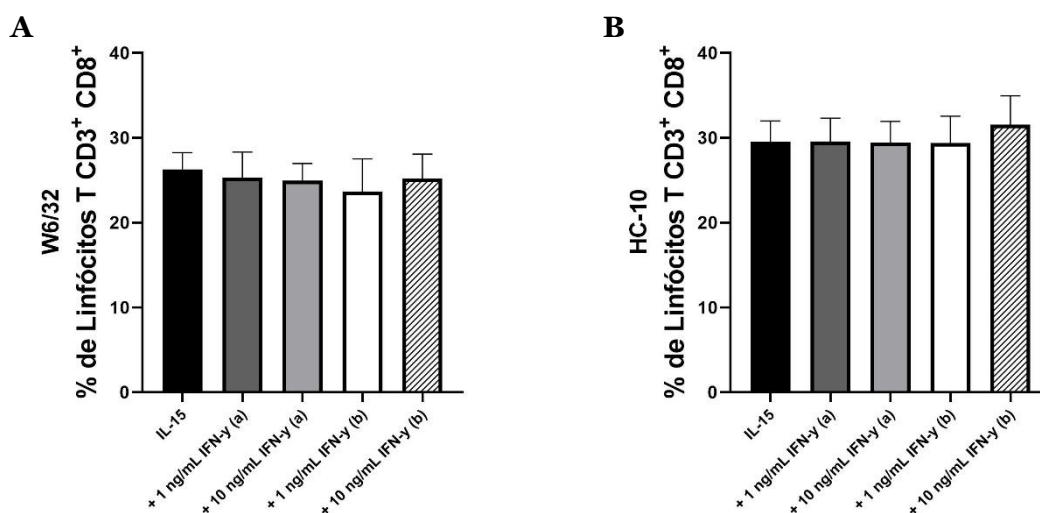


Figura 15 – Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-15. (A) Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD8⁺ aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ e posterior marcação com W6/32. (B) Efeito do IFN- γ na % de Linfócitos T CD8⁺ aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ e posterior marcação com HC-10. Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE, as células foram marcadas com W6/32 + GAM PE e com HC-10 + GAM PE. Posteriormente, estas foram marcadas com os anticorpos CD3 APC e CD8 PerCP-Cy5.5 ou CD8 β PE Cy.7 e analisadas por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram obtidos pela média da percentagem referente a 4 experiências realizadas (n = 4) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como P < 0,05. (a) – adição de IFN- γ no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

4.3. Papel do IFN- γ e da IL-17A na Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados pela IL-15

Ainda através da estratégia de “Gating” é possível observamos a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ devido à marcação efetuada com CFSE em FL1 (1^o detetor de fluorescência do citômetro de fluxo). Sendo o CFSE característico para a observação do número de divisões celulares ocorridas e da conseqüente proliferação celular, conseguimos verificar através da **Figura 16 e 17** que, após a adição quer de IL-15 + IFN- γ ou de IL-15 + IL-17A, a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ aumenta visivelmente (59,2% vs. 71,5% (W6/32) e 58,3% vs 68,1% (HC-10), nos linfócitos T CD4⁺; e 80,8% vs. 86,5% (W6/32) e 82,5% vs 87,2% (HC-10), nos linfócitos T CD8⁺), contudo, derivado ao valor SEM obtido entre a média das 4 experiências realizadas, os resultados não apresentam significância estatística ($P > 0,05$) em qualquer das condições de estudo realizadas (isto é, com a adição de 1 ou 10 ng/mL de citocina IFN- γ /IL-17A no dia 0 ou 6 de cultura celular de PBLs ativados previamente com IL-15). A **Figura 16** representa, assim, a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ ativados pela IL-15 e marcados com os anticorpos W6/32 (**A**) e HC-10 (**B**) na ausência e presença de IFN- γ ou IL-17A, enquanto a **Figura 17** representa a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-15 e marcados com os anticorpos W6/32 (**A**) e HC-10 (**B**) na ausência e presença de IFN- γ ou IL-17A.

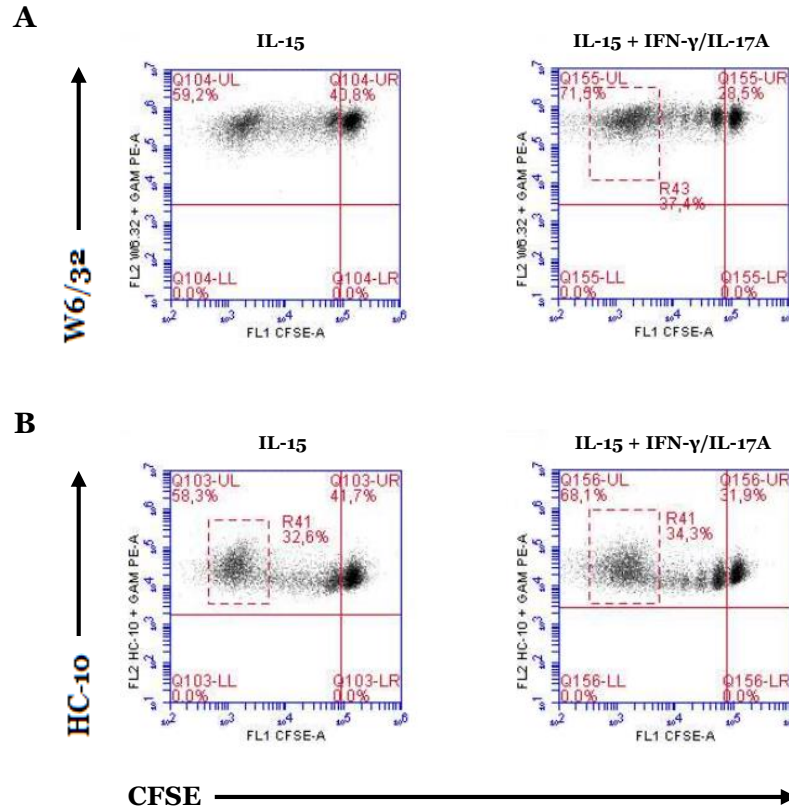


Figura 16 – Divisão celular de linfócitos T CD4⁺ ativados pela IL-15 na ausência (dot-plots à esquerda) e na presença (dot-plots à direita) de IFN- γ ou de IL-17A. (A) Divisão celular de linfócitos T CD4⁺ ativados pela IL-15 na ausência e na presença de IFN- γ /IL-17A marcados com o anticorpo W6/32 + GAM PE. (B) Divisão celular de linfócitos T CD4⁺ ativados pela IL-15 na ausência e na presença de IFN- γ /IL-17A marcados com o anticorpo HC-10 + GAM PE. Antes da cultura celular de PBLs durante os 12 dias de cultura, os PBLs isolados foram previamente marcados com CFSE para a análise da divisão celular através da citometria de fluxo e de acordo com as características de FSC/SSC. Os dot-plots obtidos na análise do efeito de IFN- γ são similares aos dot-plots obtidos na análise do efeito de IL-17A, pelo que os dot-plots representados em (A) e (B) são universais para quaisquer condições estudadas e representativos de qualquer das 4 experiências realizadas (n = 4). Os quadrantes Q104-UL e Q155-UL representam a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ marcados com W6/32 + GAM PE. Os quadrantes Q103-UL e Q156-UL representam a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ marcados com HC-10 + GAM PE.

