

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**EFEITO DAS CÉLULAS T REGULADORAS NAS INTERACÇÕES  
ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS, CÉLULAS T EFECTORAS  
TIPO 1 E CÉLULAS T EFECTORAS TIPO 17**

Ana Maria Antunes de Pinho Simões Vaz

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**EFEITO DAS CÉLULAS T REGULADORAS NAS INTERACÇÕES  
ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS, CÉLULAS T EFECTORAS  
TIPO 1 E CÉLULAS T EFECTORAS TIPO 17**

Ana Maria Antunes de Pinho Simões Vaz

Dissertação orientada por: Doutor Carlos Eduardo Tadokoro<sup>1</sup>

Orientador interno: Doutora Ana Maria Crespo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2009



FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN

Instituto Gulbenkian de Ciência

O trabalho conducente a esta Tese foi desenvolvido no Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras



National  
Multiple Sclerosis  
Society

Trabalho realizado integralmente no âmbito do projecto 410583 PFE-GI-NMSS-RG-4303-A-1 aprovado pela *National Multiple Sclerosis Society*

## Resumo

As células T reguladoras são essenciais para o controlo do desenvolvimento de doenças autoimunes. Recentemente foi descrito que a expressão do gene *Foxp3* é necessária e suficiente para a geração e função destas células. No entanto, se a especificidade antigénica das células T reguladoras é essencial ou não para a sua função supressora nos tecidos inflamados é ainda desconhecido. Neste projecto pretendemos estudar os efeitos de células T reguladoras específicas e não específicas para o péptido da proteína básica da mielina Ac1-11 (MBP1-11) nos contactos entre células dendríticas, células Th1 e células Th17. Para tal, células T reguladoras e células T efectoras MBP1-11 específicas foram geradas *in vitro* a partir de células do baço de animais Tg/Tg *Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup>* e células T reguladoras e células T efectoras policlonais foram geradas *in vitro* a partir de células do baço de animais B10.PL *Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup>*. Para além destas, células dendríticas de murganhos CD11c-YFP foram também utilizadas. Os dados obtidos através da aquisição de imagens de culturas contendo os três tipos de células (células T reguladoras, células dendríticas e células Th1 ou células Th17) sugerem que células T reguladoras MBP-específicas são capazes de impedir os contactos entre células Th1 MBP-específicas e células dendríticas estabelecendo contactos com ambas as células e impedindo, assim, a activação de células Th1 pelas células dendríticas, não se verificando o mesmo efeito para as células Th17. Assim, parece que células T reguladoras MBP-específicas são capazes de se ligar mais eficazmente às células dendríticas do que células T reguladoras policlonais, mas apenas na presença de células Th1 MBP-específicas. No futuro seria importante repetir estas experiências para que se possam verificar estes resultados e observar estes contactos *in vivo*. Neste caso poder-se-ia utilizar o mesmo modelo animal (EAE), transferir células T reguladoras para estes murganhos e observar o seu efeito nos contactos celulares na espinal medula, o tecido inflamado na EAE.

## Palavras-chave

Células T reguladoras, supressão, autoimunidade, EAE, células Th1, células Th17, células dendríticas, contacto celular.

## Abstract

Regulatory T cells (Tregs) are essential for the control of the development of autoimmune diseases. Recently it was described that expression of *Foxp3* is necessary and sufficient for Treg development and function. Nevertheless, it's not known if the antigen specificity of Tregs is necessary for their function. In this project we want to study the effect of Tregs specific and non-specific for the myelin basic protein peptide Ac1-11 (MBP1-11) in the contacts between dendritic cells, Th1 cells, and Th17 cells. In this sense we *in vitro* generated MBP1-11 Tregs and MBP1-11 effector T cells (Teffs), from spleen of Tg/Tg  $Foxp3-KI^{gfp/gfp}$ , and polyclonal Tregs and Teffs from the spleens of and B10.PL  $Foxp3-KI^{gfp/gfp}$ . We also used CD11c-YFP dendritic cells (DCs). Based on the data obtained from the imaging of cultures containing these three types of cells (Tregs, Teffs, and DCs) we conclude that MBP-Tregs inhibit the contacts between MBP-Th1 cells and DCs, establishing contacts with both Th1 cells and DCs. This inhibition doesn't seem to happen when Th17 cells were in culture. It seems that MBP-Tregs are capable of more efficient inhibition of contacts between Th1 cells and DCs than polyclonal Tregs, although they are not capable of inhibit the contacts between DCs and Th17 cells. Future work should include the repetition of these experiments to confirm the results obtained and *in vivo* imaging of these contacts. In this sense we can use the same animal model (EAE), transfer Tregs to these mice, and image the contacts between Tregs, Teffs, and DCs in the spinal cord, the target tissue of EAE.

## Key-words

Regulatory T cells, suppression, autoimmunity, EAE, Th1 cells, Th17 cells, Dendritic cells, cell-cell contacts.

## Índice

Resumo .....	1
Palavras-chave .....	1
Abstract .....	2
Key-words.....	2
Índice.....	3
Lista de abreviaturas.....	4
Introdução.....	5
<i>Células T reguladoras</i> .....	5
<i>Factor de transcrição Foxp3</i> .....	7
<i>Papel de CD25 e IL-2</i> .....	10
<i>Mecanismos de supressão</i> .....	12
Material e Métodos .....	16
<i>Murganhos</i> .....	16
<i>Diferenciação de células T reguladoras, Th1 e Th17</i> .....	16
<i>Marcação de moléculas da superfície celular</i> .....	17
<i>Marcação de Foxp3</i> .....	17
<i>Marcação intracelular de citocinas</i> .....	18
<i>Separação de células</i> .....	19
<i>Imagem de contactos entre células</i> .....	19
<i>Análise de Imagem</i> .....	20
<i>Diferenciação de células T reguladoras in vitro</i> .....	21
<i>Diferenciação de células Th1 e Th17 in vitro</i> .....	22
<i>Marcadores de superfície de células Th1 e Th17</i> .....	24
<i>Nível de expressão dos marcadores de superfície para Th1 e Th17</i> .....	24
<i>Efeito das células T reguladoras nos contactos entre células dendríticas, células Th1 e células Th17</i> .....	29
Discussão .....	35
Bibliografia .....	39
Anexos .....	43

## Lista de abreviaturas

A488 – Alexa 488

APC – Célula apresentadora de antígenos (*Antigen Presenting Cell*)

B16-Flt3-GFP - linha celular de melanoma de murganho que expressa *Flt3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) e GFP

BSA – Albumina do soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CTLA-4 – Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

DCs – Células dendríticas (*Dendritic Cells*)

EAE – Encefalomielite Autoimune Experimental (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

FBS – Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

GFP – Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)

GITR - Receptor de TNF induzido por glucocorticóides (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*)

IFN- $\gamma$  – Interferão-gama (*Interferon-gama*)

IL – Interleucina (*Interleukin*)

iTreg – células T reguladoras induzidas

KI – *Knock-in*

MBP – Proteína básica da mielina (*Myelin Basic Protein*)

MBP1-11 – péptido da proteína básica da mielina Ac1-11

MBP-4Y – péptido semelhante ao MBP1-11 mas contendo uma modificação para tirosina no quarto aminoácido, que lhe confere maior estabilidade na fenda do complexo principal de histocompatibilidade

MBP-DCs – células dendríticas estimuladas com MBP-4Y

MBP-Teffs – células T efectoras específicas para MBP1-11

MBP-Tregs – células T reguladoras específicas para MBP 1-11

nTreg – célula T reguladora que ocorre naturalmente

Poly –Teffs – células T efectoras policlonais

Poly-Tregs – células T reguladoras policlonais

RBC – Hemácias (*Red Blood Cells*)

TCR – Receptor das células T (*T cell receptor*)

TGF- $\beta$  – Factor  $\beta$  de transformação de crescimento de tumores (*Transforming growth factor beta*)

Th1 – células T efectoras tipo 1 (*T helper cells 1*)

Th17 – células T efectoras tipo 17 (*T helper cells 17*)

YFP – Proteína Fluorescente Amarela (*Yellow fluorescent protein*)

$\alpha$  (alfa)– utilizado para abreviar a palavra “anti-“

## Introdução

O sistema imune dos mamíferos protege o hospedeiro de uma enorme variedade de microorganismos patogénicos mas simultaneamente evita respostas imunes excessivas ou contra o próprio e, portanto, evita o desenvolvimento de doenças autoimunes, ou seja, doenças que resultam de respostas imunes exacerbadas contra os antigénios próprios. Ambos os tipos de resposta imune (protectora e deletéria para o hospedeiro) são mediados por células T e B, as quais possuem uma enorme diversidade no reconhecimento de antigénios, elevada especificidade antigénica e actividade efectora e memória imunológica duradoura<sup>1</sup>. Devido ao elevado potencial de reconhecimento de auto-antigénios destas células, pode ocorrer uma resposta imune inadequada que irá provocar danos ao hospedeiro. No entanto, num sistema imune normal, todas as respostas imunes se desenvolvem dentro de determinados limites. A concentração de anticorpos ou de células T efectoras aumentam progressivamente após estimulação por antigénios mas os níveis máximos são atingidos rapidamente e voltam a decrescer. Além disso, a maioria das respostas imunes são adaptadas quantitativa e qualitativamente para produzir um resultado óptimo e a autoimunidade é mantida sob controlo bem como é mantido, a níveis constantes, o *pool* de linfócitos durante os processos homeostáticos. Os mecanismos envolvidos nestes processos são muitos e complexos envolvendo imunoregulação, ou seja, a regulação das respostas imunes por anticorpos ou por células T, independentemente do mecanismo effector subjacente<sup>2</sup>. Entre as células que estão envolvidas nesta regulação tem sido atribuída grande relevância às células T reguladoras.

### ***Células T reguladoras***

Em 1982 foram publicadas as primeiras experiências que provaram definitivamente a existência de células capazes de suprimir respostas imunes contra o próprio. Nestes estudos, Sakaguchi mostrou que murganhos recém-nascidos timectomizados desenvolviam autoimunidade, afectando vários órgãos (por exemplo tiróide, estômago, ovários e testículos). No entanto, nestes estudos, Sakaguchi mostrou também que a inoculação de células T CD4<sup>+</sup>, obtidas de murganhos selvagem, inibe o desenvolvimento de autoimunidade<sup>3,4</sup>. Com estes resultados surgiu

a prova de que murganhos normais, para além de possuírem células auto-reactivas potencialmente patogénicas, possuem também células T que suprimem a autoimunidade controlando as células T auto-reactivas. Mais tarde, o mesmo autor mostrou que a inoculação de uma suspensão celular de células T CD4<sup>+</sup> depletada de células CD5<sup>high</sup> em murganhos *Nude*<sup>a</sup> leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes tais como ovarite, orquite, gastrite e tiroidite<sup>5</sup>. Assim, utilizando um marcador fenotípico (CD5), Sakaguchi provou a interpretação dada aos resultados obtidos anteriormente. No entanto, a aceitação da existência destas células esteve comprometida durante os primeiros anos após a sua descoberta devido ao aparecimento de outros tipos de células T capazes de controlar a sua própria activação/expansão (actualmente designadas por células T efectoras tipo 1 e 2)<sup>2</sup>, à falta de um marcador fiável para distinguir as células T reguladoras de outros tipos de células T, à ambiguidade encontrada na biologia molecular da supressão e à dificuldade de diferenciar clones de células T reguladoras antigénio-específicas<sup>6</sup>. Contudo, as células T reguladoras conseguiram sobreviver a este escrutínio. Ao longo dos anos foram utilizados outros marcadores fenotípicos, como por exemplo, CD45RC e CD45RB<sup>6</sup>, para distinguir as células T reguladoras e em 1995 foi identificada o marcador fenotípico de células T reguladoras que mais tem sido utilizado, a molécula CD25<sup>b</sup>. Neste estudo Sakaguchi mostrou que a transferência de uma suspensão de esplenócitos depletada de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> para murganhos *Nude* leva ao desenvolvimento de autoimunidade com maior gravidade do que a desenvolvida em estudos anteriores. Por outro lado, a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> inibe o desenvolvimento de autoimunidade<sup>7</sup>. Presentemente, o factor de transcrição *Foxp3* é o marcador molecular mais fiável para as células T reguladoras<sup>6, 8, 9</sup> mas, devido à sua localização nuclear, a marcação de células *in vivo* é impossível. No entanto, actualmente já existem murganhos em que a expressão de *Foxp3* é acompanhada da expressão da proteína fluorescente verde (*GFP-Green Fluorescent Protein*)<sup>10, 11</sup> ou da expressão receptores membranares para a toxina da difetéria (que induz a morte das células)<sup>12, 13</sup>, permitindo, respectivamente, a identificação ou depleção das células T reguladoras.

<sup>a</sup> *Nude* - murganhos que devido a uma mutação pontual no gene *Foxn1* não possuem células epiteliais tímicas e portanto não são capazes de desenvolver timo e conseqüentemente não possuem células T; nestes murganhos também se verifica um crescimento anormal do pêlo e daí serem denominados *Nude*

<sup>b</sup> CD25 corresponde à cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, expresso também em células T activadas e portanto, em murganhos imunizados não é útil para isolar células T reguladoras

Actualmente, as células T reguladoras são consideradas uma população de células T especializadas na supressão da activação do sistema imunitário, ou seja, são células que controlam constantemente a activação e expansão de linfócitos aberrantes ou auto-reactivos e suprimem respostas imunes excessivas<sup>1</sup> através de contacto directo célula-a-célula e/ou da produção de citocinas<sup>14</sup>. O desenvolvimento de uma parte destas células, tal como o de todas as células T, ocorre no timo<sup>1, 6, 15</sup>, sendo que num sistema imune normal são produzidas células T reguladoras destinadas a suprimir respostas imunes contra o próprio e o não próprio mas também células T efectoras, algumas das quais auto-reactivas e que se tornam patogénicas quando activadas<sup>2, 6</sup>, podendo levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Durante o seu desenvolvimento no timo, as células T são sujeitas a um processo de selecção que leva à eliminação das células auto-reactivas (tolerância central)<sup>16</sup>. No entanto, algumas destas células escapam à selecção e migram para a periferia. Aí as células T reguladoras maduras exercem controlo sobre as células T auto-reactivas que escaparam à selecção no timo, de modo a que estas não sejam activadas (tolerância periférica)<sup>1</sup>. Assim, a disrupção da diferenciação ou função das células T reguladoras leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes<sup>1, 12, 13</sup> devido à falta de controlo das células T auto-reactivas. Para além do desenvolvimento de autoimunidade, a selecção de células T reguladoras permite também o desenvolvimento de doenças inflamatórias devido ao aumento das respostas imunes contra outros antígenos não-próprios como, por exemplo, nas respostas a bactérias comensais<sup>1</sup> e em processos alérgicos<sup>17</sup>. As células T reguladoras são também importantes na resposta anti-tumor (sendo que a depleção de células T reguladoras, antes da sensibilização ao tumor, permite uma resposta imune efectiva contra as células tumorais)<sup>18</sup> e na tolerância materno-fetal<sup>19</sup>.

