

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Expressão, caracterização e sinalização da citocina  
recombinante IL-17A de *Bos taurus***

**Vitória Sequeira Gonçalves**

Pelotas, 2018

**Vitória Sequeira Gonçalves**

**Expressão, caracterização e sinalização da citocina recombinante IL-17A de  
*Bos taurus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

**Orientador:** Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

**Coorientador:** Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

G635e Gonçalves, Vitória Sequeira

Expressão, caracterização e sinalização da citocina recombinante il-17a de bos taurus / Vitória Sequeira Gonçalves ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Rodrigo Casquero Cunha, coorientador. — Pelotas, 2018.

74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Interleucina 17a. 2. Citocina. 3. Bos taurus. 4. Proteína recombinante. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Cunha, Rodrigo Casquero, coorient. III. Título.

CDD : 574.19245

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Universidade Federal de Pelotas – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Isabel Brayer Pereira

Universidade Federal de Pelotas – Instituto de Biologia

Prof Dr. Alan John Alexander McBride

Universidade Federal de Pelotas – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Aos meu pais, com toda gratidão e amor.

Dedico.

## **Agradecimentos**

A Deus em primeiro lugar, pela saúde, força e paz que me deu em tantos momentos em que precisei Dele.

Aos meus pais, João Arthur e Marta, pelo suporte, incentivo e principalmente pela confiança que a tanto tempo me é dada.

Ao meu irmão, Arthur, grande amigo, incentivador e fonte de segurança.

Ao meu namorado, Vinicius, que é meu companheiro e tem sido meu apoio em todos momentos importantes, de maneira especial nestes dois anos de mestrado.

A toda minha família, em especial as minhas avós, Zilda e Ely, pelo carinho e compreensão em todas as horas.

Ao meu orientador Professor Fábio Leivas Leite, que há tantos anos me proporciona ensinamentos e auxílio para a realização de todos os trabalhos.

Ao meu co-orientador, Rodrigo Cunha, por todo o suporte durante a realização do trabalho.

Aos meus colegas e amigos da “Equipe Lab. 4” (laboratório de Microbiologia), por toda ajuda, apoio, companheirismo e principalmente amizade.

A dois grandes amigos, colegas e incentivadores, Alceu e Denis, por terem abraçado este trabalho junto comigo.

Aos colegas e amigos do laboratório XI da Parasitologia, por toda ajuda e parceria.

Aos meus amigos, que estiveram presentes nestes anos, incentivando e sendo compreensivos em todos os momentos.

A toda equipe da Biotecnologia, secretárias, professores, funcionários e alunos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

**“Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode não ser o bastante. Dê o  
melhor de você assim mesmo”**

Madre Teresa de Calcutá

## Resumo

GONÇALVES, Vitória Sequeira. **Expressão, caracterização e sinalização da citocina recombinante IL-17A de *Bos taurus***. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A interleucina 17A de *Bos taurus* é uma citocina altamente pró-inflamatória, que atua principalmente na defesa do organismo do hospedeiro contra infecções bacterianas extracelulares, fúngicas e víricas. Sua ação inflamatória é decorrente da sinalização para expressão de outras citocinas pró-inflamatórias que geram um alto nível de recrutamento de células polimorfonucleares para o sítio de infecção. A expressão de proteínas recombinantes utilizando cepas de *Escherichia coli* é uma técnica mundialmente utilizada para a obtenção de produtos com aplicabilidade biotecnológica. O objetivo do trabalho foi a expressão, caracterização e avaliação da sinalização da rIL-17A de *Bos taurus*. Foi realizada a clonagem utilizando vetor pAE, e a expressão realizada em cepa Rosetta™. A proteína foi expressa com peso molecular esperado de aproximadamente 15 kDa, e sua caracterização foi realizada pela técnica de *Western Blot* utilizando anticorpo monoclonal (mAB) anti-6xHis. Esplenócitos de camundongo e bovinos, células mononucleares do sangue periférico de bovinos (PBMCs) e células de linhagem do rim bovino (MDBK), foram estimuladas com 10µg de rIL-17A e cultivadas por 24 horas. As células foram coletadas e o mRNA extraído para a síntese de cDNA. Esse material foi utilizado para a avaliação da sinalização da proteína recombinante, através da detecção dos níveis de transcrição do mRNA de IL-17, IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-2, realizado pela técnica de qPCR. A rIL-17A mostrou que não gerou efeito tóxico nas células e manteve sua atividade biologicamente ativa, elevando os níveis de transcrição de IL-17 em todas as células estimuladas. Também pode-se observar uma resposta de controle do sistema imune, visto que os níveis de transcrição de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-2 também foram elevados, embora de maneira bem mais discreta. Ainda são necessários mais estudos para que se possa estabelecer a rIL-17A como um potencial adjuvante vacinal para bovinos e outras espécies.

**Palavras-chave:** Interleucina 17, Expressão em *Escherichia coli*, *Bos taurus*, proteína recombinante.

## Abstract

Gonçalves, Vitória Sequeira. **Expression, characterization and signaling of *Bos taurus* recombinant cytokine IL-17A**. 2018. 75f. Dissertação (Master Degree) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

*Bos taurus* interleukin 17A is a highly proinflammatory cytokine, which acts primarily in the host defense to e extracellular bacteria, fungal and viral infections. Its inflammatory action is mainly through signaling of expression of other proinflammatory cytokines that generate a high level of recruitment of polymorphonuclear to the site of infection. The use of *Escherichia coli* for protein expression for biotechnology purpose is well known worldwide. The aim of this study was to express, characterize and evaluate the biological activity of *Bos taurus* rIL-17A. Cloning was performed using pAE vector, and a *E. coli* Rosetta™ for expression. The protein was expressed as expected molecular weight of ~ 15 kDa, and its characterization was performed by Western Blot using anti-6xHis monoclonal antibody (mAB). Mouse and bovine splenocytes, bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the lineage cell bovine kidney cells (MDBK) were stimulated with 10µg of rIL-17A and cultured for 24 hours. The cells were collected, and total mRNA extracted for cDNA synthesis. This material was used to evaluate recombinant protein signaling through the detection of transcription levels for IL-17, IFNγ, IL-4 and IL-2 mRNA by the qPCR technique. Recombinant IL-17A showed no toxic effect on cells and maintained its biologically activity, by elevating IL-17 transcription levels in all stimulated cells. An immune system response can also be observed, since the transcription levels of IFNγ, IL-4 and IL-2 have been also elevated, although in a much more discrete manner. Further studies are needed to establish a rIL-17A as a potential vaccine adjunct for cattle and other species.

