UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUILHERME ANTONIO DUTRA MORAIS

CÉLULAS T CD4^{+} ENCEFALITOGÊNICAS CONSTROEM UM PERFIL CITOTÓXICO DURANTE A EVOLUÇÃO DA ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE E TORNAM-SE CD8αβ^{+}

ENCEPHALITOGENIC T CD4^{+} CELLS BUILD A CYTOTOXIC PROFILE DURING THE EVOLUTION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS AND BECOME CD8αβ^{+}

CAMPINAS

2015

GUILHERME ANTONIO DUTRA MORAIS

CÉLULAS T CD4$^+$ ENCEFALITOGÊNICAS CONSTROEM UM PERFIL CITOTÓXICO DURANTE A EVOLUÇÃO DA ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE E TORNAM-SE CD8αβ$^+$

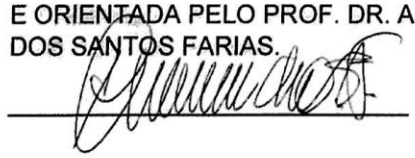
ENCEPHALITOGENIC T CD4$^+$ CELLS BUILD A CYTOTOXIC PROFILE DURING THE EVOLUTION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS AND BECOME CD8αβ$^+$

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Imunologia

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Genetics and Molecular Biology in the area of Immunology

ORIENTADOR: ALESSANDRO DOS SANTOS FARIAS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO GUILHERME ANTONIO DUTRA MORAIS E ORIENTADA PELO PROF. DR. ALESSANDRO DOS SANTOS FARIAS.



CAMPINAS

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/10637-6

Ficha catalográfica

Universidade Estadual de Campinas

Biblioteca do Instituto de Biologia

Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M792c

Morais, Guilherme Antonio Dutra, 1990-
Células T CD4$^+$ encefalitogênicas constroem um perfil citotóxico durante a evolução da encefalomielite experimental autoimune e tornam-se CD8αβ$^+$ / Guilherme Antonio Dutra Morais. – Campinas, SP: [s.n.], 2015.

Orientador: Alessandro dos Santos Farias.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Encefalomielite autoimune experimental. 2. Esclerose múltipla. 3. Linfócitos T CD4-positivos. I. Farias, Alessandro dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Encephalitogenic T CD4$^+$ cells build a cytotoxic profile during the evolution of experimental autoimmune encephalomyelitis and become CD8αβ$^+$
Palavras-chave em Inglês:

Encephalomyelitis, Autoimmune, Experimental
Multiple sclerosis
CD4-positive T-Lymphocytes
Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular **Banca examinadora:**
Alessandro dos Santos Farias [Orientador]
Mariana Lazarini
Rodolfo Thomé
Data da defesa: 27-08-2015

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, **27** de **agosto** de **2015**

BANCA EXAMINADORA

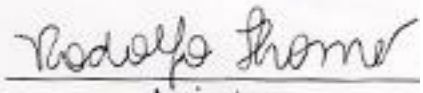
Dr. Alessandro Dos Santos Farias (orientador)

Assinatura

Dra. Mariana Lazarini

Assinatura

Dr. Rodolfo Thomé



Assinatura

Dr. Marcelo Bispo De Jesus

Assinatura

Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Vânia e Paulo, e ao meu irmão, Paulo, por todo o apoio que sempre me deram. Sem eles, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus pais e meu irmão, Vânia, Paulo e Paulo, que foram os grandes responsáveis pela minha educação e por todo o suporte que eu tive. Por este motivo, compartilho com eles todas as minhas conquistas.

Aos membros da minha família: tios, tias, primos, primas, avôs e avós. Mesmo os que eu tive menos contato foram muito importantes para mim. Aos que tive mais contato, obrigado por me acolherem sempre que precisei. Gostaria de agradecer principalmente às minhas tias Inês Gurian, Maria Silva, Maura Ferraz, Silvania Machado, Sirlei Machado, Tânia Silva, Vanete Santana, Vanda Santana; aos meus tios Antônio Silva, Valdemir Santana e Wagner Santana; aos meus primos Marcus Hüsemann e Rodolfo Santana; e às minhas primas Débora Hüsemann e Mariana Santana. Por fim, à esposa do meu irmão, Paula Campano, e toda sua família pelo carinho que nos dedicam.

Aos amigos que mantive desde antes da faculdade. Obrigado pela amizade duradoura de vocês, Fernanda Lima, Marcela Mariani, Marina Rocha e Patrícia Onishi.

Aos amigos que fiz durante o curso de biologia, por todos estes anos compartilhados de conquistas e emoções e aos amigos do curso de engenharia de controle e automação, por todos os anos até o momento e pelos próximos que ainda virão. Agradeço principalmente à minha amiga Bianca Castelucci, que participou da maioria dos momentos mais importantes da minha vida até agora e cuja amizade é inestimável para mim. Um grande agradecimento aos meus amigos André Savino, Caique Sá, Renato Oliveira, Carlos Millani, Marcelo Rodrigues, Fernanda Leite, Fernanda Luz, Guilherme Leite, Júlio Simões, Junia Yasmin, Marco Pagliusi, Letícia Gonçalves, Mateus Souza, Mariana Fernandes, Natália Miyaguti, Nathalia Bertazzi, Marcio Hirata, Pedro Contieri, Rafael, Gustavo Romano, Roney dos Santos, Ana Mioti, Thais Abib, Vivien Cielusinski, Yago Lima. Mesmo que atualmente eu tenha pouco contato, saibam que vocês são/foram muito importantes para mim.

Às turmas de japonês e roda alemã, onde conheci pessoas incríveis. Obrigado Alessandra Macedo, Ayako Akamine, Bruno Rosa, Danilo Grael, Danilo Morales, Danilo

Spinola, Domingos Leite, Emiko Suzuki, Kaian Ciasca, Marcio Kubota, Plínio Oliveira, Priscila Matsushita e Vitor Castro. Obrigado também aos amigos que tive muita sorte em conhecer nas situações mais inesperadas, Jéssica Ferreira, Lilian Spiandorelli e Leon Spiandorelli.

Ao meu orientador, Dr. Alessandro Farias, pela sua paciência e por todo o suporte que me ofereceu para que eu pudesse desenvolver este trabalho e à Profª. Dra. Leonilda M. B. Santos, por gentilmente me acolher no laboratório. Agradeço também à Dra. Mariana Lazarini e à Dra. Juliana Leite pelos importantes conselhos para que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos meus colegas de laboratório, que me ajudam ou ajudaram direta ou indiretamente: Adriel Moraes, Alexandre Borin, Alliny Dionete, Ana Leda Longhini, Bruna Campos, Camila Vaz, Carolina Francelin, Daniela Camilo, Denise Tsukada, Elaine Oliveira, Evelise Fonseca, Fernanda Moret, Fernando Pradella, Gabriela Spagnol, Gisele Tomassoni, Gleici Branco, Ingrid Maia, Ingrid Rosa, Irene Santos, Jéssica Funari, João Guarnieri, Lidiane Campos, Marcos César, Mariana Santos, Paula Russini, Rosemeire Florença, Tábata Rodrigues, Vinícius Boldrini, Walkyria Volpini. Também aos colegas de corredor, Aline Vieira, Erica Sernaglia, Renan Corrêa e José Fachi, por sempre estarem por perto para as conversas mais emocionantes e pelo auxílio prestado por Rodolfo Thomé, Rosaria di Gangi e Thiago da Costa.

Às colegas de laboratório que considero parte da minha família, Gleidy Silva, Marilia de Andrade, Michelle Parise. Muito obrigado por todo o suporte emocional e por todos os momentos que passamos juntos, seja no laboratório ou fora dele.

Faltaram tantas pessoas para agradecer e com certeza deixei escapar diversos nomes. Mas se você passou pelo menos um breve momento da sua vida comigo, saiba que ajudou a moldar quem eu sou hoje. Portanto, muito obrigado a todas as pessoas que fizeram ou fazem parte da minha vida mas que não foram citadas aqui.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Fapesp, processo nº2013/10637-6, pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

RESUMO

A Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE) é um modelo animal amplamente aceito para a Esclerose Múltipla (EM) e tem sido usado para estudar a patofisiologia da doença. A EAE foi inicialmente considerada uma patologia mediada por células Th1. Respostas imunes desenvolvidas após a imunização com antígenos de mielina para a indução da EAE revelaram uma predominância de células produtoras de IFNγ no SNC de animais doentes. Entretanto, camundongos deficientes para IFNγ não apresentaram resistência, mas sim maior susceptibilidade à EAE. Isto colocou em dúvida o papel do IFNγ e, consequentemente, o papel das células Th1 na patogênese da EAE.

Como alternativa à resposta do subtipo Th1 foi proposta a resposta Th17. Após a sua descoberta, foi mostrado que esta possuía um importante papel na EAE e outras patologias autoimunes. Hoje é aceito que células Th1 e Th17 apresentam um papel sinérgico durante o desenvolvimento da EAE. Interessantemente, parece que as células Th17 apresentam plasticidade durante a evolução da EAE. Foi mostrado que células Th17 autoagressivas reduzem a expressão de IL-17 quando chegam no SNC e passam a expressar IFNγ. Desta forma é possível que na patologia da EAE IL-17 e IFNγ sejam, ao menos em parte, produzidos pela mesma fonte. Isso mostra que mesmo células terminalmente diferenciadas podem sofrer transdiferenciação para outros subtipos.

Apesar de ambos os subtipos de linfócitos, Th1 e Th17, apresentarem atividade próinflamatória, não está completamente claro como estas células, classicamente consideradas auxiliaries, seriam capazes de iniciar a doença quando adotivamente transferidas para animais saudáveis. Neste trabalho foi mostrado que células T $CD4^+$ podem expressar moléculas associadas à citotoxicidade. Foi observado que fatores de transcrição (Runx3 e Eomes) estão envolvidos na produção de IFNγ em células Th1 e de Granzimas e Perforinas em linfócitos T $CD8^+$. Possivelmente estes fatores seriam capazes de direcionar as células T $CD4^+$ para um perfil citotóxico capaz de mediar o dano inicial observado na EAE.

Linfócitos T $CD4^+$ produtores de IFNγ encontrados no SNC apresentaram elevada expressão de IL-17 e de fatores de transcrição associados ao perfil Th17. Esta expressão foi maior que a dos linfócitos T $CD4^+$ produtores apenas de IL-17. Ainda, estes linfócitos apresentavam produção de granzima B. Surpreendentemente, além desta alteração de

perfil Th1-Th17, nós descobrimos que alguns linfócitos T CD4$^+$ podem sofrer transdiferenciação e passar a expressar CD8α e CD8β, tornando-se células duplo-positivas. Fatores de transcrição importantes para a maturação de linfócitos no timo, Runx3 e ThPok, responsáveis respectivamente pela diferenciação em subtipos CD8$^+$ e CD4$^+$, possivelmente estão envolvidos neste mecanismo. Observamos um aumento da expressão de Runx3 nestes linfócitos T CD4$^+$ que passaram a expressar CD8, o que não é típico em linfócitos maduros. Enquanto isso, a expressão de ThPok manteve-se relativamente constante.

Não foi mostrado como as células T CD4$^+$ encefalitogênicas pioneiras exercem sua função efetora. Além disso, a capacidade citotóxica destas células ainda precisa ser avaliada. Apesar disso, este trabalho contribuiu com a elucidação dos mecanismos da doença e este subtipo de célula pode ser promissor para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da EM.

Palavras-chave: Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), Esclerose múltipla, Linfócitos TCD4$^+$ encefalitogênicos.

ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a widely accepted animal model of Multiple Sclerosis (MS) and has been used to study the pathophysiology of the disease. EAE was first considered a Th1 cell mediated pathology. Immune responses developed after immunization with myelin antigens for EAE induction revealed IFNγ-producing cells domination in the CNS of animals with the disease. However, IFNγ-deficient mice were not resistant, but were instead more susceptible to EAE. It has put under doubts the role of IFNγ and, consequently, the role of Th1 cells on the EAE pathogenesis. As an alternative for Th1 subset it was proposed the Th17 subset. After its discovery, Th17 subset has been shown to perform an important role during EAE and other autoimmune pathologies. Today it is accepted that Th1 and Th17 cells present a synergic role during EAE development. Interestingly, it seems that Th17 cells present plasticity during the course of EAE. It was shown that autoagressive Th17 cells shut down the IL-17 expression when reach the CNS and start to produce IFNγ. Therefore, it is possible that in the EAE pathology, both IL-17 and IFNγ are, at least in part, produced by the same source.

Despite both Th1 and Th17 subtypes present proinflammatory activity, it is not completely clear how these cells, classically regarded as a helper, would be able to initiate the disease when adoptively transferred to health animals. In this work we've shown that T $CD4^+$ cells can express cytotoxic associated molecules. It was observed that transcription factors (Runx3 and Eomes) are involved on IFNγ production in Th1 cells and Granzyme and Perforin in $CD8^+$ T lymphocytes. Maybe these factors can drive a cytotoxic profile that could account for the initial damage mediated by $CD4^+$ cells.

T $CD4^+$ IFNγ producing lymphocytes found in the CNS upregulated IL-17 and transcription factors associated with the Th17 subset. This expression was higher than solely IL-17 producing cells. Moreover, these lymphocytes presented Granzyme B production. Surprisingly, we found that some $CD4^+$ T lymphocytes can undergo a differentiation and start to express CD8α and CD8β molecules, becoming a double positive cell. Transcription factors associated with lymphocytes intrathymic maturation, Runx3 and ThPok, respectively responsible for transdifferentiation in $CD8^+$ and $CD4^+$ subtypes, are possibly involved in this mechanism. We observed an upregulation of

Runx3 expression in T CD4 lymphocytes that started to produce CD8, what isn't typical in mature lymphocytes.

It was not shown how the pioneer $CD4^+$ encephalitogenic T cells would exert its effector function. Moreover, the direct cytotoxic ability of these cells remain to be evaluated. Despite this, this work contributed to the elucidation of the disease mechanisms and this subset of cells can be promising to account for future therapies to treat MS.

Keywords: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Multiple Sclerosis, Encephalitogenic TCD4$^+$ lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Perfil de expressão de mRNA de moléculas pró-inflamatórias e citotóxicas em linfócitos T CD4$^+$.

Figura 2 – Perfil da produção de proteínas pró-inflamatórias e citotóxicas em linfócitos T CD4$^+$.

Figura 3 – Análise da produção de proteínas pró-inflamatórias e citotóxicas por linfócitos encefalitogênicos.

Figura 4 – Perfil pró-inflamatório e citotóxico dos subtipos de linfócitos produtores de IFNγ e IL-17.

Figura 5 – Presença de linfócitos duplo-positivos no SNC.

Figura 6 – Perfil dos linfócitos duplo positivos infiltrados no SNC no pico da doença analisado por citometria de fluxo.

Figura 7 – Identificação da origem dos linfócitos duplo-positivos.

Figura 8 – Diferenciação de linfócitos T CD4$^+$ em linfócitos duplo-positivos.

Figura 9 – Balanço da expressão de ThPok e Runx3 durante a evolução da EAE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EM – Esclerose Múltipla

EAE – Encefalomielite Experimental Autoimune

BHE – Barreira Hemato-Encefálica

SNC – Sistema Nervoso Central

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MOG – Glicoproteina da Mielina de Oligodendrócitos

TCR – Receptor de Antígenos de Linfócitos T

Th – Linfócitos T *Helper*

IFN – Interferon

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral α

TGF-β – Fator Transformador de Crescimento

CIS – Síndrome Clínica Isolada

RRMS – Esclerose Múltipla - Surto e Remissão

PPMS – Esclerose Múltipla Primária Progressiva

SPMS – Esclerose Múltipla Secundária Progressiva

T-bet – Fator de transcrição T-box TBX21

STAT-4 – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 4

ROR – Receptor Órfão Relacionado a RAR

FoxP3 – *Forkhead box* P3

EOMES – Eomesodermina

Runx – Fator de Transcrição Relacionado a Runt

Zbtb7b (ThPok) – Domínio *Zinc Finger* e BTB contendo 7B

LAMP – Proteina associada à membrana lisossomal

Gzm – Granzima

Prf – Perforina

MBP – Proteína Básica da Mielina

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....16
2.OBJETIVOS 26
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....26
3.1.Animais.....26
3.2.Neuro-antígenos 26
3.3.Indução de EAE.....26
3.4.Separação de linfócitos do SNC 27
3.5.Anticorpos.....27
3.6.Primers 28
3.7.Citometria de Fluxo e Cell Sorter 29
3.8.PCR quantitativo em tempo real 29
3.9.Injeção intratímica de isotiocianato de flurosceína (FITC).....29
3.10.Transferência de células in vivo 30
3.11.Análise Estatistica.....30
4.RESULTADOS 31
4.1.Avaliação da expressão de moléculas citotóxicas e inflamatórias nos linfócitos T CD4+ 31
4.2.Avaliação da especificidade dos linfócitos T CD4+ com atividade citotóxica. 34
4.4.Presença de linfócitos CD4+CD8+ no SNC na EAE 38
4.5.Balanço da expressão de ThPOK e RUNX3 nos linfócitos T CD4+ e Duplo-positivos durante a evolução clínica da EAE.....46
5.DISCUSSÃO.....48
6.REFERÊNCIAS 51
7.APÊNDICE 59
8.ANEXOS.....72

1.INTRODUÇÃO

Descrita por Jean-Martin Charcot em 1868, a Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC). Desconsiderando traumas, a EM é a principal causa de deficiência neurológica entre adultos jovens, cerca de duas vezes mais comum em mulheres, afetando cerca de 2,5 milhões de pessoas mundialmente. A distribuição geográfica da prevalência da EM é desigual. A doença apresenta maior prevalência na América do norte e norte da Europa (60 a 200/100.000) comparado com África, Ásia e América do Sul (6-20/100.000). É importante ressaltar que nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos não existem estudos robustos sobre a prevalência (HAFLER et al., 2005; HAUSER; OKSENBERG, 2006; COMPSTON; COLES, 2002; NYLANDER; HAFLER, 2012). Desta forma, os dados referentes a esses países podem estar subestimados.

