

Mariana Dias Batista

Avaliação de aspectos inatos e adaptativos do sistema imune na psoríase: análise fenotípica e funcional de células *natural killer* e células T

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho

Coorientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Batista, Mariana Dias

Avaliação de aspectos inatos e adaptativos do sistema imune na psoríase: análise fenotípica e funcional de células *natural killer* e células T / Mariana Dias Batista-- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Coorientador: Esper Georges Kallas.

Descritores: 1.Psoríase 2.Imunidade inata 3.Células *natural-killer* 4.Antígenos CD57 5.Imunidade adaptativa 6.Citocinas 7.NKG2A

USP/FM/DBD-348/12

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Maria do Carmo e Nildo,
pelo incentivo da vida toda, com amor e
gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, por terem consentido em participar deste trabalho de forma altruísta, por acreditarem que pesquisas na área da psoríase poderão contribuir na melhora da qualidade de vida das pessoas afetadas.

Ao Prof. Dr. Esper Kallás, por todas as oportunidades oferecidas, por acreditar no meu trabalho, por me fazer enxergar a possibilidade de ingresso no universo da pesquisa e, mais que tudo, pelo acolhimento e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, pelas boas palavras de orientação, pelo aprendizado, e pela oportunidade de desenvolver meu projeto junto ao programa de Alergia e Imunopatologia, com admiração.

Ao Prof. Dr. Douglas Nixon, pelo enorme aprendizado no período em que estive em seu laboratório, pela possibilidade de desenvolver projeto relacionado à dermatologia mesmo que esse não fosse o foco do laboratório, por dividir comigo seu entusiasmo com a ciência e a pesquisa.

À Prof. Dra. Emily Ho, por ter me ensinado técnicas laboratoriais necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jeffrey Milush, pelas discussões, interpretações de resultados e planejamento de experimentos.

À Prof. Dra. Emily Eriksson e à Vanessa York, pela experiência e trabalho conjunto.

À Dra. Camilla Tincati, pela assistência e colaboração nos experimentos funcionais.

À Prof. Dra. Karina Carvalho, pelo auxílio na interpretação dos resultados e pela leitura crítica da metodologia.

Aos colegas da Dermatologia da UCSF, Drs. Patrick Unemori, Wilson Liao, Kieron Leslie e Toby Maurer, pela colaboração e pelo recrutamento dos pacientes.

Aos membros da minha banca de qualificação, pelas sugestões valiosas no aprimoramento do trabalho.

Aos colegas do LIM-60, pelas sugestões referentes à interpretação dos resultados e pelas discussões produtivas.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Alergia e Imunopatologia, pelas discussões produtivas nas reuniões.

À Ana Luiza Dias Batista, pelo auxílio na elaboração e edição das figuras.

Ao Thiago e à Alice.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e histo-patológicos	1
1.2 Fatores Genéticos	2
1.3 Sistema Imune e psoríase	3
1.3.1 Imunidade Inata	3
1.3.1.1 Queratinócitos, células dendríticas plasmocitóides, células NKT	3
1.3.1.2 Células <i>natural killer</i> (NK)	5
1.3.1.2.1 Desenvolvimento, diferenciação e aspectos funcionais de células NK	5
1.3.1.2.2 Células NK na psoríase	8
1.3.2 Imunidade Adaptativa	9
1.3.2.1 Células dendríticas mielóides e apresentação de antígeno	9
1.3.2.2 Células T residentes no tecido	10
1.3.2.3 Células T CD4+: Th-1 e Th-17	11
1.3.2.4 Células T CD8+: Tc-1 e Tc-17	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Casuística	17
3.2 Processamento de amostras de pele	18
3.3 Processamento de amostras de sangue	20
3.4 Citometria de Fluxo	20
3.5 <i>Sorting</i> de células T CD4+ e CD8+	22
3.6 Cultura de células T	23
3.7 Ensaio de multiplex	23
3.8 Análise estatística	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Manuscrito de artigo científico sobre células NK	25
4.1.1 Folha de rosto	25
4.1.2 Abstract	26
4.1.3 Introduction	27
4.1.4 Methods	30
4.1.5 Results	32
4.1.6 Discussion	40
4.1.7 References	43
4.2 Manuscrito de artigo científico sobre células T	47
4.2.1 Folha de Rosto	47
4.2.2 Abstract	48

4.2.3	Introduction	49
4.2.4	Methods	50
4.2.5	Results	54
4.2.6	Discussion	60
4.2.7	References	63
5	DISCUSSÃO	67
5.1	Casuística	67
5.2	Fenótipo de células NK	67
5.3	Fenótipo de células T CD8+	70
5.4	Ensaio funcionais de células T	71
6	CONCLUSÕES	73
7	ANEXOS	74
	Anexo A Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa UCSF	74
	Anexo B Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa FMUSP	75
	Anexo C Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
	Anexo D Comprovação de submissão ao periódico Experimental Dermatology	81
	Anexo E Comprovação de submissão ao periódico PLoS One	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL	<i>C-chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLA	<i>cutaneous lymphocyte-associated antigen</i>
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
CMKLR	<i>chemokine-like receptor</i>
CMV	citomegalovírus
CXCL	<i>CX-chemokine ligand</i>
CXCR	<i>CX-chemokine receptor</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IFN	interferon
IL	interleucina
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin receptor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKT	<i>natural killer T</i>
PBS	tampão fosfato
PMA	acetato de forbol miristato
SPE	exotoxina do <i>Streptococcus pyogenes</i>
SEB	enterotoxina estafilocócica B
T _c	células T citotóxicas
TCR	receptor de células T
Th	células T helper
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Mecanismos patogénéticos na psoríase _____	15
Figura 3.1 – Determinação de tempo de cultura de células isoladas da pele _____	19
Figura 3.2 – Estratégia de <i>gating</i> para citometria de fluxo _____	22