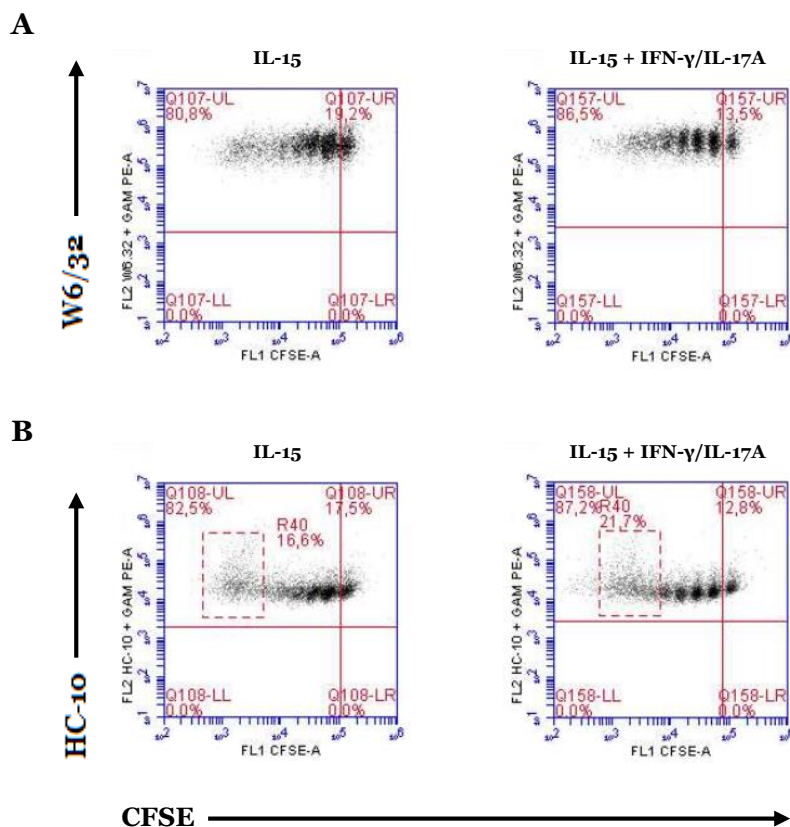


Figura 17 – Divisão celular de linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-15 na ausência (dot-plots à esquerda) e na presença (dot-plots à direita) de IFN- γ ou de IL-17A. (A) Divisão celular de linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-15 na ausência e na presença de IFN- γ /IL-17A marcados com o anticorpo W6/32 + GAM PE. (B) Divisão celular de linfócitos T CD8⁺ ativados pela IL-15 na ausência e na presença de IFN- γ /IL-17A marcados com o anticorpo HC-10 + GAM PE. Antes da cultura celular de PBLs durante os 12 dias de cultura, os PBLs isolados foram previamente marcados com CFSE para a análise da divisão celular através da citometria de fluxo e de acordo com as características de FSC/SSC. Os dot-plots obtidos na análise do efeito de IFN- γ são similares aos dot-plots obtidos na análise do efeito de IL-17A, pelo que os dot-plots representados em (A) e (B) são universais para quaisquer condições estudadas e representativos de qualquer das 4 experiências realizadas (n = 4). Os quadrantes Q107-UL e Q157-UL representam a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD8⁺ marcados com W6/32 + GAM PE. Os quadrantes Q108-UL e Q158-UL representam a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD8⁺ marcados com HC-10 + GAM PE.

Pela análise estatística efetuada de acordo com as equações (3) e (4) dos Materiais e Métodos e pela observação das **Figuras 16 (B)** e **17 (B)**, é perceptível que os linfócitos T que mais se dividiram expressam mais *open conformers* em comparação com os linfócitos T que se dividiram ou que não se dividiram, pois à medida que ocorrem os diferentes ciclos de divisão celular, a relação do valor de MFI da expressão de epitopos de HC-10 comparando os linfócitos que se dividiram e que mais se dividiram com os linfócitos que não se dividiram tende a aumentar. Ainda pela análise das **Figuras 16 e 17**, é-nos possível constatar que o nível de expressão de *closed conformers* pelos linfócitos T isolados na presença de unicamente IL-15 apresentam uma ligeira diminuição após os diferentes ciclos de divisão celular, enquanto o nível de expressão de *open conformers* apresenta um claro aumento, o que é um resultado novo tendo em conta todos os estudos existentes na

literatura. Como esperado, verificou-se também que o valor MFI correspondente aos linfócitos T marcados com W6/32 + GAM PE é substancialmente superior em relação ao valor MFI correspondente aos linfócitos T marcados com HC-10 + GAM PE, pelo que é possível constatar que a expressão de *closed conformers* é significativamente superior em relação à expressão de *open conformers* por estes linfócitos.

4.4. Delimitação das 3 subpopulações de Linfócitos T isoladas após marcação com CFSE e ativação com IL-15

A marcação com CFSE para além de permitir a observação do número de divisões celulares, permite-nos ainda, de acordo com o seu valor de MFI e o seu nível de proliferação celular, verificar e delimitar 3 diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺: os linfócitos T que não se dividiram, os linfócitos T que se dividiram e os linfócitos T que mais se dividiram. Pelo uso da estratégia de “Gating” referida na **Figura 11** dos Materiais e Métodos e através do histograma representado na **Figura 18** é possível a delimitação destas subpopulações, onde é observável que a cada ciclo de divisão celular a quantidade de CFSE contido nas células reduz-se a metade nas respetivas células-filhas e de forma sequencial (normalmente até um máximo de 7 ciclos de divisão), pelo que os linfócitos T que não se dividiram (①) apresentam uma quantidade superior de CFSE em relação aos linfócitos T que se dividiram (②) e aos que mais se dividiram (③). Os linfócitos T que mais se dividiram isolados no presente estudo são linfócitos que se dividiram mais do que 5 vezes, tal como se verifica no histograma da **Figura 18** e nos resultados apresentados nas **Tabelas 1 e 2**.

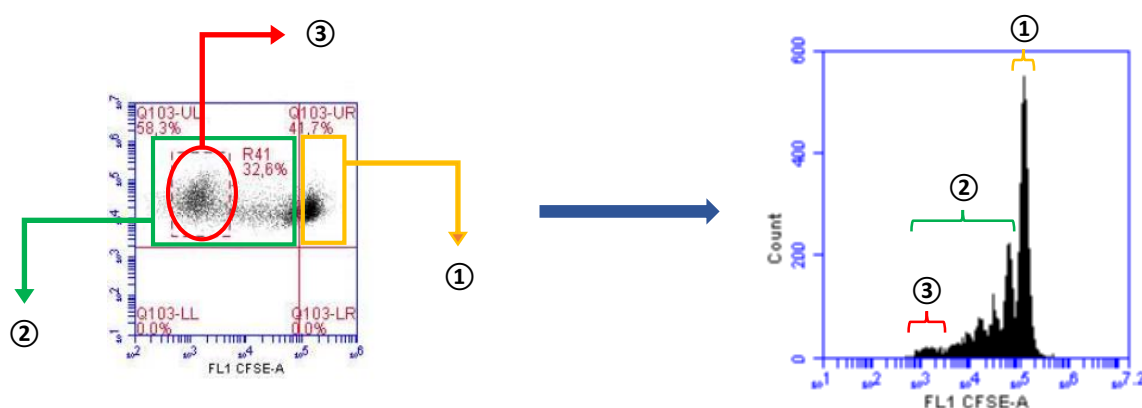


Figura 18 – Determinação das 3 subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados pela IL-15. Os PBLs isolados foram previamente marcados com CFSE para a análise da divisão celular através da citometria de fluxo e de acordo com as características de FSC/SSC. Os linfócitos T que não se dividiram estão representados a amarelo e por ①. Os linfócitos T que se dividiram estão representados a verde e por ②. Os linfócitos T que mais se dividiram estão representados a vermelho e por ③. O dot-plot (à esquerda) e o histograma (à direita) representados são referentes à cultura celular de PBLs durante 12 dias na presença de unicamente 10 ng/mL de IL-15 e 1 mL de meio RPMI filtrado + 5% de HSi + 1% de APS. Os histogramas obtidos

pelo isolamento de linfócitos T CD4⁺ são similares aos histogramas obtidos pelo isolamento de linfócitos T CD8⁺ e de igual forma semelhantes no que diz respeito à delimitação das 3 subpopulações em estudo para qualquer concentração de citocina estudada, pelo que o histograma representado é universal para qualquer condição do estudo e representativo das 4 experiências realizadas (n = 4).

4.4.1. Estudo da expressão de epitopos de W6/32 (*closed conformers*) e HC-10 (*open conformers*) nos Linfócitos T que se dividiram na presença de IFN- γ e de IL-17A

Tal como referido pela literatura, a expressão de epitopos de W6/32 é característica da expressão de *closed conformers*, enquanto a expressão de epitopos de HC-10 é característica da expressão de *open conformers* [5], [20], [109], [110]. Sendo um dos objetivos do presente trabalho a relação da proliferação celular com o estudo da expressão de *closed* e *open conformers* pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mediados por IL-15 na ausência e presença das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A, começou-se, assim, por se analisar o valor de MFI dos linfócitos T que se dividiram.