A EM é caracterizada pela intensa resposta inflamatória no SNC podendo culminar com a desmielinização axonal, e com a perda de oligodendrócitos e neurônios (NYLANDER; HAFLER, 2012). Conforme a doença progride, ela começa a superar a plasticidade do SNC, levando a um aumento progressivo do grau de incapacidade do paciente, como perda de funções motoras, autonômicas e neurocognitivas. Tradicionalmente a EM foi considerada uma doença da substância branca. No entanto, recentemente demonstrou-se, ainda nos estágios iniciais da doença, a presença de lesões inflamatórias na substância cinzenta (NYLANDER; HAFLER, 2012). O primeiro episódio de deficiência neurológica (surto) é denominado síndrome clínica isolada (CIS). Na maioria das vezes (85%) a CIS é seguida por um curso de surtos e remissões (RRMS). Aproximadamente após 10 anos do primeiro episódio os pacientes com a forma RRMS evoluem para uma forma progressiva, denominada progressiva secundária (SPMS). Uma pequena porcentagem dos pacientes (10%) evoluem para uma forma progressiva da doença, denominada primária progressiva (PPMS). Interessantemente essa forma é mais comum em homens (VONGLEHN et al., 2014).

O tratamento da EM é baseado principalmente no controle da atividade inflamatória da doença. Os surtos clínicos são geralmente controlados com o uso de corticoides. As primeiras terapias modificadoras de doença aprovadas pelo FDA foram

os imunomoduladores Interferon β recombinante (1993) e acetato de glatiramer (1996). De maneira geral essas drogas favorecem a resposta anti-inflamatória, desta forma inibindo os efeitos maléficos da resposta pró-inflamatória. Essas drogas são a primeira linha de tratamento na maioria dos países (KIESEIER et al., 2008; LUBLIN, 2005). No entanto, a literatura mostra que essas terapias são benéficas apenas para um terço dos pacientes (BELL et al., 2007). No caso de evolução rápida do déficit neurológico ou de falha terapêutica com drogas imunomoduladoras, os pacientes podem ser tratados com drogas imunosupressivas como Ciclofosfamida, Mitoxantrona e Cladribina. Na última década foram desenvolvidos novos tratamentos baseados nos mecanismos de ação da resposta autoagressiva (KIESEIR et al., 2008; VONGLEHN et al., 2014). Em 2006 o anticorpo monoclonal Natalizumab foi lançado no mercado após sua aprovação pelo FDA. Natalizumab é um anticorpo anti-VLA4 (integrina α4β1), que está expressa na superfície dos linfócitos. A ligação do anticorpo nessa integrina impede sua ligação em seus receptores (VCAM-1 e CAM-1) e consequentemente inibe a transmigração dessas células pela barreira hemato-encefálica (NIINO et al., 2006). Em 2010, foi lançada a primeira droga de administração oral, denomida Fingolimod (FTY720). O fingolimod é um modulador do receptor de esfingosina-1 fosfato (S1P1). Desta forma, a ligação do Fingolimod ao receptor impede a ligação da esfingosina-1 fosfato (S1P) no receptor. A ligação da esfingosina-1 fosfato no seu receptor é fundamental para o egresso de linfócitos dos órgão linfóides secundários (JEROLD CHUN, 2010). Assim, a droga impede a saída de linfócitos autoagresivos nesses órgãos, diminuindo a resposta inflamatória no SNC. Recentemente a Teriflunomida e o Dimetil fumarato foram aprovados para o tratamento da EM. No entanto o benefício desses tratamentos a longo prazo ainda não está claro. Apesar do considerável arsenal para o tratamento da EM o benefício clínico desses medicamentos ainda é limitado.

Muito do que se conhece a respeito dos mecanismos imunológicos da EM advém de estudos realizados no modelo experimental, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). A EAE foi descrita por RIVERS, SPRUNT e BERRY em 1933 (RIVERS; SPRUNT; BERRY, 1933). Esses pesquisadores tinham como objetivo principal estudar casos de encefalite pós vacinal que eram descrita em alguns indivíduos que recebiam a vacina antirábica, feita por Pasteur. A vacina era preparada a partir da medula

espinhal de coelhos infectados. Desta forma, esses pesquisadores repetiram os procedimentos realizados por Pasteur na elaboração da vacina, no entanto incluíram um grupo controle onde o preparado era realizado a partir de animais não infectados. Surpreendentemente eles observaram que os animais que recebiam apenas o preparado controle também podiam desenvolver paralisia. A análise histopatológica do SNC desses animais demonstrou presença de infiltrados perivasculares de células mononucleares e de anticorpos específicos para moléculas presentes no cérebro. Nos anos subsequentes o modelo foi repetido em diversas espécies de animais de experimentação através da imunização com componentes da mielina, como a proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteina (PLP), glicoproteina associada à mielina (MAG), glicoproteina de mielina do oligodendrócito (MOG) e peptídeos encefalitogênicos derivados desses antígenos. Este tipo de imunização recebe o nome de imunização ativa (BAXTER, 2007). A EAE é extensamente utilizada como modelo da EM pelo fato de compartilhar muitas características clínicas e histopatológicas com a doença humana. Dentre elas: a destruição da bainha de mielina, comprometendo pouco as demais estruturas; a presença de múltiplas lesões no SNC; a localização perivascular das lesões; a maturação temporal das lesões; e a presença de imunoglobulinas no SNC e no fluido cerebrospinal (BAXTER, 2007; STEINMAN; ZAMVIL, 2006).

Foi a partir dos conhecimentos desenvolvidos na EAE que diversas das terapias clínicas já citadas foram desenvolvidas, dentre elas o tratamento com IFN-β, acetato de glatiramer (Copaxone), mitoxantrone, natalizumab e fingolimodes. Cada um destes tratamentos age em um mecanismo específico da doença, descoberto graças ao modelo experimental e semelhante ao mecanismo observado em pacientes.

Talvez a principal contribuição do modelo experimental para a doença humana foi o entendimento que a doença é mediada por linfócitos. Estudos iniciais buscando encontrar a principal célula do sistema imune associada à EAE elucidaram a importância dos linfócitos T $CD4^+$ para o início da doença (BEN-NUN; WEKERLE; COHEN, 1981; PATERSON, 1960). A transferência de linfócitos T CD4+ encefalitogênicos previamente sensibilizados aos componentes da mielina de um animal doente para um animal saudável é capaz de induzir a doença (BEN-NUN; WEKERLE; COHEN, 1981). Este tipo de imunização, chamada de adotiva, não obteve sucesso na maioria dos estudos que

tentaram inocular outros subtipos celulares, como por exemplo linfócitos T $CD8^+$ e linfócitos B, apesar de alguns grupos terem conseguido gerar a doença manipulando estas células previamente à transferência (KOH et al., 1992) (JIANG; ZHANG; PERNIS, 1992).

Os linfócitos T CD4+ apresentam função primordialmente auxiliar (*helper*), e orquestram a resposta imunológica adaptativa celular e humoral, assim como influenciam na resposta imune inata (ZHU, 2009). MOSMANN e COFFMAN (MOSMANN; COFFMAN, 1989), propuseram um modelo dicotômico de resposta dos linfócitos T $CD4^+$. Nesse modelo os linfócitos T $CD4^+$ são divididos em dois subtipos (Th1 ou Th2) de acordo com as citocinas que liberam. Os infócitos Th1 são produtores de IFNγ, IL-2 e linfotoxina-α (LT-α) e estão principalmente ligados à eliminação de patógenos intracelulares. A produção de IFNγ leva à ativação de macrófagos e à indução de troca de isotipo em linfócitos B para anticorpos fixadores de complemento (DARDALHON et al., 2008). Estão também fortemente envolvidos em respostas de hipersensibilidade tardia, o que favorece a ideia da sua importância na EAE (KORN et al., 2007b).

Linfócitos Th2 são produtores de IL-4, IL-5, IL13 e IL-25 e estão principalmente ligados à eliminação de infecções parasitárias, produção de IgE e inflamação eosinofílica (KORN et al., 2007b). A diferenciação em Th1 é inibida por IL-4, enquanto que a diferenciação em Th2 é inibida por IFNγ. Por este motivo, acredita-se que essas duas subpopulações ajam de maneiras opostas. Esta dicotomia também existe quando são levados em conta os fatores de transcrição associados a estes dois subtipos. Os linfócitos Th1 desenvolvem-se principalmente por ação do fator T-Bet, enquanto que os linfócitos Th2 desenvolvem-se por ação de GATA-3.

As observações de que os linfócitos Th1 tinham importante relevância para a patogenicidade da EAE e da EM vieram de diversos experimentos, que mostraram a importância deste subtipo de linfócito. A transferência adotiva de linfócitos Th1 previamente sensibilizados ao neuroantígeno induz a EAE em animais saudáveis (LIBLAU; SINGER; MCDEVITT, 1995), enquanto a administração de IFNγ aos pacientes de EM resultou em piora no quadro clínico (PANITCH et al., 1987). Citocinas pró-inflamatórias como IFNγ estão presentes nas lesões do SNC, bem como nas células que invadem o SNC, durante o pico da doença, mas diminuem durante a remissão. Além

disso, citocinas indutoras de IFNγ, como a IL-12, estão aumentadas na EM (BALASHOV et al., 1997; SEGAL; SHEVACH, 1996). Estudos com camundongos deficientes em fatores de transcrição como T-bet e STAT-4, importantes para a diferenciação de Th1, mostraram que eles são resistentes ao desenvolvimento da EAE (DARDALHON et al., 2008).

Este conjunto de fatos levou à ideia de que o principal subtipo de linfócito T $CD4^+$ envolvido na patogenicidade tanto da EAE quanto da EM tratava-se do subtipo Th1. Entretanto, dados contrastantes mostraram que animais geneticamente deficientes para IFNγ ou para o receptor de IFNγ desenvolviam EAE normalmente e, surpreendentemente, a redução da sinalização por IFNγ levou até mesmo a uma piora da doença (FERBER et al., 1996; HEREMANS et al., 1996; WILLENBORG et al., 1996). O mesmo foi observado para animais deficientes em subunidades da citocina IL-12, necessária para diferenciação e estabilização do fenótipo Th1 (DARDALHON et al., 2008; GRAN et al., 2002; ZHANG et al., 2003).

O fato de os linfócitos Th1 não serem essenciais para a doença, somado ao fato de que não foram observadas respostas Th2 exacerbadas nestes estudos, sugeriu a existencia de outro subtipo celular que poderia atuar na EAE. Foi descoberta então a IL-23, um membro da família da IL-12, que compartilha com esta uma de suas subunidades. A IL-12 é composta pelas subunidades p40 e p35, enquanto que a IL-23 é composta pelas subunidades p40 e p19. Esta citocina mostrou-se importante para a manutenção de linfócitos produtores de IL-17, que receberam o nome de Th17. A diferenciação dos linfócitos Th17 é regulada por uma complexa rede de citocinas. Enquanto o TGFβ promove a diferenciação de linfócitos T reguladores que apresentam a capacidade de inibir a resposta inflamatória, a presença de IL-6 produzida pela resposta imune inata no microambiente onde a resposta imune acontece somada ao efeito de TGFβ, promove a diferenciação das células Th17 (BETTELLI et al., 2008). As citocinas IL-6 e TGFβ induzem as células T naive a secretarem IL-21 (BETTELLI et al., 2006; YANG et al., 2008). Por sua vez, a IL-21 funciona de forma autócrina e aumenta o fator de transcrição da linhagem Th17, ROR γt, aumentando a expressão de IL-17 (KORN et al., 2007a). A IL-23 atua na expansão e manutenção da população dos linfócitos Th17 contribuindo para o aumento da gravidade da EAE (BETTELLI et al., 2006). Além da IL-

6 e TGFβ, outras citocinas incluindo a IL-1, IL-13, IL-18, IL-22, IL-23 e TNFα participam da diferenciação e expansão da Th17 (BETTELLI et al., 2008). Além disso, as citocinas secretadas pelas células Th17 possuem efeito inibidor nas subpopulações Th1 e Th2, bem como IFNγ e IL-4, produzidos respectivamente pelos linfócitos Th1 e Th2, inibem o perfil Th17. Rapidamente após sua descrição demonstrou-se que o subtipo Th17 estava relacionado à patogênese de diversas doenças autoimunes mediadas por células (VELDHOEN; SEDDON, 2010). Recentemente demonstrou-se que linfócitos Th17, sob estímulo apropriado, podem passar a expressar IFNγ. Na verdade, uma grande parte da população de células produtoras de IL-17 também produz IFNγ (HIROTA et al., 2011). Os linfócitos Th17 apresentam papel crítico para a proteção contra bactérias extracelulares e fungos, além de serem importantes mediadores da migração celular, principalmente de células mononucleares (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007).

Indícios de que estas células estavam envolvidas na EAE surgiram do fato de que animais deficientes para a subunidade p19 eram resistentes ao desenvolvimento da doença (CUA et al., 2003; KORN et al., 2007a; LANGRISH et al., 2005). Além disso, animais com deficiência de IL-17 desenvolvem uma EAE tardia e menos severa (KOMIYAMA et al., 2006), bem como o uso de anticorpos anti-IL-17 previnem o desenvolvimento da EAE (HOFSTETTER et al., 2005). A transferência de linfócitos Th17 autoagressivos também mostrou-se mais eficiente na geração da doença que a transferência de linfócitos Th1 (LANGRISH et al., 2005).

Hoje em dia está bem aceito que os dois subtipo de linfócitos T $CD4^+$, Th1 e Th17, participam de forma sinérgica na doença (O'CONNOR et al., 2008). Um modelo para o papel destas duas subpopulações é que a principal célula responsável pelo início da doença seja a subpopulação Th17, formando a primeira onda de células para o SNC. Uma vez infiltrada, ela recrutaria outras ondas de linfócitos efetores, incluindo linfócitos Th1 (KORN et al., 2007a; DARDALHON et al., 2008) Recentemente mostrou-se que os linfócitos produtores de Th17 após entrarem no SNC deixam de produzir IL-17 e passam a expressar IFNγ (HIROTA et al., 2011). Nesse contexto os linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos apresentariam os dois perfis (Th1 e Th17), porém em momentos distintos durante a evolução da doença.

A resposta pro-inflamatória da EAE e de outras patologias autoimunes pode ser controlada ou inibida pela ativação de linfócitos com atividade reguladora. Esses linfócitos T reguladores (Treg) são produtores de citocinas anti-inflamatórias, como TGFβ e IL-10, e estão possivelmente envolvidos com a remissão da doença. Em 2003, com a identificação do fator de transcrição forkhead box 3 (Foxp3), o estudo em células reguladoras teve um considerável avanço. Foxp3 é um fator de transcrição hélice/forkhead e pacientes com mutações no gene do Foxp3 desenvolvem doenças autoimunes muito cedo, que hoje são coletivamente chamadas de imuno-desregulação, caracterizada por disfunção imunológica e pela ausência de células Treg em humanos. A depleção de células $Foxp3^+$ causa uma desordem autoimune fatal. Esse fator de transcrição está associado ao desenvolvimento e função das T reguladoras. As Tregs constituem cerca de 5% das células T periféricas e são caracterizadas na maioria das vezes pela expressão de CD25 e Foxp3. São responsáveis por atenuar a resposta de outros linfócitos e podem ser importantes candidatas para cessar respostas imunes exacerbadas, ja que uma das citocinas produzidas por elas, o TGFβ, está envolvida com a redução da atividade de linfócitos Th1. A ausência de Tregs leva a exacerbação dos sinais clínicos da EAE e de outras doenças autoimunes. Por outro lado a transferência adotiva de células $CD4^+$ reguladoras, principalmente as que expressam Foxp3, apresenta um papel crucial no controle da resposta autoagressiva na EAE e em outras patologias autoimunes (FARIAS et al., 2011; 2013; PRADELLA et al., 2013).

Apesar do grande avanço no entendimento da participação dos linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos, ainda não está completamente claro como esses linfócitos com ação primordialmente auxiliar exerceriam função efetora no início da doença. Acredita-se que a desmielinização, se dê principalmente pela ação de fagócitos mononucleares, graças ao efeito direto ou indireto de citocinas como o IFNγ, linfotoxina β (LTβ), fator de necrose tumoral α (TNFα), além de enzimas proteolíticas, radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) (FARIAS et al., 2007; KHOURY; HANCOCK; WEINER, 1992; KUCHROO et al., 1993). Estudos *in vitro* demonstraram que o TNFα exerce atividade mielinotóxica e pode induzir apoptose em oligodendrócitos (JUREWICZ et al., 2005; SELMAJ et al., 1991).