### ***Factor de transcrição Foxp3***

A tolerância ao próprio é um processo activo com uma componente central, a selecção clonal de timócitos auto-reactivos durante o seu desenvolvimento, e uma componente periférica. Esta é executada através de alguns mecanismos básicos como a apoptose, a anergia e a supressão. Este último é o único dos três mecanismos que é da responsabilidade de um único tipo de células T, as células T reguladoras<sup>20</sup>. Estas compreendem vários subtipos de células (**Tabela I**)<sup>1, 21</sup> das quais as que mais têm sido estudadas são as células T reguladoras CD4<sup>+</sup> que ocorrem naturalmente (nTreg). As nTregs são caracterizadas pela expressão de CD25 e do factor de transcrição Foxp3,

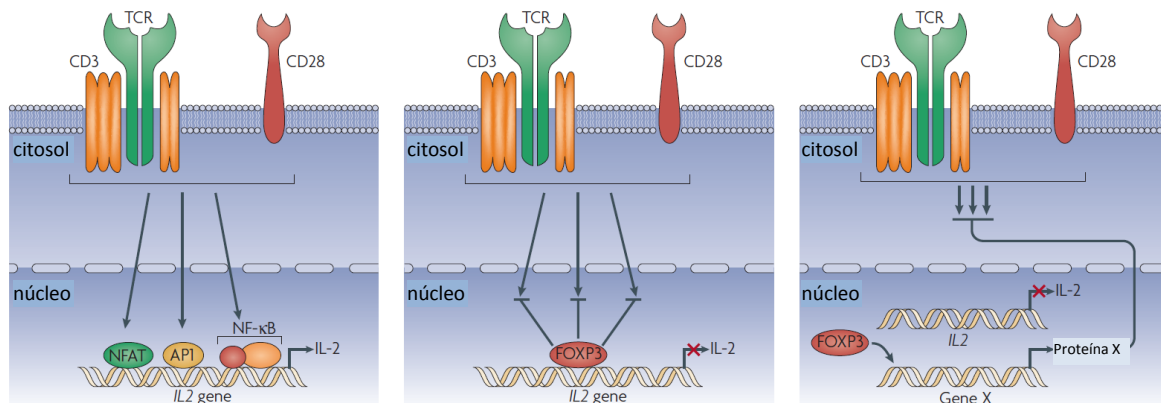
cuja expressão nuclear é necessária e suficiente para a diferenciação e função destas células<sup>22</sup>. Este gene foi inicialmente identificado como o gene espontaneamente mutado na estirpe de murgancho *scurfy*. Esta mutação é única do mutante *scurfy* e consiste numa inserção de 2 pares de base na região codificante resultando no truncamento da proteína e consequentemente à sua perda de actividade<sup>23</sup>. Em humanos, as mutações no gene *Foxp3* são responsáveis pela doença genética IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*)<sup>24, 25</sup>. Tanto em humanos quanto em murganchos, mutações no gene *Foxp3* levam ao desenvolvimento de patologias inflamatórias e autoimunes em vários órgãos<sup>25, 26</sup> como consequência de um deficiente desenvolvimento e função de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>8, 27</sup>. Estudos recentes demonstraram que células T que expressam *Foxp3* aparecem pouco tempo após o nascimento e que após a sua depleção há desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias<sup>12</sup>. Outros estudos mostraram que *Foxp3* é predominantemente expresso em células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e que a transdução retroviral ectópica do gene *Foxp3* em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>8, 9</sup> converte estas células em células semelhantes a células T reguladoras que são capazes de suprimir a proliferação de células T *in vitro* e de inibir o desenvolvimento de doenças autoimunes *in vivo*. Sabe-se ainda que a inoculação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de murganchos selvagem em murganchos *scurfy* previne a inflamação sistémica severa<sup>9</sup>.

**Tabela I – Tipos de células T com capacidade reguladora – tabela baseada em Sakaguchi *et al*<sup>1</sup> e Shevach *et al*<sup>21</sup>**

	Treg	Th3	Tr1	Ts
Marcadores característicos	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> GITR <sup>hi</sup> CTLA-4 <sup>hi</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>lo</sup> GITR <sup>med</sup> CTLA-4 <sup>med</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>lo</sup> GITR <sup>-</sup> CTLA-4 <sup>lo</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>
Mecanismo de supressão dominante	Contacto intercelular	Secreção de TGF-β	Secreção de IL-10 e TGF-β	Indução da sobreexpressão de ILT3 e ILt4 em DCs  Secreção de IL-2, IL-4, IFN-γ e TGF-β
Efeito regulador	Supressão de células T activadas  Indução de células Th0 para geração de células Tr1 e Th3	Supressão de células T activadas	Supressão de células T activadas	Modulação de DCs para que estas induzam a geração de células Tr1 e Th3
Moléculas essenciais à sua geração	Foxp3, IL-2, CTLA-4, CD28	TGF-β, IL-10, IL-4	TGF-β, IL-10, IFN-γ	?
Local de geração	timo	Periferia	Periferia	?

Após a identificação de *Foxp3* como gene essencial para a função supressora das células T reguladoras, surgiram várias questões relacionadas com o funcionamento e desenvolvimento destas células e o papel de *Foxp3* nestes processos, nomeadamente, como é que *Foxp3* controla a actividade supressora das células T reguladoras? Em estudos recentes, a caracterização dos genes-alvo de *Foxp3* indica que este interage com factores de transcrição, entre eles NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) e AML1/Runx (*acute myeloid leukemia-1/runt-related transcription factor 1*) formando um complexo responsável pela activação ou repressão de genes nas células T reguladoras<sup>6, 26, 28</sup>, como por exemplo, o aumento da expressão de CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor da Interleucina(IL)-2) e de outras moléculas existentes na superfície celular das células T reguladoras como o CTLA-4 (*cytotoxic T cell associated antigen-4*) e GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein*) e reprime a produção de Interleucina(IL)-2, Interferão(IFN)- $\gamma$  e IL-4<sup>9, 26</sup>. Para além disto, foi mostrado que *Foxp3* possui locais de ligação em cerca de 700 genes, a maior parte dos quais envolvidos na sinalização através do receptor de células T (TCR), comunicação celular e regulação da transcrição<sup>29</sup>. Neste estudo foi também mostrado que a activação ou repressão da transcrição por *Foxp3* está associada a modificações específicas das histonas no local de ligação de *Foxp3* ao gene em questão. No entanto, continua por explicar como é que o complexo formado por *Foxp3*, NFAT e AML1/Runx controla os genes responsáveis pela supressão.

*Foxp3* tem também sido associado à diferença na resposta à sinalização mediada pelo TCR observada entre células T efectoras e células T reguladoras. Enquanto as células T efectoras respondem à sinalização através do TCR accionando um programa de activação de cascatas de sinalização específicas que leva à indução das suas funções, incluindo a produção de IL-2 e a proliferação<sup>20</sup>, as células T reguladoras, quando activadas, não proliferam<sup>30</sup> e não produzem citocinas como IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  ou moléculas efectoras como TNF<sup>31, 32</sup>. No entanto, as células T reguladoras necessitam da sinalização através do TCR para a sua actividade supressora o que indica que têm propriedades de sinalização diferentes das propriedades apresentadas por células T efectoras que resultam, provavelmente, numa redução global da activação das vias de sinalização mediadas pelo TCR<sup>20, 31</sup>. No sentido de conhecer melhor o papel de *Foxp3* neste processo, vários estudos têm sido feitos permitindo criar um cenário em que *Foxp3*, directa ou indirectamente, induz a expressão de uma molécula de sinalização capaz de inibir eventos na via de sinalização do TCR ou reprime a expressão de um gene (ainda não identificado) necessário à via de sinalização do TCR (**Figura 1**)<sup>20</sup>.



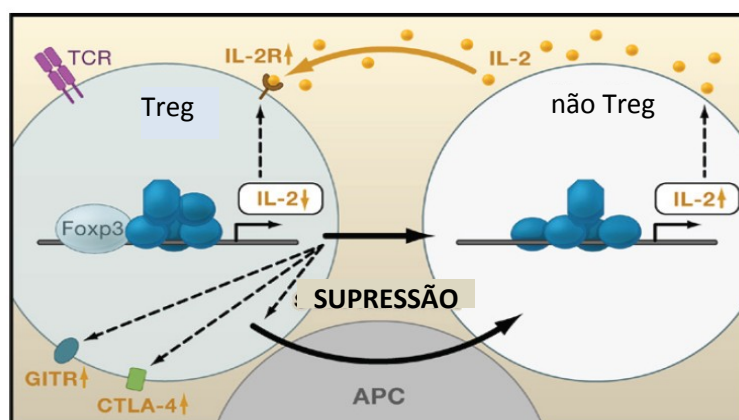
**Figura 1 - Modelos de regulação da activação de células T reguladoras mediada por Foxp3**  
 – a) Sinalização em células T efectoras CD4+ - A ligação ao TCR e a CD28 levam à activação de uma via de sinalização que culmina na translocação nuclear de NFAT, NF-κB (*nuclear factor-κB*) e AP1 (*activator protein 1*) e subsequente transcrição de *IL-2*. b) Modelo de regulação directa da sinalização através do TCR por Foxp3 - Neste modelo Foxp3 bloqueia a sinalização do TCR através da inibição da activação da transcrição mediada por NFAT, NF-κB e AP1. c) Modelo de regulação indirecta da sinalização através do TCR por Foxp3 - Neste modelo Foxp3 modula a sinalização do TCR através da expressão de um factor capaz de inibir os sinais induzidos pelo TCR. Figura modificada de Campbell *et al*<sup>20</sup>.

### Papel de CD25 e IL-2

Após a descoberta de CD25 como marcador das células T reguladoras em 1995, vários estudos mostraram que esta molécula não era apenas um marcador desta população de células T mas era também importante à sua função supressora. IL-2, a molécula reconhecida por CD25, é indispensável ao desenvolvimento, sobrevivência e função das nTregs. É sabido que IL-2 tem como alvo vários tipos de células (células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, células B, células T exterminadoras naturais (*natural killer T cells*)) e que as suas funções pleiotrópicas têm efeitos contraditórios na resposta imune. Por um lado, IL-2 facilita a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células Th1, leva à expansão de células T memória e células exterminadoras naturais (*natural killer cells*) mas também promove apoptose de células T activadas por antígenos<sup>1, 33</sup>. Outra das suas funções é manter as células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>, expandi-las em grande escala e facilitar a sua diferenciação, dependente de TGF-β (*Transforming growth factor beta*), na periferia a partir de células T *naïve*. No entanto, uma vez que Foxp3 reprime a expressão de *IL-2*, as células T reguladoras estão dependentes de IL-2 exógeno. Considerando que a maior fonte de IL-2 são as células T activadas, existe um controlo por *feedback* negativo das respostas imunes via IL-2, ou seja, IL-2

produzida por células T não-reguladoras contribui para a manutenção, expansão e activação de nTregs que, por seu lado, controlam a expansão de células T não-reguladoras (**Figura 2**)<sup>1</sup>. A disrupção desta cadeia de sinalização leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias, como se constata em murganhos deficientes para IL-2 ou CD25, devido à deficiente diferenciação de células T reguladoras<sup>34, 35</sup>. Este facto sugere que a sinalização de IL-2 através do seu receptor é muito importante para a biologia destas células.

A grande maioria das células T reguladoras expressa constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (IL-2R), sendo que este é composto pelas cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ <sup>33</sup>. A sinalização através da cadeia  $\beta$  do IL-2R leva à activação do factor de transcrição STAT5 que nas células T reguladoras é, em parte, responsável pela expressão de *Foxp3*, mantendo assim a função destas células<sup>36</sup>. Um estudo recente indicou que o nível de IL-2 necessário a estas células é baixo, facto que explicaria a utilização eficaz desta citocina pelas células T reguladoras, mesmo sendo esta uma citocina escassa no sistema imune de um animal não imunizado. Assim, as células T reguladoras ter-se-ão adaptado a um ambiente pobre em IL-2 através da manutenção de *Foxp3* pela activação de STAT5 mediada por níveis baixos de IL-2<sup>35</sup>.



**Figura 2 - Papel de IL-2 na homeostase imunológica** – Foxp3, juntamente com outros factores de transcrição, inibe a transcrição de *IL-2* nas células T reguladoras (Treg), tornando-as altamente dependentes de IL-2 exógeno, produzido essencialmente por células T não-reguladoras (não Treg), para a manutenção da sua actividade supressora. Foxp3 também activa a transcrição de genes que codificam moléculas associadas às células T reguladoras, como por exemplo, CD25, CTLA-4 e GITR e confere actividade supressora às mesmas. As células T reguladoras controlam células T não-reguladoras directamente ou modulando a actividade de células apresentadoras de antígeno (APCs). Figura modificada de Sakaguchi *et al*, 2008<sup>1</sup>.