**Keywords:** Interleukin 17, Expression in *Escherichia coli*, *Bos taurus*, recombinant protein.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> BLAST .....	36
<b>Figura 2:</b> Gene da IL-17A. ....	43
<b>Figura 3:</b> Eletroforese em gel de agarose 1%. Produto de amplificação pela reação de PCR das diferentes concentrações de cDNA e temperaturas de anelamento.. ...	45
<b>Figura 4:</b> Eletroforese em gel de agarose de 1% - extração plasmídial. ....	45
<b>Figura 5:</b> Eletroforese em gel de agarose 1% - confirmação dos clones pAE/IL-17A .....	46
<b>Figura 6:</b> Eletroforese em gel de agarose de 1% - digestão do fragmento de IL-17 com <i>KpnI</i> . ....	47
<b>Figura 7:</b> SDS-PAGE 15% - Expressão .....	48
<b>Figura 8:</b> SDS-PAGE 15% - Purificação .....	49
<b>Figura 9:</b> Membrana de nitrocelulose – <i>Western Blot</i> .....	50
<b>Figura 10:</b> Transcrição relativa de mRNA de IL-17 .....	51
<b>Figura 11:</b> Transcrição relativa de mRNA de INF $\gamma$ .....	52
<b>Figura 12:</b> Transcrição relativa de mRNA de IL-4.....	52
<b>Figura 13:</b> Transcrição relativa de mRNA de IL-2 .....	53
<b>Figura 14:</b> Resultados BLAST – <i>blastp suite- 2 sequences</i> .....	57

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Sequência e temperatura de melting dos <i>primers</i> utilizados na reação de qPCR para células de origem bovinas .....	42
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos oligo iniciadores utilizados para obter a sequência da IL-17A .....	44

## Lista de Abreviaturas

AMPs – Proteínas antimicrobianas

APCs – *Antigen-presenting Cells* (Células apresentadoras de antígenos)

BCR – Receptor de célula B

BTB – Tuberculose bovina

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local)

C-CSF - *colony stimulating factor 1* (Fator estimulador de colônia)

CD16 – *Cluster of Differentiation 16* (Grupo de diferenciação 16)

CD3 – *Cluster of Differentiation 3* (Grupo de diferenciação 3)

CD4 - *Cluster of Differentiation 4* (Grupo de diferenciação 4)

CD8 - *Cluster of Differentiation 8* (Grupo de diferenciação 8)

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CDTec – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

ConcA – Concanavalina A

Ct - *Cycle threshold* (Limiar de ciclo)

D.O. – Densidade óptica

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoadsorção enzimática)

G-CSF - *Granulocyte-colony stimulating factor* (Fator estimulador de colônias de granulócitos)

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos)

IFN $\gamma$  – Interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 – Interleucina 1 (citocina 1)

IL-10 – Interleucina 10 (citocina 10)

IL-12 – Interleucina 12 (citocina 12)

IL-17 – Interleucina 17 (citocina 17)

IL-2 – Interleucina 2 (citocina 2)

IL-21 – Interleucina 21 (citocina 21)

IL-23 – Interleucina 23 (citocina 23)

IL-4 – Interleucina 4 (citocina 4)

IL-6 – Interleucina 6 (citocina 6)

IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

JAK2 – *Janus quinase 2*

LB – *Luria Bertani*

mAb – *Monoclonal antibody* (Anticorpo monoclonal)

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína quinase ativada por mitógeno)

MDBK - *Madin-Darby Bovine Kidney* (Madin-Darby rim bovino)

MHCI - *Major Histocompatibility Complex class I* (Complexo principal de histocompatibilidade classe I)

MHCII – *Major Histocompatibility Complex class II* (Complexo principal de histocompatibilidade classe II)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NK – *Natural Killer*

Pb – Pares de base

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell* (Célula mononuclear do sangue periférico)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina fosfatada)

PBS-T – *Phosphate Buffered Saline-Tween* (Solução salina fosfatada com Tween)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGE2 – Prostaglandina 2

qPCR - *Quantitative polymerase chain reaction* (Reação quantitativa em cadeia da polimerase)

rIL-17A – Interleucina 17A recombinante

RNA – Ácido ribonucleico

ROR - *Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor* (Receptor nuclear órfão relacionado com ácido retinóico)

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecilsulfato de sódio)

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Dodecilsulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida)

SFB – Soro Fetal Bovino

STAT - *Signal transducers and activators of transcription* (Transdutores de sinal e ativadores de transcrição)

Tc – Linfócito T citotóxico

TCR – Receptor de célula T

Tfh – Linfócitos T foliculares

TGF $\beta$  - *Transforming growth factor beta* (Fator de transformação de crescimento beta)

Th1 – Linfócito *T helper 1*

Th17 – Linfócito *T helper 17*

Th2 – Linfócito *T helper 2*

TNK – Linfócito *T Natural Killer*

Treg – Linfócitos T regulatórios

TYK2 – *Tirosine Kinase 2*

## Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1.	Sistema Imune .....	18
2.2.	Imunologia Adquirida.....	19
2.2.1.	Linfócitos .....	19
2.3.	Linfócitos Th17 .....	22
2.3.1.	Diferenciação de T CD4+ em Th17 .....	23
2.3.2.	Relação entre Th17 e Treg.....	26
2.3.3.	Funções efectoras das células Th17 na proteção e patogenia .....	28
2.4.	Família IL-17 .....	28
2.4.1.	Papel IL-17 .....	29
2.4.2.	IL-17 na resposta contra microrganismos extracelulares .....	32
2.4.3.	IL-17 na resposta contra microrganismos intracelulares .....	32
2.4.4.	Família de receptor IL-17.....	33
2.4.5.	IL-17 em bovinos .....	33
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS .....	35
3.1.	Hipótese .....	35
3.2.	Objetivo Geral .....	35
3.3.	Objetivos Específicos .....	35
4	CAPÍTULOS.....	36
4.1.	Materiais e Métodos .....	36
4.1.1.	Desenho <i>in silico</i> dos iniciadores.....	36
4.1.2.	Amplificação da sequência da IL-17A a partir de cDNA de esplenócitos bovinos.....	36
4.1.3.	Clonagem no plasmídeo pAE do gene IL-17A.....	37

4.1.4.	Seleção dos clones e confirmação da clonagem.....	38
4.1.5.	Expressão da rIL-17A.....	38
4.1.6.	Purificação da rIL-17A.....	39
4.1.7.	Caracterização da rIL-17A.....	40
4.1.8.	Cultivo celular.....	40
4.1.9.	Reação de qPCR (PCR quantitativo).....	41
4.1.10.	Análises estatísticas.....	42
4.2.	Resultados.....	43
4.2.1.	Construção dos iniciadores.....	43
4.2.2.	Amplificação da sequência da IL-17A a partir de cDNA de esplenócitos bovinos.....	44
4.2.3.	Clonagem e seleção dos clones.....	45
4.2.4.	Caracterização plasmidial.....	46
4.2.5.	Expressão da rIL-17A.....	47
4.2.6.	Purificação.....	48
4.2.7.	Caracterização da rIL-17A.....	49
4.2.8.	qPCR.....	50
4.3.	Discussão.....	53
5	PERSPECTIVAS.....	61
6	CONCLUSÃO GERAL.....	63
7	REFERÊNCIAS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção de proteínas recombinantes, revolucionou diversas áreas de estudo, mas principalmente a biotecnologia. A capacidade de expressar e purificar uma proteína de interesse em grande escala, permite a sua caracterização bioquímica, sua utilização em processos industriais e o desenvolvimento de bens comerciais (Rosano & Ceccarelli, 2014). Um dos principais avanços na engenharia genética estão relacionados ao desenvolvimento de novas estratégias de uso dos sistemas de expressão (Papaneophytou & Kontopidis, 2014). O sistema de expressão em *Escherichia coli* é altamente utilizado pelo fato de ter as questões que envolvem a expressão bem elucidadas, e os procedimentos da transformação serem relativamente simples (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Os linfócitos Th17 são a principal fonte de IL-17 no organismo (Park et al., 2005), e são responsáveis principalmente por fornecer proteção ao indivíduo contra infecções bacterianas extracelular, fúngicas, víricas e de parasitos (Sutherland et al., 2014; Zambrano-Zaragoza et al., 2014). As primeiras descrições dos linfócitos Th17, estavam relacionados ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, e foram necessárias outros estudos para demonstrar que microrganismos também eram capazes de induzir uma resposta Th17 (Infante-duarte et al., 2000). Para a diferenciação das linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens em linfócitos Th17, se inicia um processo no qual requer a participação de fatores, como as citocinas: TGF- $\beta$  (Mangan et al., 2006), IL-6 (Bettelli et al., 2006), IL-21 (Leonard et al., 2008) e IL-23 (Yannam et al., 2012), e o fator de transcrição *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR $\gamma$ t) que caracteriza os linfócitos Th17 (Bi & Yang, 2012).