Além do dano causado por fagócitos, outras células que contribuem para a quebra da barreira hemato-encefálica e dano à mielina e axônios são os linfócitos T CD8 e as células NK. Sua atividade ocorre principalmente por meio da liberação dos grânulos citotóxicos de Granzima e Perforina (FRIESE; FUGGER, 2009; MCFARLAND; MARTIN, 2007). Perforina é responsável pela formação de poros na membrana da célula-alvo, enquanto que a granzima entra na célula por meio destes poros e leva à apoptose por meio da ativação da via das caspases (LOPEZ et al., 2013). Assim, estas células chamadas citotóxicas podem mediar dano direto às células presentes no SNC.

Apesar de a Granzima ser mais comumente encontrada em linfócitos T $CD8^+$ e NK, também pode ser expressa em altas quantidades em linfócitos T $CD4^+$, que podem apresentar citotoxicidade independente de perforina (OZDEMIRLI et al., 1992). Além disso, essa expressão é importante para que estes linfócitos encefalitogênicos atravessem a BHE (KEBIR et al., 2007; QUI et al., 2011). Desta forma, a presença destas moléculas poderia indicar um mecanismo através do qual linfócitos T $CD4^+$ iniciariam o processo de desmielinização, já que eles são os principais responsáveis por induzir a doença.

Experimentos prévios realizados em 2006 no Max Planck Institute of Neurobiology, na Alemanha (dados não publicados), mostraram que dentre as moléculas mais expressas em linfócitos encefalitogênicos infiltrados no SNC, com relação à contraparte não encefalitogênica presente na periferia, figuravam as moléculas de Granzima B e de Perforina. Isto chama a atenção a possível atividade de linfócitos T $CD4^+$ citotóxicos e sua importância para o início do desenvolvimento da EAE. Estudos recentes têm cada vez mais mostrado a importância destes linfócitos T $CD4^+$ citotóxicos e, inclusive, associando sua atividade citotóxica aos perfis já descritos de linfócitos Th1 ou Th17. KEBIR e colaboradores descreveram essa capacidade citotóxica na EAE em células Th17. No entanto, a capacidade citotóxica de linfócitos T $CD4^+$ está bem descrita para linfócitos Th1 em tumores (ST ROSE et al., 2013). Além das moléculas citotóxicas já mencionadas duas moléculas coestimuladoras, CD134 e CD137, também estavam entre as mais expressas. A coestimulação por meio destas duas moléculas foi mostrada como capaz de induzir um perfil citotóxico em linfócitos T $CD4^+$, resultando na liberação de Granzima B (QUI et al., 2011).

Alguns estudos têm demonstrado que esses linfócitos T $CD4^+$ com atividade citotóxica podem apresentar também a expressão de CD8α (CHEROUTRE; HUSAIN, 2013; MUCIDA et al., 2013; REIS et al., 2013). Desta forma, essas células duplo positivas ($CD4^+CD8^+$) apresentariam características tanto de linfócitos auxiliares como de citotóxicos. A presença de linfócitos duplo positivos circulantes não é comum em situações de homeostase. No entanto, algumas patologias inflamatórias podem apresentar liberação de timócitos imaturos na periferia (FRANCELIN et al., 2011; LEPLETIER et al., 2013). Durante a maturação, estes linfócitos passam pelo processo de seleção, sendo este o responsável por direcionar o linfócito a um destino CD4 ou a um destino CD8. O direcionamento acontece após o rearranjo dos genes do TCR, quando ocorre a seleção positiva para receptores funcionais. Por este motivo acreditava-se que esta escolha era determinante e que, exceto em condições especiais que levassem à liberação de linfócitos imaturos duplo-positivos, os linfócitos que deixavam o timo estavam comprometidos com uma linhagem específica, fosse ela CD4 ou CD8.

No timo, a diferenciação é mediada principalmente por dois fatores de transcrição e demais fatores associados a eles: Runx3 e ThPok (WANG; BOSSELUT, 2009). Runx3 faz parte da família Runx, que inclui também as moléculas Runx1 e Runx2. Tanto Runx1 quanto Runx3 estão relacionadas à diferenciação de linfócitos T. Runx1 é importante principalmente para a geração de linfócitos duplo-positivos a partir de linfócitos duplo-negativos e também para a sobrevivência de linfócitos T $CD4^+$. Já Runx3 não é encontrado em células duplo-positivas, mas está presente nas fases pré e pós-tímicas de linfócitos T $CD8^+$, bem como em linfócitos T $CD4^+$ ativados do subtipo Th1, onde ele promove a produção de IFNγ (TANAKA; TANIUCHI, 2014; TANIUCHI et al., 2002). Ambos os fatores estão envolvidos também na produção de moléculas citotóxicas como as Granzimas e Perforinas e o fator de transcrição EOMES (CRUZ-GUILLOTY et al., 2009).

EOMES foi inicialmente descrito pelo seu papel no desenvolvimento do mesoderma e na diferenciação do trofoblasto. Animais knockout para Eomes não sobrevivem às fases de desenvolvimento (INTLEKOFER et al., 2008; PEARCE et al., 2003). Trabalhos mostraram que a presença de EOMES é importante para a expressão de IFNγ em linfócitos T $CD8^+$ e a expressão de EOMES em linfócitos Th2 induz a

expressão de IFNγ nestas células. Quando superexpresso, induz inclusive a produção de mRNA para Granzima B e Perforina e proteínas de Granzima B em linfócitos Th2 (PEARCE et al., 2003). Apesar disso, EOMES não mostrou-se necessário para o desenvolvimento intratímico dos linfócitos T $CD8^+$. Por este motivo, está associado à diferenciação em linfócitos T $CD8^+$ efetores. Desta forma, a expressão de Runx3 pode ser associada à indução de um perfil citotóxico em linfócitos T $CD8^+$ (WANG; BOSSELUT, 2009).

Em oposição aos Runx está o fator de transcrição Thpok, ou Zbtb7b. Thpok é responsável por direcionar o desenvolvimento dos linfócitos para um perfil CD4 ao prevenir a diferenciação em CD8, já que células deficientes tanto para Thpok quanto para Runx desenvolvem perfil CD4 (BILIC; ELLMEIER, 2007; EGAWA; LITTMAN, 2008; HE et al., 2005). Thpok requer a expressão de Gata3 para promover a diferenciação em CD4 e acredita-se que Gata3 tenha ação *upstream*, apesar do fato de que a expressão forçada de Gata3 não afeta a diferenciação em CD4 ou CD8. Gata3 também não é necessário para que Thpok iniba a diferenciação em CD8, já que ele leva à repressão de CD8, Granzima B e Perforina. Além disso, linfócitos T $CD4^+$ maduros que têm a expressão de Thpok comprometida podem expressar CD8 e Granzima B (WANG et al., 2008; WANG; BOSSELUT, 2009).

Desta forma, o balanço entre Runx e Thpok é um dos principais motores da diferenciação e comprometimento intratímico dos linfócitos com a linhagem T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ (EGAWA; LITTMAN, 2008; SETOGUCHI et al., 2008). Também foi mostrado que, mesmo fora do timo, a inibição de Thpok pode levar à expressão de moléculas citotóxicas, bem como de CD8 em linfócitos T $CD4^+$ (WANG; BOSSELUT, 2009). Assim, este balanço pode ser importante também para a manutenção do destino destas células na periferia, não atuando apenas no ambiente intratímico. Diante do exposto foi nosso principal objetivo nesse trabalho o estudo da atividade citotóxica dos linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos e os mecanismos que induzem e suportam essa atividade.

2.OBJETIVOS

- Estudo da atividade citotóxica de linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos durante a evolução clínica da EAE**.**
- Análise dos mecanismos de ação e diferenciação dos linfócitos T $CD4^+$ com atividade citotóxica.
- Análise da relação do perfil citotóxico dos linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos com os subtipos TH1 e/ou Th17.
- Análise do perfil duplo positivo $CD4^+CD8^+$, sua expressão gênica e origem.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Animais

Camundongos fêmeas de C57BL/6, B6.129S4-Ifngtm3.1Lky/J (**IFNγYFP**), STOCKIl17atm1.1(GFP)stck/J (**IL-17aGFP**), GFP^{het} (células GFP) e $Rag1^{-/-}$ (animais incapazes de produzir linfócitos maduros) com 6-8 semanas de idade, e ratos Lewis fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, mantidas durante a fase de experimentação no biotério de manutenção do depto de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da UNICAMP, em condições livres de patógenos (CIBIO # 1/2013). Em todas as análises foram utilizados grupos de três animais, já que o número de células infiltradas no SNC mostrou-se muito baixo principalmente no início da doença.

3.2.Neuro-antígenos

A EAE foi induzida nos camundongos através da imunização com o peptideo de Glicoproteína da Mielina de Oligodendrócitos, pMOG35-55 (N-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-C; GeneMed Synthesis, TX, USA).

3.3.Indução de EAE

Os camundongos foram imunizados na axila por via subcutânea com 100µg de pMOG35-55 em 50µl de PBS em emulsão com igual volume de adjuvante completo

de Freund contendo 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Kansas, USA. Cat# 231141). 200ng de toxina de pertussis foram administradas intraperitonealmente 0 e 48h após a imunização (CROCKER, 2006).

Os animais foram observados diariamente a partir do nono dia após a imunizacao. Para os sinais clinicos da EAE, foram atribuidos *scores* clínicos a cada animal do grupo em uma escala de 0 a 5: 1, cauda sem tônus; 2, fraqueza dos membros posteriores; 3, paralisia completa dos membros posteriores; 4, tetra ou quadriplegia; 5, moribundo ou morto (CROCKER, 2006).

3.4.Separação de linfócitos do SNC

Para o isolamento de leucócitos do SNC foi utilizado um gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich, Missouri, USA. Cat# P1644-500ml). Primeiramente foi preparada uma solução-mãe de 90% de Percoll com 10% de PBS 10x. As células foram centrifugadas a 350g e ressuspendidas para uma concentração final de 30% da solução-mãe, diluída em PBS 1x. Foram então lentamente colocadas em um falcon de 15ml sobre 2ml de solução-mãe 70% diluída em PBS 1x e centrifugadas por 30 minutos a 950g. Na interface entre as duas concentrações formou-se um anel de leucócitos. O anel foi removido e lavado duas vezes em 10ml de meio Hanks (Sigma-Aldrich, Missouri, USA. Cat# H6136-10X1L) e centrifugado a 350g por 7 minutos. (Modificado (PINO; CARDONA, 2011))

3.5.Anticorpos

Os anticorpos utilizados para a marcação das células podem ser vistos na **Tabela 1**. Anticorpos para moléculas de superfície foram incubados com as células por 30 minutos a temperatura ambiente em PBS 1x com soro de camundongo 1%. Para a marcação intracelular foi utilizado o kit de fixação e permeabilização para FoxP3/Fatores de transcrição (eBioscience, San Diego, CA, USA. Cat# 00-5521-00), segundo orientações do fabricante.

Tabela 1 – Anticorpos obtidos para uso em citometria de fluxo e *cell sorting*. 1 - (BD Biosciences, New Jersey, USA). 2 - (eBioscience, San Diego, CA, USA.)

Anticorpo	Clone	Isotipo
CD3e[1]	145-2C11	Ar Ham IgG1, κ
CD4[1]	RM4-5	Rat IgG2a, κ
CD8a[1]	53-6.7	Rat IgG2a, κ
CD8b[1]	H35-17.2	Rat IgG2b, κ
Perforina[2]	eBioOMAK-D	Rat IgG2a, κ
Granzima B[2]	NGZB	Rat IgG2a, κ
CD134[2]	OX-86	Rat IgG1, κ
Eomes[2]	Dan11mag	Rat IgG2a, κ
Lamp1[1]	1D4B	Rat IgG2a, κ
TCR Vα3.2Vβ11[2]	RR3-15	Rat IgG2b, κ

3.6.Primers

Tabela 2 – *Primers* obtidos para realização de PCR quantitativo em tempo real por meio do ensaio *taqman*. (Best coverage, Applied Biosystems, Massachusetts, USA).

Primer	Cat.#	Primer	Cat.#
Tbet	4331182	IFN γ	4331182
Ror γt	4331182	Prf1	4331182
Ror α	4331182	Klrg1	4331182
Eomes	4331182	Kir3dl2	4331182
Lamp1	4331182	Vav3	4331182
Lamp2	4331182	Xcl1	4331182
Tgf β	4331182	Runx3	4331182
GzmB	4331182	ThPok	4331182
GzmC	4331182	CD244	4331182
CD134	4331182	CD8α	4331182
CD137	4331182	CD8β1	4331182
IL-17	4331182	GAPDH	4331182

Os *primers* apresentados na **Tabela 2** foram obtidos para quantificação de moléculas associadas principalmente aos perfis pró-inflamatório e citotóxico, todas para o ensaio quantitativo *taqman*. O controle interno utilizado foi a GAPDH.

3.7.Citometria de Fluxo e *Cell Sorter*

Todas as amostras foram lidas através do citômetro de fluxo Gallios (Beckman) e a análise foi feita utilizando o *software Flow Jo*. O *sorter* foi realizado no laboratório de marcadores celulares da FCM usando FACS-Aria (BD Biosciences, New Jersey, USA).

3.8.PCR quantitativo em tempo real

Após passarem pelo sorting, as amostras de medula e linfonodo foram colocadas em tampão de lise do kit de extração RNeasy e mantidas congeladas a -80°C. O mRNA foi extraído com o auxílio de colunas de extração RNeasy micro kit (Qiagen, Hilden, Germany. Cat# 74004) e convertido em cDNA com o kit de conversão (Applied Biosystems, Massachusetts, USA. Cat# 4368814). Para a realização do qPCR foi utilizado o kit de amplificação (Applied Biosystems, Massachusetts, USA. Cat# 4391128) conforme instruções do fabricante para um volume final de reação de 15µl. As análises foram realizadas utilizando o equipamente 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA. Cat# 4351106).

Para as amostras de SNC, foi necessário realizar pré-amplificação do cDNA. Para isto, utilizamos o kit TaqMan PréAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA. Cat# 4391128), conforme instruções do fabricante. A amplificação foi feita para todos os genes analisados no trabalho.

3.9.Injeção intratímica de isotiocianato de flurosceína (FITC)

Os camundongos controle e imunizados foram anestesiados intraperitonealmente com 5 mg/ml de cetamina e 1 mg/ml de xilazina. A cavidade torácica foi aberta através de uma incisão na linha média, e 10ul de FITC (Sigma Co., St. Louis, Missouri, EUA) foram injetados em cada lóbulo do timo. As injeções foram realizadas 10

dias após a imunização e camundongos não imunizados que receberam somente FITC ou solução salina (PBS), foram considerados controles. Trabalhos anteriores revelaram que a injeção de FITC, sozinho, não consegue induzir alterações significativas dentro do timo (SMANIOTTO et al., 2005). Cerca de 48 horas depois, SNC e linfonodos axiais foram coletados e utilizados para análise das subpopulações de linfócitos.

3.10.Transferência de células *in vivo*

$1x10^6$ $TCR\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$ células de camundongos GFP^{het} foram obtidas por cell sorting e inoculadas por via intraperitoneal em camundongos $Rag1^{-/-}$ 4 semanas antes da imunização. Posteriormente, foram removidos medula espinhal e linfonodos destes animais para análise por citometria de fluxo.

Em outro experimento, $1x10^6$ células T $CD4^+$ MBPgfp (células T CD4 GFP específicas para MBP de ratos Lewis) foram transferidas para ratos Lewis por via intravenosa (veia da cauda). 5 dias após a transferência, a medula espinhal dos animais foi removida para separação de linfócitos para citometria de fluxo.

3.11.Análise Estatistica

Os dados foram analisados por método de análise de variância não paramétrica (Kruskal Wallis) e teste U de Mann-Whitney. Um valor de $p<0,05$ foi considerado significativo. Os dados mostrados como médias e desvios padrão.

4.RESULTADOS

4.1.Avaliação da expressão de moléculas citotóxicas e inflamatórias nos linfócitos T CD4+

A fim de avaliar a atividade citotóxica e inflamatória dos linfócitos T CD4+ durante a evolução clínica da EAE, linfócitos dos linfonodos e SNC foram extraídos e passaram por sorting para separação das populações de T CD4+, 10 e 13 dias após a imunização. Esses dias representam o início (10 dias) e o pico (13 dias) das manifestações clínicas da EAE. É possível observar na **Fig. 1B** um aumento na expressão da maioria das moléculas relacionadas à resposta inflamatória (RORγt, RORα, IL-17a, T-bet, IFNγ) e à atividade citotóxica (GzmB, GzmC, CD134, CD137) nas células infiltradas no SNC em comparação com as células extraídas do linfonodo.Outras moléculas, como Lamp1 e Eomes, apresentaram maior expressão na periferia ou tiveram pouca alteração entre os tecidos.O mesmo pode ser visto através da análise de cluster (**Fig. 1C**), que mostra que as células presentes no infiltrado do SNC são distintas quanto à expressão de moléculas pró-inflamatórias e citotóxicas quando comparadas às células presentes nos linfonodos. Este tipo de análise permite agrupar as células com fenótipo mais similar. Nesta análise foram observadas outras moléculas que não apareceram individualmente. Perforina 1, por exemplo, apresentou-se mais elevada na periferia que no SNC. Entretanto, devido ao mecanismo de citotoxicidade dependente de granzima mas independente de Prf1, esta não é essencial para caracterizar a citotoxicidade da célula. Vav3, Kir3dl2 e Xcl1 foram utilizadas por estarem envolvidas com resposta citotóxica de células NK (CELLA et al., 2004) e de linfócitos T CD8+ (HARTUNG et al., 2015). Lamp2, bem como Lamp1, podem ser encontradas em vesículas lisossomais e são necessárias para o transporte de grânulos citotóxicos (KRZEWSKI et al., 2013). Por fim, Runx3 também aparece na análise de cluster, mas seu papel será discutido posteriormente, graças à sua importância para o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T CD8+. Dados anteriores (dados não publicados) mostraram que a expressão destas moléculas nos linfonodos durante o pico da doença oferece pouca informação a respeito das células que chegam no sistema nervoso central, já que grande parte das células efetoras já migrou para o SNC.