Após a análise estatística elaborada, constatou-se que tanto a adição de IFN- γ como a adição de IL-17A induzem ao aumento da expressão de *closed conformers* (epitopos de W6/32) nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que se dividiram, principalmente aquando da adição de concentrações mais elevadas (10 ng/mL) e aquando da adição da citocina pró-inflamatória em estudo no dia 6 da cultura celular de PBLs previamente ativados pela IL-15. Pela análise das **Figuras 19 e 20** pode-se, assim, verificar que os resultados obtidos para a adição de IL-17A (P = 0,0108 e P = 0,0088 para os linfócitos T CD4⁺ e P = 0,0369 e P = 0,0351 para os linfócitos T CD8⁺) foram mais significativos em comparação com a adição de IFN- γ (P = 0,0410 para os linfócitos T CD4⁺), havendo também uma maior significância aquando da expressão de epitopos de W6/32 pelos linfócitos T CD4⁺ em relação aos linfócitos T CD8⁺.

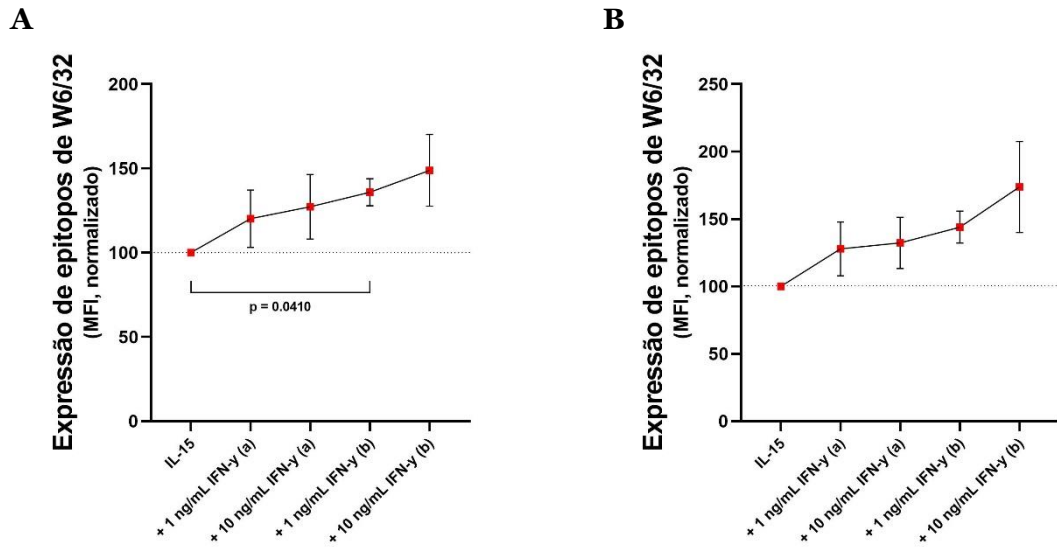


Figura 19 – Efeito da IFN- γ na expressão de epitopos de W6/32 (closed conformers) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que se dividiram ativados pela IL-15. (A) Expressão de epitopos de W6/32 pelos linfócitos T CD4⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ . (B) Expressão de epitopos de W6/32 pelos linfócitos T CD8⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ . Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE (FL1) durante 12 dias de cultura, as células foram marcadas com W6/32 + GAM PE (FL2), com CD8 PerCP-Cy5.5/CD8 β PE Cy.7 (FL3) e com CD3 APC (FL4) para posterior análise por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram normalizados segundo a equação (5) referida nos Materiais e Métodos e são representativos de 4 experiências realizadas (n = 4) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como $P < 0,05$. (a) – adição de IFN- γ no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

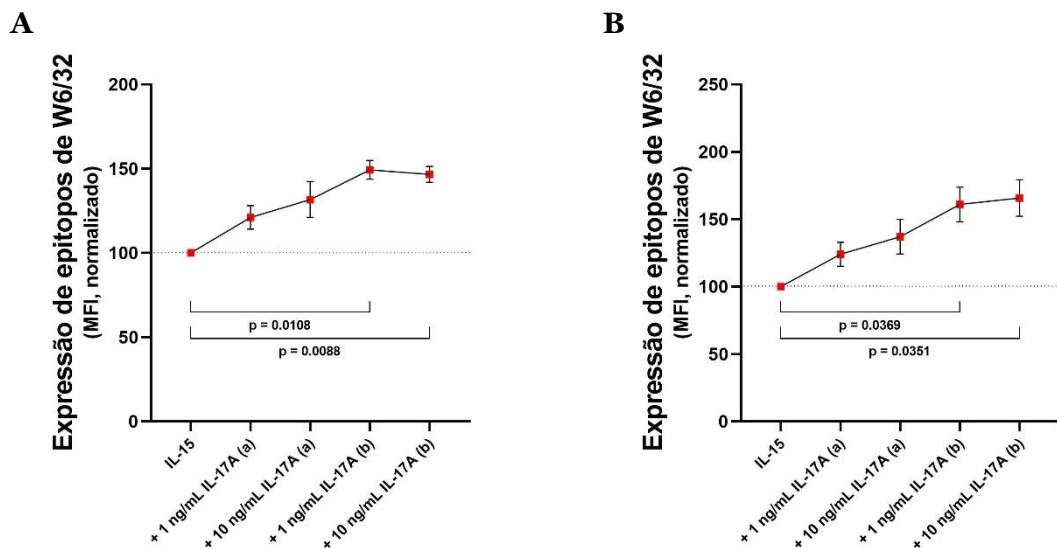


Figura 20 – Efeito da IL-17A na expressão de epitopos de W6/32 (closed conformers) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que se dividiram ativados pela IL-15. (A) Expressão de epitopos de W6/32 pelos linfócitos T CD4⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IL-17A. (B) Expressão de epitopos de W6/32 pelos linfócitos T CD8⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IL-17A. Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE (FL1) durante 12 dias de cultura, as células foram marcadas com W6/32 + GAM PE (FL2), com CD8 PerCP-Cy5.5/CD8 β PE Cy.7 (FL3) e com CD3 APC (FL4) para posterior análise por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram normalizados segundo a equação (5) referida

nos Materiais e Métodos e são representativos de 4 experiências realizadas ($n = 4$) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como $P < 0,05$. (a) – adição de IL-17A no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IL-17A no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

No que diz respeito à expressão de *open conformers* (epitopos de HC-10) aquando da adição de IFN- γ e de IL-17A, verificou-se que a adição destas citocinas pró-inflamatórias induziam um efeito semelhante quer nos linfócitos T CD4⁺ quer nos linfócitos T CD8⁺. Ainda assim, o efeito provocado pela presença de IFN- γ é ligeiramente diferente ao efeito provocado pela presença de IL-17A. Pela análise da **Figura 21**, pode-se inferir que a adição de IFN- γ no meio de cultura de PBLs conduz à diminuição da expressão de *open conformers* em comparação com somente a adição de IL-15, principalmente aquando da adição de 1 ng/mL de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs, ainda que os dados obtidos sejam apenas significantes na expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ ($P = 0,0108$). Em contrapartida, pela análise da **Figura 22**, pode-se concluir que a adição de IL-17A no meio de cultura de PBLs conduz em geral a uma ligeira diminuição da expressão de *open conformers*, contudo, aquando da adição de 1 ng/mL de IL-17A no dia 0 da cultura celular de PBLs ativados pela IL-15, foi possível observar-se um aumento da expressão dos *open conformers*. No entanto, como o devido aumento apresenta um elevado valor SEM ($P > 0,05$), o mesmo não é significativo nem fiável, pelo que estudos complementares seriam necessários para comprovar se de facto este aumento ocorreria nesta condição particular de cultura.