As citocinas são as principais responsáveis pela comunicação celular. Sendo polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que podem variar entre 8 a 30kDa. Podem ser produzidas por células, tanto no local da lesão como por células do sistema imune, a partir de ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Essas proteínas são armazenadas na forma de moléculas pré-formadas, atuando principalmente de forma parácrina, autócrina e endócrina (Lin et al., 2000).

A família IL-17 possui 6 membros que participam de respostas inflamatórias e na patogenia de muitas doenças inflamatórias (Wattegedera et al., 2017). O principal



membro dessa família é a IL-17A (ou simplesmente chamada de IL-17), e mantém um alto nível de homologia com os outros membros da família, bem como entre outras espécies (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). Sua principal função é tida como o recrutamento de células polimorfonucleares, atuando na indução da inflamação e defesa do hospedeiro, e por isso é relatado que essa é uma citocina altamente pró-inflamatória (Song & Qian, 2013). Essa citocina é secretada por diferentes tipos de células (incluindo células do sistema imune inato), mas os linfócitos Th17 são a sua principal fonte (Gaffen et al., 2014). As células que produzem IL-17 também podem expressar TNF, IL-10, IL-22, entre outras, embora a expressão de cada citocina possa ser regulada separadamente (Dixon et al., 2016). Depois da ativação do receptor de IL-17 em linfócitos B, ocorre um processo em cascata resultando no aumento da retenção dos mesmos nos centros germinativos, aumentando a produção de anticorpos de alta afinidade (Trentini et al., 2016).

O presente trabalho teve como objetivo a produção de forma recombinante, utilizando a plataforma de expressão de *Escherichia coli*, a interleucina 17A (IL-17A) de *Bos taurus*. Caracterizá-la e testar sua atividade biológica como potencial produto biotecnológico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Sistema Imune

Imunologia compreende o estudo das defesas do organismo contra doenças. Atualmente são descritas diversas categorias de microrganismos que causam doenças: os vírus, as bactérias, os fungos patogênicos e outros organismos eucarióticos relativamente grandes e complexos coletivamente chamados de parasitas (Medzhitov & Janeway Jr., 2000).

A primeira etapa que o sistema imune deve cumprir para proteger o indivíduo de maneira eficaz contra uma doença é o reconhecimento imunológico que, quando causada por agente microbiológico, se entende pela detecção de uma infecção. Essa tarefa é realizada pelas células do sistema imune inato às quais vão proporcionar uma resposta imediata (Banchereau et al., 2000). A segunda etapa corresponde a conter a infecção e, se possível, eliminá-la por completo, o que envolve a ação das funções imune efetoras, bem como o sistema do complemento, anticorpos, e a capacidade destrutiva dos linfócitos e outras células que compõem o sistema imune. E por fim, a última etapa é proteger o indivíduo contra a recorrência de uma doença resultante da infecção por um mesmo patógeno. Essa etapa também consiste na memória imunológica, que é o processo pelo qual alguns dos linfócitos produzidos são armazenados e chamados de células de memória. Estas guardam a capacidade de reconhecer rapidamente agentes infecciosos com os quais o organismo já teve contato. Sendo assim, quando esses antígenos aparecem no organismo novamente, as células de memória são estimuladas e respondem com um processo de defesa do organismo, em um menor intervalo de tempo (Shin, 2018). O sistema imune é capaz de se autorregular para que não traga danos ao próprio organismo. A falha dessa regulação pode contribuir para o desenvolvimento de determinadas condições como alergias e doenças autoimunes (Mesquita Júnior et al., 2010).

As respostas imune adaptativas, dependem de atividades das células sanguíneas brancas, todas originadas na medula óssea, que migram para os tecidos periféricos, podendo permanecer nos tecidos ou circulando na corrente sanguínea e no sistema linfático (Iwasaki & Medzhitov, 2015).

## 2.2. Imunologia Adquirida

Quando a infecção não pode ser controlada pela imunidade inata e transcende seus limites, uma segunda linha de defesa é necessária para conter o patógeno. Portanto, para combater a ampla gama de patógenos que o indivíduo pode entrar em contato, as células efectoras do sistema imune precisam ser capazes de reconhecer uma grande variedade de antígenos de bactérias, vírus e de outros organismos causadores de doenças. Um antígeno corresponde a qualquer molécula ou parte de uma, que é especificamente reconhecida por proteínas de reconhecimento altamente especializados dos linfócitos estranho ao organismo (Goldman & Prabhakar, 2008).

### 2.2.1. Linfócitos

Os linfócitos são células responsáveis pelo centro da imunidade adquirida e das defesas do organismo. Nessa classe, existem três categorias de células: a *Natural Killer*, que participam da imunidade inata, os linfócitos T, que são os reguladores da imunidade adaptativa e responsáveis pela imunidade celular, e os linfócitos B, que são os responsáveis pela produção de anticorpos (LaRosa & Orange, 2008). Elas se diferenciam pelas suas moléculas de superfície e seu comportamento. Essas células podem ser tanto encontradas nos órgãos linfoides do organismo, como no sangue e distribuídas nas superfícies mucosas. Elas se diferenciam pelas suas moléculas de superfície e seu comportamento. Cada uma das moléculas apresenta uma denominação funcional ou química e atualmente o sistema de nomenclatura fornece números sequenciais para todas as moléculas: CD4, CD8, CD16 e assim por diante (Izcue et al., 2009).

As estruturas mais importantes da superfície de um linfócito, são os receptores de antígenos, denominados como TCR ou BCR. Eles são muito variáveis com relação a sua especificidade antigênica, permitindo que cada indivíduo desenvolva respostas imunes contra uma grande diversidade de patógenos (Busslinger, 2004). O CD3 é o nome dado ao complexo de proteínas do TCR que transmitem o sinal do receptor para o linfócito T e por isso, estão presentes em todos os linfócitos T. O CD4 é o complexo de proteínas do TCR, conhecido como co-receptor, que sinalizam os linfócitos T,

quando o receptor reconhece os antígenos exógenos já processados, apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Já o CD8, é expresso nos linfócitos que tem a capacidade de atingir as células que exibem antígenos específicos identificados como ameaças ao corpo, chamados de linfócitos T citotóxicos. Ele corresponde a receptores para moléculas do MHC de classe I (Neefjes et al., 2011).

#### **2.2.1.1. Linfócitos T**

Os linfócitos T provêm de precursores originados na medula óssea, e a partir daí migram para o timo, onde amadurecem. Através de receptores de superfície, conhecidos como TCR (receptores de células T), os linfócitos T são capazes de reconhecer antígenos de maneira específica (Bailey et al., 2013). Diferente das células B, os linfócitos T precisam que o antígeno seja processado em peptídeos curtos e apresentado em moléculas do sistema principal de histocompatibilidade (MHC), as quais estão divididas em três classes, I, II e III, sendo suas principais I e II (Behl et al., 2012)

Existem dois principais tipos de linfócitos: o citotóxico (Tc), que apresentam na sua membrana plasmática a molécula co-receptora CD8 e os auxiliares (Th), que apresentam o co-receptor CD4. Linfócitos Tc detectam os peptídeos apresentados pelas moléculas de classe I e sua principal função é lisar as células que apresentam peptídeos estranhos ao organismo. Já os linfócitos Th reconhecem os peptídeos apresentados por moléculas de classe II e sua função é orquestrar respostas imunes e ajudar ou estimular outras células do sistema imunológico (Neefjes et al., 2011). O sistema imunológico tem estratégias diferentes para eliminar as infecções tanto em compartimentos do sistema vesicular como citosólico. As células infectadas por vírus ou bactérias que habitam o citosol são eliminados em geral por linfócitos T citotóxicos, por outro lado os gêneros que infectam compartimentos vesiculares são detectados por linfócitos T auxiliares (Wang & Reinherz, 2012). Os linfócitos são especializados em ativar outras células, como linfócitos B, macrófagos ou ainda células epiteliais, que eliminam o agente infeccioso (Díaz Martín et al., 2013).