### ***Mecanismos de supressão***

As nTregs exercem a sua função supressora sobre as células T efectoras, as quais executam as suas funções através da produção de diferentes perfis de citocinas<sup>37</sup>. Neste trabalho experimental as células T efectoras em estudo são as células T efectoras tipo 1 (Th1) e células T efectoras tipo 17 (Th17). A recente descoberta destas últimas modificou o conceito de que as doenças autoimunes específicas de um órgão são resultado da desregulação da resposta apenas de células Th1 específicas de auto-antígenos<sup>38</sup>. Durante a patogénese de várias doenças autoimunes como, por exemplo, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)<sup>39</sup>, as células Th17 produzem a citocina pró-inflamatória IL-17 causando danos no tecido inflamado, descritos anteriormente como mediados apenas por células Th1. Estas são produtoras da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  e são essenciais à imunidade celular, incluindo respostas contra microrganismos e supressão de tumores<sup>40</sup>. Para exercerem as suas funções, as células T efectoras são activadas por células apresentadoras de antígenos (APCs), neste caso, células dendríticas<sup>41, 42</sup>. Estas células recolhem antígenos nos tecidos periféricos e, em resposta a sinais de inflamação, migram para os nódulos linfáticos onde apresentam os antígenos a células T em circulação, desencadeando, assim, a resposta imune<sup>42</sup>.

Apesar de nos últimos anos ter sido publicada muita informação acerca das nTregs, duas grandes questões continuam por responder: como é que as nTregs são geradas no timo e qual ou quais os mecanismos de acção das nTregs? Para melhor compreender esta última questão têm sido efectuados muitos estudos nos últimos anos a partir dos quais se pode concluir que as nTregs têm quatro modos de acção básicos: supressão por citocinas inibitórias, citólise, disrupção metabólica ou modulação da maturação ou funcionamento das células dendríticas (**Figura 3**).

Citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- $\beta$  têm sido consideradas mediadoras da actividade supressora das células T reguladoras e, apesar da sua importância como mediadores da supressão ser indiscutível, a sua contribuição para a função das nTregs é ainda discutida. A produção de IL-10 por células T reguladoras foi verificada no modelo de murganho de doença inflamatória dos intestinos (IBD)<sup>43</sup>, no bloqueio da imunidade anti-tumor<sup>44</sup>, na tolerância mediada por IL-10 num modelo de hepatite<sup>45</sup> e na tolerância materno-fetal<sup>46</sup>. No entanto, a delecção de IL-10 em células T reguladoras não resulta no desenvolvimento espontâneo de autoimunidade sistémica, embora leve a uma patologia agravada do cólon de murganhos com idade avançada e dos pulmões de murganhos com hipersensitividade induzida das vias respiratórias<sup>47</sup>.

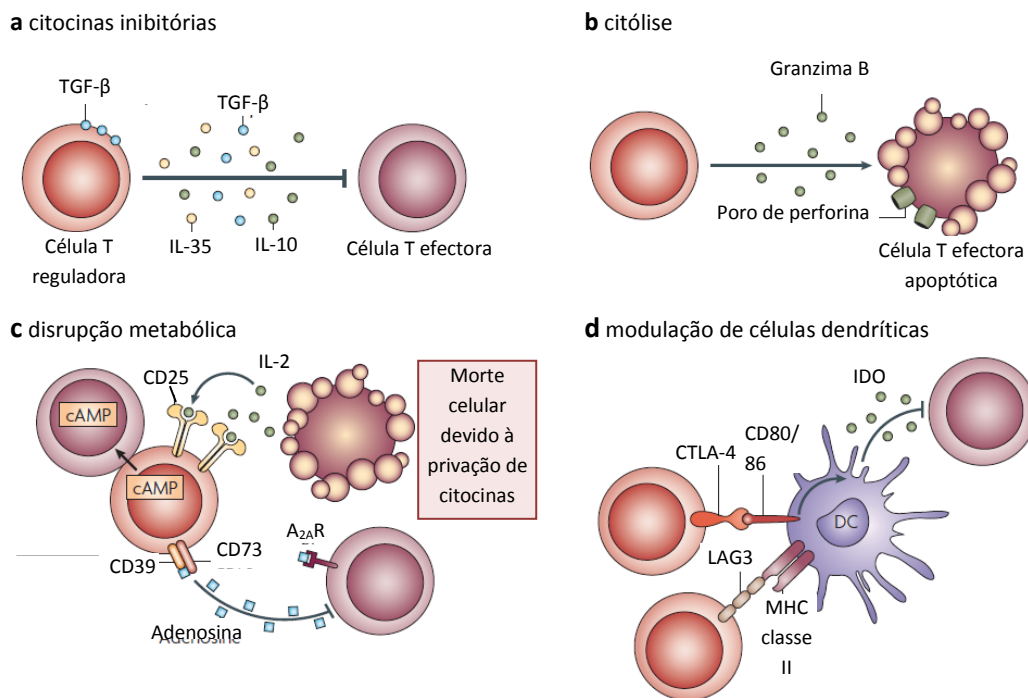
Estes resultados parecem sugerir que o papel de IL-10 na supressão está dependente do organismo ou doença alvo da supressão<sup>48</sup>. Relativamente ao papel de TGF- $\beta$  na supressão mediada por células T reguladoras, vários estudos sugerem que o TGF- $\beta$  produzido pelas mesmas participa directamente na supressão células T efectoras<sup>49-51</sup>. Tal como IL-10, TGF- $\beta$  também foi implicado no bloqueio da imunidade anti-tumor<sup>48</sup>. Mais recentemente, IL-35 foi adicionado à lista de citocinas inibitórias envolvidas na supressão mediada por células T reguladoras. IL-35 foi descrito como expresso preferencialmente em células T reguladoras e necessário para que estas possam atingir o máximo da actividade supressora<sup>52</sup>. Apesar destas três citocinas (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35) serem todas inibitórias e participarem na supressão mediada por células T reguladoras, a forma como são utilizadas difere, o que sugere que a sua acção não é sobreponível<sup>48</sup>.

Uma vez que as células T CD4<sup>+</sup> não são citolíticas, foi surpreendente descobrir que as células T reguladoras de murganhos expressam granzima B. Relativamente à função desta granzima na supressão mediada por células T reguladoras, foi descrito que células T reguladoras deficientes para a granzima B possuem uma actividade supressora reduzida *in vitro*, que a supressão dependente da mesma resulta na indução de apoptose nas células T efectoras por parte das células T reguladoras e que células T reguladoras envolvidas em tolerância pós-transplante também dependem de granzima B para a sua função supressora<sup>53</sup>. Mais recentemente, duas moléculas, TRAIL-DR5 (*tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5*) e galectina 1, foram também implicadas na indução de apoptose em células T efectoras por parte das células T reguladoras<sup>48</sup>. No entanto, ainda é necessário muito trabalho para que se possam definir os mecanismos citolíticos utilizados por células T reguladoras.

Uma questão que há muito é debatida é se a elevada expressão de CD25 permite que as células T reguladoras consumam a IL-2 disponível e, assim, provoquem uma disrupção metabólica nas células T efectoras, dado que estas necessitam de IL-2 para sobreviver. Alguns estudos apoiam esta hipótese mostrando que as células T reguladoras podem induzir apoptose por privação de citocinas<sup>54</sup>. No entanto, é necessário mais trabalho para a esclarecer este mecanismo de supressão. Recentemente foram adicionados dois novos mecanismos a esta categoria de supressão mediada por células T reguladoras. Estes mecanismos levam à libertação, intracelular ou extracelular, de nucleósidos de adenosina. A expressão de CD39 e CD73 gera adenosina pericelular que, para além de suprimir a função das células T efectoras, aumenta também a diferenciação de células T reguladoras induzidas

(iTregs) por inibição da expressão de IL-6 (IL-6 inibe a diferenciação de células T reguladoras<sup>26</sup>) e promoção da secreção de TGF- $\beta$ . Por outro lado, foi também demonstrado que as células T reguladoras são capazes de transferir cAMP para células T efectoras através de junções de hiato e assim suprimir as suas funções efectoras<sup>48</sup>.

Finalmente, as células T reguladoras são também capazes de exercer a sua função supressora através da modulação da maturação ou função das células dendríticas, as quais são necessárias à activação das células T efectoras<sup>41, 42</sup>. No entanto, ainda existem poucos dados que apoiem esta teoria. Estudos recentes sugerem que LAG3 (*Lymphocyte Activation Gene 3*), um homólogo de CD4 necessário à função supressora das células T reguladoras, bloqueia a maturação de células dendríticas e, assim, a sua capacidade de activar células T efectoras<sup>53</sup>. Outros estudos sugerem que as células T reguladoras são capazes de diminuir a capacidade das células dendríticas para activar as células T efectoras através da supressão da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86<sup>48</sup>.



**Figura 3 - Mecanismos de supressão mediada por células T reguladoras** – Os vários mecanismos de supressão das células T reguladoras podem ser divididos em quatro modos de acção básicos. **a)** Supressão por citocinas inibitórias, incluindo IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35. **b)** Supressão por citólise inclui mecanismos dependentes da granzima B. **c)** Supressão por disrupção metabólica inclui apoptose mediada pela privação de IL-2 dependente de CD25, inibição mediada por cAMP e imunossupressão mediada pelo receptor 2A ( $A_{2A}R$ ) de adenosina produzida por CD39 e/ou CD73. **d)** Mecanismos de supressão por modulação da maturação ou função de células dendríticas incluem a acção de LAG3, CTLA-4, CD80, CD86 e IDO. Figura modificada de Vignali *et al*, 2008<sup>48</sup>.

Para melhor compreender este mecanismo de supressão, em muito têm contribuído os avanços obtidos em aquisição de imagens *in vivo*. Em 2006, através de imagem intravital, Tadokoro *et al* mostrou que as nTregs são capazes de suprimir *in vivo* os contactos estáveis estabelecidos entre células dendríticas e células T efectoras<sup>55</sup>. Mais recentemente, a clonagem de *Foxp3* e a criação de murganhos repórter que expressam a proteína de fusão *Foxp3-GFP* (murganhos *Foxp3-Knock In(KI)<sup>gfp/gfp</sup>*)<sup>10</sup> permitiu a visualização *in vivo* de nTregs. Num estudo recorrendo a este modelo observou-se que as nTregs estabelecem contactos estáveis com células dendríticas para evitar a activação de células T efectoras (Tadokoro, C.E., comunicação pessoal). Além disso, o contacto entre nTregs e células dendríticas é quebrado quando são administrados adjuvantes aos murganhos em estudo, sendo este fenómeno independente da presença de antígenos ou de células T efectoras antígeno-específicas (Tadokoro, C.E., comunicação pessoal). Apesar de não ser suficiente para estabelecer quais os mecanismos envolvidos na função das nTregs, a mera observação de contactos entre células traz novos conhecimentos. Assim, os dados acima referidos permitiram estabelecer um cenário em que as nTregs estão constantemente em actividade, suprimindo os contactos entre células dendríticas e células T efectoras e estabelecendo novos contactos com as primeiras. Foi também demonstrado que este processo de supressão envolve CTLA-4<sup>56</sup> (molécula que é constitutivamente expressa pelas células T reguladoras) e que as células T reguladoras são capazes de induzir nas células dendríticas a expressão de IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) que se sabe induzir a produção de metabolitos pró-apoptóticos do catabolismo do triptofano, levando à supressão de células T efectoras por mecanismos dependentes das interacções entre CTLA-4 e CD80 e/ou CD86<sup>48</sup>.

Neste estudo pretendemos adquirir mais conhecimentos sobre os contactos entre as células já mencionadas (células T reguladoras, células T efectoras e células dendríticas) e perceber qual a importância da especificidade antigénica neste processo, pois é ainda desconhecido se a especificidade antigénica é ou não necessária para a função supressora das células T reguladoras. Para tal utilizámos um modelo de Esclerose Múltipla em murganho, a encefalomielite autoimune experimental (EAE; a descrição destes murganhos encontra-se em anexo) para obter células específicas para o péptido da proteína básica da mielina Ac1-11 (MBP1-11).

## Material e Métodos

### *Murganhos*

Durante o trabalho laboratorial foram utilizados murganhos das estirpes B10.PL, B10.PL Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup>, Tg/Tg Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> e CD11c-YFP, com 8 semanas. Estes murganhos foram mantidos no biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência em condições de temperatura, humidade e fotoperíodo standardizadas e manipulados de acordo com o Decreto-Lei 129/92, Portaria 1005/92. Para as experiências de obtenção de imagens de contactos entre os diferentes tipos de células, murganhos CD11c-YFP foram injectados subcutaneamente com  $5 \times 10^6$  células B16-Flt3-GFP<sup>c</sup> catorze dias antes da utilização do baço para extracção de células CD11c-YFP<sup>d</sup>. Os restantes murganhos não foram sujeitos a outro tipo de manipulação para além da incluída na rotina do biotério (alimentação e acomodação).

### *Diferenciação de células T reguladoras, Th1 e Th17*

As células foram isoladas do baço de murganhos B10.PL, B10.PL Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> ou Tg/Tg Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> através de maceração do órgão e subsequente lise de hemáceas, com o tampão de lise de hemácias (RBC (*Red Blood Cells*) lysis buffer), seguida de lavagem com meio RPMI completo (meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*; Invitrogen), 200mM de Glutamina (Invitrogen), 100mM de Piruvato (Invitrogen), 100U/mL de Penicilina (Invitrogen) e 100 µg/mL de Streptamicina (Invitrogen), 50mM de 2-Mercaptoetanol (Sigma). Para diferenciação de células T reguladoras,  $1 \times 10^6$  esplenócitos/ml foram incubadas em meio RPMI completo e estimulados com 1 µg/ml de anti(α)-CD3, 1 µg/ml de αCD28, 5 ng/ml de TGF-β, 200 U/ml de IL-2 e 100 µM de ácido retinóico durante 4 dias, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No quarto dia as células foram recolhidas dos poços e ressuspensas em novo meio RPMI completo ao qual foram adicionados todos os anticorpos e citocinas utilizados anteriormente nas mesmas concentrações. Antes do início da nova cultura

<sup>c</sup> Células B16-Flt3-GFP - linha celular de melanoma de murganho que expressa *Flt3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*), que está envolvido na regulação do desenvolvimento de células dendríticas, e GFP; estas células foram utilizadas pois apresentam capacidade de induzir a geração de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> do baço.

<sup>d</sup> Murganhos CD11c-YFP - estes murganhos foram utilizados porque é possível observar as suas células dendríticas sob luz de fluorescência, uma vez que as estas expressam a proteína amarela fluorescente (YFP – *Yellow Fluorescent Protein*).

1mg/mL de  $\alpha$ CD3 foi incubando em PBS durante 1h a 37°C de modo a fazer o mesmo aderir ao poço de cultura antes da inoculação de células. A cultura foi mantida até ao sexto dia nas mesmas condições de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>. O estado da cultura foi controlado todos os dias para evitar que o meio se tornasse demasiado ácido ou que a confluência ideal das células fosse ultrapassada. Nestas situações foi adicionado mais meio aos poços ou as células divididas por mais poços.