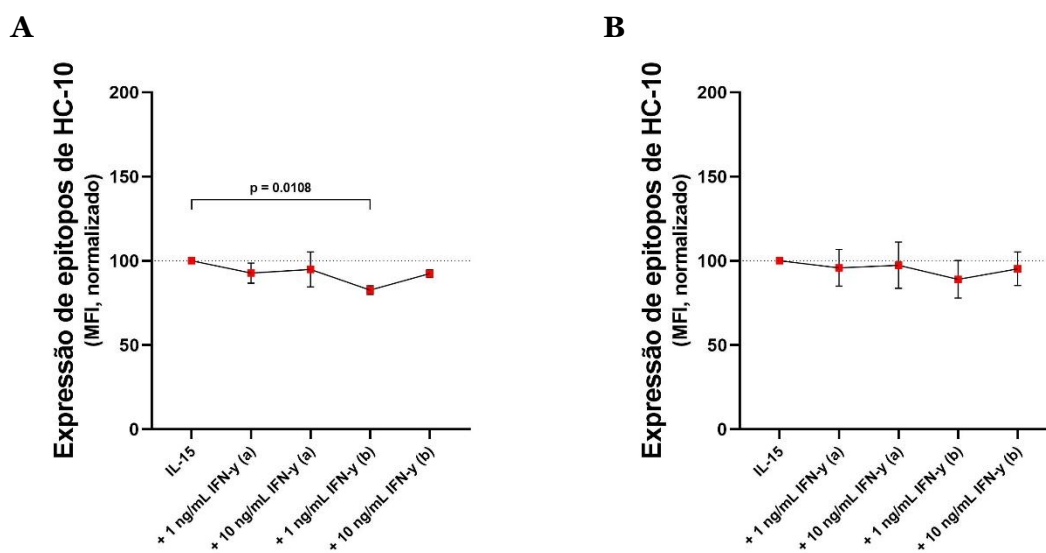


Figura 21 – Efeito da IFN- γ na expressão de epitopos de HC-10 (*open conformers*) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que se dividiram ativados pela IL-15. (A) Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ . **(B)** Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD8⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ . Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE (FL1) durante 12 dias de cultura, as células foram marcadas com HC-10 + GAM PE (FL2),

com CD8 PerCP-Cy5.5/CD8 β PE Cy.7 (FL3) e com CD3 APC (FL4) para posterior análise por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram normalizados segundo a equação (5) referida nos Materiais e Métodos e são representativos de 4 experiências realizadas (n = 4) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como P < 0,05. (a) – adição de IFN- γ no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

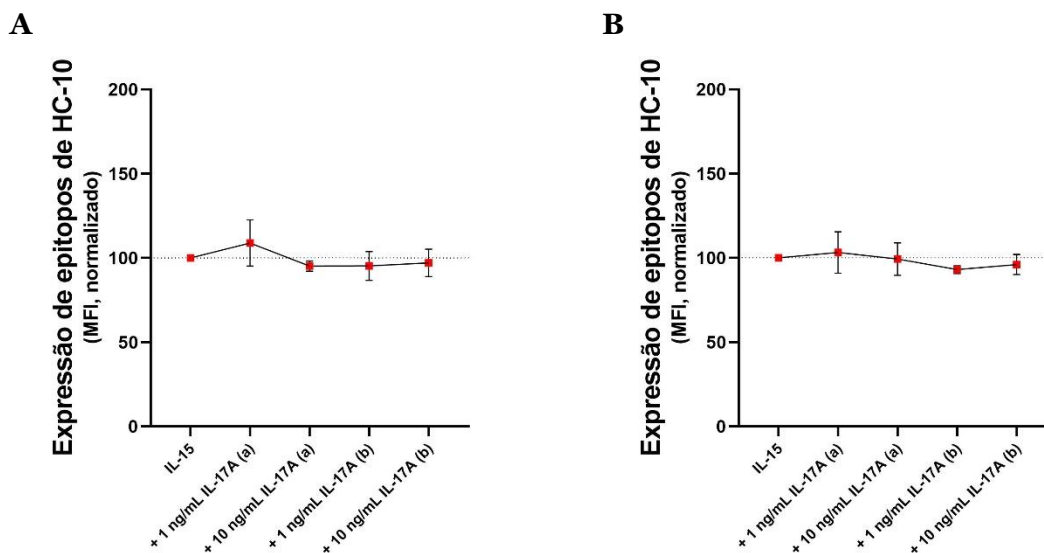


Figura 22 – Efeito da IL-17A na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que se dividiram ativados pela IL-15. (A) Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IL-17A. (B) Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD8⁺ que se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IL-17A. Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE (FL1) durante 12 dias de cultura, as células foram marcadas com HC-10 + GAM PE (FL2), com CD8 PerCP-Cy5.5/CD8 β PE Cy.7 (FL3) e com CD3 APC (FL4) para posterior análise por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram normalizados segundo a equação (5) referida nos Materiais e Métodos e são representativos de 4 experiências realizadas (n = 4) e de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A significância estatística foi definida como P < 0,05. (a) – adição de IL-17A no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IL-17A no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

4.4.2. Estudo da expressão de *closed* e *open conformers* em Linfócitos T que mais se dividiram na presença de IFN- γ e de IL-17A

Pela análise da **Figura 23**, concluímos que a adição de IFN- γ induz um comportamento ligeiramente diferente na expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que mais se dividiram. Todavia, é possível observar-se que em ambos os linfócitos T que mais se dividiram, a expressão de epitopos de HC-10 tende a diminuir com a adição de IL-15 + IFN- γ em comparação com somente a adição de IL-15, sendo esta diminuição mais acentuada na expressão de *open conformers* pelos linfócitos T CD4⁺. Embora seja observável tal facto, os resultados obtidos para as diferentes condições de estudo também

não apresentam significância estatística devido ao elevado valor SEM ($P > 0,05$), pelo que experimentos adicionais seriam necessários para a obtenção de resultados mais fiáveis.

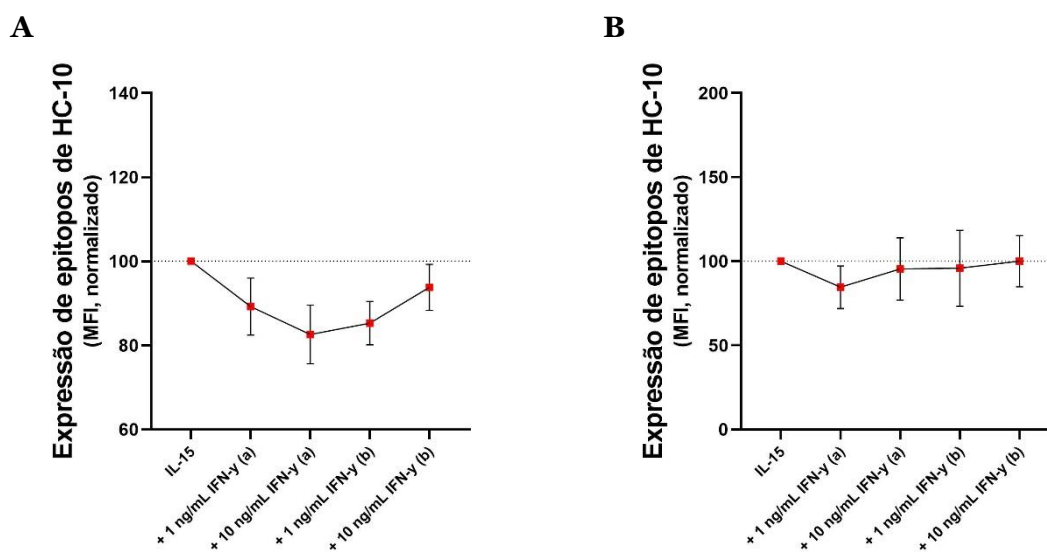


Figura 23 – Efeito do IFN- γ na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que mais se dividiram ativados pela IL-15. (A) Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ que mais se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ . **(B)** Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD8⁺ que mais se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IFN- γ . Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE (FL1) durante 12 dias de cultura, as células foram marcadas com HC-10 + GAM PE (FL2), com CD8 PerCP-Cy5.5/CD8 β PE Cy.7 (FL3) e com CD3 APC (FL4) para posterior análise por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram normalizados segundo a equação (5) referida nos Materiais e Métodos e são apresentados de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ que mais se dividiram é representativa de 3 experiências realizadas ($n = 3$), enquanto a expressão de epitopos pelos linfócitos T CD8⁺ que mais se dividiram é representativa de 4 experiências realizadas ($n = 4$). A significância estatística foi definida como $P < 0,05$. (a) – adição de IFN- γ no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IFN- γ no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

Por fim, ao observar-se a **Figura 24**, verificou-se que os resultados obtidos para as diferentes condições de estudo (adição de 1 ou 10 ng/mL de citocina no dia 0 ou 6 da cultura celular de PBLs ativados previamente pela IL-15) também não apresentam significância estatística devido à disparidade de resultados entre as 4 experiências realizadas. Ainda assim, pela observação dos resultados é perceptível que, contrariamente à adição de IL-15 + IFN- γ , a adição de IL-15 + IL-17A tende a aumentar a expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T que mais se dividiram em comparação com somente a adição de IL-15.