### 2.2.1.2. Linfócitos Th

Os linfócitos T *helper* (Th) exercem um papel fundamental na adaptação do sistema imunológico que desempenha diversas funções biológicas. Eles interagem com componentes do sistema imune inato e respondem aos estímulos dos antígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos (Zygmunt & Veldhoen, 2011). Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> virgens podem ser ativados pelo encontro com o antígeno via MHC de classe II e diferenciar-se em linfócito T efetores ou linfócito T de memória (Doherty et al., 2016). Dependendo da intensidade da estimulação e presença de determinadas citocinas e outros fatores, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em várias subpopulações de linfócito Th com funções e propriedades específicas (Ivanova & Orekhov, 2015). Essa especialização das funções é regulada por uma série de fatores de transcrição que são ativados em resposta a estímulos específicos e promovem a expressão de padrões distintos de moléculas superficiais. Esses padrões são usados para distinguir diferentes classes de linfócitos Th (Zygmunt & Veldhoen, 2011). Embora dados mais recentes sugiram que existe um grau de flexibilidade nas atividades das linhagens de linfócito T e esses linfócitos podem ganhar ou perder algumas características durante a vida. Os subconjuntos Th ainda podem ser identificados pelo perfil de citocinas que secretam (Murphy & Stockinger, 2010). A primeira classificação dividiu em linfócitos efetores CD4<sup>+</sup> em dois subconjuntos, Th1 e Th2 (Mosmann et al., 1986). Os linfócitos Th1 são induzidos em resposta a agentes patogênicos, como infecções virais, e são caracterizados pela produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e por promoverem a ativação dos macrófagos que são eficientes contra patógenos intracelulares. Além disso, dão suporte a funções efectoras de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e regulam a expressão de outros mediadores em células imunológicas e não imunológicas (Mosser, 2003). Os linfócitos Th2 estão principalmente envolvidos na resposta imune humoral e em fornecer ajuda aos linfócitos B para produção de anticorpos (Ivanova & Orekhov, 2015), sendo interleucina 4 (IL-4) sua principal citocina secretada, no entanto sabe-se que elas também são capazes de secretar IL-5, IL-6 e IL-1 (Paul & Zhu, 2010). Nos últimos anos, tornou-se evidente que outros subconjuntos de linfócito Th funcionais podem ser induzidos por vários estímulos, *in vitro* e *in vivo*. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de interleucina 17 (IL-17) diferenciadas em resposta ao estímulo de Fator de Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) e outras citocinas, foram reconhecidas como um subconjunto de linfócitos T *helper*, denominadas Th17

(Muranski & Restifo, 2013). Essas células podem ser detectadas em locais de inflamação no início da resposta imune, orquestrando respostas imunes inatas, como o recrutamento de neutrófilos (Lin et al., 2009). Outro subconjunto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> são os linfócito T reguladores (Tregs) que expressão o fator de transcrição Foxp3 (Sakaguchi et al., 2013). Essas células desenvolvem um papel regulador na ativação e função das células imunes e são capazes de alterar as respostas imunes mediadas por Th1 e Th2 (Belkaid, 2007). Também estão associadas com a expressão de TGF- $\beta$  e IL-10 (Vignali et al., 2008). Os linfócitos Th foliculares (Tfh) foram descritos como uma linhagem distinta de células T *helper* que residem nos folículos e auxiliam os linfócitos B a gerarem anticorpos (Crotty, 2011). A diferenciação de vários subconjuntos de linfócitos T depende em mudar os programas genéticos específicos responsáveis pela expressão de padrões de citocinas e receptores. A presença de certos fatores de transcrição é considerado com um marcador de subconjuntos de linfócitos, e esses fatores pode se regular um ao outro criando um *feedback* positivo ou negativo (Murphy & Stockinger, 2010).

Os eventos iniciais que resultam na ativação e diferenciação de linfócito Th ocorrem em tecidos altamente organizados, como linfonodos e o baço. Essas estruturas são necessárias para aumentar o potencial de um encontro entre um antígeno e uma célula linfoide específica (Randall et al., 2009). Além disso, elas servem para criar um microambiente que favorece o desenvolvimento de uma resposta imune apropriada. O antígeno é apresentado no contexto de vários fatores adicionais que influenciam cada um dos processos que, por fim, determinam a diferenciação da linhagem de linfócito Th (Zygmunt & Veldhoen, 2011).

### **2.3. Linfócitos Th17**

Os linfócitos Th17 descritas pela primeira vez em camundongos, são a principal fonte de IL-17 em muitos tipos de imunidade adaptativa (Park et al., 2005). Enquanto os linfócitos Th1 e Th2 fornecem respostas efectoras contra as infecções bacterianas intracelulares e virais, e aos agentes patogênicos parasitários, respectivamente, as células Th17 fornecem proteção ao indivíduo contra infecções bacterianas e fúngicas extracelulares e ainda foram relacionadas a auto-imunidade (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).

### 2.3.1. Diferenciação de T CD4+ em Th17

Os linfócitos Th17 foram estabelecidas como um novo subconjunto de células Th pela identificação de fatores de diferenciação e fatores de transcrição específicos para essas células secretoras de IL-17. A ativação de linfócitos T na presença de TGF- $\beta$  direciona a diferenciação inicial de linfócitos T CD4+ em linfócitos Th17 produtoras de IL-17 (Mangan et al., 2006). Alguns estudos independentes relataram que uma combinação de TGF- $\beta$  e IL-6, que é uma citocina pró-inflamatória, são necessários para induzir a produção de IL-17 em linfócitos T diferenciados (Mangan et al., 2006). A partir de então entendeu-se que a IL-6 não só era um fator de diferenciação para linfócitos Th17 como também inibia uma via de diferenciação de linfócitos Th virgens induzidas por TGF- $\beta$  para linfócitos Treg (Korn et al. 2009). A IL-6 desempenha um papel fundamental ao iniciar o processo, ativando o STAT3, que regula diretamente a transcrição de RORc que é um gene específico da linhagem de linfócitos Th17 (Ramos et al., 2010).

Outros estudos mostraram que na ausência de IL-6 outros fatores poderiam induzir a diferenciação dos linfócitos Th17 (Strom et al., 2007). A IL-21 foi identificada como uma citocina que supriu a expressão induzida por TGF- $\beta$  de Foxp3 e induziu a expressão de IL-17. Como os linfócitos Th17 são uma fonte ampla de IL-21, foi proposto que exista um ciclo de auto-regulação e amplificação autócrina pelo qual os linfócitos Th17 aumentam sua própria diferenciação (Zhou et al., 2007). Assim como existe na regulação cruzada de Th1 e Th2, a IL-21 facilita a diferenciação da subpopulação que o produz, enquanto inibe diretamente o estímulo para outra via. Tanto a IL-6 quanto a IL-21 ativam preferencialmente STAT3, uma via crucial para o desenvolvimento de linfócitos Th17 (Nurieva et al., 2007). No entanto a exposição posterior a IL-23 é necessária para a maturação funcional dos linfócitos Th17 (Mcgeachy et al., 2009).