Para diferenciação de células Th1 seguiu-se o protocolo descrito anteriormente utilizando os seguintes anticorpos e citocinas: 1  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ CD3, 1  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ CD28, 1 ng/ml de IL-12. Neste caso, no quarto dia adicionou-se  $\alpha$ CD3 solúvel e restantes anticorpos e citocinas.

Para diferenciação de células Th17 seguiu-se o protocolo descrito anteriormente utilizando os seguintes anticorpos e citocinas: 1  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ CD3, 1  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ CD28, 5 ng/ml de TGF- $\beta$ , 20 ng/ml de IL-6. Neste caso, no quarto dia adicionou-se  $\alpha$ CD3 solúvel, 10 ng/mL de IL-23 e restantes anticorpos e citocinas.

Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences. As citocinas foram adquiridas da Peprotech e o ácido retinóico foi adquirido da Sigma.

### ***Marcação de moléculas da superfície celular***

Para marcação de moléculas da superfície as células foram incubadas com anticorpo diluído 1:100, durante 30 minutos a 4°C. De seguida foram lavadas (5 minutos; 400g) e ressuspensas em PBE<sup>e</sup>. Os anticorpos utilizados para marcação superficial foram:  $\alpha$ CD4-Alexa(A)488,  $\alpha$ CD4-PE,  $\alpha$ CD8-Cy5,  $\alpha$ CD8-PB,  $\alpha$ CD11c-PE,  $\alpha$ CD25-biotinilado(biotin),  $\alpha$ CD28-biotin,  $\alpha$ CD44-biotin,  $\alpha$ CD69-biotin,  $\alpha$ CD62L-biotin,  $\alpha$ CD103-biotin,  $\alpha$ CD152-biotin,  $\alpha$ CD154-biotin e  $\alpha$ GITR-biotin. Os anticorpos biotinilados, após a marcação para a molécula de superfície, foram incubados com Streptavidina-PerCP durante 30 minutos a 4°C. De seguida as células foram lavadas e ressuspensas em PBE. A análise foi efectuada no citómetro de fluxo FACS Aria. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

### ***Marcação de Foxp3***

Células previamente marcadas com  $\alpha$ CD4-A488 e  $\alpha$ CD8-Cy5 segundo o protocolo descrito acima foram centrifugadas (5 minutos; 400g) e ressuspensas em

<sup>e</sup> PBE - tampão para marcação de células que, uma vez que possui BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma) mantém as células viáveis durante um maior período de tempo; composição do tampão: PBS (Gibco), 0,5% BSA e 1mM EDTA (Sigma).

100  $\mu$ L/tubo da solução cytofix/cytoperm (BDbiosciences), durante 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura. Após os 30 minutos as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 100  $\mu$ L/tubo de uma solução de 1% PFA (Paraformaldeído utilizado para fixação das células; Merck) e 0,5% Tween-20 (*Polysorbate 20*, utilizado para lise da membrana celular; Biorad), durante 30 minutos, a temperatura ambiente e em câmara escura. De seguida foram adicionados 100  $\mu$ L/tubo de tampão de permeabilização (1L PBS, 1g azida sódica (Sigma), 10mL FBS e 2g saponina (Sigma)) e as células centrifugadas e ressuspensas novamente em tampão de permeabilização. As células foram, então, incubadas com anti-*mouse* FoxP3-PE diluído 1:100, durante 1 hora em câmara escura e de seguida lavadas e ressuspensas em PBE. A análise foi efectuada no citómetro de fluxo FACSAria. Todos os anticorpos foram adquiridos da BDbiosciences.

#### **Marcação intracelular de citocinas**

Para marcação intracelular de citocinas as células de um poço de cada cultura foram incubadas com 100 ng/mL de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma) e 200 ng/mL de Ionomicina (Sigma) a 37°C, durante duas horas. De seguida foi adicionado no mesmo poço 2  $\mu$ M de Monensina (Sigma) para incubação por mais duas horas a 37°C. Ao fim de duas horas as células foram centrifugadas (5 minutos; 400g) e lavadas com PBS a 4°C. Após três lavagens as células foram ressuspensas em PBS. Foi adicionado anticorpo anti-CD16/CD32 (*FcBlock*), diluído 1:100, para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos, durante 10 minutos a temperatura ambiente. De seguida as células foram marcadas, tal como descrito acima, com anti( $\alpha$ )-CD4-A488,  $\alpha$ CD8-Cy5 e um dos seguintes marcadores de superfície:  $\alpha$ CD25-biotin,  $\alpha$ CD28-biotin,  $\alpha$ CD44-biotin,  $\alpha$ CD69-biotin,  $\alpha$ CD62L-biotin,  $\alpha$ CD103-biotin,  $\alpha$ CD152(CTLA-4)-biotin,  $\alpha$ CD154(CD40L)-biotin,  $\alpha$ GITR-biotin. Após esta marcação as células foram lavadas com PBS, ressuspensas e incubadas em 100  $\mu$ L/tubo de solução Cytofix/Cytoperm durante 20 minutos, a temperatura ambiente, em câmara escura e em seguidas lavadas com tampão de permeabilização (5 minutos; 400g). De seguida as células foram ressuspensas em tampão de permeabilização e marcadas com os anticorpos anti-citocinas  $\alpha$ IL-17-PE e  $\alpha$ IFN- $\gamma$ -APC, diluídos 1:100, durante 20 min, a temperatura ambiente e em câmara escura. Finalmente as células foram lavadas em tampão de permeabilização, ressuspensas em PBE e a análise de citocinas executada no citómetro de fluxo FACSAria. Todos os anticorpos foram

adquiridos da BDbiosciences. Todos os anticorpos foram adquiridos da BDbiosciences.

### ***Separação de células***

Para separação de células, após os seis dias de cultura celular, as células foram marcadas com marcadores de superfície  $\alpha$ CD11c-PE,  $\alpha$ CD4-PE,  $\alpha$ CD8-PB segundo o protocolo descrito acima. A separação das populações de interesse foi efectuada no citómetro de fluxo FACSAria. Todos os anticorpos foram adquiridos da BDbiosciences.

### ***Imagem de contactos entre células***

Após a separação das populações de células de interesse,  $1 \times 10^5$  células dendríticas  $CD11c^+YFP^+$  foram transferidas para cada um dos poços de um Lab-tek (câmara histológica de 8 poços; Nunc) pelo menos 1 hora antes da adição de MBP-4Y<sup>f</sup> (AcASQYRPSQRSK; Invitrogen) aos poços em que as células dendríticas receberam este estímulo e mantidas na estufa a 37°C até à aquisição das imagens. Nos poços que receberam estímulo de MBP-4Y, este foi adicionado ao poço na concentração de 10  $\mu$ g/mL, 30 minutos antes da adição das restantes populações celulares. Após estes 30 minutos foram adicionadas ao poço as populações de células T reguladoras e células T efectoras correspondentes a cada poço (o esquema de distribuição das populações de células está representado na **Figura 4**). As células foram mantidas durante 20 minutos a 37°C antes do início da aquisição de imagem. Após estes 20 minutos a aquisição de imagem foi iniciada. A aquisição foi feita durante 20 minutos, a 37°C usando a objectiva 63X do microscópio confocal (LEICA SP5). A distância utilizada entre cada passo de Z foi 4  $\mu$ m. As células T efectoras foram marcadas com *CellTracker™ Orange CMRA* (Invitrogen) antes da sua inoculação nos poços do Lab-Tek.

---

<sup>f</sup> MBP-4Y – péptido semelhante ao MBP1-11 mas contendo uma modificação para tirosina no quarto aminoácido, que lhe confere maior estabilidade na fenda do complexo principal de histocompatibilidade

### **Análise de Imagem**

A análise das imagens obtidas foi efectuada no software Imaris 6.2 (Bitplane Inc.). Para cada filme foi feita a contagem do tempo de contacto entre as diferentes populações de células. A análise estatística dos dados resultantes desta análise foi feita recorrendo ao software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software).

	DCs		MBP-DCs	
MBP-Tregs	filme 9	filme 11	filme 1	filme 3
Poly-Tregs	filme 10	filme 12	filme 2	filme 4
	Th1	Th17	Th1	Th17
Poly-Teffs				
	DCs		MBP-DCs	
MBP-Tregs	filme 13	---	filme 5	filme 7
Poly-Tregs	filme 14	---	filme 6	filme 8
	Th1	Th17	Th1	Th17
MBP-Teffs				

**Figura 4 – Representação esquemática dos Lab-Tek utilizados para aquisição de imagem dos contactos celulares** - Cada poço contém três populações de células: uma população de células T reguladoras, células T reguladoras MBP-específicas (MBP-Tregs) ou células T reguladoras policlonais (Poly-Tregs), uma população de células T efectoras, células T efectoras MBP-específicas (MBP-Teffs) tipo 1 (Th1) ou tipo 17 (Th17) ou células T efectoras policlonais (Poly-Teffs) tipo 1 (Th1) ou tipo 17 (Th17), e uma população de células dendríticas com (MBP-DCs) ou sem (DCs) estímulo do péptido MBP-4Y.

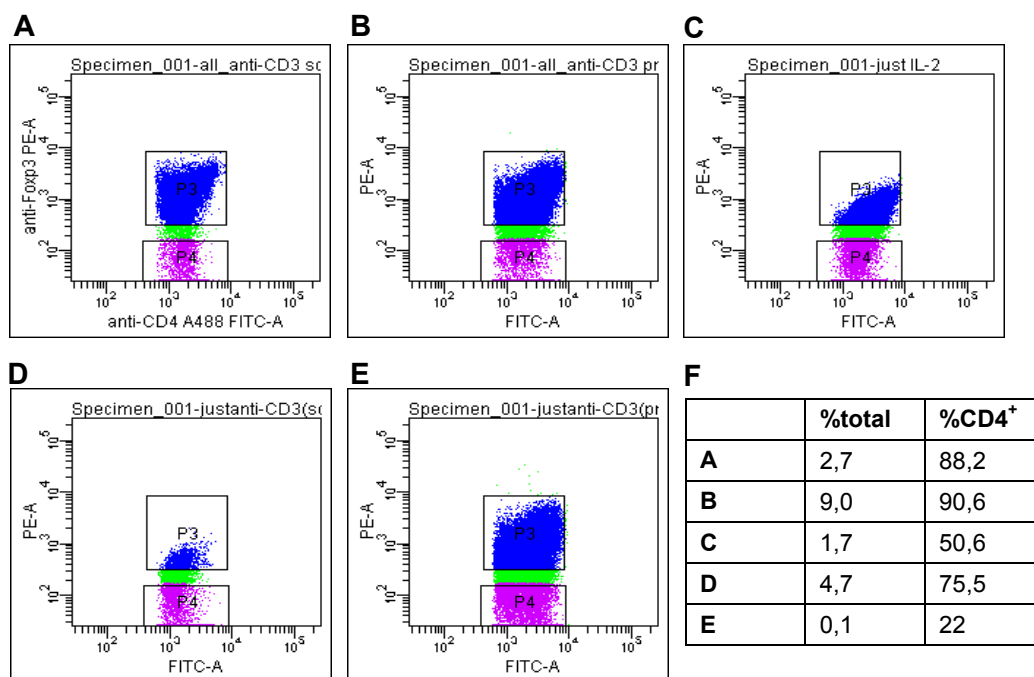
## Resultados

### *Diferenciação de células T reguladoras in vitro*

Tal como referido anteriormente, o principal objectivo deste trabalho é perceber qual o papel das células T reguladoras específicas e não-específicas para MBP1-11 nas interacções entre células dendríticas, células Th1 e células Th17. Para tal foi necessário expandir nTregs (policlonais) ou diferenciar iTregs (MBP-específicas) a partir de esplenócitos de murganhos B10.PL Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> ou Tg/Tg Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup>, respectivamente. Uma vez que nos animais Tg/Tg as células T reguladoras só se começam a acumular após o início dos sintomas da doença (para mais informações consultar texto suplementar em anexo) é necessário diferenciar células T *naïve* da periferia, neste caso, do baço. De acordo com estudos feitos anteriormente, a diferenciação de células T reguladoras pode ser induzida *in vitro* a partir de células T *naïve* da periferia através de estimulação antigénica na presença de TGF- $\beta$ <sup>57-59</sup>, IL-2<sup>35</sup> e ácido retinóico<sup>60</sup>. Relativamente às nTregs, estas poderiam ser isoladas de animais B10.PL Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> e utilizadas imediatamente nos ensaios de visualização de contactos entre células. No entanto, para que a comparação entre os efeitos dos dois tipos de células T reguladoras seja a mais correcta possível, as nTregs foram expandidas nas mesmas condições que as iTregs.

Para tentar otimizar a diferenciação de células T reguladoras *in vitro* seguiu-se o protocolo mencionado na secção “Material e Métodos” mas utilizando diferentes combinações de anticorpos e citocinas para re-estimulação das células no quarto dia de cultura. Assim, foi testada a utilização de todos os anticorpos e citocinas simultaneamente, com ou sem adesão prévia de  $\alpha$ CD3 ao poço de cultura, a utilização de apenas IL-2 ou de apenas  $\alpha$ CD3 e  $\alpha$ CD28, com ou sem adesão prévia de  $\alpha$ CD3. Verificou-se que utilizando estas condições de estimulação a percentagem de células T reguladoras obtidas após 6 dias de cultura varia entre 22% e 90,6% das células CD4<sup>+</sup> presentes na cultura e entre 0,1% e 9% do total de células da cultura (**Figura 5**). Das condições de estimulação testadas, aquela que apresentou melhor resultado, traduzido numa maior percentagem de células T reguladoras ao fim de seis dias de cultura, foi a utilização de todos os anticorpos e citocinas simultaneamente, com adesão prévia de  $\alpha$ CD3 ao poço de cultura. Neste caso conseguiu-se obter uma população de 90,6% de células T reguladoras dentro da população de células CD4<sup>+</sup>, correspondente a 9% da população total de células em cultura. Assim, e tal como

descrito na secção “Material e Métodos”, a diferenciação de células T reguladoras foi efectuada utilizando este protocolo.