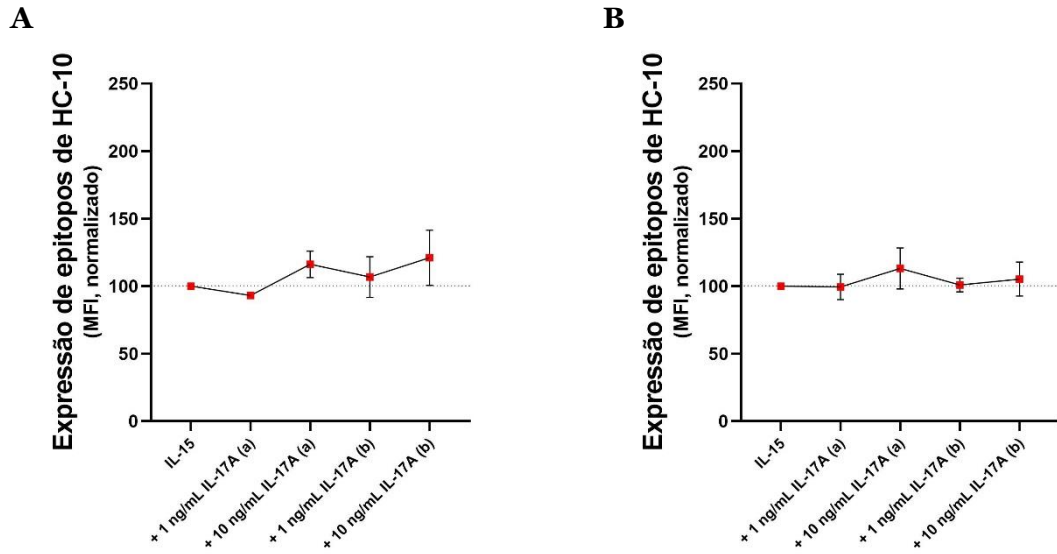


Figura 24 – Efeito da IL-17A na expressão de epitopos de HC-10 (open conformers) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que mais se dividiram ativados pela IL-15. (A) Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ que mais se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IL-17A. **(B)** Expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD8⁺ que mais se dividiram aquando da adição de somente IL-15 e da adição de IL-15 + 1 ou 10 ng/mL de IL-17A. Após a cultura celular dos PBLs marcados com CFSE (FL1) durante 12 dias de cultura, as células foram marcadas com HC-10 + GAM PE (FL2), com CD8 PerCP-Cy5.5/CD8 β PE Cy.7 (FL3) e com CD3 APC (FL4) para posterior análise por citometria de fluxo de acordo com as características de FSC/SSC. Os valores foram normalizados segundo a equação (5) referida nos Materiais e Métodos e são apresentados de acordo com o respetivo desvio padrão médio (média \pm SEM). A expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD4⁺ que mais se dividiram é normalmente representativa de 4 experiências realizadas (n = 4), exceto aquando da adição de 1 ng/mL de IL-17A em que apenas os valores de 2 experiências foram considerados (n = 2). A expressão de epitopos de HC-10 pelos linfócitos T CD8⁺ que mais se dividiram é normalmente representativa de 4 experiências realizadas (n = 4), exceto aquando da adição de 1 ng/mL de IL-17A em que apenas os valores de 3 experiências foram considerados (n = 3). A significância estatística foi definida como P < 0,05. (a) – adição de IL-17A no dia 0 de cultura celular de PBLs; (b) – adição de IL-17A no dia 6 de cultura celular de PBLs; P – p value.

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 5 – Discussão

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Capítulo 5 – Discussão

O principal objetivo do presente trabalho foi o estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na expansão de linfócitos T humanos ativados pela IL-15 e a resultante expressão de *closed* e *open conformers*. Sendo a IL-15 conhecida por induzir a ativação, expansão e proliferação celular dos linfócitos T [57], [58], utilizou-se esta citocina homeostática como estímulo da ativação celular. Sabendo que as citocinas IFN- γ e IL-17A são igualmente conhecidas por ativarem e expandirem diferentes subpopulações de linfócitos T mediante o microambiente em que se encontrem [84], [91], julgou-se que estas citocinas poderiam exacerbar o efeito já conhecido da IL-15, por forma a conduzirem a uma maior proliferação celular pela sua ligação aos recetores IFNGR1-IFNGR2 e IL-17RA-IL-17RC, respetivamente, expressos na superfície dos linfócitos T, motivo pelo qual o IFN- γ e a IL-17A foram escolhidos para o presente estudo. A escolha da isoforma A da IL-17 em comparação com as restantes (de B a F) deveu-se ao facto da mesma ser a isoforma fundadora da família de citocinas IL-17, ao facto de ser a isoforma que mais se relaciona com um papel mais central na condução da autoimunidade, por apresentar uma sinalização mais eficiente e por ser uma das isoformas mais frequentemente encontradas no sistema imunológico humano [91], [92], [95]. Assim sendo, para o devido estudo isolaram-se PBLs a partir de *buffy-coats* de doadores saudáveis, que foram seguidamente marcados com CFSE e cultivados durante um período de 12 dias na presença de IL-15 e na ausência e presença de IFN- γ e IL-17A em diferentes condições de estudo. Para a respetiva análise da expressão de *closed* e *open conformers*, após a cultura celular de 12 dias, os PBLs isolados foram marcados com os anticorpos monoclonais W6/32 e HC-10, conjugados com o anticorpo GAM PE e igualmente marcados com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD8.

Inicialmente, fez-se a análise geral da expansão dos linfócitos presentes nas preparações de PBLs isoladas de BCs, onde foi possível observar-se que tanto a adição de IFN- γ como de IL-17A induziram acentuadamente a uma diminuição da % Total de Blastos e a um aumento da % Total de Não-Blastos, o que nos permite constatar que na presença destas citocinas os linfócitos têm uma clara tendência para proliferarem mais comparativamente à presença de somente IL-15. Ao estudar-se em particular a % de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ verificámos que, na presença de IFN- γ e de IL-17A, a % de Linfócitos T CD4⁺ aumentou aquando da marcação com W6/32 e que a % de Linfócitos T CD8⁺ diminuiu aquando da marcação com W6/32 e aumentou aquando da marcação com HC-10. Adicionalmente, ao estudar-se a % de Divisão Celular de Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, observou-se que a presença das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A conduzem ao aumento da proliferação celular quer

quando da marcação com W6/32 quer na marcação com HC-10. Estes resultados em conjunto permitem-nos por fim inferir que as citocinas IFN- γ e IL-17A, de facto, exacerbam o efeito proliferativo causado pela IL-15, tal como fora esperado dadas as capacidades proliferativas já conhecidas das mesmas nos linfócitos T ou até mesmo pelo facto das citocinas IFN- γ e IL-17A utilizarem as mesmas vias de sinalização para a ativação de linfócitos T que a citocina IL-15 [84], [91]. Além disso, tais resultados podem ainda indicar que a presença de IL-15 pode induzir o aumento da expressão dos recetores do IFN- γ e da IL-17A na MP dos linfócitos T, razão pela qual a presença destas citocinas pró-inflamatórias induza um aumento significativo da proliferação e divisão celular em comparação com a IL-15 sozinha. Contudo, estudos adicionais seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Através da estratégia de “Gating”, observou-se que na presença de somente IL-15, a expressão de epitopos de HC-10 aumenta à medida que a divisão celular aumenta, o que nos indica que esta expressão é, portanto, superior nos linfócitos T que mais se dividiram em comparação com os que não se dividiram e os que se dividiram. Estes resultados encontram-se de acordo com o que já fora descoberto pelos estudos examinados da literatura que referem que as moléculas de MHC-I tendem a passar de uma conformação fechada a aberta quando as células se encontram metabolicamente ativadas [6], [7]. Adicionalmente, foi possível observar-se que os linfócitos T humanos ativados somente pela IL-15 induzem a uma diminuição na expressão de *closed conformers* e a um aumento na expressão de *open conformers* ao fim de diversos ciclos de divisão celular. Interessantemente, embora seja já conhecido o efeito da IL-15 na expansão de linfócitos T, o aumento da expressão de epitopos de HC-10 causado pela presença de IL-15 é pela primeira vez observado num estudo científico. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de investigação, mostraram que os linfócitos T_N CD8⁺ expandidos na presença de IL-15 tinham características de linfócitos T CD8⁺ NK-like, caracterizados fenotipicamente por serem CD45RA⁺ CD28⁻ NKR⁺ [72], [73]. Os resultados desta tese alargam estes resultados ao mostrar pela primeira vez que os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados pela IL-15 expressam *open conformers* na MP, nomeadamente nos linfócitos com mais ciclos de divisão celular, ou seja, são HC-10⁺. Com base na evidência acumulada do possível papel dos *open conformers* na regulação da sinalização de recetores para hormonas e fatores de crescimento [6], [7], é tentador especular que a presença dos *open conformers* na superfície celular de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ poderá estar relacionada com a regulação de sinais intracelulares que regulam a entrada em sucessivos ciclos de divisão celular destes linfócitos T. Se esta regulação é feita através de interações em *cis* ou em *trans* com o recetor para a IL-15 ou com outros recetores que transmitam sinais de sobrevivência, está ainda por esclarecer.