Manuscrito 4.1

Figure 1 - Características fenotípicas de células NK CD56+CD16+ na psoríase _____	34
Figure 2 – Co-expressão de CD57, NKG2A e NKG2C em células NK CD56+CD16+ _____	35
Supplemental figure 1 – Comparação de células NK CD56+CD16+ entre subtipos de psoríase _____	36
Figure 3 – Características fenotípicas de células NK CD56+CD16- na psoríase _____	38
Supplemental figure 2- Comparação de células NK CD56+CD16- entre subtipos de psoríase _____	39

Manuscrito 4.2

Supplemental Figure 1- Estratégia de <i>gating</i> , amostra de pele lesional _____	53
Figure 1- Distribuição de células T na pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase _____	55
Figure 2 – Expressão de CD57 em células T na psoríase _____	56
Figure 3 – Produção de citocinas por células T CD4+ de pacientes com psoríase isoladas por <i>cell-sorting</i> _____	58
Figure 4 - Produção de citocinas por células T CD8+ de pacientes com psoríase isoladas por <i>cell-sorting</i> _____	58
Figure 5 – Correlação de níveis de IL-22 com outras citocinas _____	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Características amostrais e demográficas dos pacientes _____	17
Tabela 3.2 – Características amostrais e demográficas dos controles _____	18
Tabela 3.3 – Anticorpos utilizados para citometria de fluxo _____	21
Tabela 3.4- Anticorpos utilizados para sorting celular _____	23

RESUMO

Batista MD. *Avaliação de aspectos inatos e adaptativos do sistema imune na psoríase: análise fenotípica e funcional de células natural killer e células T* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: A psoríase é doença inflamatória hiperproliferativa da pele, na qual mecanismos imunológicos são cruciais para o processo patogênico. O marcador CD57 denota inabilidade de replicação e imuno-senescência de células T CD8+, e sua expressão foi demonstrada em diversas condições inflamatórias. CD57 também pode ser expresso por células *natural killer* (NK), nas quais é considerado marcador de maturidade, por ser em geral adquirido pelas formas mais diferenciadas CD56+CD16+. A expressão de CD57 e outros receptores de células NK não foi amplamente investigada na psoríase. **OBJETIVOS:** Este estudo buscou examinar o fenótipo de células NK em biópsias de pele e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com psoríase em relação a controles sadios. Este estudo investigou também o fenótipo e características funcionais de células T isoladas da pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase. **MÉTODOS:** Foram isoladas células NK dos subtipos CD56+CD16- e CD56+CD16+ de pele lesional, não afetada e CMSP de pacientes com psoríase, comparadas com pele normal e CMSP de controles sadios. A expressão de CD57, NKG2A e NKG2C foi determinada nesses subtipos de células por citometria de fluxo. Células T CD4+ e CD8+ foram isoladas da pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase, e a expressão de CD57 foi avaliada. Características funcionais de células T foram estudadas através da análise da secreção de diversas citocinas inflamatórias (IL-17A, IFN- γ , IL-2, IL-33, TNF- α , IL-21, IL-22 and IL-27) produzidas por células T CD4+ e CD8+ isoladas por *sorting* celular, a partir de amostras de pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase. **RESULTADOS:** Células NK isoladas das lesões de psoríase apresentaram um fenótipo particular, caracterizado por baixa expressão de CD57 e alta expressão de NKG2A na pele lesional e não afetada em relação aos controles. Em relação às células T, encontrou-se frequência de células T CD4+CD57+ e CD8+CD57+ significativamente maior na pele não afetada em relação à pele lesional de pacientes com psoríase. Células T CD4+ isoladas por *sorting* celular a partir de amostras de pele lesional produziram níveis maiores de IL-17A, IL-22 e IFN- γ em relação às amostras de pele não afetada. Células T CD8+ isoladas da pele lesional secretaram maiores níveis de IL-17A, IFN- γ , TNF- α e IL-2 em relação à pele não afetada. **CONCLUSÕES:** Esses dados sugerem que células NK presentes nas lesões de psoríase apresentam fenótipo imaturo, que foi previamente associado a maiores capacidades funcionais, e poderiam ser implicadas na patogênese da psoríase. Em relação às células T, as características fenotípicas sugerem menor sobrevivência de células com baixa capacidade replicativa na pele lesional, pelo ambiente inflamatório local ou pelo alto *turnover* celular da psoríase.

Descritores: psoríase, imunidade inata, células *natural-killer*, antígenos CD57, imunidade adaptativa, citocinas, NKG2A

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