**Figura 5 – Diferenciação de células T reguladoras *in vitro* – A)** A re-estimulação da cultura de células foi feita com todas os anticorpos e citocinas, sendo que  $\alpha$ CD3 se encontrava solúvel no meio de cultura. **B)** A re-estimulação da cultura de células foi feita com todas os anticorpos e citocinas, sendo que  $\alpha$ CD3 se encontrava aderido ao poço de cultura. **C)** A re-estimulação da cultura de células foi feita apenas com IL-2. **D)** A re-estimulação da cultura de células foi feita apenas com  $\alpha$ CD3 e  $\alpha$ CD28 solúveis. **E)** A re-estimulação da cultura de células foi feita apenas com  $\alpha$ CD3 e  $\alpha$ CD28, sendo que  $\alpha$ CD3 se encontrava aderido ao poço de cultura. **F)** Percentagem das populações de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (população P3) nas imagens de A a E. % total representa a percentagem de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> na população total de células em cultura, e %CD4<sup>+</sup> representa a percentagem da mesma população em relação à população de células CD4<sup>+</sup> presente na cultura. A marcação de células foi feita com  $\alpha$ CD4-A488 e  $\alpha$ Foxp3-PE.

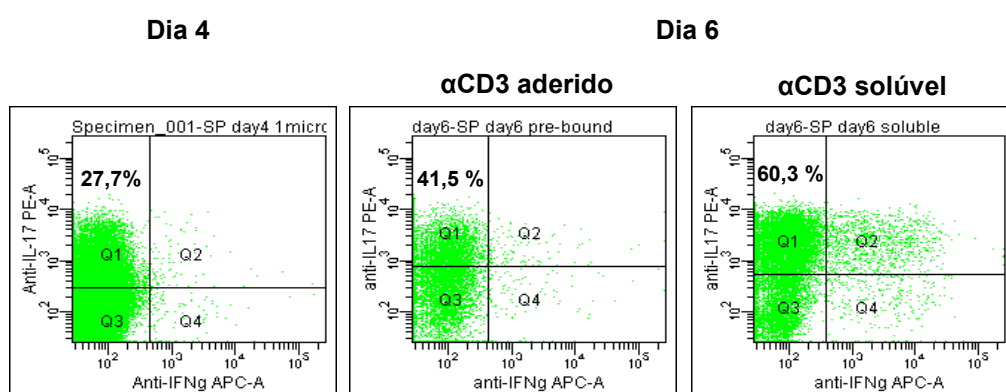
### Diferenciação de células Th1 e Th17 *in vitro*

Para alcançar o objectivo principal deste trabalho foi também necessário diferenciar *in vitro* células Th1 e células Th17. A utilização deste tipo de células T efectoras e não de outro, como por exemplo, células T efectoras tipo 2, deve-se ao facto de serem estas aquelas que se sabe estarem envolvidas na EAE, doença desenvolvida pelos murganhos Tg/Tg e, portanto, seria sobre estas células que as células T reguladoras teriam que exercer a sua função supressora *in vivo* durante a fase efectora da resposta imune. Por outro lado, será interessante ver se o efeito de células T reguladoras específicas ou não para MBP1-11 é diferente consoante o tipo de célula T efectora a suprimir uma vez que se verifica que as percentagens destes

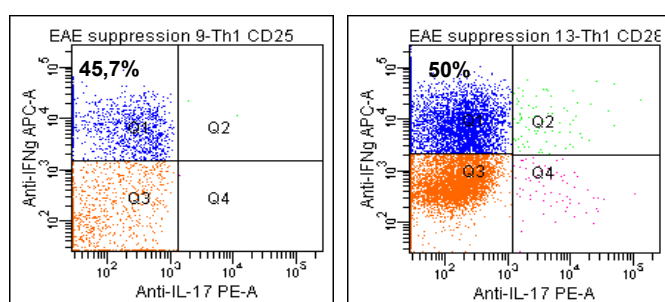
dois tipos de células T efectoras em tecidos inflamados de animais com doença já em fase crónica são diferentes e parecem estar associadas à fatalidade da doença, EAE (para mais informações consultar texto suplementar em anexo).

De acordo com o protocolo de diferenciação de células Th17<sup>10</sup>, a cultura deveria conter cerca de 30% de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 no quarto dia de cultura e 70% destas células no sexto dia de cultura. Nas nossas culturas observámos resultados semelhantes (**Figura 6**) obtendo-se 27,7% de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 presentes em cultura no dia 4 e 41,5% ou 60,3% no dia 6. Uma vez que o melhor resultado foi obtido com re-estimulação das células com  $\alpha$ CD3 solúvel (60,3% de células Th17), este foi o protocolo utilizado nas experiências seguintes.

O protocolo de diferenciação de células Th1 foi também testado. Neste caso a percentagem de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  obtida no sexto dia de cultura foi cerca de 50% em ambas as culturas teste (**Figura 7**). Uma vez que este protocolo levou à diferenciação de uma percentagem satisfatória de células Th1, foi adoptado para o trabalho experimental subsequente.



**Figura 6 – Teste do protocolo de diferenciação de células Th17 *in vitro*** – Na figura estão representadas as percentagens de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 na cultura, nos dias 4 e 6. Nesta experiência, a percentagem de células obtidas é semelhante à que seria de esperar, ou seja cerca de 30% no dia 4 e cerca de 70% no dia 6. Uma vez que a percentagem de células Th17 no dia 6 é superior utilizando  $\alpha$ CD3 solúvel, este foi o protocolo utilizado no decorrer do trabalho.



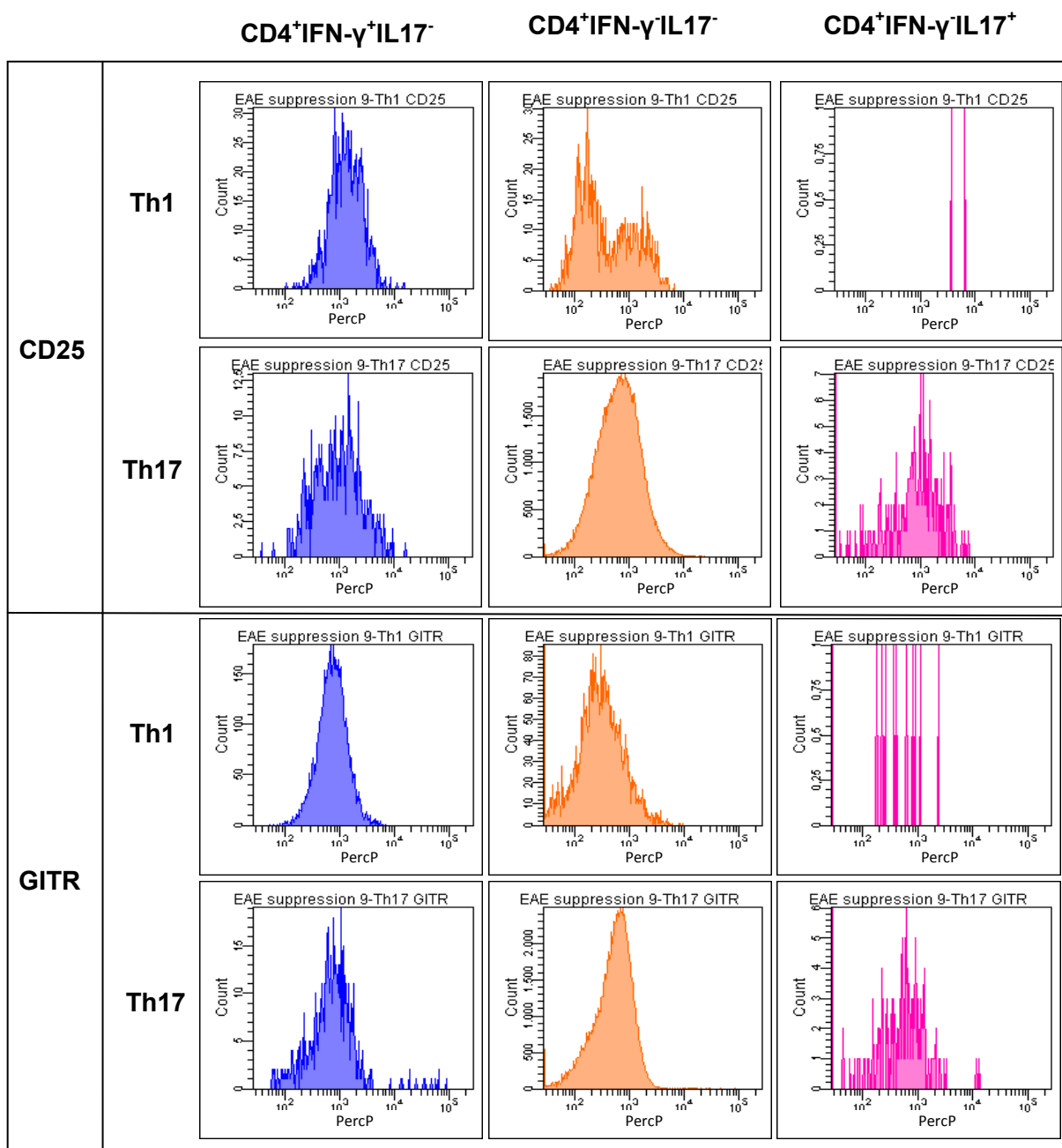
**Figura 7 - Cultura de células Th1** – Na figura estão representadas as populações, e respectivas percentagens, de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  no dia 6 de duas culturas celulares independentes.

### ***Marcadores de superfície de células Th1 e Th17***

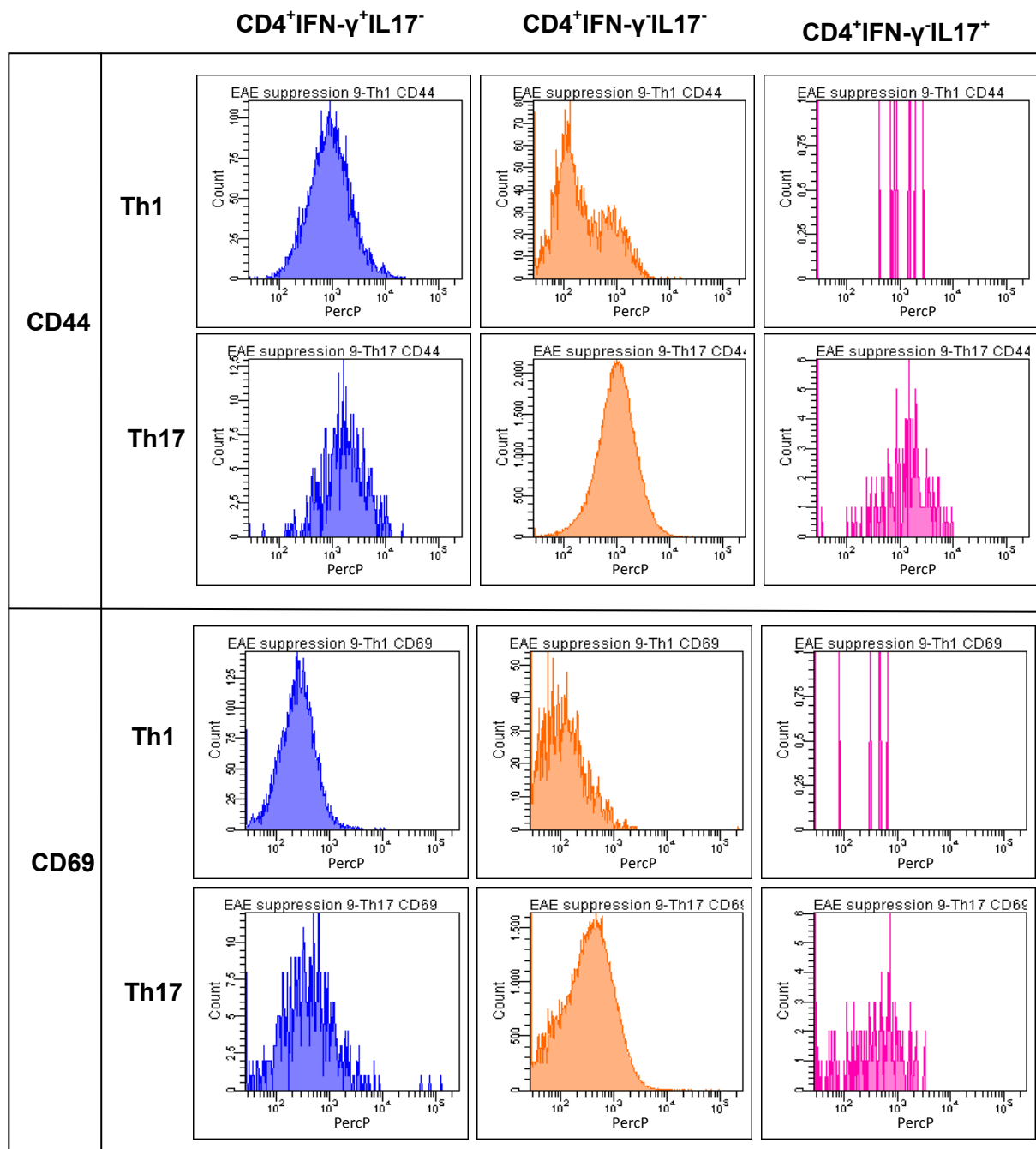
Para identificar células Th1 ou Th17 pelas citocinas libertadas pelas mesmas, IFN- $\gamma$  e IL-17, respectivamente, é necessário fazer marcação intracelular de citocinas, tal como descrito em “Material e Métodos”. No entanto, esta marcação mata as células, facto que torna a utilização deste método inviável para marcar células que serão separadas no citómetro de fluxo e posteriormente utilizadas para a visualização de contactos entre células T reguladoras, células dendríticas e células T efectoras. Assim, e uma vez que ainda não são conhecidos marcadores de superfície que sejam específicos destas células, tentámos identificar um ou mais marcadores para o efeito. Tendo como base os dados publicados em 2007 por Nakae *et al*, após seis dias de cultura em condições de diferenciação de células Th1 ou Th17, as células foram marcadas com  $\alpha$ CD4-A488,  $\alpha$ IL-17-PE,  $\alpha$ IFN- $\gamma$ -APC e um dos seguintes anticorpos:  $\alpha$ CD25-biotin,  $\alpha$ CD28-biotin,  $\alpha$ CD44-biotin,  $\alpha$ CD69-biotin,  $\alpha$ CD62L-biotin,  $\alpha$ GITR-biotin,  $\alpha$ CD103-biotin,  $\alpha$ CD152-biotin ou  $\alpha$ CD154-biotin. Nas **figuras 8, 9, 10 e 11** estão representados os histogramas de expressão de cada um dos marcadores de superfície. Esta fenotipagem não revelou nenhum marcador específico para nenhuma das linhas celulares pois as curvas de expressão para as diferentes populações em cultura são quase totalmente sobreponíveis. Ainda assim, os marcadores mais promissores para células Th1 são CD44, CD152 e CD154 pois nestes casos poderiam separar-se as células que se encontram no final da curva de expressão e, assim, excluir as restantes populações. No entanto, a percentagem de células que se obteria seria muito baixa o que torna a utilização destes marcadores inviável.