Estudos relatam que um desenvolvimento de Th17 independente de TGF- $\beta$  pode ocorrer no intestino, contudo é de eficiência reduzida quando comparado com o seu desenvolvimento na presença de TGF- $\beta$  (Ghoreschi et al., 2010). Na ausência de TGF- $\beta$ , IL-23 parece ser o fator essencial para a realização da diferenciação das

células Th17. Uma vez que o receptor de IL-23 está ausente, a IL-6 mostrou-se necessária e suficiente para a sua expressão. No entanto, a combinação de IL-23 e IL-6 demonstrou não ser suficiente para a geração de células secretoras de IL-17 (Bettelli et al., 2006).

#### **2.3.1.1. Função do TGF- $\beta$ na diferenciação Th17**

TGF- $\beta$  é um fator pleiotrópico com vários papéis diferentes no desenvolvimento de linfócitos T, homeostase e tolerância (Krstic & Santibanez, 2014). O papel do TGF- $\beta$  no desenvolvimento dos linfócitos Th17 gera discussão. Alguns estudos sugerem a existência de pelo menos duas subclasses funcionais de linfócitos Th17, diferenciadas pelo seu desenvolvimento na presença ou ausência de TGF- $\beta$  e há relatos de que os linfócitos Th17 podem produzir seu próprio TGF- $\beta$  (Bedoya et al., 2013). Somado a isso, outros estudos mostraram que podem haver duas vias de diferenciação para linfócitos Th17, sendo uma dependente de TGF- $\beta$ , que dá origem aos linfócitos Th17 “não patogênicas” e uma via independente que origina os linfócitos Th17 “patogênicas” (Ghoreschi et al., 2010).

#### **2.3.1.2. Função da IL-6 na diferenciação Th17**

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica secretada pelas células do sistema imune inato, como células dendríticas, monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos B e um subconjunto de linfócitos T ativados. Estudos mostram que a IL-6 tem um papel muito importante na regulação do equilíbrio entre linfócitos Th17 e os linfócitos Treg. IL-6 combinada com TGF- $\beta$  induz o desenvolvimento de linfócitos Th17, e em contraste inibe a diferenciação de linfócitos Treg (Bettelli et al., 2006).

#### **2.3.1.3. Função da IL-21 na diferenciação Th17**

A IL-21 é produzida por uma série de subconjuntos de linfócitos T CD4+ diferenciadas e células *Natural Killer* (Leonard et al., 2008). O sinal da IL-21 é recebido através de um receptor heterodimérico, que é formado por uma cadeia gama comum



(compartilhada com receptores de outras citocinas) e outra específica para IL-21 (Monteleone et al., 2008). Sabendo que o receptor para IL-21 é altamente expresso em células com diferentes funções em diversos lugares, entende-se que essa citocina atua em uma variedade de linhagens linfoides e exerce efeitos diversos. A IL-21 conduz a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th17. A IL-21 é induzida pela presença da citocina IL-6 e expressão do fator nuclear ROR $\gamma$ t e estabiliza e mantém as linfócitos Th17 aumentando a sua própria expressão e do receptor de IL-23 (Leonard et al., 2008).

#### **2.3.1.4. Função da IL-23 na diferenciação Th17**

A IL-23 é produzida principalmente por células dendríticas ativadas e macrófagos em resposta a estímulos microbianos (Morrison et al., 2011). A IL-23 é um heterodímero e parece ter função crucial para a produção de IL-17 (Lowes et al., 2012). A via de sinalização da IL-23 é mediada pela quinase 2 associada a Janus (Jak2), tirosina quinase (Tyk2) e outros membros diversos da família STAT (Parham et al., 2002). Nos linfócitos, a IL-23 induz uma forte fosforilação de STAT3 e uma ativação relativamente fraca para STAT4. Essa fosforilação de STAT3 é essencial para o desenvolvimento de linfócitos Th17 produtoras de IL-17 (Yannam et al., 2012). Essa citocina funciona como um fator de sobrevivência para linfócitos Th17, que são mantidas, mas não induzidas por IL-23. Após a indução inicial dos linfócitos Th17, a presença de IL-23 aparentemente se torna no fator limitante que determina se a resposta Th17 é mantida durante uma resposta imune inflamatória (Veldhoen et al., 2006).

#### **2.3.1.5. Fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de células Th17**

O receptor nuclear tipo receptor esteroide ROR $\gamma$ t, que é uma variante de ROR $\gamma$  expresso em linfócitos T, é expresso seletivamente em linfócitos Th17. O ROR $\gamma$  parece ser necessário para a produção de IL-17, uma vez que estudos mostraram que camundongos deficientes de ROR $\gamma$  apresentaram uma diminuição na diferenciação

Th17 (Ivanov et al., 2006). No entanto, embora em menor quantidade, as células produtoras de IL-17 não estão ausentes em camundongos deficientes de ROR $\gamma$ t. Outros membros da família dos receptores nucleares retinóides podem atuar de forma semelhante; o ROR $\alpha$  também é expresso seletivamente nos linfócitos Th17 e existem relatos de que desempenha papel similar mas não idêntico ao ROR $\gamma$ t na diferenciação das linfócitos Th17, sugerindo que a diferenciação dos linfócitos Th17 poderia ser ditada por dois fatores de transcrição específicos da mesma linhagem (Yang et al., 2008). A indução de ROR $\gamma$ t é dependente de STAT3, que é preferencialmente ativado por IL-6, IL-21 e IL-23 e desempenha um papel importante na regulação da produção de IL-17 em linfócitos T (Chen et al., 2006).

Estudos mostram que camundongos com deficiência de STAT3 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> prejudicaram a diferenciação em Th17, e a sobreexpressão de uma forma ativa de STAT3 é capaz de aumentar a produção de IL-17 (Yang et al., 2007). Assim, STAT3 pode interferir na expressão de IL-17 aumentando a expressão de ROR $\gamma$ t, que está diretamente relacionado com a diferenciação Th17. Portanto, STAT3 e ROR $\gamma$ t parecem cooperar entre si, e a produção mais efetiva de IL-17 depende da presença de ambos os fatores de transcrição (Korn et al. 2009).

O fator de transcrição ROR $\gamma$ t ainda se relaciona com outros fatores para a indução de linfócitos Th17, como o IFN $\alpha$ 4 que anteriormente estava relacionado a diferenciação das subpopulações Th1 e Th2. Em estudos, os camundongos *knock-out* para IFN $\alpha$ 4 não conseguiram montar uma resposta Th17. Estes linfócitos T deficientes de IFN $\alpha$ 4 não conseguiram regular o ROR $\gamma$ t após a estimulação na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, e não se diferenciaram em linfócitos Th17, sugerindo que IFN $\alpha$ 4 ou suas reações subsequentes, podem ter que cooperar com ROR $\gamma$ t para o comprometimento total das linfócitos T com a linhagem Th17 (Brustle et al., 2007).

### 2.3.2. Relação entre Th17 e Treg

O desenvolvimento da diferenciação dos linfócitos Th17 e Treg são mutuamente interligados. Essa descoberta foi baseada na observação de que após uma estimulação, um linfócito T virgem pode ser conduzida a expressar Foxp3 e se

tornar um linfócito Treg na presença de TGF- $\beta$ . No entanto, como já relatado, na presença de TGF- $\beta$  junto com IL-6 ou IL-21, a via de desenvolvimento de Treg é bloqueada, e os linfócitos se diferenciam em linfócitos Th17 (Korn et al. 2009).