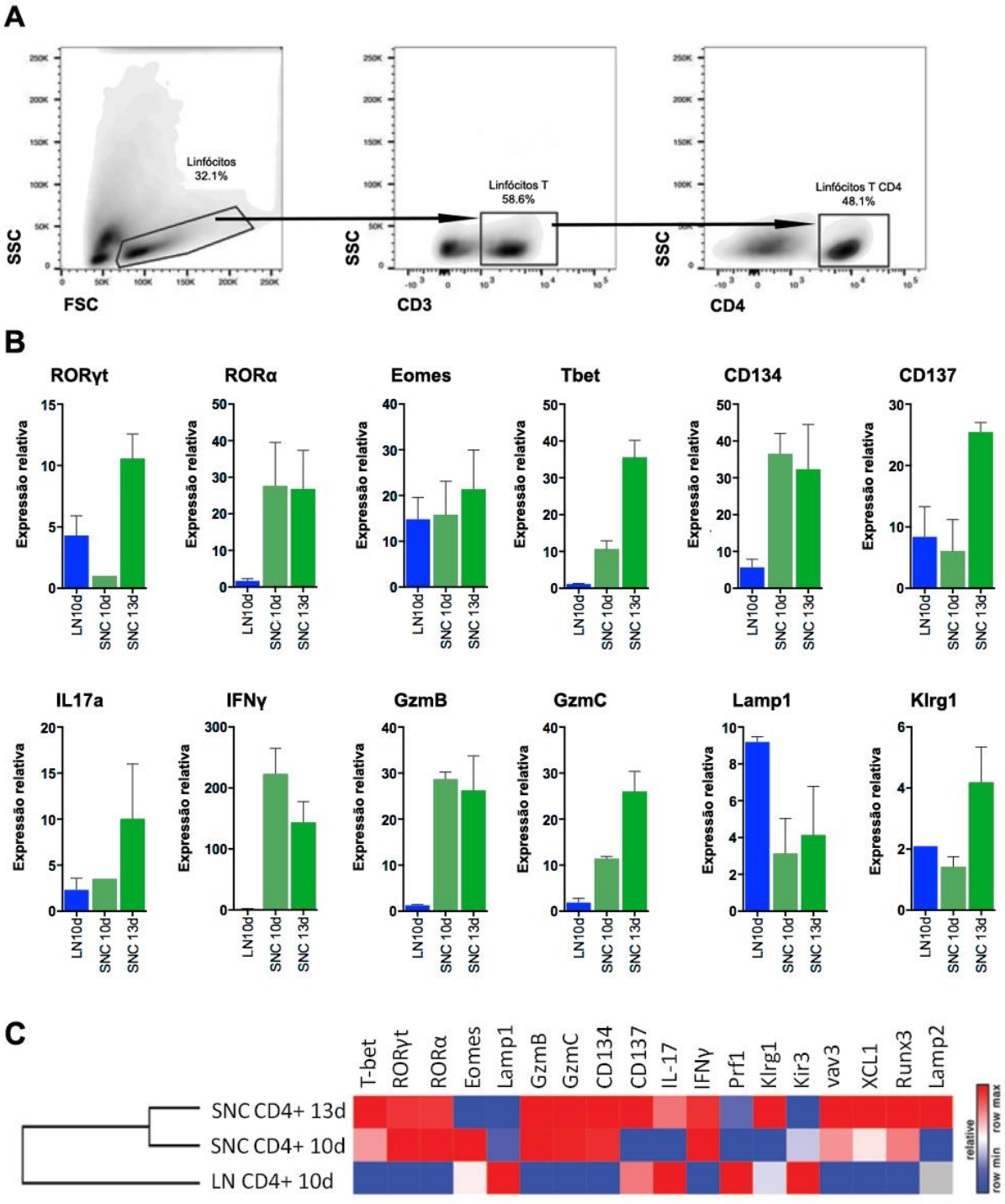


Figura 1 – Perfil de expressão de mRNA de moléculas pró-inflamatórias e citotóxicas em linfócitos T CD4⁺. Foram utilizados 3 grupos de 3 animais cada. **A)** Figura representativa da lógica de *gates* utilizada para separar a subpopulação T CD4⁺ por meio de citometria de fluxo e *cell sorting*. Os linfócitos foram extraídos de linfonodos

e SNC de 3 grupos com 3 camundongos cada. **B)** Análise por PCR *real time* da expressão de moléculas pró-inflamatórias e citotóxicas em linfócitos T $CD4^+$ presentes nos linfonodos no início da manifestação clínica (LN10d) e infiltrados no SNC no início (CNS10d) e no pico (CND13d) da doença. **C)** Análise de cluster para os resultados observados em A. Com poucas exceções, é possível observar um aumento da expressão de moléculas associadas ao perfil citotóxico e pró-inflamatório nas células infiltradas no SNC. Além disso, estas células T $CD4^+$ infiltradas podem ser agrupadas em um grupo fenotipicamente distinto das células T $CD4^+$ presentes no linfonodo, conforme mostra a análise de cluster.

Nem sempre a relação da expressão gênica (mRNA) é linear com a expressão de proteína. Desta forma, analisamos a expressão proteica de algumas dessas moléculas por citometria de fluxo. Para tal nós selecionamos as células TCR^+CD4^+ e analisamos a expressão de Eomes, Granzima B e CD134 (**Fig. 2A**). De maneira geral, podemos observar na **Fig. 2B** que a expressão das moléculas analisadas vai ao encontro ao nível de expressão gênica. Apesar de não haver um aumento significativo na expressão de CD134, a presença deste receptor pode estar relacionada principalmente à fase de ativação do linfócito. Portanto, pode não ser mais essencial para o desenvolvimento do perfil citotóxico uma vez que esta célula já diferenciou-se. Desta forma, nossos resultados demonstram que os linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos regulam positivamente a expressão de moléculas relacionadas com a citotoxicidade juntamente com a expressão de moléculas pró-inflamatórias quando infiltram no SNC.

4.2.Avaliação da especificidade dos linfócitos T $CD4^+$ com atividade citotóxica.

É sabido que para a linhagem C57BL/6 os linfócitos encefalitogênicos expressam o TCR Vα3.2Vβ11. Desta forma, nós usamos anticorpos anti-Vβ11 para avaliar se o perfil citotóxico dos linfócitos T $CD4^+$ estava ligado à especificidade para o neuroantígeno. Seria possível, nesse contexto, que o microambiente inflamatório da lesão no SNC induzisse de maneira geral o perfil citotóxico nos linfócitos T $CD4^+$ ali infiltrados. Interessantemente, quando selecionadas especificamente as células encefalitogênicas T $CD4^+Vβ11^+$ (**Fig. 3**), a expressão de Eomes, GzmB e Lamp1 mostrou-se ainda mais acentuada que nas células T $CD4^+Vβ11^-$. Isto mostra uma possível importância da estimulação antígeno específica para a geração deste fenótipo com características semelhantes a células citotóxicas. Além disso, Lamp1, que não havia apresentado alteração na análise por PCR, possui uma expressão mais acentuada nos linfócitos T $CD4^+Vβ11^+$. Considerando que estas células constituem uma parte menor da população, estes efeitos de aumento da expressão poderiam estar sendo mascarados. Outro fator a ser levando em consideração é a não linearidade da expressão de mRNA com a expressão proteica.

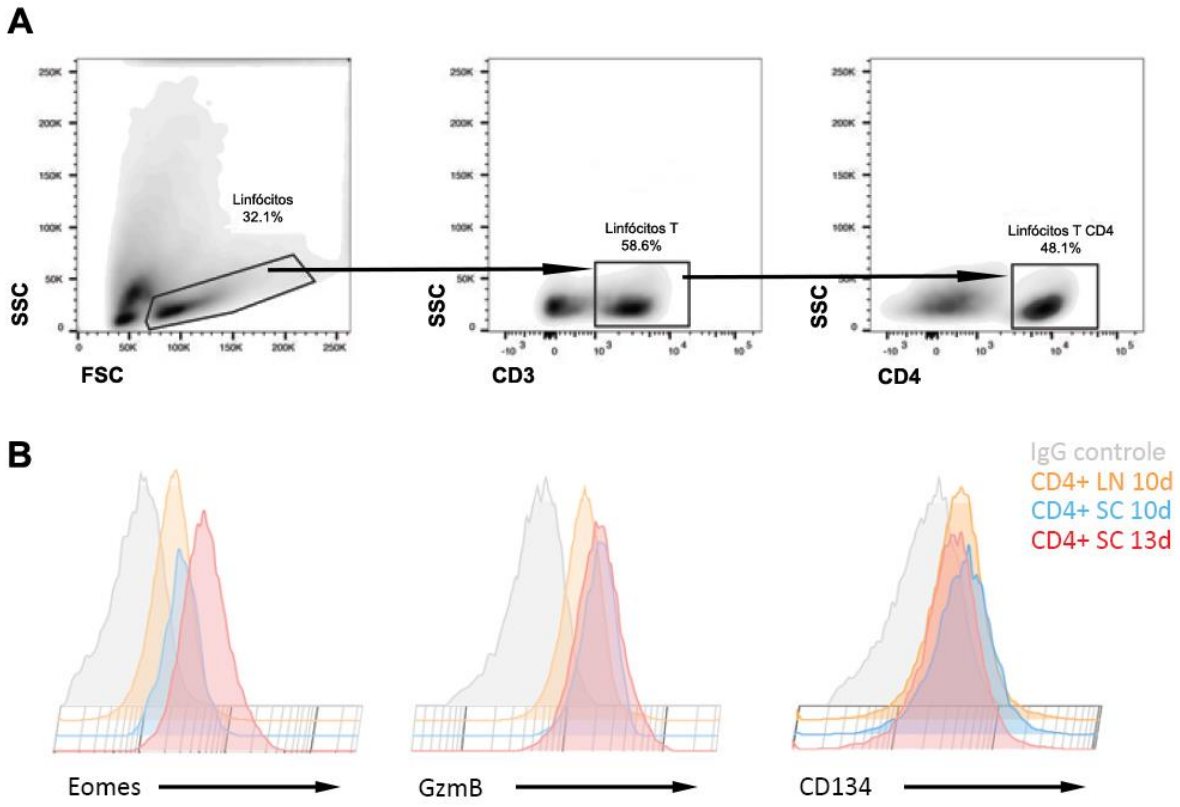


Figura 2 – Perfil da produção de proteínas pró-inflamatórias e citotóxicas em linfócitos T CD4⁺. A) Figura representativa da lógica de *gates* utilizada para separar a subpopulação T CD4⁺ por meio de citometria de fluxo e *cell sorting*. Os linfócitos foram extraídos de linfonodos e SNC de um grupo com 3 camundongos. **B)** Expressão de Eomes, GzmB e CD134 nas amostras de linfonodos e medula espinhal com 10 e 13 dias após a imunização, observada por citometria de fluxo. É possível observar, principalmente no pico da doença, um aumento na expressão de Eomes e Granzima B nos linfócitos T CD4⁺ encontrados no SNC. Entretanto, não houve aumento na expressão de CD134.

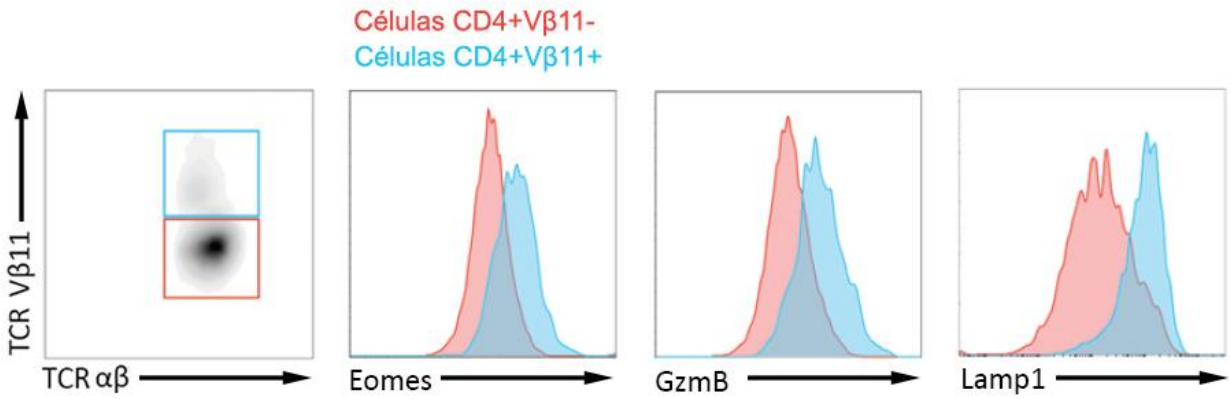


Figura 3 – Análise da produção de proteínas pró-inflamatórias e citotóxicas por linfócitos encefalitogênicos. Análise por citometria de fluxo da produção de Eomes, GzmB e Lamp1 nos linfócitos encefalitogênicos, $CD4^{+}V\beta11^{+}$, em comparação com demais linfócitos $CD4^{+}V\beta11^{-}$ infiltrados no SNC. Foi utilizado um grupo com três animais para a extração do SNC. Eomes, GzmB e Lamp1 apresentaram expressão mais elevada nos linfócitos encefalitogênicos $CD4^{+}V\beta11^{+}$, indicando um perfil mais citotóxico.

Recentemente demonstrou-se que os linfócitos T CD4$^+$ encefalitogênicos são reativados por APCs tanto na meninge como no parênquima do SNC(BARTHOLOMÄUS et al., 2009). Desta forma, parece que esse perfil citotóxico depende não apenas do microambiente do SNC mas também de processos relacionados a reativação antigênica *in loco.* Nesse contexto, a expressão de moléculas coestimuladoras relacionadas a ativação da atividade citotóxica (CD134 e CD137) por essas células encefalitogênica seria fundamental para o desenvolvimento do perfil citotóxico.

4.3.Relação do perfil citotóxico com os subtipos Th1 e/ou Th17

Até o presente momento um único trabalho na literatura relacionou a atividade citotóxica com o desenvolvimento da EAE(KEBIR et al., 2007). Nesse artigo os autores evidenciam a expressão de granzima B por linfócitos Th17. Esses linfócitos seriam importantes para quebra da barreira hemato-encefálica e consequentemente para a geração da inflamação local. No entanto, diversos autores mostraram que linfócitos T CD4$^+$ com atividade citotóxica geralmente apresentam um perfil Th1(OZDEMIRLI et al., 1992; ST ROSE et al., 2013). Desta forma, nós induzimos a doença em animais IL-17_GFP e IFNγ_YFP para entender melhor o subtipo celular destas células citotóxicas.

A fim de avaliar o perfil de expressão dessas duas subpopulações de linfócitos T CD4$^+$ foi realizado *sorting* dos linfócitos T CD4$^+$IL-17$^+$ e dos linfócitos T CD4$^+$IFNγ$^+$ em dois experimentos paralelos (**Fig. 4A**). A **Fig. 4A** mostra uma maior porcentagem de linfócitos T CD4$^+$IFNγ$^+$ (27.1%) que de linfócitos T CD4$^+$IL-17 (12.1%) no SNC 13 dias após a imunização. Surpreendentemente, ao observarmos as moléculas associadas à citotoxicidade e perfil pró-inflamatório expressas por estas células (**Fig. 4B**), os linfócitos T CD4$^+$IFNγ$^+$ apresentaram maior expressão de todos os genes analisados, com exceção do ThPok, incluindo até mesmo a citocina IL17 e os fatores de transcrição RORγt e RORα, associados à diferenciação de linfócitos no subtipo Th17.

Como dito anteriormente, recentemente demonstrou-se que os linfócitos Th17 encefalitogênicos começam a expressar IFNγ após entrarem no SNC(HIROTA et al., 2011). Desta forma, seria sim possível que uma boa parte dos linfócitos T CD4$^+$IFNγ$^+$

também apresentassem a expressão de IL-17. Para avaliar essa possibilidade nós marcarmos concomitantemente IL-17 e IFNγ, e checamos a produção de GzmB. Nossos dados mostram que tanto linfócitos $CD4^+IFN\gamma^+$ quanto $CD4^+IFN\gamma^+IL\text{-}17^+$ apresentam uma maior expressão de GzmB quando comparados com os linfócitos que apenas expressam IL-17 ($CD4^+IL\text{-}17^+$) (**Fig. 4C**).