### ***Nível de expressão dos marcadores de superfície para Th1 e Th17***

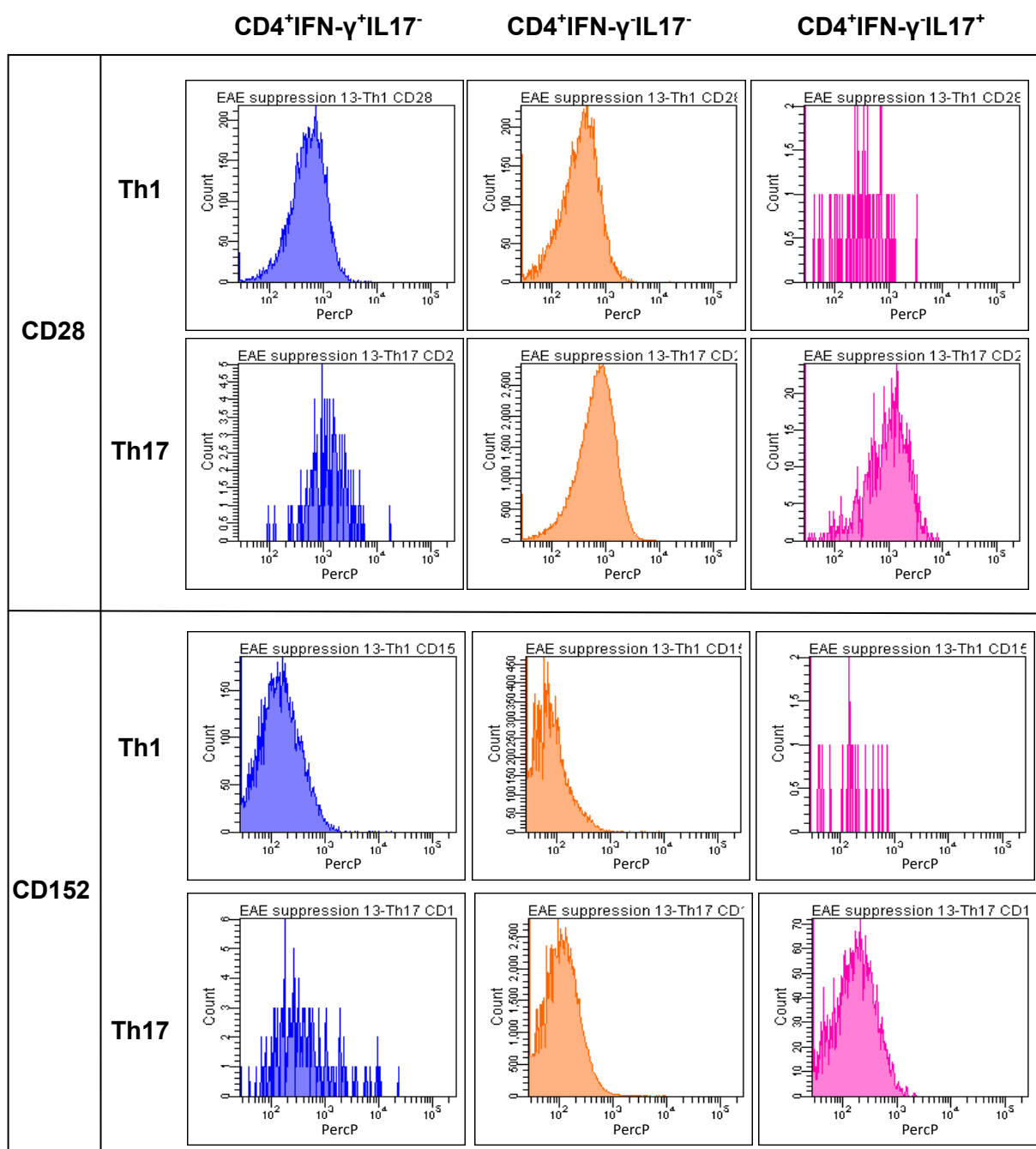
Foi também determinado o valor médio de intensidade de fluorescência para cada marcador testado. Na **Tabela II** estão representados estes valores para as culturas de células Th1 e células Th17. Os marcadores de superfície CD44, CD28 e CD152 apresentam maior expressão nas células Th17, enquanto os marcadores CD62L e CD154 apresentam maior expressão nas células Th1. No entanto, como as intensidades de fluorescência são muito próximas, só poderemos concluir se, de facto, estas diferenças são significativas, repetindo a experiência.



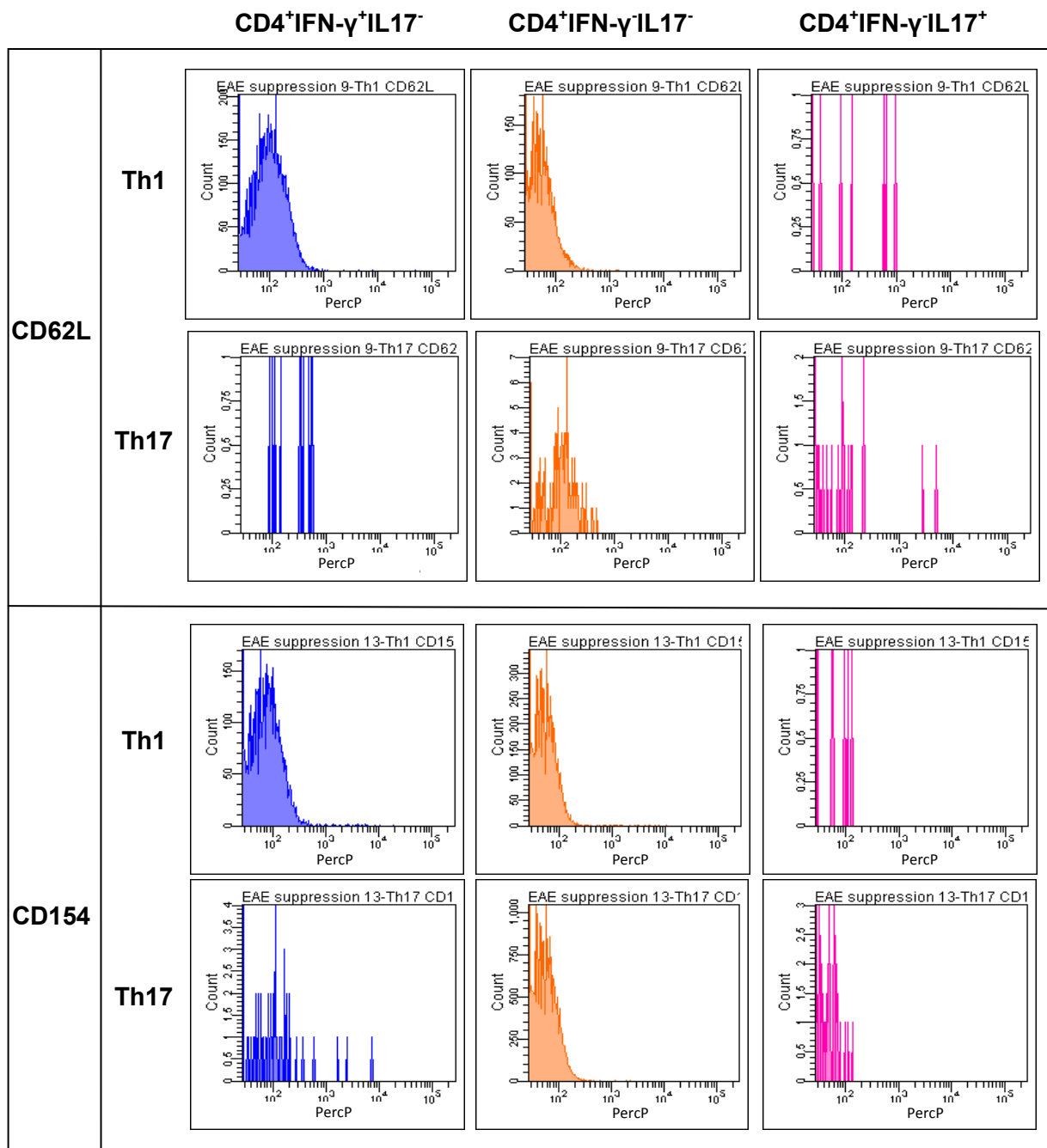
**Figura 8 – Expressão de marcadores de superfície CD25 e GITR em células Th1 e Th17 –** Nesta figura estão representados os perfis de expressão as moléculas da superfície celular CD25 e GITR, testadas como marcadores das populações celulares Th1 e Th17. Estão representados os perfis de expressão das moléculas de superfície para as populações de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL17<sup>-</sup> (primeira coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>-</sup> (segunda coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>+</sup> (terceira coluna).



**Figura 9 - - Expressão de marcadores de superfície CD44 e CD69 em células Th1 e Th17 -** Nesta figura estão representados os perfis de expressão as moléculas da superfície celular CD44 e CD69, testadas como marcadores das populações celulares Th1 e Th17. Estão representados os perfis de expressão das moléculas de superfície para as populações de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>-</sup> (primeira coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>-</sup> (segunda coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>+</sup> (terceira coluna).



**Figura 10 - Expressão de marcadores de superfície CD28 e CD152 em células Th1 e Th17 –** Nesta figura estão representados os perfis de expressão das moléculas da superfície celular CD28 e CD152, testadas como marcadores das populações celulares Th1 e Th17. Estão representados os perfis de expressão das moléculas de superfície para as populações de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL17<sup>-</sup> (primeira coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>-</sup> (segunda coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>+</sup> (terceira coluna).



**Figura 11 - Expressão de marcadores de superfície CD62L e CD154 em células Th1 e Th17 –** Nesta figura estão representados os perfis de expressão das moléculas da superfície celular CD62L e CD154, testadas como marcadores das populações celulares Th1 e Th17. Estão representados os perfis de expressão das moléculas de superfície para as populações de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL17<sup>-</sup> (primeira coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>-</sup> (segunda coluna), CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>IL17<sup>+</sup> (terceira coluna).

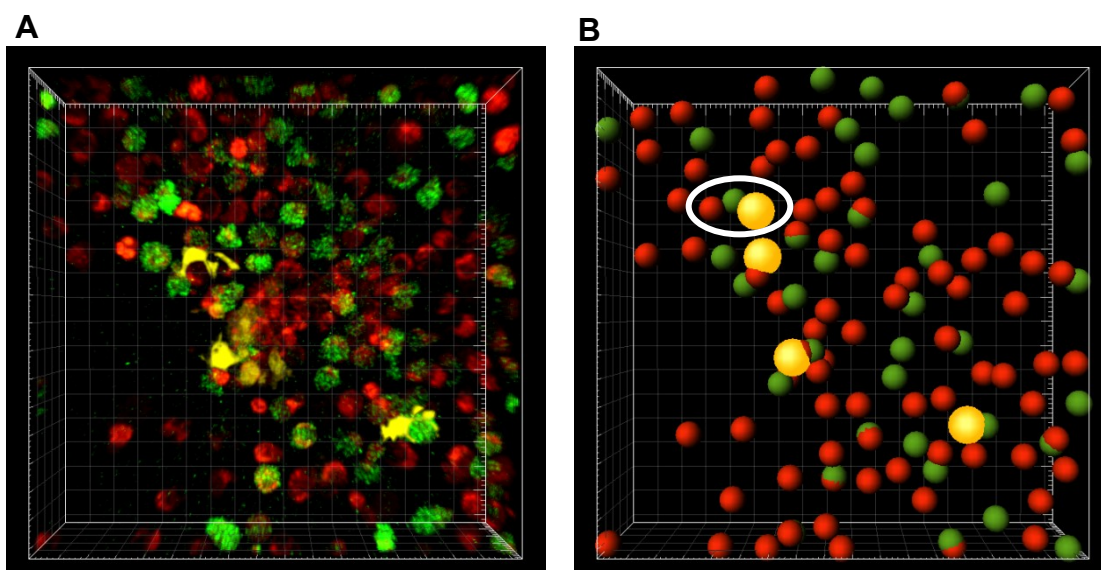
**Tabela II - Média da Intensidade de Fluorescência** – Na tabela estão indicados os valores da média da intensidade fluorescência para os marcadores de superfície CD25, GITR, CD44, CD69, CD28, CD152, CD62L e CD154

	Th1	Th17
<b>CD25</b>	1499	1243
<b>GITR</b>	1250	1712
<b>CD44</b>	299	398
<b>CD69</b>	803	747
<b>CD28</b>	104	996
<b>CD152</b>	577	952
<b>CD62L</b>	139	122
<b>CD154</b>	198	96

***Efeito das células T reguladoras nos contactos entre células dendríticas, células Th1 e células Th17***

Tal como referido anteriormente, o principal objectivo deste trabalho é perceber qual o papel das células T reguladoras específicas e não-específicas para o péptido MBP1-11 nas interações entre células dendríticas, células Th1 e células Th17. Para tal, a partir de esplenócitos de murganhos Tg/Tg Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> foram diferenciadas células T reguladoras MBP-específicas, células Th1 MBP-específicas e células Th17 MBP-específicas. Como controlo foram utilizadas células T reguladoras policlonais, células Th1 policlonais e células Th17 policlonais diferenciadas a partir de esplenócitos de murganhos B10.PL Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup>. No sexto dia de cultura as células foram separadas no citómetro de fluxo de forma a obter as populações de interesse. Assim, de ambas as culturas de células T reguladoras (Tg/Tg Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup> e B10.PL Foxp3-KI<sup>gfp/gfp</sup>) foram separadas as células CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> (**Figura Suplementar 1**) e das culturas de células T efectoras foram separadas as células CD4<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> e posteriormente calculada a percentagem de células Th1 e Th17 presente em cultura (**Figura Suplementar 2**), uma vez que até este ponto não conseguimos identificar um marcador fiável para estas populações. Relativamente às células dendríticas, a população separada para utilização na visualização de contactos entre os diferentes tipos de células foi CD11c<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup> (**Figura Suplementar 3**) que foi obtida a partir do baço de um murganho CD11c-YFP ao qual tinham sido administradas, subcutaneamente, células B16-Flt3-