O TGF- $\beta$  é uma citocina produzida por vários tipos distintos de células, incluindo os linfócitos Treg e as células do sistema imune inato (Chen & Dijke, 2016). Essa citocina tem diversos efeitos inibitórios em todo o sistema imunológico. Além disso, o TGF- $\beta$  induz o fator de transcrição específico dos linfócitos Treg, o Foxp3, que é necessário para indução e manutenção dos linfócitos Treg (Kretschmer et al., 2005). Entretanto, a adição de IL-6 na presença de TGF- $\beta$  inibe a geração de Tregs e induz a diferenciação de Th17. Sendo assim, sugere-se que existe uma relação recíproca entre os linfócitos Tregs e Th17, e que a presença ou não da IL-6 é fator determinante para direcionar a resposta imune para linfócitos Th17, com ação pró-inflamatória ou para linfócitos Treg (Bettelli et al., 2006). Entende-se que o sistema imunológico não ativado (na ausência de estímulos inflamatórios) produz TGF- $\beta$ , que induz a geração de linfócitos Treg induzidas, que agem juntamente com os linfócitos Treg naturais, mantendo os linfócitos de memória efetores sob controle. Quando há uma resposta de fase aguda, a IL-6 induzida durante esse processo, inibe a função dos linfócitos Treg naturais e evita a geração de Treg induzidas, e induz a produção de linfócitos Th17 (Sun et al., 2017).

O mecanismo pela qual IL-6 e IL-21 vão agir como fatores, depende do controle do balanço de Foxp3/ROR $\gamma$ t (Zhou et al., 2008). Sabe-se, por exemplo, que camundongos que não expressam Foxp3 aumentam a expressão de ROR $\gamma$ t e por consequência, de IL-17 (Li et al., 2007). Na presença de TGF- $\beta$ , as citocinas IL-6 e IL-21 desempenham um papel importante na diferenciação de Th17 por inibição da expressão de Foxp3 direcionado por TGF- $\beta$  (Mangan et al., 2006). Tanto, ROR $\alpha$  quanto o ROR $\gamma$ t se associam fisicamente com Foxp3 (Du et al., 2008). Essa associação, é a base molecular para a relação recíproca entre os linfócitos Treg e Th17. A relação recíproca entre Treg e Th17 é ainda mantida por estudos que relataram que camundongos *knout-out* para IL-6 apresentam um defeito grave na geração de linfócitos Th17 e paralelamente um aumento no número de linfócitos Treg (Diller et al., 2016)

### 2.3.3. Funções efetoras das células Th17 na proteção e patogênia

O conceito de que os linfócitos Th17 são um subconjunto diferenciado de linfócitos Th efetores foi desenvolvido pela primeira vez quando analisado no desenvolvimento de auto-imunidade específica de um órgão, induzido por linfócitos Th17. No entanto, um estudo inicial mostrou que um lisado microbiano foi capaz de induzir quantidades maciças de IL-17 em cultura de células (Infante-duarte et al., 2000). Certamente, não é a principal função dos linfócitos Th17 induzir a autoimunidade, e sim constituir um ramo do sistema imune adaptativo que tem função de eliminação dos tipos específicos de agentes patogênicos que necessitam de uma resposta inflamatória e não são adequadamente tratados pela imunidade Th1 ou Th2. Diversos patógenos, tanto Gram-negativos quanto Gram-positivos, fungos, vírus e protozoários podem desencadear uma resposta Th17 forte (Rahal et al., 2015; Rudner et al., 2007; Trautwein-Weidner et al., 2015).

Estudos nos quais linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória produtoras de IL-17 possuem uma ação contra antígenos fúngicos, sugerem que os mesmos podem ser induzidos por resposta imunes contra os mesmos, representando importante papel na proteção do hospedeiro (Acosta-rodriguez et al., 2007).

Com base em estudos com doenças infecciosas, condições auto-imunes, reações de transplantes, alergias e tumores, os pesquisadores têm relacionado os linfócitos Th17 e a citocina IL-17 como doenças humanas. Nessa vertente as evidências sugerem que os linfócitos Th17 são importantes na psoríase humana, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, asma e algumas infecções bacterianas e fúngicas (Korn et al. 2009).

### 2.4. Família IL-17

A família IL-17 compreende citocinas que participam de respostas inflamatórias e na patogenicidade de muitas doenças inflamatórias (Wattegedera et al., 2017). Atualmente se conhece 6 membros nesta família: IL-17A (também conhecida como IL-17 ou CTLA8), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (ou IL-25) e IL-17F. Seus receptores

formam uma família que contém 5 membros (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE). As citocinas IL-17 mostram um alto nível de homologia com a IL-17A (16 a 50% de identidade da sequência de aminoácidos), enquanto os outros membros desta família e os receptores da família IL-17 mostram uma homologia estrutural entre seus membros (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). A IL-17A foi descoberta em 1993 e sua principal função é tida como o recrutamento de células polimorfonucleares, agindo na indução da inflamação e defesa do hospedeiro, no entanto a produção patológica leva a inflamação excessiva e provoca danos aos tecidos (Song & Qian, 2013).

As fontes celulares e a regulação da IL-17F são semelhantes às da IL-17A. Os genes que codificam a IL-17A e IL-17F estão localizados no cromossomo 6 (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). A IL-17E (ou IL-25) demonstra ser menos semelhante com a IL-17A em termos de sequência de aminoácidos mas também promove respostas imunes mediadas por linfócitos Th2, contribuindo para doenças alérgicas e defesas contra parasitas helmínticos (Jin & Dong, 2013). A IL-17C é produzida por células epiteliais e queratinócitos que em resposta a patógenos ou citocinas inflamatórias também promove a produção de IL-17. Em contrapartida, IL-17B e IL-17D são pouco estudados e suas funções biológicas ainda não são elucidadas (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).

Além dos linfócitos Th17, vários outros tipos de células do sistema imune inato podem produzir IL-17, colocando essa citocina em uma interface entre imunidade inata e imunidade adaptativa (Stockinger et al., 2007). A IL-17 pode ser expressa por várias populações de linfócitos, tais como linfócitos T  $\gamma\delta$  (Papotto et al., 2017), células T *Natural Killer* (TNK), células *Natural Killer* (NK) e células linfóides inatas do grupo 3 (ILC3) (Gaffen et al., 2014).

#### 2.4.1. Papel IL-17

O papel da IL-17 parece ter um significado particular nos sítios de barreiras epiteliais: na pele, pulmões, cavidade bucal, trato gastrointestinal e urogenital (Pappu et al., 2012). O enriquecimento de linfócitos T produtores de IL-17 foi relatado em barreiras epiteliais de vertebrados (Guo et al., 2009). Populações de linfócitos T  $\gamma\delta$  que expressam a IL-17 estão localizados nas camadas mais profundas das barreiras

epiteliais e podem exercer papel importante na proteção a longo prazo contra invasão microbiana (Romagnoli et al., 2016). Além disso, a expressão onipresente e alta de IL-17RA em células epiteliais permite que a maioria das células nos órgãos de barreira responda a IL-17 (Ishigame et al., 2008).

Estudos demonstraram que *in vitro*, a IL-17 tem capacidade de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias importantes, como a IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, G-CSF e TNF a partir de fibroblastos, macrófagos, condrócitos e osteócitos (Veldhoen, 2017). A IL-17 também pode aumentar a expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 (Kolls et al., 2008). Também nos sítios de barreiras epiteliais, a IL-17 induz proteínas antimicrobianas (AMPs), que são capazes de inibir diretamente, ou mesmo eliminar os microrganismos invasores (Liévin-Le & Servin, 2006).