Coletivamente, estes dados indicam que o subtipo de linfócitos produtores de IFNγ é o principal responsável pela citotoxicidade associada a linfócitos T $CD4^+$. Além disso é possível que o mesmo mecanismo que direcione a expressão de IFNγ nos linfócitos Th17 seja responsável pela indução da atividade citotóxica.

4.4.Presença de linfócitos $CD4^+CD8^+$ no SNC na EAE

Ainda que não fosse nosso objetivo inicial nesse trabalho, nós encontramos linfócitos T $CD4^+CD8^+$ infiltrados no SNC principalmente no pico da doença (13 dias após a imunização) (**Fig. 5**).

Como características citotóxicas são principalmente observadas em linfócitos T $CD8^+$ e uma vez que fatores de transcrição associados à citotoxicidade também estão associados à diferenciação no fenótipo T $CD8^+$ citotóxico, investigamos a expressão de marcadores citotóxicos e proteínas efetoras associadas à citotoxicidade desses linfócitos T $CD4^+CD8^+$ em relação aos linfócitos T $CD4^+CD8^-$. Desta forma, realizando as análises de citometria para estas células duplo positivas e para linfócitos T $CD4^+CD8^-$ simples positivos, encontramos uma maior expressão de EOMES e de moléculas associadas à citotoxicidade (GzmB, LAMP-1) nos linfócitos duplo positivos (**Fig. 6A**). Dentre as células duplo positivas, poucas eram produtoras de IL-17, mas uma grande parte era produtora de IFNγ (**Fig. 6B**), o que reforça a hipótese de que os linfócitos produtores de IL-17 estariam se diferenciando em linfócitos produtores de IFNγ, concomitantemente ao aumento da citotoxicidade. Ainda, estas células duplo positivas mostraram-se majoritariamente encefalitogênicas TCR $V\beta11^+$ (**Fig. 6C**). Esses resultados indicam que esses linfócitos $CD4^+CD8^+$ são uma diferenciação dos linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos.

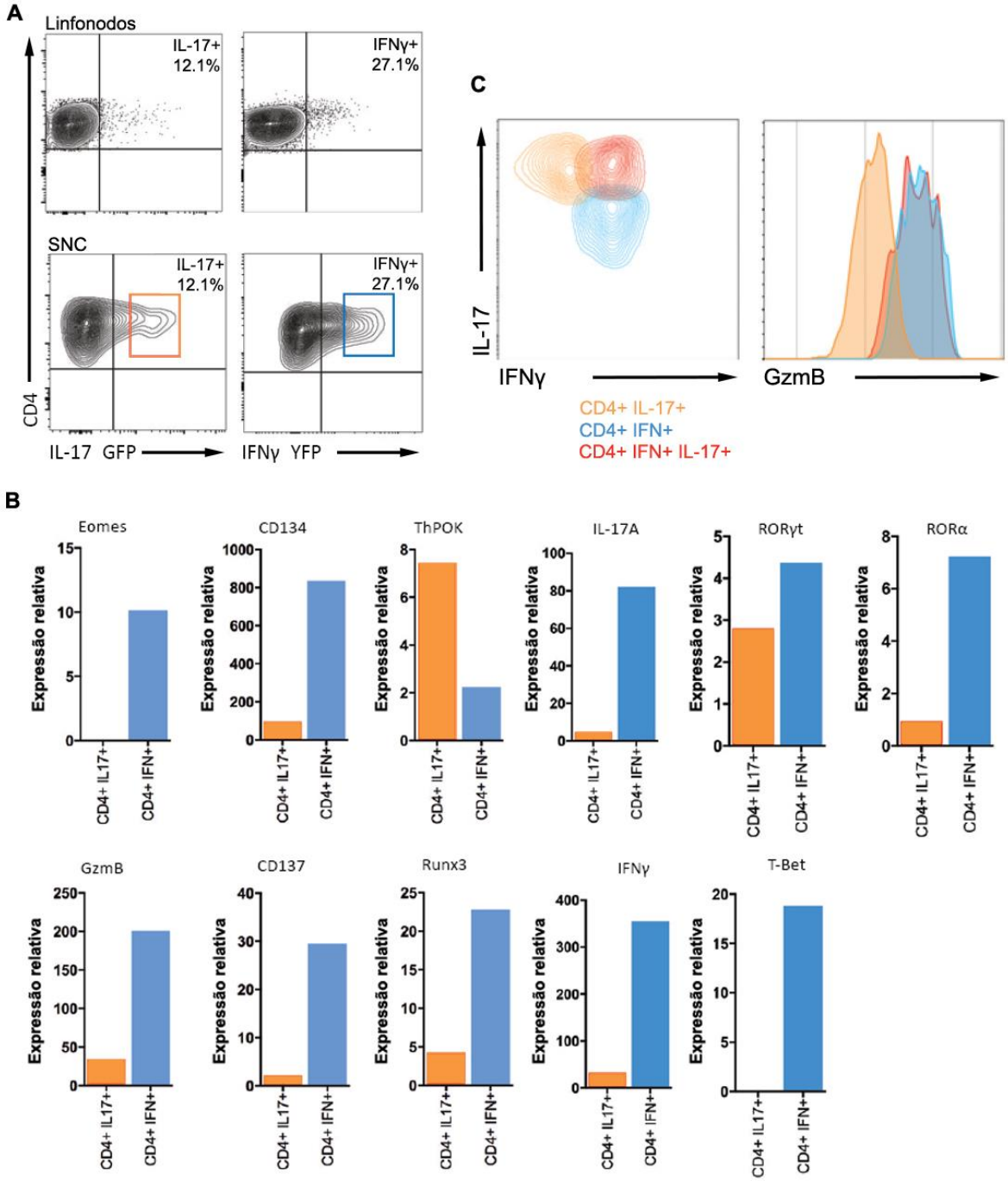


Figura 4 – Perfil pró-inflamatório e citotóxico dos subtipos de linfócitos produtores de IFNγ e IL-17. Para as análises foram utilizados dois grupos de 3 animais cada, um para os animais IL17_GFP e outro para os animais IFNγ_YFP. **A)** Lógica de *gates* para o sorting das populações celulares IL17^{+} e IFNγ^{+} respectivamente dos animais IL17_GFP

e IFNγ_YFP. **B)** PCR quantitativo em tempo real para avaliação da expressão gênica de moléculas associadas ao perfil pró-inflamatório e citotóxico nas subpopulações de linfócitos IL17$^+$ e IFNγ$^+$. Com exceção de ThPok, todas as demais moléculas associadas ao perfil pró-inflamatório e citotóxico apresentaram aumento na expressão quando comparados os linfócitos IFNγ$^+$ com os IL-17$^+$. Pode-se observar que mesmo os fatores de transcrição Rorγt e Rorα, responsáveis pela expressão de IL-17, são expressos em maior quantidade nos linfócitos IFNγ$^+$. **C)** Análise por citometria de fluxo da produção de GzmB pelas diferentes subpopulações de células duplamente marcadas. Os linfócitos IFNγ$^-$IL17$^-$ foram omitidos da análise. É possível observar uma população de linfócitos IFNγ+IL17+, que pode ser responsável pela expressão elevada dos fatores de transcrição Rorγt e Rorα em linfócitos IFNγ$^+$.

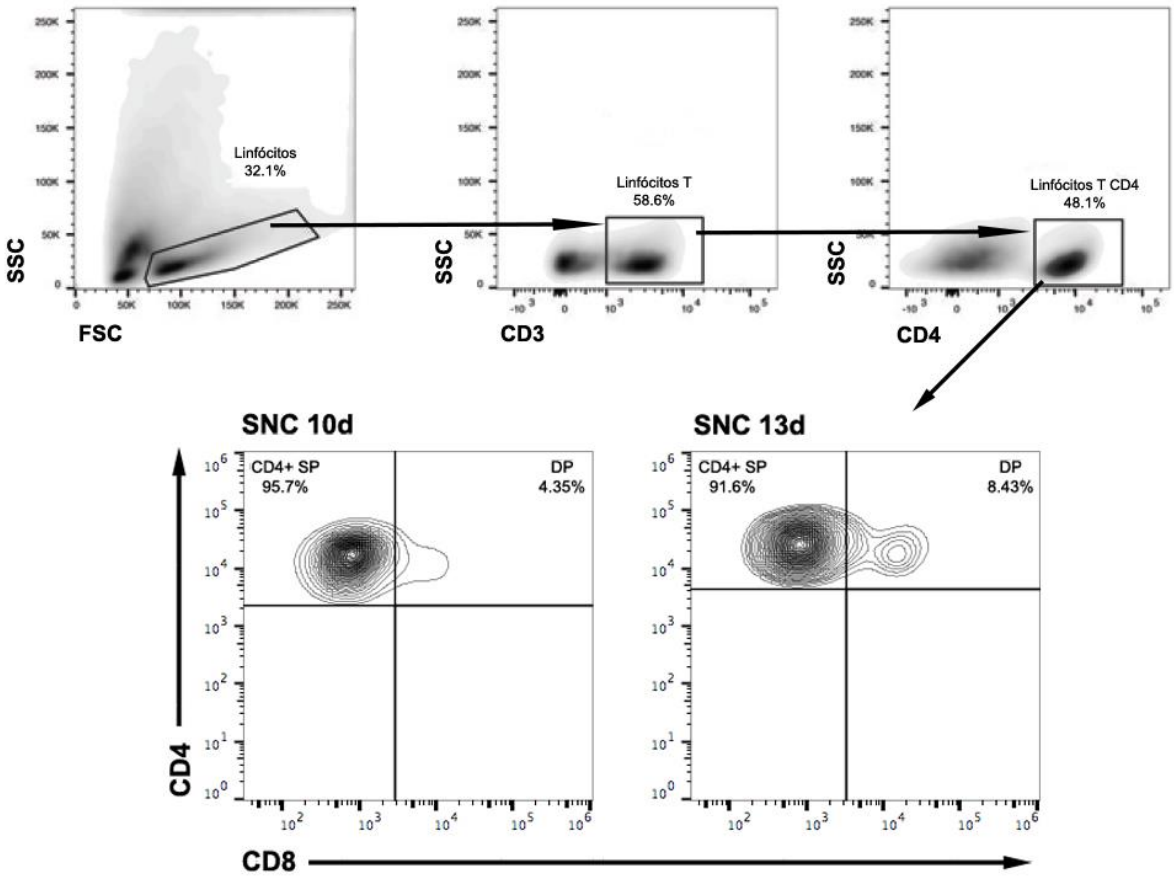


Figura 5 – Presença de linfócitos duplo-positivos no SNC. Grupo experimental com 3 camundongos. Análise por citometria de fluxo da expressão de CD4 e CD8 em linfócitos infiltrados no SNC 10 e 13 dias após a imunização. Ao longo da evolução da doença nos dias observados, o número de linfócitos CD4+CD8 é crescente. Nos linfonodos, esta população duplo-positiva foi raramente encontrada nas repetições do experimento (dados não apresentados).

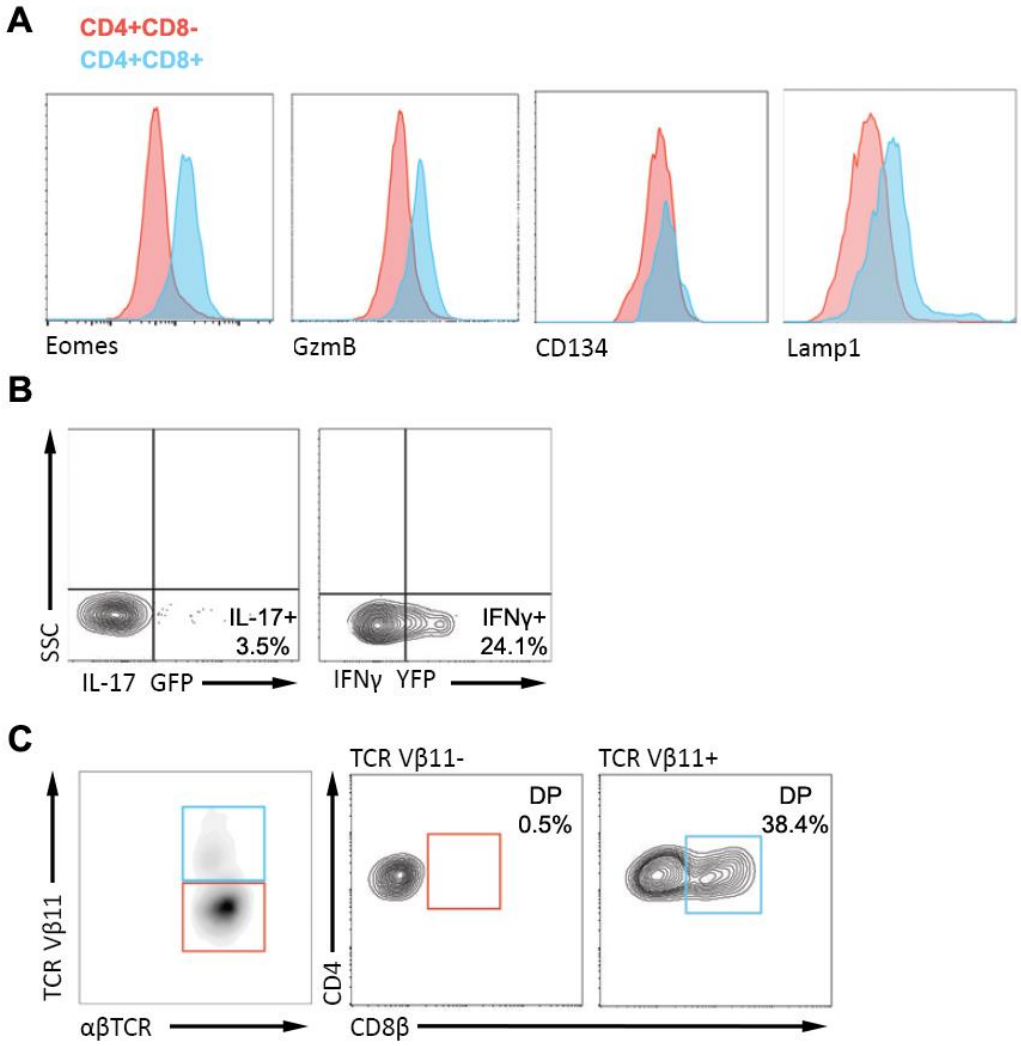


Figura 6 – Perfil dos linfócitos duplo positivos infiltrados no SNC no pico da doença analisado por citometria de fluxo. Grupo experimental com 3 camundongos. **A)** Expressão de Eomes, GzmB, CD134 e Lamp1 observadas nas subpopulações simples e duplo-positivas por citometria de fluxo. Com exceção de CD134, as demais moléculas foram mais expressas nos linfócitos duplo-positivos, indicando um perfil citotóxico. **B)** Produção de IL-17 e IFNγ por células duplo positivas. Uma grande proporção destas células expressa IFNγ. O mesmo não foi observado para IL-17. **C)** Potencial encefalitogênico dos linfócitos simples e duplo-positivos pela expressão de Vβ11. A subpopulação de linfócitos $CD4^{+}CD8^{+}$ pôde ser encontrada predominantemente dentro do conjunto de células encefalitogênicas, indício da importância da estimulação antígeno-específica para a diferenciação deste subtipo celular.

Provavelmente o mecanismo que induz o perfil citotóxico nessas células também induz a expressão de CD8. Nesse sentido nós resolvemos analisar a possibilidade de essas células duplo positivas terem sidos liberadas pelo timo prematuramente, uma vez que sob determinadas condições inflamatórias o timo pode liberar células imaturas para a periferia. Primeiramente, realizamos a injeção no timo do animal com FITC 10 dias após a imunização. Nossos resultados demonstraram que apenas uma pequena parte (7%) dos linfócitos T $CD4^+CD8^+$ infiltrados no SNC era FITC positivo (**Fig. 7A**).

Esse resultado indica que a maioria das células duplo positivas que infiltram o SNC são provenientes de linfócitos já maduros. Para reforçar essa hipótese nós transferimos linfócitos $CD4^+CD8$-GFP^+ para animais $RAG^{-/-}$ e induzimos a EAE. Como os linfócitos de animais $Rag^{-/-}$ não completam a maturação, os linfócitos maduros encontrados são originados daqueles transferidos. Assim, a presença de linfócitos duplo-positivos revela a diferenciação de linfócitos simples positivos $CD4^+$. Na **Fig. 7B** mostra-se que uma porção das células GFP passou a apresentar expressão de CD8. O mesmo pode ser observado na doença monofásica induzida em ratos Lewis, quando foram transferidos linfócitos T $CD4^+CD8^-$ específicos para MBP. Cinco dias após a transferência, uma porcentagem (3.6%) destas células passou a expressar CD8 (**Fig. 8**). Esses resultados comprovam que células T $CD4^+$ simples positivas e maduras encontradas na periferia têm a capacidade de expressar moléculas citotóxicas e, inclusive, de expressar CD8. Ainda, esse processo de transdiferenciação pode ser importante para a atividade destas células, contribuindo para o desenvolvimento da doença.