GFP, catorze dias antes da aquisição de imagens. As células foram então transferidas para os poços de um Lab-Tek, e mantidas a 37°C durante toda a aquisição de imagens (**Filmes Suplementares 1 a 14** encontram-se nos DVDs em anexo). Na **Figura 12** pode observar-se uma imagem representativa dos filmes adquiridos e a respectiva representação gráfica. Esta representação é uma substituição das células presentes na imagem por pontos permitindo uma percepção mais rápida dos contactos estabelecidos entre os diferentes tipos de células. No entanto foi também realizada a contagem do tempo de contacto entre células (**Figuras 13, 14 e 15**). Apesar do resultado desta contagem não mostrar diferenças estatisticamente significativas nos contactos entre células dendríticas e células T reguladoras, parece que o tempo de contacto entre células T reguladoras MBP-específicas e células dendríticas estimuladas com MBP-4Y (MBP-DCs), na presença de células Th1 MBP-específicas, é superior ao tempo de contacto entre células T reguladoras policlonais e MBP-DCs, na presença de células Th1 MBP-específicas (**Figura 13**). Nas mesmas condições verifica-se que o tempo de contacto entre MBP-DCs e células Th1 MBP-específicas é inferior na presença de células T reguladoras MBP-específicas e que o tempo de contacto entre células T reguladoras MBP-específicas e células Th1 MBP-específicas é superior ao tempo de contacto na presença de células T reguladoras policlonais (**Figuras 14 e 15**). Estas diferenças sugerem que as células T reguladoras MBP-específicas impedem os contactos entre células dendríticas apresentadoras de MBP e células Th1 MBP-específicas, colocando-se fisicamente entre os dois tipos de células (**Figura 12B**) e, portanto, estabelecendo contactos com ambas o que resulta no aumento do tempo de contacto entre células T reguladoras e células dendríticas e entre células T reguladoras e células Th1, e na diminuição do contacto entre células dendríticas e células Th1. Este comportamento parece não ocorrer na presença de células Th17 pois apesar de aparentemente o tempo de contacto entre células T reguladoras MBP-específicas e MBP-DCs, na presença de células Th17 MBP-específicas, ser superior ao tempo de contacto entre células T reguladoras policlonais e MBP-DCs, na presença de células Th17 MBP-específicas (provavelmente devido ao número reduzido de contactos) o tempo de contacto entre MBP-DCs e células Th17 MBP-específicas não é alterado na presença de células T reguladoras e o tempo de contacto entre células T reguladoras MBP-específicas e células Th17 MBP-específicas é inferior ao tempo de contacto na presença de células T reguladoras policlonais (**Figuras 13, 14 e 15**). Nas outras condições testadas também não se verificam diferenças no tempo de contacto entre os diferentes tipos de células.



**Figura 12 – Visualização de contactos entre células T reguladoras, células dendríticas e células T efectoras** – Na figura pode observar-se **A)** uma imagem representativa dos filmes adquiridos, em que as células a amarelo são células dendríticas  $CD11c^{+}YFP^{+}$ , as células a verde são células T reguladoras  $CD4^{+}GFP^{+}$  e as células a encarnado são células T efectoras  $CD4^{+}GFP^{-}$  marcadas com CMRA, e **B)** a respectiva representação gráfica. A circunferência branca mostra um exemplo de como as células T reguladoras parecem colocar-se entre células T efectoras e células dendríticas, evitando o contacto entre as mesmas.







## Discussão

As nTregs estão activamente envolvidas na manutenção da homeostase e tolerância imunológicas. Uma das suas características é a capacidade de suprimir, *in vitro*<sup>31</sup> e *in vivo*<sup>61</sup>, a proliferação de outras células T por um mecanismo que é dependente do contacto entre células<sup>20, 62</sup>. Uma vez que as células dendríticas têm um papel fundamental na iniciação das respostas imunes, activando células T *naïve*<sup>41, 42</sup>, são um potencial alvo das células T reguladoras neste mecanismo de supressão dependente de contacto. Vários estudos têm abordado este tema e recentemente Onishi *et al* demonstrou que células T reguladoras são capazes de regular células T *naïve* formando agregados à volta das células dendríticas<sup>63</sup>. Baseados nos resultados que obtiveram, este grupo propôs um modelo para um mecanismo de supressão mediado por células T reguladoras. Neste modelo propõem a formação inicial de um agregado de células T reguladoras a rodear as células dendríticas e a sub-modulação da expressão de CD80/86 nas células dendríticas, ou seja, as células T reguladoras manteriam os níveis baixos de CD80/86 em células dendríticas impedindo assim a sua maturação e conseqüentemente a activação de células T *naïve*. Este possível mecanismo está de acordo com os dados obtidos em 2006 por Tadokoro *et al*, que indicam que as células T reguladoras são capazes de inibir contactos estáveis entre células T efectoras e células dendríticas<sup>55</sup>, e com os dados obtidos com o trabalho experimental conducente a esta dissertação. Aqui vemos que células T reguladoras específicas para MBP1-11 são capazes de impedir os contactos entre células Th1 MBP-específicas e células dendríticas estimuladas com o péptido MBP-4Y, estabelecendo contactos com ambas as células e impedindo, assim, a activação de células Th1 pelas células dendríticas (**Figuras 13, 14 e 15**). No entanto, o mesmo não se verificou quando a população de células T efectoras presente em cultura era Th17 (**Figuras 13, 14 e 15**). Apesar de ser necessário ainda muito trabalho para esclarecer esta questão, é possível que a falta de capacidade das células T reguladoras em suprimir os contactos entre células dendríticas e células Th17 seja uma explicação para o facto de 1/3 dos murganhos Tg/Tg morrerem devido ao desenvolvimento de EAE, pois estes apresentam maior percentagem de células Th17 do que aqueles que sobrevivem à doença (Tadokoro, CE, comunicação pessoal). Por outro lado, neste trabalho, como noutros estudos já feitos<sup>38, 53</sup>, mostramos que as células T reguladoras MBP-específicas são capazes de se ligar mais eficazmente às células dendríticas do que células T reguladoras policlonais uma vez que o efeito acima descrito não se

verificou quando em cultura se encontravam células T reguladoras policlonais (**Figuras 13, 14 e 15**). Este resultado pode ser indicativo de que a sinalização via TCR é um factor determinante na supressão mediada por células T reguladoras na fase efectora da resposta imune desencadeada por células Th1. Para se testar esta hipótese seria necessário impedir esta via de sinalização e observar se os resultados obtidos são semelhantes aos aqui apresentados.

Apesar de os resultados obtidos indicarem que as células T reguladoras MBP-específicas são capazes de impedir o contacto entre células Th1 e células dendríticas, o que sugere que desta forma suprimem a actividade efectora das células Th1, nestes ensaios não foi medida a supressão *in vitro* destas células, mas apenas o tempo de contacto entre células T reguladoras, células dendríticas e células T efectoras. Assim, não se pode concluir que, neste caso, a supressão das células T efectoras pelas células T reguladoras é mediada por um mecanismo de modulação da função de células dendríticas. No entanto, em trabalhos futuros seria interessante medir a supressão de células Th1 e Th17, em culturas semelhantes às utilizadas para obtenção das imagens de contactos intercelulares, e comparar com os resultados aqui apresentados. Neste caso, também seria importante conhecer um ou mais marcadores para estas células T efectoras. Neste trabalho não foi identificado nenhum novo marcador para estas populações mas alguns dos marcadores testados podem ser promissores se utilizados simultaneamente. Neste caso utilizaríamos CD44, CD152 e CD154, ou CXCR3 e CCR5 como descrito por Liu *et al*<sup>64</sup>, para tentar marcar células Th1, e CCR6 e ICOS para tentar marcar células Th17, tal como descrito por Marks *et al*<sup>65</sup>. A marcação superficial de células Th17 revelou que estas têm maior expressão do marcador de activação CD44 do que a população de células Th1. Caso estes resultados se confirmem em experiências futuras será interessante avaliar se o nível de expressão se altera após cultura com células T reguladoras e células dendríticas. Para futuras experiências com estas células, Th1 e Th17, será muito útil a utilização de murganhos que expressam GFP sob o controlo do promotor de IFN- $\gamma$  ou do promotor de IL-17, respectivamente.

Apesar de muito se ter estudado os mecanismos de supressão mediados por células T reguladoras, ainda há questões por responder. É ainda desconhecido se a especificidade antigénica das células T reguladoras é essencial ou não para a sua função supressora nos tecidos inflamados, quais os mecanismos de sinalização que direccionam as células T reguladoras para os órgãos não-linfóides e quais os mecanismos utilizados pelas células T reguladoras que dependem do contexto em que elas exercem a sua actividade supressora. No entanto, no que respeita a este trabalho

experimental, é necessário repetir a experiência de aquisição de imagens de contactos entre células T reguladoras, células dendríticas e células T efectoras em condições distintas das utilizadas neste trabalho (por exemplo, utilizar poli-D-lisina para aderir as células dendríticas ao poço do Lab-Tek pois é sabido que a utilização desta lisina altera o comportamento das células). Para além disso, para que possamos tentar responder a algumas perguntas sobre os mecanismos utilizados por células T reguladoras na supressão, será também necessário adquirir imagens destes contactos *in vivo*. Neste caso, uma vez que estamos a utilizar a EAE como modelo, os contactos seriam observados na espinal medula, o tecido inflamado neste modelo animal para a esclerose múltipla.

## Agradecimentos

Ao Instituto Gulbenkian de Ciência, local onde o trabalho conducente a esta Dissertação foi desenvolvido, pelas excelentes condições e ambiente de trabalho.

Ao Doutor Carlos Tadokoro por me ter dado a oportunidade de realizar o trabalho experimental no seu grupo de investigação e pelos conhecimentos transmitidos.

À Doutora Ana Maria Crespo pela revisão do trabalho.

À Doutora Íris Caramalho pela ajuda no desenvolvimento do protocolo de visualização de contactos intercelulares

À minha família pelo apoio incondicional.

Às minhas amigas Bárbara Fekete, Jaqueline García e Mafalda Cavaleiro, colegas do IGC que se tornaram grandes amigas, por todo o apoio, paciência e boa disposição.

Ao meu amigo e colega de curso Pedro Lima por me ter dado a conhecer este projecto e assim ter tornado esta dissertação possível

## Bibliografia

1. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787 (2008).
2. Bach, J.F. Regulatory T cells under scrutiny (vol 3, pg 189, 2003). *Nature Reviews Immunology* **3**, 509-509 (2003).
3. Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice .1. Requirement of lyt-1 effector-cells for oocytes damage after adoptive transfer. *Journal of Experimental Medicine* **156**, 1565-1576 (1982).
4. Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice .2. Requirement of lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *Journal of Experimental Medicine* **156**, 1577-1586 (1982).
5. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. & Masuda, T. Organ-specific autoimmune-diseases induced in mice by elimination of t-cell subset .1. Evidence for the active participation of t-cells in natural self-tolerance - deficit of a t-cell subset as a possible cause of autoimmune-disease. *Journal of Experimental Medicine* **161**, 72-87 (1985).
6. Sakaguchi, S., Wing, K. & Miyara, M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European Journal of Immunology* **37**, S116-S123 (2007).
7. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunological self-tolerance maintained by activated t-cells expressing il-2 receptor alpha-chains (cd25) - breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune-diseases. *Journal of Immunology* **155**, 1151-1164 (1995).
8. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
9. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nature Immunology* **4**, 330-336 (2003).
10. Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H)17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238 (2006).
11. Fontenot, J.D. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FoxP3. *Immunity* **22**, 329-341 (2005).
12. Kim, J.M., Rasmussen, J.P. & Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature Immunology* **8**, 191-197 (2007).
13. Lahl, K. et al. Selective depletion of Foxp3(+) regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 57-63 (2007).
14. Wan, Y.S.Y. & Flavell, R.A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological Reviews* **212**, 114-130 (2006).
15. Izcue, A., Coombes, J.L. & Powrie, F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunological Reviews* **212**, 256-271 (2006).
16. Van Parijs, L. & Abbas, A.K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off. *Science* **280**, 243-248 (1998).
17. de Lafaille, M.A.C. & Lafaille, J.J. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Current Opinion in Immunology* **14**, 771-778 (2002).
18. Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S. Induction of tumor immunity by removing CD25(+)CD4(+) T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of Immunology* **163**, 5211-5218 (1999).

19. Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M. & Betz, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology* **5**, 266-271 (2004).
20. Campbell, D.J. & Ziegler, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* **7**, 305-310 (2007).
21. Shevach, E.M. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* **25**, 195-201 (2006).
22. Sakaguchi, S. et al. Foxp3(+)/CD25(+)/CD4(+) natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews* **212**, 8-27 (2006).
23. Brunkow, M.E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* **27**, 68-73 (2001).
24. Ochs, H.D., Ziegler, S.F. & Torgerson, T.R. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunological Reviews* **203**, 156-164 (2005).
25. Ochs, H.D. et al. Immune deficiency/dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked inheritance (IPEX) is caused by mutations of the human scurfy (FOXP3) gene. *Faseb Journal* **15**, A1014-A1014 (2001).
26. Sakaguchi, S. & Powrie, F. Perspective - Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* **317**, 627-629 (2007).
27. Hori, S. & Sakaguchi, S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* **6**, 745-751 (2004).
28. Sundrud, M. et al. in Annual Meeting of the American-Association-of-Immunologists S238-S238 (Amer Assoc Immunologists, Boston, MA, 2006).
29. Zheng, Y. et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**, 936-940 (2007).
30. Shevach, E.M. et al. The lifestyle of naturally occurring CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunological Reviews* **212**, 60-73 (2006).
31. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 287-296 (1998).
32. Allan, S.E. et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4(+) Tregs. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 3276-3284 (2005).
33. Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology* **6**, 1142-1151 (2005).
34. Malek, T.R., Yu, A.X., Vincek, V., Scibelli, P. & Kong, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R beta-deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* **17**, 167-178 (2002).
35. Yu, A.X., Zhu, L.J., Altman, N.H. & Malek, T.R. A Low Interleukin-2 Receptor Signaling Threshold Supports the Development and Homeostasis of T Regulatory Cells. *Immunity* **30**, 204-217 (2009).
36. Burchill, M.A., Yang, J.Y., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R. & Farrar, M.A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3(+) regulatory T cells. *Journal of Immunology* **178**, 280-290 (2007).
37. Mucida, D. et al. Reciprocal T(H)17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **317**, 256-260 (2007).
38. Huter, E.N., Stummvoll, G.H., DiPaolo, R.J., Glass, D.D. & Shevach, E.M. Pre-differentiated Th1 and Th17 effector T cells in autoimmune gastritis: Ag-specific regulatory T cells are more potent suppressors than polyclonal regulatory T cells. *International Immunopharmacology* **9**, 540-545 (2009).

39. Komiyama, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* **177**, 566-573 (2006).
40. Chen, Y. et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation* **116**, 1317-1326 (2006).
41. Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & von Andrian, U.H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154-159 (2004).
42. Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I. & Cahalan, M.D. Imaging the single cell dynamics of CD4(+) T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 847-856 (2004).
43. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 995-1003 (1999).
44. Loser, K. et al. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *Journal of Immunology* **179**, 365-371 (2007).
45. Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T. & Tiegs, G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* **45**, 475-485 (2007).
46. Schumacher, A. et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* **110**, 1137-1145 (2007).
47. Rubtsov, Y.P. et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **28**, 546-558 (2008).
48. Vignali, D.A.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* **8**, 523-532 (2008).
49. Fahlen, L. et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 737-746 (2005).
50. Li, M.O., Wan, Y.S.Y. & Flavell, R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* **26**, 579-591 (2007).
51. Joetham, A. et al. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. (vol 178, pg 1433, 2007). *Journal of Immunology* **178**, 5400-5400 (2007).
52. Collison, L.W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-U19 (2007).
53. Shevach, E.M. Mechanisms of Foxp3(+) T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* **30**, 636-645 (2009).
54. Pandiyan, P., Zheng, L.X., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M.J. CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nature Immunology* **8**, 1353-1362 (2007).
55. Tadokoro, C.E. et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4(+) T cells and dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 505-511 (2006).
56. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 295-302 (2000).
57. Chen, W.J. et al. Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1875-1886 (2003).

58. Apostolou, I. & von Boehmer, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *Journal of Experimental Medicine* **199**, 1401-1408 (2004).
59. Kretschmer, K. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology* **6**, 1219-1227 (2005).
60. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. & Noelle, R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 1765-1774 (2007).
61. Shen, S.Q. et al. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 3517-3526 (2005).
62. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-458 (2000).
63. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3(+) natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10113-10118 (2008).
64. Liu, L.P. et al. Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3(-/-) mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* **176**, 4399-4409 (2006).
65. Marks, B.R. et al. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nature Immunology* **10**, 1125-U108 (2009).
66. Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M. & Tonegawa, S. High-incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient antimyelin basic-protein t-cell receptor transgenic mice. *Cell* **78**, 399-408 (1994).
67. Olivares-Villagomez, D., Wang, Y. & Lafaille, J.J. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **188**, 1883-94 (1998).

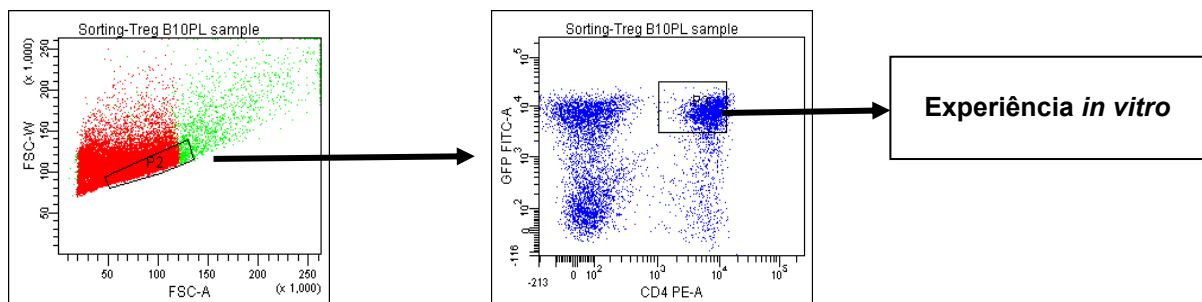
## Anexos

### *EAE*

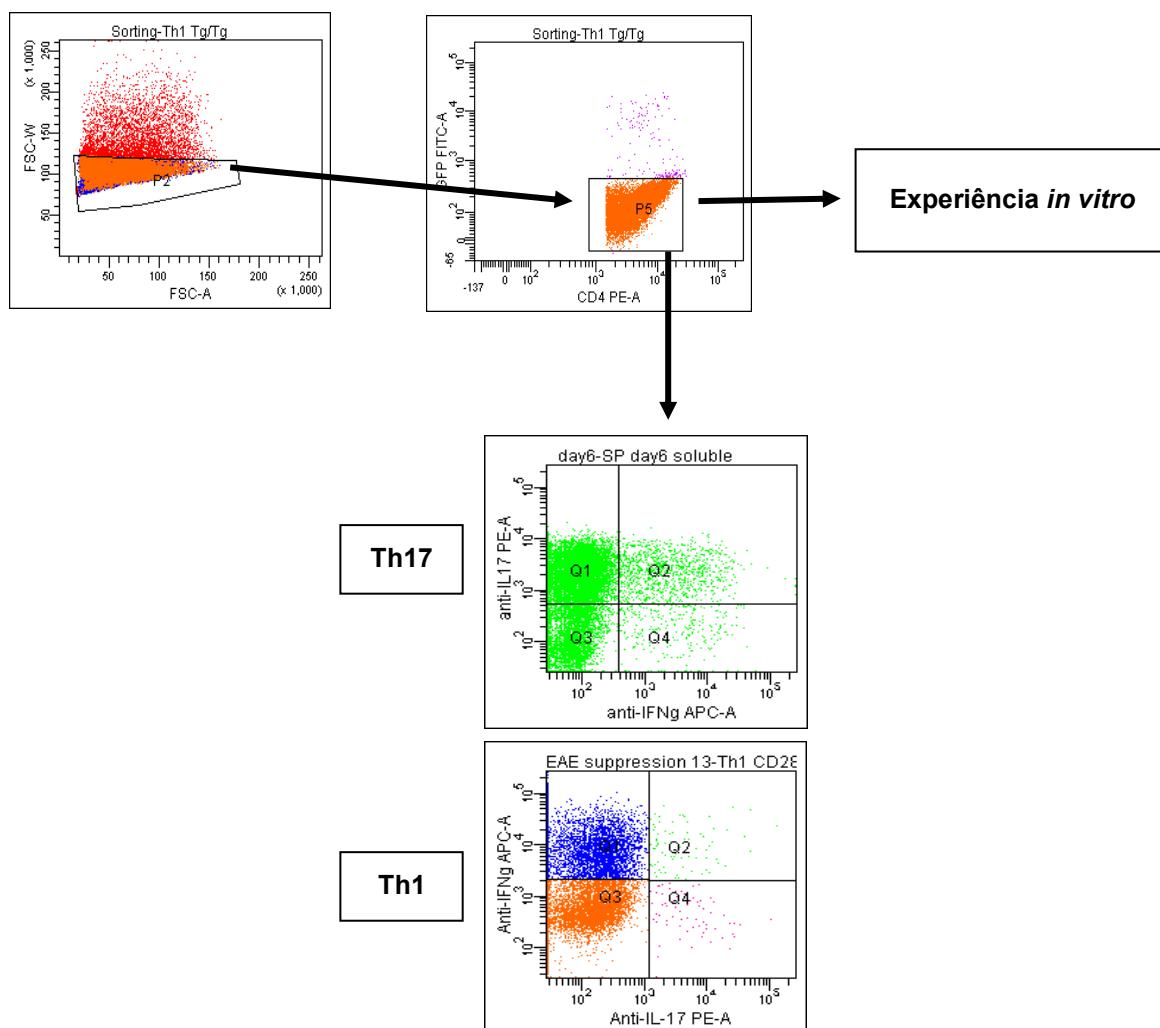
A encefalomielite autoimune experimental (EAE), para a qual têm um papel fundamental as células T reguladoras<sup>66</sup>, desenvolve-se espontaneamente apenas em algumas linhas de murganhos. No laboratório do Dr. Juan Lafaille foi desenvolvido um modelo de EAE para estudar células T reguladoras que consiste num murganho transgénico para o receptor das células T (TCR) específico para a proteína básica da mielina (MBP)<sup>66</sup>. Este murganho é denominado T/R<sup>+</sup> e não apresenta doença pois ainda é capaz de fazer o rearranjo dos seus TCRs endógenos e, portanto, consegue gerar células T reguladoras. No entanto, quando cruzados com murganhos Rag<sup>-/-</sup> (murganhos que não possuem a enzima RAG recombinase, responsável pelo rearranjo do TCR) ou murganhos TCR  $\alpha^{-/-}/\beta^{-/-}$  (murganhos que não possuem as cadeias endógenas do TCR), gerando, assim, murganhos T/R<sup>-</sup> e Tg/ $\alpha\beta^{-}$ , respectivamente, toda a descendência desenvolve espontaneamente EAE<sup>66, 67</sup>. Também foi mostrado que a homozigotia para o transgene MBP-TCR, obtida por cruzamento de murganhos T/R<sup>+</sup>, dá origem a murganhos Tg/Tg que também desenvolvem espontaneamente EAE mas, ao contrário dos murganhos T/R<sup>-</sup> e Tg/ $\alpha\beta^{-}$ , a maioria não morre devido à doença mas desenvolvem uma fase crónica da doença com perda do tónus da cauda e fraqueza ou paralisia dos membros anteriores e posteriores<sup>67</sup>. Para além disto, neste modelo, as fases da EAE são muito bem definidas. Na primeira fase, fase sub-clínica da EAE, os animais com cerca de 4 semanas não apresentam sintomas nem expressam marcadores de activação nas células T e não têm células T reguladoras. De seguida os murganhos perdem em 24h cerca de 0,5 a 2 g do seu peso total; esta fase ocorre por volta do dia 49 a 56 após o seu nascimento e os animais ainda não apresentam sintomas da doença. Esta fase é designada fase pré-clínica. Dois ou três dias depois desta perda abrupta de peso começam a aparecer os primeiros sintomas de EAE que se irão agravar durante as duas ou três semanas seguintes, período este designado por fase aguda. A EAE é graduada em níveis, podendo os sintomas adquiridos num nível passar para o nível seguinte: nível 1, que corresponde à perda do tónus da cauda; nível 2, fraqueza dos membros posteriores; nível 3, paralisia dos membros posteriores; nível 4, fraqueza dos membros anteriores; nível 5, paralisia dos membros anteriores/morte. Na fase crónica os sintomas de EAE estabilizam-se e, em animais Tg/Tg, 1/3 dos murganhos morrerão

devido ao estado crónico severo da doença (nível 5) e 2/3 sobreviverão com perda do tónus da cauda e fraqueza dos membros (nível 1 e 2), permanecendo assim num estado crónico moderado (Tadokoro, C.E., comunicação pessoal). Na fase pré-clínica e durante a fase aguda as células T reguladoras começam a aparecer em diferentes órgãos, incluindo a espinal medula não havendo diferença na percentagem de células entre animais que morrem e animais que sobrevivem à doença. Uma vez que a acumulação de células T reguladoras ocorre tardiamente podemos inferir que estas células não são capazes de controlar a doença depois de ela se ter iniciado e/ou que a lesão tecidual não é reversível. Por outro lado, é possível que as células Th17 tenham um papel importante na doença uma vez que a sua percentagem difere entre animais que morrem devido à doença e animais que sobrevivem à doença (Tadokoro, C.E., comunicação pessoal). No entanto, o facto de não existirem diferenças no número de células T reguladoras não significa que elas não tenham um papel fundamental na geração de células Th17.

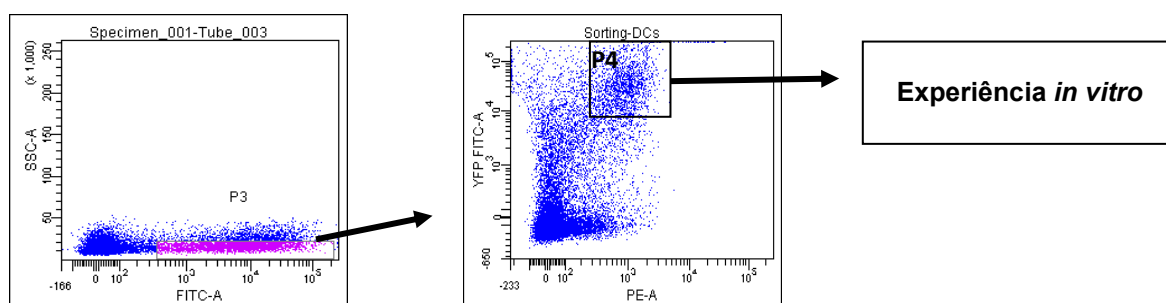
### Dados Suplementares



**Figura Suplementar 1 - Separação de células T reguladoras** – no esquema está representada a população de células T reguladoras, CD4<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>, separada no FACSaria para a experiência *in vitro*



**Figura Suplementar 3 - Separação de células T efectoras**— no esquema está representada a população de células T efectoras, CD4<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> separada no FACSaria para a experiência *in vitro* e a análise de células Th1 e Th17 presentes nas respectivas cultuas



**Figura Suplementar 2 – Separação de células dendríticas** – no esquema está representada a população de células dendríticas, CD11c<sup>+</sup>YFP<sup>+</sup> separada no FACSaria para a experiência *in vitro*.