A IL-17 também está ativamente envolvida no recrutamento de células imunes sem envolver quimio-atrativos. De maneira geral, a expressão de IL-17 atuando em sinergia com o TNF, é um poderoso sinal inflamatório que resulta no recrutamento rápido e na presença sustentada de neutrófilos (Veldhoen, 2017). Este efeito induz a uma vasodilatação, mediada por prostaglandina E2 (PGE2) (Shalom-Barak et al., 1998) permitindo o aumento do tráfico de células do sistema imunes; a expressão de MMP (metalproteinases de matriz), que induz a acessibilidade aos tecidos e a sobrevivência e atividade aumentada de células fagocíticas através da indução de G-CSF e GM-CSF (Parsonage et al., 2008).

A indução de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF por IL-17 constitui um circuito de feedback positivo que melhora a produção e fortalece os efeitos da IL-17, e por consequência as respostas de fase aguda (Ogura et al., 2008). Esta é a base de um processo auto-sustentável para a secreção de IL-17 durante a infecção. A IL-17 recruta um grande número polimorfonucleares e pode expandir e manter populações dessas células no local de infecção (Amatya et al., 2017). Além disso, ela atua sistematicamente na resposta de fase aguda, atuando no aumento de quantidades séricas de G-CSF e GM-CSF para acelerar o desenvolvimento de subconjuntos de células imunes necessárias, como neutrófilos e macrófagos (Veldhoen, 2017).

A IL-17 não é um potente indutor de inflamação por si próprio (Gaffen, 2009). Os seus efeitos fortes durante a inflamação derivam da sua capacidade de recrutar

células imune através da expressão de quimiocinas e induzir a expressão dos receptores, principalmente do receptor de TNF (Zrioual et al., 2009), e de sua ação sinérgica com outras citocinas. As vias de sinalização de IL-17 podem convergir com outras vias de sinalização ao nível de MAPK, e a sinalização de IL-17 também pode resultar no sequestro de fatores que são responsáveis por inibirem essas vias, dessa forma, sua atividade seria liberada (Amatya et al., 2017).

As células que produzem IL-17 também podem expressar TNF, IL-10 e IL-22, embora a expressão de cada citocina possa ser regulada separadamente. A atividade sinérgica de IL-17 e IL-22 é particularmente importante nos epitélios, especialmente através da indução de AMPs, que tem efeito direto sobre a redução da carga microbiana (Dixon et al., 2016).

Durante as respostas imunes, tanto IL-17 como IFN- $\gamma$  são frequentemente encontrados no local da inflamação, sejam eles produzidos pelos linfócitos Th17 ou produzidos por outras células. Embora a presença de IL-17 e IFN- $\gamma$  em locais inflamatórios e os papéis específicos dessas citocinas já ser altamente elucidados, há poucos relatos sobre os potenciais efeitos sinérgicos dessas duas citocinas. Uma exceção pode ser a indução da produção de óxido nítrico, que é fortemente aumentado pela IL-17 na presença de IFN- $\gamma$  (Zhang et al., 2012). Existem estudos que relatam que IL-17 e IFN- $\gamma$  desenvolvem efeitos adversos um sobre o outro, mostrando resultados de cultivos de linfócitos T produtores de IL-17, onde quando adicionado IFN- $\gamma$ , ocorreu a diminuição da produção de IL-17 (Peckham et al., 2014). Para uma resposta combinada de IL-17 e IFN- $\gamma$  necessita de ajuste fino, em alguns casos a neutralização de IL-17 ou IFN- $\gamma$  pode levar o aumento de outra citocina e resultar em imunopatologia (Kezic et al., 2012).

A IL-17 também possui papel da produção de IgA nas placas de *Peyer* (Hirota et al., 2013). Através da ativação do receptor de IL-17, um processo em cascata resulta no aumento da retenção de linfócitos B em centros germinais, aumentando a chance de uma produção de anticorpos de alta afinidade. Além disso, através desse processo de retenção de linfócitos B em centros germinativos, os linfócitos Th17 aumentam a proteção a longo prazo contra agentes infecciosos, bem como a proteção após a vacinação (Trentini et al., 2016).

#### 2.4.2. IL-17 na resposta contra microrganismos extracelulares

As respostas controladas pela IL-17 destinam-se principalmente a conter microrganismos, fortalecendo as barreiras epiteliais e induzindo a expressão de proteínas anti-microbianas e o recrutamento de polimorfonucleares (Korn et al., 2009). Quando uma barreira epitelial se rompe, esse evento resulta na secreção de citocinas, como IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  que a partir daí, vão conduzir a liberação de IL-17 (Jin & Dong, 2013). Ao atuar em conjunto com TNF e IL-22, a IL-17 aumenta rapidamente a produção de AMPs e quimiocinas, que por sua vez, recrutam células imunes adicionais, como os neutrófilos, para o local da lesão (Martin et al., 2009). No trato respiratório, por exemplo, a IL-17A está envolvida na proteção contra *Klebsiella pneumoniae*, que causa infecção pulmonar. Estudos mostraram que em camundongos a ausência do receptor de IL-17 impede as respostas dadas pela presença de IL-17, reduzindo a imunidade e assim o recrutamento de neutrófilos e por consequência aumentando a carga bacteriana e a mortalidade dos animais (Ye et al., 2001).

#### 2.4.3. IL-17 na resposta contra microrganismos intracelulares

Estudos demonstraram que, após a infecção por uma bactéria intracelular como *Listeria monocytogenes* ou *Chlamydia muridum*, a produção de IL-17 tem um papel importante, no recrutamento de polimorfonucleares (Zhang et al., 2012) (Hamada et al., 2008). Relatos semelhantes foram observados na infecção com parasitos apicomplexas intracelulares como *Toxoplasma gondii* e *Eimeria Falciformes*. A sinalização de IL-17 não é crítica para o controle de *Toxoplasma*, no entanto os camundongos com deficiência de IL-17 infectados, mostram maior taxa de mortalidade em comparação aos animais com níveis normais de IL-17. Este fato se justifica devido ao recrutamento reduzido de neutrófilos para o local de infecção (Kelly et al., 2005). Bem como sabe-se que uma resposta em equilíbrio de IL-17 e IFN- $\gamma$  é necessária para limitar a imunopatologia durante a infecção por *E. falciformis* (Stange et al., 2012).



#### 2.4.4. Família de receptor IL-17

Os receptores IL-17 constituem uma família de receptores de citocinas com 5 membros, IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE, onde IL-17RA e IL-17RC são os principais receptores de IL-17A (Kuestner et al., 2010). Os membros dessa família têm um domínio transmembranar e um terminal C intracelular. Exceto para IL-17RA, os mRNAs de *splicing* alternativo parecem existir para todos os membros da família IL-17R. Alguns membros dessa família podem formar dímeros ou oligômeros com outras cadeias da mesma família, mas não está claro se também podem de associar com cadeias de famílias de diferentes citocinas (Korn et al. 2009). A IL-17 quando encontra seu receptor ativa as vias de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e NK- $\kappa$  $\beta$  através de TRAF-6 (Schwandner et al., 2000) e interage com o adaptador proximal de membrana Act1 (Qian et al., 2007).

IL-17RA liga tanto IL-17A quanto IL-17F, embora se ligue com maior afinidade com IL-17A. Esse receptor é altamente expresso em células hematopoiéticas, mas também, embora em níveis mais baixos, em células endoteliais e epiteliais (Moseley et al., 2003). Esse padrão de expressão é curioso, já que as principais respostas mediadas por IL-17 ocorrem nas células epiteliais e de fibroblastos (Shen & Gaffen, 2009). A força de sinalização induzida por IL-17A correlaciona-se com os níveis de expressão do seu receptor na superfície celular, e diferente do que acontece com a maioria das citocinas, altos níveis de IL-17AR são necessários para desencadear respostas efetivas (Maitra et al., 2007). Além disso, o receptor de IL-17A parece ter um papel regulador, ele tem a capacidade de limitar a sinalização por internalização. A expressão superficial de IL-17AR diminui rapidamente após a ligação da IL-17A. O receptor internaliza a IL-17A limpando-a do meio inflamatório (Lindemann et al., 2008).