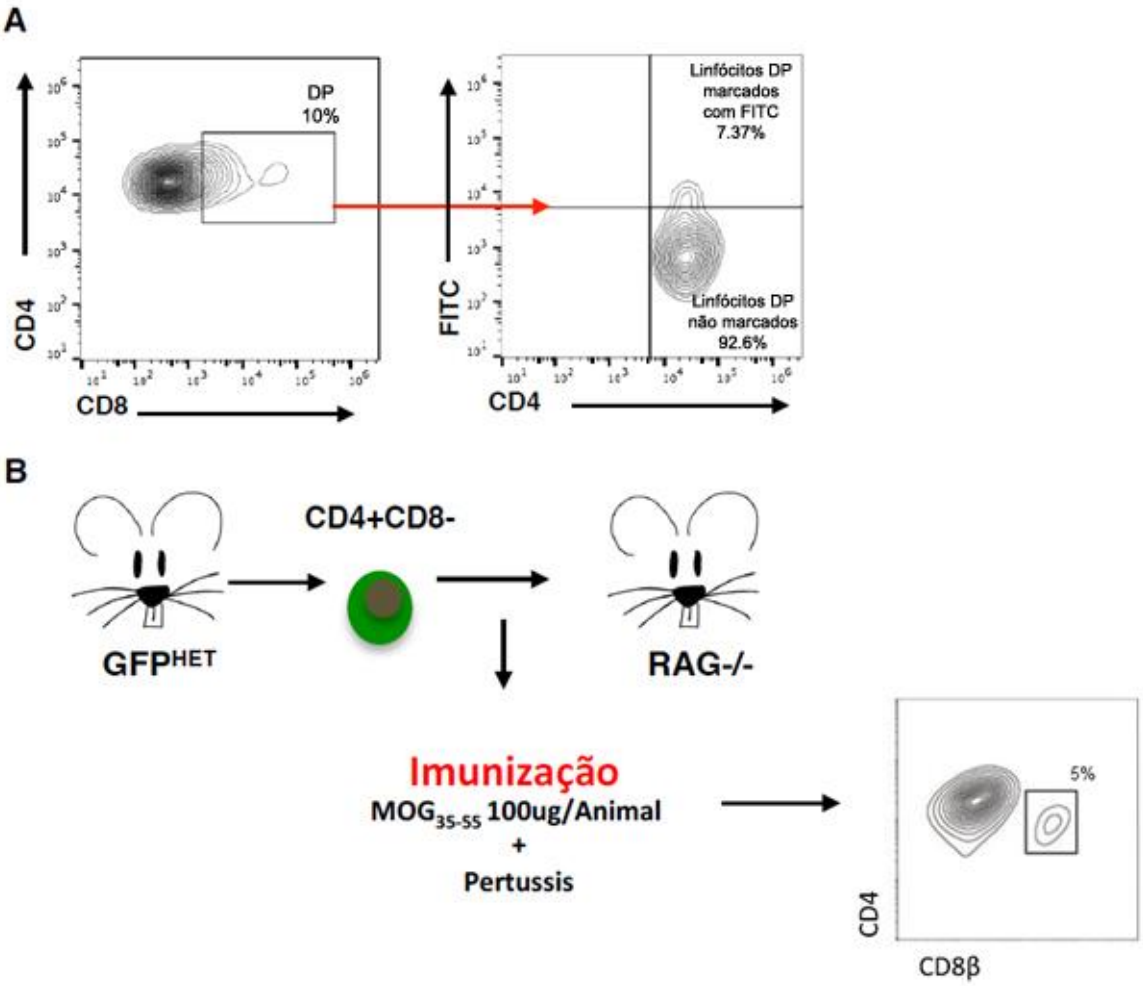


Figura 7 – Identificação da origem dos linfócitos duplo-positivos. A) Inoculação de FITC no timo de animais previamente imunizados e análise por citometria das populações celulares presentes no linfonodo. No SNC, o número de células é bastante reduzido e as células inoculadas estavam presentes em pouca quantidade. Grupos com 3 camundongos cada. Pode-se observar que, dentre as células duplo-positivas, poucas tiverem origem do timo, já que não estavam marcadas com FITC. **B)** Transferência adotiva de linfócitos T $CD4^{+}$ de um camundongo GFP para um camundongo $RAG^{-/-}$, imunização deste e posterior análise por citometria das células transferidas. Uma pequena proporção dos linfócitos T CD4+ transferidos passou a expressar CD8β após a transferência, evidenciando a possibilidade de transdiferenciação.

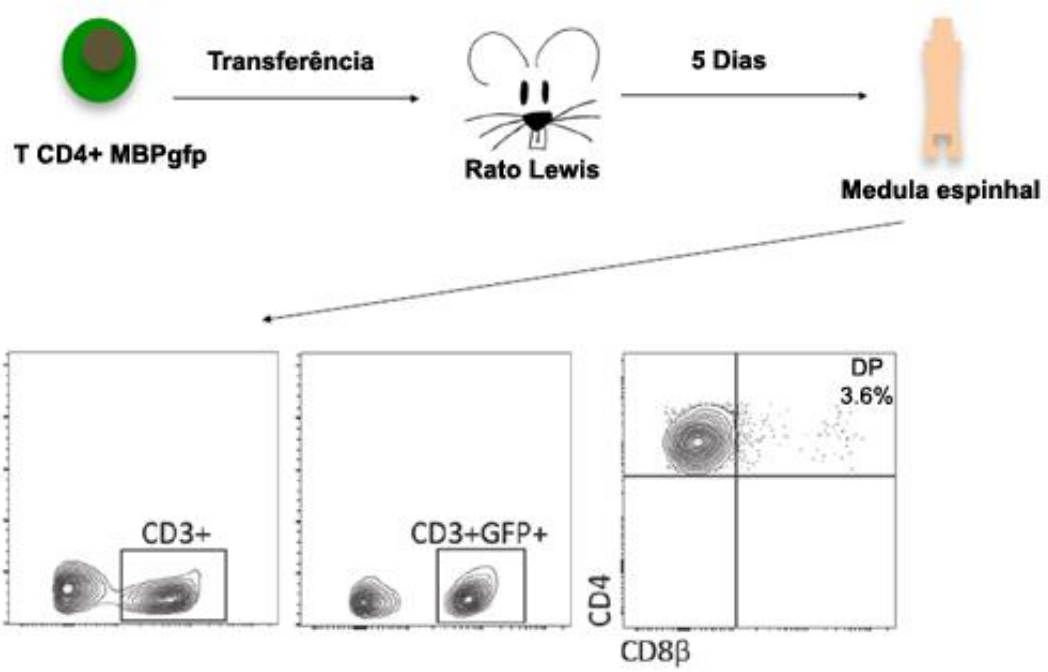


Figura 8 – Diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linfócitos duplo-positivos. Transferência de linfócitos T CD4⁺ GFP específicos para MBP para três ratos Lewis e análise por citometria de fluxo das populações de linfócitos GFP originadas a partir da transferência. Uma pequena proporção das células T CD4+ transferidas passou a expressar CD8β dentro de cinco dias após a transferência.

4.5.Balanço da expressão de ThPOK e RUNX3 nos linfócitos T CD4$^+$ e Duplo-positivos durante a evolução clínica da EAE

Tendo em vista que, no timo, os principais reguladores para a diferenciação em linfócitos T CD4$^+$ e T CD8$^+$ são, respectivamente, ThPok e Runx3, fomos observar a expressão destas duas moléculas nos linfócitos T CD4$^+$ durante a evolução clínica da EAE. Interessantemente nossos resultados demonstraram que a expressão de ThPok é relativamente constante. Entretanto, a expressão de Runx3 apresentou aumento com a evolução da doença (**Fig. 9**). O runx3 é responsável por estimular a transcrição de grande parte das moléculas responsáveis pelo fenótipo T CD8$^+$, incluindo moléculas citotóxicas. Desta forma, a expressão crescente desse fator de transcrição é compatível com a geração do perfil citotóxico e com a expressão de CD8 por esses linfócitos T CD4$^+$ já maduros.

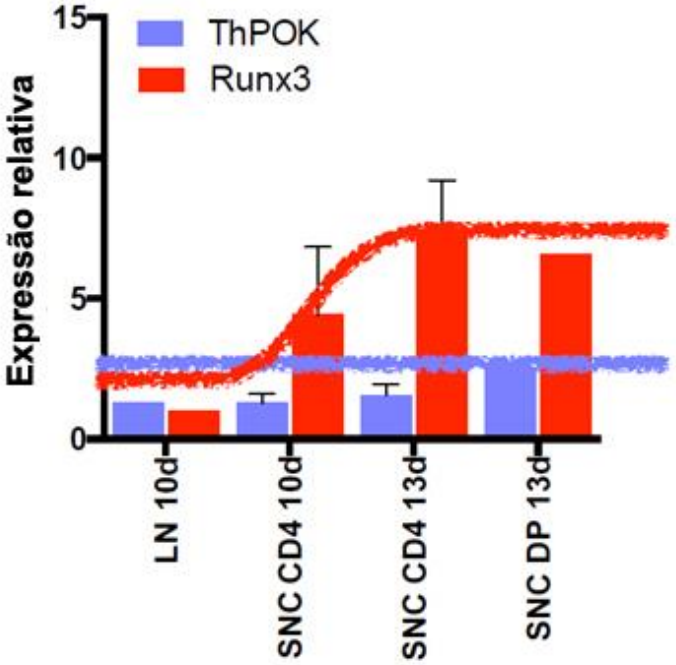


Figura 9 – Balanço da expressão de ThPok e Runx3 em linfócitos T CD4⁺ e duplo-positivos durante a evolução da EAE. Expressão por PCR *real time* de ThPok e Runx3 nos diferentes dias de doença e nas diferentes populações de linfócitos simples e duplo positivos. As linhas vermelha e azul evidenciam uma tendência. A expressão de ThPOK manteve-se praticamente inalterada nos diferentes órgãos, dias e subtipos celulares. Entretanto, a expressão de Runx3 foi mais elevada em linfócitos T CD4⁺ e linfócitos CD4⁺CD8⁺ (DP) infiltrados no SNC.

5.DISCUSSÃO

A EAE tem, desde de sua descrição, ajudado a desvendar importantes mecanismos da resposta autoagressiva na EM, assim como no desenvolvimento e teste de novas drogas. No entanto alguns mecanismos da doença ainda precisam ser melhor estudados. O melhor entendimento desses mecanismo pode beneficiar significativamente os pacientes de EM e possivelmente de outras patologias autoimunes. No presente estudo foi nosso objetivo avaliar o possível perfil citotóxico dos linfócitos T CD4+ encefalitogênicos durante a evolução clínica da doença.

O estudo da atividade citotóxica dos linfócitos T $CD4^+$ na EAE não é completamente novo. Um único trabalho na literatura mostra que os linfócitos Th17 expressam GzmB, a qual usam para quebrar a barreira hemato-encefálica (KEBIR et al., 2007). No entanto, nós observamos que havia uma aumentada expressão de GzmB e perforina no tecido do SNC durante o pico da doença (dados não apresentados). Desta forma, nossos dados indicavam que após a querbra da barreira hemato-encefálica havia alta expressão de moléculas relacionadas à citotoxicidade *in loco*. Nossos dados demonstram que os linfócitos T $CD4^+$ encefalitogênicos apresentam um perfil citotóxico crescente durante a evolução clínica da doença. Interessantemente outros dados do nosso laboratório indicam que os pacientes de EM apresentam 3 vezes mais linfócitos T $CD4^+GzmB^+$ circulantes que indivíduos saudáveis (dados não apresentados). Desta forma, o melhor entendimento desses mecanismos pode não apenas ser importante para desvendar o papel dos linfócitos T $CD4^+$ na EAE e na EM, mas também contribuir para o diagnóstico da EM.

Interessantemente esses linfócitos com o perfil citotóxico são predominantemente produtores de IFNγ. A princípio esse resultado estaria em desacordo com a literatura vigente. No entanto, recentemente demonstrou-se que os linfócitos Th17 passam a expressar IFNγ após entrarem no SNC(HIROTA et al., 2011). Assim, é possível que o processo aqui descrito seja na verdade uma continuação da atividade citotóxica dos linfócitos Th17 descrita por Kebir e colaboradores(KEBIR et al., 2007). Ainda, nossos dados de expressão de GzmB, IL-17, e IFNγ indicam que a mudança no perfil de expressão de citocinas e a atividade citotóxica são um processo continuo e paralelo da

atividade desses linfócitos encefalitogênicos após entrarem no SNC. Interessantemente um trabalho de 1992 já mostrava que linfócitos Th1 podem apresentar atividade citotóxica compatível com linfócitos T $CD8^+$(OZDEMIRLI et al., 1992). Nossos resultados demonstram que a atividade citotóxica está diretamente relacionada, ou pelo menos é mais evidente nos clones encefalitogênicos $V\beta11^+$. Esse fato denota a especificidade do mecanismo, que provavelmente é mediado pela reativação dos clones autoreativos no SNC(BARTHOLOMÄUS et al., 2009).

Recentemente tem sido demonstrada cada vez mais a atividade citotóxica de linfócitos T $CD4^+$ em contextos tumorais, infecciosos ou na imunidade de mucosa(CHEROUTRE; HUSAIN, 2013; MUCIDA et al., 2013; ST ROSE et al., 2013). Muitas das vezes essa atividade citotóxica está associada à expressão de CD8α nessas células(MUCIDA et al., 2013; REIS et al., 2013). Surpreendentemente nós encontramos linfócitos T $CD4^+$ já maduros expressando CD8α e CD8β. A expressão de CD8αβ propiciaria que esses células interagissem com células alvo via MCH-I. A análise do TCR Vβ11 revelou que uma grande proporção das células duplo positivas apresentava o TCR encefalitogênico. Desta forma, tudo indica que a expressão das moléculas de CD8 está diretamente relacionada à ativação do perfil citotóxico, principalmente porque estes linfócitos T $CD4^+CD8^+$ não correspondem a células que deixaram o timo prematuramente. Esta subpopulação citotóxica pode responder por parte do dano causado ao SNC durante a evolução da EAE e pode ter papel importante no início da doença, principalmente na quebra da BHE e na geração de dano inicial mediado por linfócitos T $CD4^+$.

Tendo em vista a importância dos fatores de transcrição ThPok e Runx3 para a diferenciação nos subtipos simples positivos durante o desenvolvimento no timo, eles poderiam explicar, ao menos em parte, esta diferenciação na periferia. Um fato interessante é que a expressão de ThPok manteve-se constante entre as amostras de diferentes órgãos e dias. Em contrapartida, concomitantemente ao aumento da expressão de CD8, também houve um aumento da expressão de Runx3. A literatura mostra que no timo, durante a maturação de linfócitos, o Runx3 se liga na região licenciadora do ThPok suprimindo a expressão desse gene(LUCKEY et al., 2014). No entanto, parece ser possível a expressão conjunta dos dois fatores em linfócitos maduros,

o que corrobora com os nosso dados(REIS et al., 2013). Runx3 é responsável por levar à transcrição de Eomes que, por sua vez, leva ao fenótipo pró-inflamatório e citotóxico. Por estes motivos, é provável que o mecanismo pelo qual a célula passa a tornar-se duplo positiva na periferia assemelhe-se àquele observado no timo. O fato de isto ser observado principalmente nas células IFNγ$^+$ reforça as semelhanças entre os fatores de transcrição associados a estes fenótipos.

As células duplos positivas produzem elevadas quantidades de moléculas citotóxicas quando comparada com as células T CD4$^+$ (dados não apresentados). Como não foi avaliada a capacidade citotóxica destas células, ainda não conseguimos dizer se este perfil citotóxico tem importância para a geração ou manutenção da doença. Também não é possível saber se a molécula de CD8 presente nestas células possui importância funcional. Apesar de as chances de conformação similar entre os antígenos apresentados via MHC de classe I e de classe II serem baixas, a presença de CD8 poderia promover um novo tipo de interação citotóxica para os linfócitos T CD4$^+$ ao permitir o reconhecimento via MHC de classe I. Desta forma, estas células poderiam mediar diretamente o dano aos oligodendrócitos de maneira contato-dependente, sem depender da apresentação por MHC de classe II, que é pobre nestas células. Por outro lado, estas células poderiam fazer parte de um mecanismo fisiológico de homeostase. A expressão de Klrg1, um marcador de células efetoras de curta duração, pode indicar que estas células em breve entrarão em apoptose, reduzindo os efeitos danosos ao SNC.

6.REFERÊNCIAS

BALASHOV, K. E. et al. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 2, p. 599–603, 21 jan. 1997.

BARTHOLOMÄUS, I. et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. **Nature**, v. 462, n. 7269, p. 94–98, 5 nov. 2009.

BAXTER, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 11, p. 904–912, nov. 2007.

BELL, C. et al. Cost-effectiveness of four immunomodulatory therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis: a Markov model based on long-term clinical data. **Journal of managed care pharmacy : JMCP**, v. 13, n. 3, p. 245–261, abr. 2007.

BEN-NUN, A.; WEKERLE, H.; COHEN, I. R. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. **Eur J Immunol**, v. 11, n. 3, p. 195–199, mar. 1981.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 11 maio 2006.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051–1057, 19 jun. 2008.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 652–657, dez. 2007.

BILIC, I.; ELLMEIER, W. The role of BTB domain-containing zinc finger proteins in T cell development and function. **Immunol Lett**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 15 jan. 2007.