Embora seja conhecido o papel do IFN- γ no aumento da expressão de moléculas de MHC-I na superfície celular dos linfócitos T [7], [86], o efeito desta citocina e da citocina IL-17A na mudança de conformação fechada para aberta destas moléculas de MHC-I permanece até ao momento pouco conhecido, pelo que o presente estudo também abordou esse efeito. Ao delimitar-se as três subpopulações de linfócitos T para a análise da respetiva divisão celular na presença de somente IL-15 ou na presença de IL-15 + IFN- γ e IL-15 + IL-17A, constatou-se que a adição de IFN- γ e de IL-17A induz ao aumento da expressão de moléculas de MHC-I fechadas tanto nos linfócitos T CD4⁺ que se dividiram como nos linfócitos T CD8⁺ que se dividiram, sendo estatisticamente mais significativa a adição de IL-17A em comparação com a adição de IFN- γ à cultura celular de PBLs ativados pela IL-15. Contrariamente, e tal como esperado tendo em conta que a expressão de *closed* e *open conformers* é inversamente proporcional, constatou-se que a adição destas citocinas pró-inflamatórias induz na generalidade uma diminuição da expressão de moléculas de MHC-I abertas pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que se dividiram. Estes resultados sugerem que a adição das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A neutralizam parcialmente o efeito causado pela IL-15 na expressão destas moléculas de MHC-I em conformação fechada e aberta, o qual pode estar relacionado com a elevada presença de moléculas CD8 na MP destes linfócitos que compitam pela ligação com os epitopos de HC-10, ou com a inclinação do IFN- γ e da IL-17A para gerar linfócitos Th1 e Th17, respetivamente, diminuindo, assim, a expressão de moléculas de MHC-I na superfície destes linfócitos.

Ainda que estes estudos tenham proporcionado um maior conhecimento no que diz respeito à expressão de *closed* e *open conformers*, já que poucos estudos em relação a estas moléculas foram até ao momento realizados e uma vez que nenhum estudo correlacionando sinergicamente estas 3 citocinas fora até então elaborado, estudos complementares na presença de IFN- γ e de IL-17A seriam necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos por detrás da expressão destas moléculas de MHC-I abertas e no potencial efeito em funções não imunológicas dos linfócitos T CD8⁺ diferenciados.

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Conclusões

Realizado o presente estudo, foi possível observar-se resultados interessantes no que diz respeito ao papel das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A em perfeita simbiose com a citocina homeostática IL-15 na ativação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Através dos dados obtidos constatou-se que a presença de IFN- γ e IL-17A na cultura celular de PBLs ativados pela IL-15 proporciona um claro aumento na divisão e proliferação celular de linfócitos T, impulsionando, assim, o efeito proliferativo já conhecido da citocina homeostática IL-15.

O nosso trabalho permitiu observar pela primeira vez que na presença de somente IL-15, os PBLs expandidos expressam altos níveis de *open conformers* e baixos níveis de *closed conformers*, principalmente nos linfócitos T que mais se dividiram. Tal observação é indicativa de que após os diferentes ciclos de divisão celular, a expressão de epitopos de HC-10 aumenta, indicando, assim, que a presença de IL-15 na expansão de linfócitos T pode induzir à entrada nos diferentes ciclos de divisão celular pela expressão de *open MHC-I conformers*.

Contrariamente, pudemos constatar que, a adição de IFN- γ e de IL-17A proporcionou um aumento dos *closed conformers* e uma diminuição dos *open conformers* em linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ ativados pela IL-15. Estes resultados sugerem que a adição destas citocinas pró-inflamatórias é capaz de neutralizar parcialmente o efeito da IL-15 na expressão de moléculas de MHC-I abertas, mas não o efeito proliferativo causado pela mesma.

Por forma a se obter um melhor entendimento do potencial terapêutico destas citocinas pró-inflamatórias e a sua ação em cooperação conjunta, estudos adicionais seriam necessários, como por exemplo, o estudo do efeito do IFN- γ e da IL-17A na expansão de subpopulações específicas de linfócitos T CD8⁺ mediada pela IL-15 e a respetiva correlação com a expressão de moléculas de MHC-I abertas capazes de gerar funções não-imunológicas, através das interações *cis-trans* com os recetores TCR e NKRs.

Estudo do efeito das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17A na ativação de linfócitos T humanos mediada pela IL-15

Referências e Bibliografia

- [1] E. T. Abualrous, J. Sticht, and C. Freund, “Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II proteins: impact of polymorphism on antigen presentation”, *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 70, pp. 95–104, 2021.
- [2] J. Valečka, C. R. Almeida, B. Su, P. Pierre, and E. Gatti, “Autophagy and MHC-restricted antigen presentation”, *Mol. Immunol.*, vol. 99, pp. 163–170, 2018.
- [3] F. A. Arosa, E. M. Cardoso, and F. C. Pacheco, *Fundamentos de Imunologia*, 2ª Edição. Porto: Lidel - Edições técnicas, Lda, 2012.
- [4] K. L. Rock, E. Reits, and J. Neefjes, “Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules”, *Trends Immunol.*, vol. 37, no. 11, pp. 724–737, 2016.
- [5] E. M. Cardoso *et al.*, “Distinctive CD8⁺ T cell and MHC class I signatures in polycythemia vera patients”, *Ann. Hematol.*, vol. 97, pp. 1563–1575, 2018.
- [6] F. A. Arosa, S. G. Santos, and S. J. Powis, “Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules”, *Trends Immunol.*, vol. 28, no. 3, pp. 115–123, 2007.
- [7] F. A. Arosa, A. J. Esgalhado, D. Reste-Ferreira, and E. M. Cardoso, “Open MHC class I conformers: A look through the looking glass”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, pp. 1–27, 2021.
- [8] J. Thibodeau, M. A. Moulefera, and R. Balthazard, “On the structure–function of MHC class II molecules and how single amino acid polymorphisms could alter intracellular trafficking”, *Hum. Immunol.*, vol. 80, pp. 15–31, 2019.
- [9] C. Alfonso and L. Karlsson, “Nonclassical MHC Class II Molecules”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, pp. 113–142, 2000.
- [10] P. Cresswell, “Assembly, transport, and function of MHC class II molecules”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, pp. 259–293, 1994.
- [11] G. Lizée, G. Basha, and W. A. Jefferies, “Tails of wonder: Endocytic-sorting motifs key for exogenous antigen presentation”, *Trends Immunol.*, vol. 26, no. 3, pp. 141–149, 2005.
- [12] A. N. Antoniou, S. J. Powis, and T. Elliott, “Assembly and export of MHC class I

- peptide ligands”, *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 15, pp. 75–81, 2003.
- [13] J. G. Donaldson and D. B. Williams, “Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules”, *Traffic*, vol. 10, pp. 1745–1752, 2009.
- [14] S. G. Santos, A. N. Antoniou, P. Sampaio, S. J. Powis, and F. A. Arosa, “Lack of Tyrosine 320 Impairs Spontaneous Endocytosis and Enhances Release of HLA-B27 Molecules”, *J. Immunol.*, vol. 176, no. 5, pp. 2942–2949, 2006.
- [15] E. A. Hughes, C. Hammond, and P. Cresswell, “Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, pp. 1896–1901, 1997.
- [16] J. Neefjes, M. L. M. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke, “Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation”, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, pp. 823–836, 2011.
- [17] W. Held and R. A. Mariuzza, “Cis interactions of immunoreceptors with MHC and non-MHC ligands”, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 4, pp. 269–278, 2008.
- [18] B. C. Guild and J. L. Strominger, “Human and murine class I MHC antigens share conserved serine 335, the site of HLA phosphorylation in vivo”, *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 14, pp. 9235–9240, 1984.
- [19] G. Lizée *et al.*, “Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain”, *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1065–1073, 2003.
- [20] S. G. Santos, S. J. Powis, and F. A. Arosa, “Misfolding of major histocompatibility complex class I molecules in activated T cells allows cis-interactions with receptors and signaling molecules and is associated with tyrosine phosphorylation”, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 51, pp. 53062–53070, 2004.
- [21] R. Gruda *et al.*, “Intracellular Cysteine Residues in the Tail of MHC Class I Proteins Are Crucial for Extracellular Recognition by Leukocyte Ig-Like Receptor 1”, *J. Immunol.*, vol. 179, no. 6, pp. 3655–3661, 2007.
- [22] D. Baía *et al.*, “Interaction of the LILRB1 inhibitory receptor with HLA class Ia dimers”, *Eur. J. Immunol.*, vol. 46, pp. 1681–1690, 2016.
- [23] A. Bodnár *et al.*, “Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled

- by exogenous β 2-microglobulin: Implications in activation of cytotoxic T lymphocytes”, *Int. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 331–339, 2003.
- [24] G. Vámosi, A. Bodnár, S. Damjanovich, P. Nagy, Z. Varga, and L. Damjanovich, “The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes”, *Immunol. Lett.*, vol. 104, pp. 53–58, 2006.
- [25] D. R. Fooksman, G. K. Grönvall, Q. Tang, and M. Edidin, “Clustering Class I MHC Modulates Sensitivity of T Cell Recognition”, *J. Immunol.*, vol. 176, no. 11, pp. 6673–6680, 2006.
- [26] S. Zilberman *et al.*, “HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: The influence of the tumor microenvironment”, *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, pp. 1599–1608, 2012.
- [27] L. A. Benoit, J. Shannon, J. W. Chamberlain, and R. G. Miller, “Influence of Xenogeneic β 2-Microglobulin on Functional Recognition of H-2Kb by the NK Cell Inhibitory Receptor Ly49C”, *J. Immunol.*, vol. 175, no. 6, pp. 3542–3553, 2005.
- [28] C. Due, M. Simonsen, and L. Olsson, “The major histocompatibility complex class I heavy chain as a structural subunit of the human cell membrane insulin receptor: Implications for the range of biological functions of histocompatibility antigens”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, pp. 6007–6011, 1986.
- [29] A. B. Schreiber, J. Schlessinger, and M. Edidin, “Interaction between major histocompatibility complex antigens and epidermal growth factor receptors on human cells”, *J. Cell Biol.*, vol. 98, no. 2, pp. 725–731, 1984.
- [30] G. Mocsár *et al.*, “MHC I Expression Regulates Co-clustering and Mobility of Interleukin-2 and -15 Receptors in T Cells”, *Biophys. J.*, vol. 111, no. 1, pp. 100–112, 2016.
- [31] G. Vámosi *et al.*, “IL-2 and IL-15 receptor α -subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 30, pp. 11082–11087, 2004.
- [32] G. M. Spaggiari *et al.*, “Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction”, *Blood*, vol. 100, no. 12, pp. 4098–4107, 2002.

- [33] N. Zavazava, “Soluble HLA class I molecules: Biological significance and clinical implications”, *Mol. Med. Today*, pp. 116–121, 1998.
- [34] V. Appay, R. A. W. Van Lier, F. Sallusto, and M. Roederer, “Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues”, *Cytom. Part A*, vol. 73, pp. 975–983, 2008.
- [35] N. P. Restifo and L. Gattinoni, “Lineage relationship of effector and memory T cells”, *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 25, pp. 556–563, 2013.
- [36] K. Liu, M. Catalfamo, Y. Li, P. A. Henkart, and N.-P. Weng, “IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8⁺ memory T cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 9, pp. 6192–6197, 2002.
- [37] N. P. Weng, Y. Araki, and K. Subedi, “The molecular basis of the memory T cell response: Differential gene expression and its epigenetic regulation”, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 306–315, 2012.
- [38] Y. D. Mahnke, T. M. Brodie, F. Sallusto, M. Roederer, and E. Lugli, “The who’s who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets”, *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, pp. 2797–2809, 2013.
- [39] F. Sallusto, J. Geginat, and A. Lanzavecchia, “Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, pp. 745–763, 2004.
- [40] F. A. Arosa, A. J. Esgalhado, C. A. Padrão, and E. M. Cardoso, “Divide, conquer, and sense: CD8⁺CD28⁻ T cells in perspective”, *Front. Immunol.*, vol. 7, pp. 1–9, 2017.
- [41] A. N. Vallejo *et al.*, “Expansions of NK-like $\alpha\beta$ T cells with chronologic aging: Novel lymphocyte effectors that compensate for functional deficits of conventional NK cells and T cells”, *Ageing Res. Rev.*, vol. 10, pp. 354–361, 2011.
- [42] D. Mou, J. Espinosa, D. J. Lo, and A. D. Kirk, “CD28 negative T cells: Is their loss our gain?”, *Am. J. Transplant.*, vol. 14, pp. 2460–2466, 2014.
- [43] N. Weng, A. N. Akbar, and J. Goronzy, “CD28⁻ T cells: their role in the age-associated decline of immune function”, *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 7, pp. 306–312, 2009.
- [44] S. Abedin, J. J. Michel, B. Lemster, and A. N. Vallejo, “Diversity of NKR expression

- in aging T cells and in T cells of the aged: The new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly”, *Exp. Gerontol.*, vol. 40, pp. 537–548, 2005.
- [45] M. C. Mingari, M. Ponte, C. Vitale, R. Bellomo, and L. Moretta, “Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: A regulated mechanism that controls T-cell activation and function”, *Hum. Immunol.*, vol. 61, no. 1, pp. 44–50, 2000.
- [46] D. E. Speiser *et al.*, “CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients”, *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, pp. 1990–1999, 1999.
- [47] N. Anfossi, V. Pascal, E. Vivier, and S. Ugolini, “Biology of T memory type 1 cells”, *Immunol. Rev.*, vol. 181, pp. 269–278, 2001.
- [48] M. T. Kim and J. T. Harty, “Impact of inflammatory cytokines on effector and memory CD8⁺ T cells”, *Front. Immunol.*, vol. 5, pp. 1–5, 2014.
- [49] J. J. C. Thome and D. L. Farber, “Emerging concepts in tissue-resident T cells: Lessons from humans”, *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 7, pp. 428–435, 2015.
- [50] J. Smolders *et al.*, “Tissue-resident memory T cells populate the human brain”, *Nat. Commun.*, vol. 9, pp. 1–14, 2018.
- [51] P. Sansoni *et al.*, “The immune system in extreme longevity”, *Exp. Gerontol.*, vol. 43, pp. 61–65, 2008.
- [52] R. Lachmann *et al.*, “Polyfunctional T Cells Accumulate in Large Human Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses”, *J. Virol.*, vol. 86, no. 2, pp. 1001–1009, 2012.
- [53] C. Nathan and A. Ding, “Nonresolving Inflammation”, *Cell*, vol. 140, pp. 871–882, 2010.
- [54] Y.-K. Kim, K.-S. Na, A.-M. Myint, and B. E. Leonard, “The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression”, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 64, pp. 277–284, 2016.
- [55] J.-M. Zhang and J. An, “Cytokines, Inflammation and Pain”, *Int. Anesthesiol. Clin.*,

vol. 45, no. 2, pp. 27–37, 2007.

- [56] K. H. Grabstein *et al.*, “Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor”, *Science*, vol. 264, pp. 965–968, 1994.
- [57] A. Mishra, L. Sullivan, and M. A. Caligiuri, “Molecular pathways: Interleukin-15 signaling in health and in cancer”, *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 2044–2050, 2014.
- [58] S. Zhang, J. Zhao, X. Bai, M. Handley, and F. Shan, “Biological effects of IL-15 on immune cells and its potential for the treatment of cancer”, *Int. Immunopharmacol.*, vol. 91, pp. 1–11, 2021.
- [59] N. L. Alves, F. A. Arosa, and R. A. W. van Lier, “Common γ chain cytokines: Dissidence in the details”, *Immunol. Lett.*, vol. 108, no. 2, pp. 113–120, 2007.
- [60] S. W. Stonier and K. S. Schluns, “Trans-presentation: A novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses”, *Immunol. Lett.*, vol. 127, no. 2, pp. 85–92, 2010.
- [61] T. A. Waldmann, “The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design”, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, pp. 595–601, 2006.
- [62] D. M. Anderson *et al.*, “Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes”, *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 50, pp. 29862–29869, 1995.
- [63] X. Wei *et al.*, “The Sushi Domain of Soluble IL-15 Receptor α Is Essential for Binding IL-15 and Inhibiting Inflammatory and Allogenic Responses In Vitro and In Vivo”, *J. Immunol.*, vol. 167, no. 1, pp. 277–282, 2001.
- [64] J. Marks-Konczalik *et al.*, “IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 21, pp. 11445–11450, 2000.
- [65] Y. Tagaya *et al.*, “Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, pp. 14444–14449, 1997.
- [66] K. A. Read, M. D. Powell, P. W. McDonald, and K. J. Oestreich, “(IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4⁺ T helper cell differentiation”, *Exp. Hematol.*, vol. 44, no. 9, pp. 799–808, 2016.