CELLA, M. et al. Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK Cell Cytotoxicity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 6, p. 817-823, 20 set.

2004

CHEROUTRE, H.; HUSAIN, M. M. CD4 CTL: Living up to the challenge. **Seminars in immunology**, 2013.

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet**, v. 359, n. 9313, p. 1221–1231, 6 abr. 2002.

CRUZ-GUILLOTY, F. et al. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 51–59, 16 jan. 2009.

CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 13 fev. 2003.

DARDALHON, V. et al. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. **J Autoimmun**, v. 31, n. 3, p. 252–256, nov. 2008.

EGAWA, T.; LITTMAN, D. R. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. **Nature Immunology**, v. 9, n. 10, p. 1131–1139, 1 out. 2008.

FARIAS, A. S. et al. Nitric oxide and TNFalpha effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 1, p. 32–38, 2007.

FARIAS, A. S. et al. Regulatory T Cell Induction during Plasmodium chabaudi Infection Modifies the Clinical Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17849, 25 mar. 2011.

FARIAS, A. S. et al. Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 269–277, abr. 2013.

FERBER, I. A. et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **J Immunol**, v. 156, n. 1,

p. 5–7, 1 jan. 1996.

FRANCELIN, C. et al. Effects of Plasmodium berghei on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4(+)CD8(+) thymocytes in experimentally infected mice. **Immunobiology**, v. 216, n. 10, p. 1148–1154, out. 2011.

FRIESE, M. A.; FUGGER, L. Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 2, p. 132–141, 1 ago. 2009.

GRAN, B. et al. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. **The Journal of Immunology,** v. 169, n.12, p. 7104-7110, 15 dez. 2002.

HAFLER, D. A. et al. Multiple sclerosis. **Immunol Rev**, v. 204, n. 1, p. 208–231, abr. 2005.

HARTUNG, E. et al. Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1. The Journal of Immunology, v.194, n.3, p. 1069-1079, 01 fev. 2015.

HAUSER, S. L.; OKSENBERG, J. R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 61–76, 5 out. 2006.

HE, X. et al. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. **Nature**, 2005.

HEREMANS, H. et al. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 10, p. 2393–2398, out. 1996.

HIROTA, K. et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 255–263, mar. 2011.

HOFSTETTER, H. H. et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, v. 237, n. 2, p. 123–

130, out. 2005.

INTLEKOFER, A. M. et al. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 408–411, 18 jul. 2008.

JEROLD CHUN, H.-P. H. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. **Clinical neuropharmacology**, v. 33, n. 2, p. 91–101, mar. 2010.

JIANG, H.; ZHANG, S.-L.; PERNIS, B. Role of CD8+ T Cells in Murine Experimental Allergic Encephalomyelitis. Science, v. 256, n. 5060, p. 1213–1215, 22 maio 1992.

JUREWICZ, A. et al. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. **Brain**, v. 128, n. Pt 11, p. 2675–2688, nov. 2005.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173–1175, out. 2007.

KHOURY, S. J.; HANCOCK, W. W.; WEINER, H. L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 5, p. 1355–1364, 1 nov. 1992.

KIESEIER, B. C. et al. Immunomodulatory treatment strategies in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 255 Suppl 6, n. S6, p. 15–21, dez. 2008.

KOH, D.-R. et al. Less Mortality but More Relapses in Experimental Allergic Encephalomyelitis in CD8-/- Mice. **Science**, v. 256, n. 5060, p. 1210–1213, 22 maio 1992.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 566–573, 1 jul. 2006.

KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17

cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484–487, 26 jul. 2007a.

KORN, T. et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. **Seminars Immunol**, v. 19, n. 6, p. 362–371, dez. 2007b.

KRZEWSKI, K. et al. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. **Blood**, v.121, n. 23, p. 4672-4683, 6 jun. 2013.

KUCHROO, V. K. et al. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 8, p. 4371–4382, 15 out. 1993.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 17 jan. 2005.

LEPLETIER, A. et al. Trypanosoma cruzi disrupts thymic homeostasis by altering intrathymic and systemic stress-related endocrine circuitries. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2470, nov. 2013.

LIBLAU, R. S.; SINGER, S. M.; MCDEVITT, H. O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. **Immunology today**, v. 16, n. 1, p. 34–38, jan. 1995.

LOPEZ, J. A. et al. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. **Blood**, v. 121, n. 14, p. 2659–2668, 4 abr. 2013.

LUBLIN, F. History of modern multiple sclerosis therapy. **Journal of Neurology**, v. 252 Suppl 3, n. S3, p. iii3–iii9, set. 2005.

LUCKEY, M. A. et al. The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4(+) lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. **Nat Immunol**, v. 15, n. 7, p. 638–645, jul. 2014.

MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 913–919, set. 2007.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n. 1, p. 145–173, 1989.

MUCIDA, D. et al. Transcriptional reprogramming of mature CD4+ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. **Nature Immunology**, v. 14, n. 3, p. 281–289, 1 mar. 2013.

NIINO, M. et al. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 59, n. 5, p. 748–754, maio 2006.

NYLANDER, A.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1180–1188, abr. 2012.

O'CONNOR, R. A. et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3750–3754, 15 set. 2008.

OZDEMIRLI, M. et al. The cytotoxic process of CD4 Th1 clones. **J Immunol**, v. 149, n. 6, p. 1889–1895, 15 set. 1992.

PANITCH, H. S. et al. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. **Neurology**, v. 37, n. 7, p. 1097–1102, jul. 1987.

PATERSON, P. Y. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. **The Journal of experimental medicine**, p. 119–143, 1960.

PEARCE, E. L. et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 1041–1043, 7 nov. 2003.

PINO, P. A.; CARDONA, A. E. Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using

percoll gradients. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 48, 2011.

PRADELLA, F. et al. Granulocyte-colony-stimulating factor treatment enhances Foxp3(+) T lymphocytes and modifies the proinflammatory response in experimental autoimmune neuritis. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 19, n. 7, p. 529–532, jul. 2013.

QUI, H. Z. et al. CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 7, p. 3555–3564, 1 out. 2011.

REIS, B. S. et al. Mutual expression of the transcription factors Runx3 and ThPOK regulates intestinal $CD4^+$ T cell immunity. **Nat Immunol**, v. 14, n. 3, p. 271–280, mar. 2013.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; BERRY, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **Journal of Experimental Medicine**, v. 58, n. 1, p. 39–53, 1933.

SEGAL, B. M.; SHEVACH, E. M. IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 771–775, 1 ago. 1996.

SELMAJ, K. et al. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. **J Immunol**, v. 147, n. 5, p. 1522–1529, 1 set. 1991.

SETOGUCHI, R. et al. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. **Science**, 2008.

SMANIOTTO, S. et al. Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 3005–3017, jul. 2005.

ST ROSE, M.-C. et al. CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN-γ maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. **Immunology and cell biology**, v. 91, n. 2, p. 173–183, fev. 2013.

STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 60, n. 1, p. 12–21, jul. 2006.

TANAKA, H.; TANIUCHI, I. The CD4/CD8 lineages: central decisions and peripheral modifications for T lymphocytes. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 373, n. Chapter 323, p. 113–129, 2014.

TANIUCHI, I. et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. **Cell**, v. 111, n. 5, p. 621–633, 27 nov. 2002.

VELDHOEN, M.; SEDDON, B. Empowering T helper 17 cells in autoimmunity. **Nature Medicine**, v. 16, n. 2, p. 166–168, fev. 2010.

VONGLEHN, F. et al. **Multiple Sclerosis: An Overview.** Traducao. 1. ed. [s.l.] BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2014. v. 1p. 223–250

WANG, L. et al. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 10, p. 1122–1130, out. 2008.

WANG, L.; BOSSELUT, R. CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 5, p. 2903–2910, 1 set. 2009.

WILLENBORG, D. O. et al. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 157, n. 8, p. 3223–3227, 15 out. 1996.

YANG, L. et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. **Nature**, v. 454, n. 7202, p. 350–352, 17 jul. 2008.

ZHANG, G.-X. et al. Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response by APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 171, n. 9, p. 4485–4492, 1 nov. 2003.

7.APÊNDICE

Letter

ENCEPHALITOGENIC T CD4+ CELLS BUILD A CYTOTOXIC PROFILE DURING THE EVOLUTION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS AND BECOME CD8αβ+

Guilherme A. D. Morais[1]*, Fernando Pradella[1]*, Carolina Francelin[1], Vinicius O. Boldrini[2], Evelise S. M. Fonseca[1], Ana Leda F. Longhini[1,2], Adriel S. Moraes[2], Michele Rocha-Parise[1], Gleidy A. Silva[1,3], Alliny C. Dionete[2], Felipe von Glehn[2], Alfredo Damasceno[3], Benito P. Damasceno[3], Leonilda M. B. Santos[2] and Alessandro S. Farias[1,2]

[1]Neuroimmunomodulation Group, University of Campinas - Campinas - Brazil
[2]Neuroimmunology Unity - University of Campinas - Campinas - Brazil
[3]Departament of Neurology - University of Campinas - Campinas - Brazil

Correspondence should be addressed to A.S.F. (asfarias@unicamp.br)
*These authors contributed equally to this work

Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) serves as experimental model of multiple scleoris (MS) since both diseases share clinical and histopathological similarities. EAE is a $CD4^+$ T cell-mediated autoimmune disease(BEN-NUN; WEKERLE; COHEN, 1981; PATERSON, 1960). Although is clear that enchephalitogenic $CD4^+$ T presents a proinflammatory activity, how these T helper cells are able to exert effector role during the clinical phase of the disease is not completely elucidated. Some evidences have indicated that $CD4^+$ T lymphocytes may present a cytotoxic profile under special conditions. Therefore, here we evaluated the cytotoxic activity of $CD4^+$ T lymphocytes during the evolution of EAE and in MS patients. We observed that $CD4^+$ T lymphocytes present an increasing cytotoxic activity during the evolution of the disease. Moreover this cytotoxic profile is prominent in the peak of the disease and in encephalitogenic clones ($V\beta11^+$). Interesting, these encephalitogenic clones not only presents a $CD8^+$-like activity but also start to express the CD8α and β molecules. Furthermore peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis (MS) patients also present a cytotoxic profile in comparison with healthy controls. Yet, we observed an increased percentage of CD4+CD8+ T cells in the cerebral-spinal fluid from MS patients during relapse. These data indicate that encephalitogenic CD4+ T cells build a cytotoxic profile during the evolution of the autoagressive response in an antigen specific-mediated manner. This cytotoxic activity would explain, at least in part, the effector mechanism of these helper cells during the inflammatory process in EAE and MS.

EAE has been described as a $CD4^+$ T lymphocyte-mediated autoimmune disease a long time ago (BEN-NUN; WEKERLE; COHEN, 1981; PATERSON, 1960; SCHLUESENER; WEKERLE, 1985). The encephalitogenic CD4+ T lymphocytes breach endothelial blood-brain barrier (BBB) invading the CNS to initiate the disease(WEKERLE, 1993). EAE was first described as a Th1-mediated pathology (DAS et al., 1997; KUCHROO et al., 1993; SEGAL; DWYER; SHEVACH, 1998). However it seems that Th1 is not essential for the development of the disease(BECHER; DURELL; NOELLE, 2002; FERBER et al., 1996). Instead, Th17 appears as the new pivotal T helper subtype for the autoagreesive response of EAE and other organ specific autoimmune diseases(CUA et al., 2003; YOSEF et al., 2013). Currently, it seems that IFNγ and IL-17A-producing T cells work in a synergetic manner during the evolution of EAE and MS(GOVERMAN, 2009; HIROTA et al., 2011; O'CONNOR et al., 2008). However, how these T helper cells are able to exert effector role during the clinical phase of the disease is not completely elucidated. Interesting, a classical studies have shown that Th1 clones may present a cytotoxic activity like $CD8^+$ T lymphocytes(KUCHROO et al., 1993; OZDEMIRLI et al., 1992). Moreover, recent evidences have indicated that encephalitogenic $CD4^+$ T cells are able to express granzyme B (GzmB) which is essential to breach the blood brain barrier (BBB)(KEBIR et al., 2007). However, our data show higher expression of GzmB in CNS tissue during the clinical phase of the disease **(Fig. s1).** Therefore, in the present study we evaluated the cytotoxic and inflammatory activity of $CD4^+$ T cells during the EAE evolution (**Supplementary Methods**). qPCR analysis shows that $CD4^+$ T lymphocytes sorted from CNS present a higher expression of cytotoxic-related molecules in comparison with $CD4^+$ T lymphocytes from lymph nodes. In general, considering inflammatory and cytotoxic-related molecules, $CD4^+$ T cells from the CNS show a prominent activity (**Fig. 1a, Fig. 1b**). Flow cytometry analysis data corroborates with our finds in qPCR (**Fig. 1c**). Interestingly, $CD4^+V\beta11^+$ T cells show an up regulation of Eomes, GzmB in comparison with $CD4^+V\beta11^-$ T cells (**Fig. 1d**).

The cytotoxic activity of $CD4^+$ T cells in EAE has been related to the Th17 subset(KEBIR et al., 2007). Therefore, we used IFNγ and IL-17A reporter mice to evaluate the cytotoxic-related molecules in IFNγ and IL-17A-producing T cells (**Supplementary Methods**). Our results show a higher percentage of $CD4^+$ T cells expressing IFNγ than

IL-17A infiltrated into the CNS (**Fig. 1E**) The mRNA expression analysis of IFNγ and IL-17A-producing cells shows that IFNγ-producing cells present a higher expression in all cytotoxic-related molecules (**Fig. 1f**). Interestingly, $CD4^+$ T IFNγ-producing cells present higher expression of RORα, RORγt and IL-17A (**Fig. 1f**). Recently, it has been shown using fate-reported mice that, after reaching the CNS, $CD4^+$ T cells shut down IL-17A and start to produce IFNγ. During this process, these cells present an intermediary profile with the expression of IFNγ and IL-17A(HIROTA et al., 2011). In order to evaluate the relationship between the cytotoxic profile and the transition of IL-17A to IFNγ-producing cells profile we generated double reporter ($IFN\gamma^{ygp}IL\text{-}17a^{gfp}$) mice. Indeed, $IL17A^+IFN\gamma^+$ and $IL17A^-IFN\gamma^+$ CD4 T cells present a higher expression of cytotoxic-related molecules in comparison with $IL17A^+IFN\gamma^-$-producing cells.

Surprisingly, we found that a part of $CD4^+$ T cell infiltrated in the CNS also express the molecule CD8 (**Fig 2a**). The presence of immature double positive (DP) T cells ($CD4^+CD8^+$) in the periphery has been described in some special conditions(BONOMO; KEHN; SHEVACH, 1994). In order to evaluate the possibility of these DP cells had been prematurely released from thymus during the inflammatory process of the disease. In order to evaluate this possibility we have performed intra-thymic FITC injection(**Supplementary Methods**). Our results show that only a very small percentage of DP cells are $FITC^+$ (**Fig. 2b**). So, apparently DP cells are resulting from mature CD4+ T lymphocytes. In order to confirm that, we injected CD4+CD8- T cells previously stimulated with $MOG_{35\text{-}55}$ from GFP mice into $RAG^{-/-}$ mice. Our results show that a percentage of GFP^+ are expressing $CD8^+$ as well (**Fig. 2c**). Interestingly, monophonic EAE induced by adoptive transfer of GFP^+ T_{MBP} cells in Lewis rats also show a percentage of DP cells after reach the CNS (**Fig. 2d).** Although fate cell determination of $CD4^+$ helper or $CD8^+$ cytotoxic T cells takes place in the thymus during the maturation process, in some cases, under special conditions, it is possible that $CD4^+$ T cells start expressing CD8 molecule after its differentiation(MUCIDA et al., 2013).

In most of these cases these DP T cells present a cytotoxic activity as well(MUCIDA et al., 2013). Indeed, these DP T cells present higher expression of Eomes, GzmB, Lamp1 compared with single $CD4^+$ T cells (**Fig. 2e**). Interestingly, the expression of GzmB by those cells are comparable to the expression of single $CD8^+$ T cells also

infiltrated in the CNS (**Fig. 2f**) Moreover, DP T cells infiltrated in the CNS only express IFNγ and none IL-17A (**Fig. 2g**). In this context, the inflammatory milieu in the CNS could be inducing this “ectopic" expression of CD8 molecules in T helper cells. Surprisingly, almost all DP T cells are Vβ11$^+$ (**Fig. 2h**). It appears that the process is restrict to encephalitogenic clones and are derived upon TCR stimulation.

Aiming to translate these results to Multiple Sclerosis (MS), we analyzed the expression of GzmB in CD4$^+$ T lymphocytes from peripheral blood of relapse-remitting MS patients. Although all patients were under immunomodulatory therapy (**Supplementary Methods**), we found a significant increased percentage of CD4$^+$GzmB$^+$ T cells in relation to healthy controls (**Fig. 3a**). Our results indicated that CD4+ cells during EAE development or from MS patient, behavior like a CD8+ T lymphocytes as well. Impressively, we have also found an increased percentage of DP T cells in the cerebral-spinal fluid of MS patients during relapse in comparison with healthy controls or MS patients in clinical remission (**Fig. 3b**).