- [67] G. Kurys, Y. Tagaya, R. Bamford, J. A. Hanover, and T. A. Waldmann, “The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15”, *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 39, pp. 30653–30659, 2000.
- [68] A. T. Waickman *et al.*, “CD4 effector T cell differentiation is controlled by IL-15 that is expressed and presented in trans”, *Cytokine*, pp. 266–274, 2017.
- [69] S. Xu *et al.*, “IL-15 and dendritic cells induce proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from peripheral blood”, *Immunol. Lett.*, vol. 140, pp. 59–67, 2011.
- [70] J. Geginat, S. Campagnaro, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, “TCR-Independent Proliferation and Differentiation of Human CD4⁺ T Cell Subsets Induced by Cytokines”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 512, pp. 107–112, 2002.
- [71] M. E. Raeber, Y. Zurbuchen, D. Impellizzieri, and O. Boyman, “The role of cytokines in T-cell memory in health and disease”, *Immunol. Rev.*, vol. 283, pp. 176–193, 2018.
- [72] N. L. Alves, B. Hooibrink, F. A. Arosa, and R. A. W. Van Lier, “IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8⁺ T cells in vitro,” *Blood*, vol. 102, no. 7, pp. 2541–2546, 2003.
- [73] M. P. Correia, A. V. Costa, M. Uhrberg, E. M. Cardoso, and F. A. Arosa, “IL-15 induces CD8⁺ T cells to acquire functional NK receptors capable of modulating cytotoxicity and cytokine secretion”, *Immunobiology*, vol. 216, pp. 604–612, 2011.
- [74] S.-A. Younes *et al.*, “IL-15 promotes activation and expansion of CD8⁺ T cells in HIV-1 infection”, *J. Clin. Invest.*, vol. 126, no. 7, pp. 2745–2756, 2016.
- [75] M. K. Kennedy *et al.*, “Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice”, *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 5, pp. 771–780, 2000.
- [76] X. Zhang, S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, and J. Sprent, “Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15”, *Immunity*, vol. 8, pp. 591–599, 1998.
- [77] E. Frederick Wheelock, “Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin”, *Science*, vol. 149, pp. 310–311, 1965.
- [78] G. R. Adolf, “Structure and Effects of Interferon-Gamma”, *Oncology*, vol. 42, pp. 33–

40, 1985.

- [79] E. A. Bach, M. Aguet, and R. D. Schreiber, “The IFN γ receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 563–591, 1997.
- [80] L. A. O’Donnell *et al.*, “Interferon gamma induces protective non-canonical signaling pathways in primary neurons”, *J. Neurochem.*, vol. 135, pp. 309–322, 2015.
- [81] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, “Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions”, *J. Leukoc. Biol.*, vol. 75, pp. 163–189, 2004.
- [82] M. A. Farrar and R. D. Schreiber, “The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 11, pp. 571–611, 1993.
- [83] C. V. Ramana, M. P. Gil, R. D. Schreiber, and G. R. Stark, “Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling”, *Trends Immunol.*, vol. 23, no. 2, pp. 96–101, 2002.
- [84] E. Alspach, D. M. Lussier, and R. D. Schreiber, “Interferon γ and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 1–20, 2019.
- [85] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard, “Cellular responses to interferon- γ ”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 749–795, 1997.
- [86] J. R. Schoenborn and C. B. Wilson, “Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses”, *Adv. Immunol.*, vol. 96, pp. 41–101, 2007.
- [87] D. Jorgovanovic, M. Song, L. Wang, and Y. Zhang, “Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review”, *Biomark. Res.*, vol. 8, pp. 1–16, 2020.
- [88] L. E. Harrington, P. R. Mangan, and C. T. Weaver, “Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage”, *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 18, pp. 349–356, 2006.
- [89] S. P. D.-G. Berry *et al.*, “The role of IL-17 and anti-IL-17 agents in the immunopathogenesis and management of autoimmune and inflammatory diseases”, *Int. Immunopharmacol.*, vol. 102, pp. 1–12, 2022.
- [90] E. Rouvier, M.-F. Luciani, M.-G. Mattéi, F. Denizot, and P. Colstein, “CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene”, *J. Immunol.*, vol. 150, no. 12, pp. 5445–

5456, 1993.

- [91] N. Amatya, A. V. Garg, and S. L. Gaffen, “IL-17 Signaling: The Yin and the Yang”, *Trends Immunol.*, vol. 38, no. 5, pp. 310–322, 2017.
- [92] X. Li, R. Bechara, J. Zhao, M. J. McGeachy, and S. L. Gaffen, “IL-17 receptor-based signaling and implications for disease”, *Nat. Immunol.*, vol. 20, pp. 1594–1602, 2019.
- [93] M. J. McGeachy, D. J. Cua, and S. L. Gaffen, “The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease”, *Immunity*, vol. 50, pp. 892–906, 2019.
- [94] C. Gu, L. Wu, and X. Li, “IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling”, *Cytokine*, vol. 64, pp. 477–485, 2013.
- [95] S. L. Gaffen, “Structure and signalling in the IL-17 receptor family”, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, pp. 556–567, 2009.
- [96] R. M. Onishi, S. J. Park, W. Hanel, A. W. Ho, A. Maitra, and S. L. Gaffen, “SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: An extended SEFIR domain is required for IL-17RA-mediated signal transduction”, *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 43, pp. 32751–32759, 2010.
- [97] H. Park *et al.*, “A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17”, *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1133–1141, 2005.
- [98] L. E. Harrington *et al.*, “Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages”, *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1123–1132, 2005.
- [99] C. L. Langrish *et al.*, “IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation”, *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 2, pp. 233–240, 2005.
- [100] V. Siffrin *et al.*, “In Vivo Imaging of Partially Reversible Th17 Cell-Induced Neuronal Dysfunction in the Course of Encephalomyelitis”, *Immunity*, vol. 33, pp. 424–436, 2010.
- [101] V. Cipollini, J. Anrather, F. Orzi, and C. Iadecola, “Th17 and Cognitive Impairment: Possible Mechanisms of Action”, *Front. Neuroanat.*, vol. 13, pp. 1–12, 2019.
- [102] A. Brevi *et al.*, “Much More Than IL-17A: Cytokines of the IL-17 Family Between Microbiota and Cance”, *Front. Immunol.*, vol. 11, pp. 1–19, 2020.

- [103] H.-W. Mittrücker, A. Visekruna, and M. Huber, “Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells”, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, vol. 62, pp. 449–458, 2014.
- [104] Y. H. Lee *et al.*, “IFN γ - IL-17⁺ CD8 T cells contribute to immunosuppression and tumor progression in human hepatocellular carcinoma”, *Cancer Lett.*, vol. 552, pp. 1–11, 2023.
- [105] U. Srenathan, K. Steel, and L. S. Taams, “IL-17⁺ CD8⁺ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease”, *Immunol. Lett.*, vol. 178, pp. 20–26, 2016.
- [106] M. Moaaz, S. Youssry, A. Elfatatry, and M. A. E. R. Rahman, “Th17/Treg cells imbalance and their related cytokines (IL-17, IL-10 and TGF- β) in children with autism spectrum disorder”, *J. Neuroimmunol.*, vol. 337, pp. 1–11, 2019.
- [107] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, “IL-17 and Th17 Cells”, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 485–517, 2009.
- [108] E. V Dang *et al.*, “Control of Th 17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1”, *Cell*, vol. 146, pp. 772–784, 2011.
- [109] J. J. Ladasky, B. P. Shum, F. Canavez, H. N. Seuánez, and P. Parham, “Residue 3 of β 2-microglobulin affects binding of class I MHC molecules by the W6/32 antibody”, *Immunogenetics*, vol. 49, pp. 312–320, 1999.
- [110] F. Perosa, G. Luccarelli, M. Prete, E. Favoino, S. Ferrone, and F. Dammacco, “ β 2-Microglobulin-Free HLA Class I Heavy Chain Epitope Mimicry by Monoclonal Antibody HC-10-Specific Peptide”, *J. Immunol.*, vol. 171, no. 4, pp. 1918–1926, 2003.