Taking together, it seems that during the evolution of EAE encephalitogenic CD4$^+$ T cells build a cytotoxic profile upon TCR stimulation. This cytotoxic profile is important first to open the BBB(KEBIR et al., 2007). However, after entry in the CNS these encephalitogenic CD4$^+$ T cells up regulate cytotoxic activity, probable by local antigen presentation(BARTHOLOMÄUS et al., 2009). Although we need more data to confirm, it seems that the same mechanisms responsible for the cytotoxic activity are inducing the expression of CD8 in the CD4+ encephalitogenic T cells. In our view, after the encefalitogenic CD4+ T cells entry into the CNS the local presentation combined with the CNS milieu trigger a special effector mechanism on these encephalitogenic cells.

METHODS SUMMARY

Animals. six to eight weeks old female C57BL/6^{WT}, GFP^{het}, IFNγ^{yfp}, IL-17A^{gfp}, Rag1$^{-/-}$, were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and established as a colony at the University of Campinas Breeding Center, where they were housed and maintained under pathogen-free conditions in the university animal facility. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care and approved by the University Committee for Ethical Animal Experimentation (CEEA/UNICAMP #2038-1).

Experimental autoimmune encephalomyelitis model. Mice were immunized subcutaneously with 150 µg of MOG_{35-55} in complete Freud's adjuvant (CFA), and heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* and with intraperitoneal injection of Bordatella pertussis toxin.

Quantitative PCR. mRNA was extracted using Trizol and reverse transcribed to cDNA. TaqMan analysis was performed using a TaqMan ABI Prism 7500 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). mRNA was normalized to that of a housekeeping gene (GAPDH). The data were obtained by independent duplicate measurements. The threshold cycle value of the individual measurements did not exceed 0.5 amplification cycles.

***In vivo* cell transfer.** 1x10^6 TCRαβ$^+$CD4$^+$CD8$^-$ sorted cells from GFP^{het} mice were injected i.p. in Rag1$^{-/-}$ mice 4 weeks prior immunization.

Flow cytometry and cell sorting. Flow cytometry data were acquired on an Gallios (Becton Dickinson) and were analyzed with FlowJo software (TreeStar). A Foxp3 Mouse Regulatory T cell Staining Kit (eBioscience) was used for intracellular staining of Eomes, Lamp1 and granzyme B. Cell sorting were realized on an FACS Aria cutometry (BD bioscience).

Author Contributions G.A.D.M. and F.P. performed most of the experiments. C.F.R. performed intratymic injection and flow cytometry experiments. E.S.M.F. performed cell transfer experiments. V.O.B., A.S.M. and A.C.D. performed the flow cytometry analysis with MS patients. M.R-P, F.S.S and A.L.F.L. performed CNS cell sorting. V.vG. A.D. and B.P.D. selected the patients. A.S.F. coordinated the experimental work. A.S.F. and L.M.B.S. designed the study and wrote the manuscript with inputs from co-authors.

REFERENCES

BARTHOLOMÄUS, I. et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. **Nature**, v. 462, n. 7269, p. 94–98, 5 nov. 2009.

BECHER, B.; DURELL, B. G.; NOELLE, R. J. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 4, p. 493–497, ago. 2002.

BEN-NUN, A.; WEKERLE, H.; COHEN, I. R. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. **Eur J Immunol**, v. 11, n. 3, p. 195–199, mar. 1981.

BONOMO, A.; KEHN, P. J.; SHEVACH, E. M. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. **J Immunol**, v. 152, n. 4, p. 1509–1514, 15 fev. 1994.

CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 13 fev. 2003.

DAS, M. P. et al. Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein. **The**

Journal of experimental medicine, v. 186, n. 6, p. 867–876, 15 set. 1997.

FERBER, I. A. et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **J Immunol**, v. 156, n. 1, p. 5–7, 1 jan. 1996.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393–407, jun. 2009.

HIROTA, K. et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 255–263, mar. 2011.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173–1175, out. 2007.

KUCHROO, V. K. et al. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 151, n. 8, p. 4371–4382, 15 out. 1993.

MUCIDA, D. et al. Transcriptional reprogramming of mature CD4+ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. **Nature Immunology**, v. 14, n. 3, p. 281–289, 1 mar. 2013.

O'CONNOR, R. A. et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3750–3754, 15 set. 2008.

OZDEMIRLI, M. et al. The cytotoxic process of CD4 Th1 clones. **J Immunol**, v. 149, n. 6, p. 1889–1895, 15 set. 1992.

PATERSON, P. Y. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. **The Journal of experimental medicine**, p. 119–143, 1960.

SCHLUESENER, H. J.; WEKERLE, H. Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing

the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. **J Immunol**, v. 135, n. 5, p. 3128–3133, nov. 1985.

SEGAL, B. M.; DWYER, B. K.; SHEVACH, E. M. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 4, p. 537–546, 16 fev. 1998.

WEKERLE, H. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. **Current opinion in Neurobiology**, 1993.

YOSEF, N. et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 461–468, 25 abr. 2013.

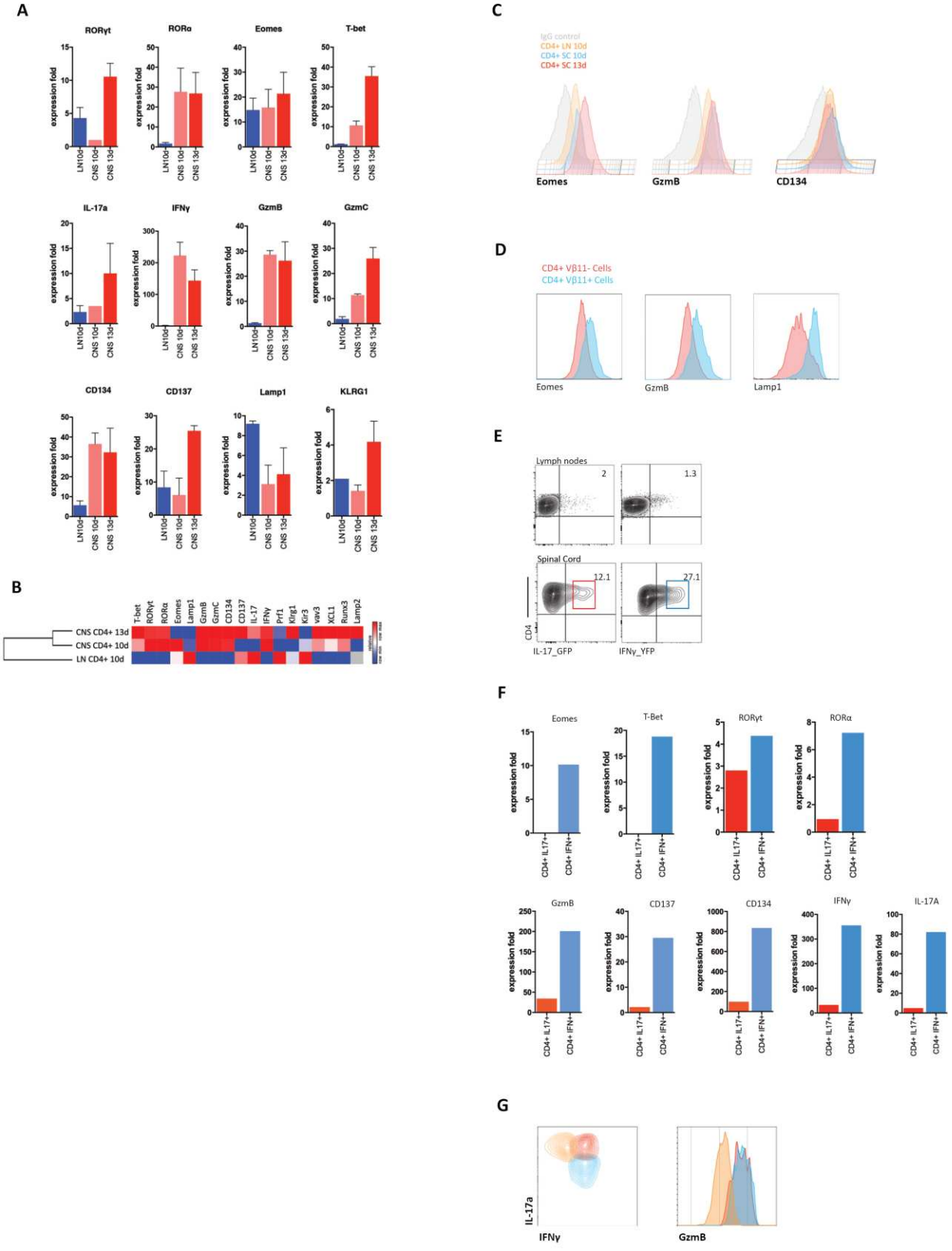

A
RORγt
RORα
Eomes
T-bet
IL-17a
IFNγ
GzmB
GzmC
CD134
CD137
Lamp1
KLRG1
expression fold
LN10d
CNS 10d
CNS 13d
B
T-bet
RORγt
RORα
Eomes
Lamp1
GzmB
GzmC
CD134
CD137
IL-17
IFNγ
Prf1
Klrg1
Kir3
vav3
XCL1
Runx3
Lamp2
CNS CD4+ 13d
CNS CD4+ 10d
LN CD4+ 10d
C
IgG control
CD4+ LN 10d
CD4+ SC 10d
CD4+ SC 13d
Eomes
GzmB
CD134
D
CD4+ Vβ11- Cells
CD4+ Vβ11+ Cells
Eomes
GzmB
Lamp1
E
Lymph nodes
2
1.3
Spinal Cord
12.1
27.1
CD4
IL-17_GFP
IFNγ_YFP
F
Eomes
T-Bet
RORγt
RORα
GzmB
CD137
CD134
IFNγ
IL-17A
expression fold
CD4+ IL17+
CD4+ IFN+
G
IL-17a
IFNγ
GzmB

Figure 1 – T CD4 lymphocytes profile during EAE evolution. A) Real time PCR analysis of proinflammatory and cytotoxic molecules in T CD4 lymphocytes found in lymphnodes at the beginning of clinical manifestation (LN10d) and infiltrated on CNS at the beginning (CNS10d) and peak (CNS13d) of the disease. **B)** Cluster analysis for the results observed in A. **C)** Eomes, GzmB and CD134 expression in lymphocytes by flow cytometry of lymphnodes and spinal cord 10 and 13 days after immunization. **D)** Flow cytometry analysis of Eomes, GzmB and Lamp1 in encephalitogenic lymphocytes, $CD4^{+}V\beta11^{+}$, compared with CNS infiltrated $CD4^{+}V\beta11^{-}$ lymphocytes. **E)** Flow cytometry of IL-17^{+} and IFNγ^{+} population respectively from IL-17_GFP and IFNγ_YFP animals for posterior cell sorting. **F)** Real time PCR for proinflammatory and cytotoxic molecules of IL-17 and IFNγ producing lymphocytes subpopulation. **G)** Flow cytometry analisys of GzmB production by different subpopulation of double positive IL-17^{+} IFNγ^{+} cells.

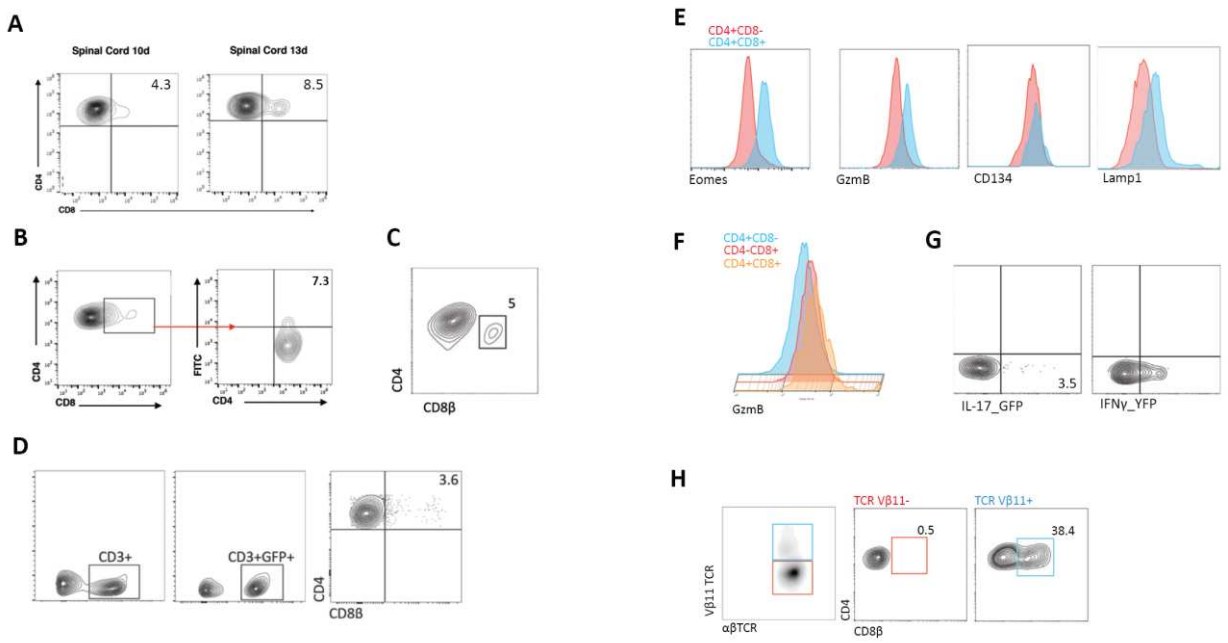


Figure 2 – Profile of CD4⁺CD8⁺ lymphocytes found in the CNS of animals with EAE. **A)** Flow cytometry analysis of CD4 and CD8 expression in lymphocytes infiltrated on the CSN 10 and 13 days after immunization, showing double-positive populations. **B)** FITC innoculation in previously immunized animals' thymus and flow cytometry analysis of celular populations that migrated to the lymphnodes. **C)** Adoptive transference of $CD4^+$ T lymphocytes from GFP mice to $RAG^{-/-}$ mice, followed by immunization of the receptor and flow cytometry analysis of transferred cells. **D)** Transference of GFP T $CD4^+$ MBP specific lymphocytes to Lewis rats and flow cytometry analysis of GFP populations originated since the transference. **E)** Eomes, GzmB, CD134 and Lamp1 expression by flow cytometry observed in mice single and double-positive subpopulations. **F)** Comparison of granzyme expression between T $CD4^+$, T $CD8^+$ and double positive population by flow cytometry. **G)** IL-17 and IFNγ production by double positive T cells by flow cytometry. **H)** Encephalitogenic potential on single and double-positive cell by means of Vβ11 expression, observed with flow cytometry.

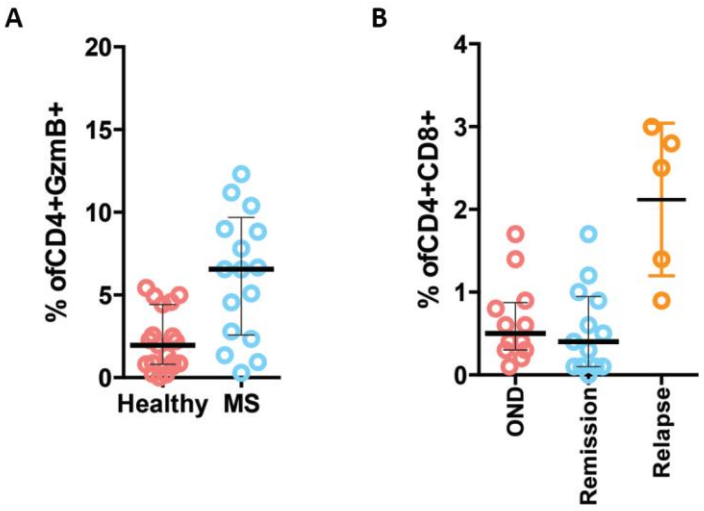
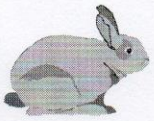


Figure 3 – MS CD4 T cells show similar profiles to EAE cells. A) Flow cytometry of granzyme producing $CD4^+$ T lymphocytes found on peripheral blood from MS patients. **B)** Flow cytometry of double positive lymphocytes found on cerebrospinal fluid of MS patients during relapse.

8.ANEXOS

UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O,

Certificamos que o projeto **"Analise da Expressão e Ação de Moléculas Citotóxicas nos Linfócitos T CD4+ Durante a Evolução da Encefalomielite Autoimune Experimental"** (protocolo nº **2474-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias / Guilherme Antonio Dutra Morais**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **04 de julho de 2011**.

Campinas, 22 de julho de 2015.

2ª VIA

Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Raquel Gomes Hatamoto
Secretária da Coordenadoria de Ações Internacionais CAIn-IB/UNICAMP - Matr. 304902

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Células TCD4 encefalitogênicas constroem um perfil citotoxico durante a evolução da Encefalomielite Experimental Autoimune e tornam-se CD8αβ+.**, não infringem os dispositivos da Lei n.° 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de Julho de 2015

Assinatura : _____
Nome do(a) autor(a): **Guilherme Antonio Dutra Morais**
RG n.° 35292527-9

Assinatura : _____
Nome do(a) orientador(a): **Alessandro Santos Farias**
RG n.° 35501186-4

Alessandro S. Farias PhD
Depto. Genética, Evolução e Bioagentes
IB - UNICAMP
(19) 3521.6263 | 6714