#### 2.4.5. IL-17 em bovinos

Estudos mostram a relação da IL-17 em doença de alto impacto econômico em rebanhos bovinos (Mensikova et al., 2013). A tuberculose bovina (BTB) por exemplo, é uma doença causada por *Mycobacterium bovis*, que ocorre preferencialmente em macrófagos alveolares e provavelmente células dendríticas intersticiais, onde o agente *M. bovis* é capaz de sobreviver, replicar-se e estender-se para outros sítios

(Volkman et al., 2004). Os autores Blanco et al., relatam que foi possível observar que há uma expressão exacerbada de IL-17 em bovinos infectados experimentalmente. Foi relatado que a expressão de IL-17 distingue significativamente os animais com lesões macroscópicas daqueles sem lesão. Dessa forma, entende-se que a IL-17 tem um papel como potencial biomarcador de prognóstico em BTB. Os biomarcadores parecem ser uma ferramenta poderosa para a detecção de potenciais animais transmissores de tuberculose em rebanhos infectados, sendo dessa forma uma ferramenta que pode contribuir para o controle e a transmissão de BTB em animais de produção e para humanos (Blanco et al., 2011).

Outros estudos relatam que o estímulo da produção de IL-17 a curto ou a longo prazo pode fornecer proteção contra a infecção por *Neospora caninum* em bovinos, com linfócitos Th17 bovinos atuando no contexto da vacinação desses animais. O *N. caninum* é um protozoário intracelular intimamente relacionado com a causa de aborto em bovinos no mundo todo e por isso, perdas econômicas devido à perda de produtividade (R K Peckham et al., 2014).

Estudos realizados recentemente quanto a infecção por *Cryptosporidium parvum* em bovinos também relatam a importância da resposta IL-17 para proteção dos animais. O *C. parvum* é um parasito extracelular, sendo um dos causadores de diarreia em bezerros, que é um fator de morte em 50% dos animais infectados (Morrill et al., 2012). Zhao e colaboradores (2014), encontraram um aumento dos níveis de mRNA de IL-17 dentro de 12 horas pós-infecção em aves (Zhao et al., 2014), e em outra publicação de seu grupo em 2015 também um aumento na expressão de mRNA da IL-17 6 horas pós-infecção no intestino e 24 horas pós-infecção no baço de camundongos (Zhao et al., 2015). Ainda há outros estudos que relatam como resultados que a IL-17A pode agir diretamente nos fibroblastos e reduzir o número de placas causada pela infecção deste mesmo parasito (Drinkall et al., 2017).

### 3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótese

A interleucina 17A (IL-17A) de *Bos taurus* expressa de forma recombinante mantem sua atividade biológica.

#### 3.2. Objetivo Geral

Expressar de forma recombinante a interleucina 17A de *Bos taurus* em cepas de *Escherichia coli* e avaliar sua atividade biológica em células de diferentes origens.

#### 3.3. Objetivos Específicos

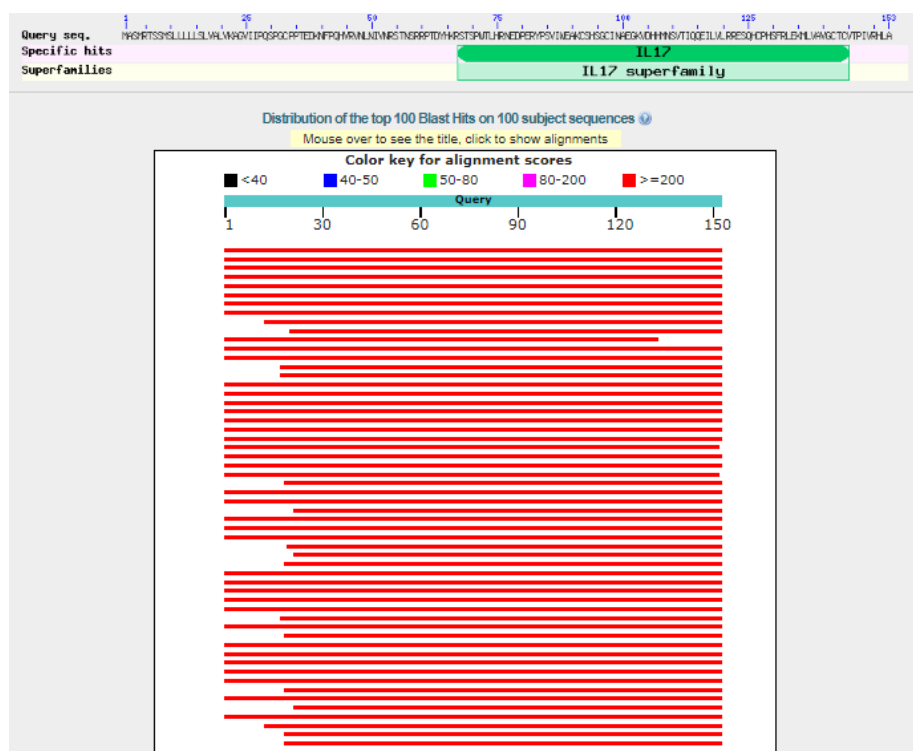
- Amplificar a sequência completa do gene da interleucina 17A e cloná-la em vetor pAE;
- Expressão da IL-17A em cepa de *Escherichia coli*;
- Caracterização da proteína recombinante por meio de reconhecimento por anticorpos específicos;
- Avaliação da atividade biológicas (sinalização) por qPCR.

## 4 CAPÍTULOS

### 4.1. Materiais e Métodos

#### 4.1.1. Desenho *in silico* dos iniciadores

Para obter a sequência da interleucina 17A de *Bos taurus*, foram construídos *in silico* oligo iniciadores (*primers*) no software Vector NTI Advance <sup>TM</sup> (Invitrogen), com base na sequência da mesma depositada no GeneBank (AF412040) (Fig. 1)



**Figura 1:** Dados apresentados pela página NCBI utilizando a ferramenta BLAST

#### 4.1.2. Amplificação da sequência da IL-17A a partir de cDNA de esplenócitos bovinos

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada a partir de amostras de cDNA de esplenócitos bovinos, para a amplificação do gene da IL-17A. O baço para obtenção das células foi obtido por doação de um frigorífico da região e

o isolamento foi realizado segundo protocolo de Dummer et al., (2014). A técnica foi realizada utilizando *Taq* DNA Polimerase, com 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento em gradiente de 51 °C, 56 °C e 62 °C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto.

#### 4.1.3. Clonagem no plasmídeo pAE do gene IL-17A

A clonagem foi realizada utilizando o plasmídeo pAE, que se encontra na Biblioteca de vetores do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), o qual é utilizado amplamente para expressão de proteínas em *Escherichia coli*. Sua regulação é realizada pelo promotor T7, possui resistência ao antibiótico ampicilina, e é responsável por adicionar 6 aminoácidos de histidina (6xHis) na região N-terminal da proteína produzida, permitindo posteriormente a purificação em coluna de níquel e sua caracterização por reações de *Imunoblotting*.

Tanto o produto obtido através da técnica de PCR, quanto o vetor de expressão foram submetidos a restrição com as enzimas *EcoRI* (GAATTC) e *XhoI* (CTCGAG) (BioLabs) separadamente por 18 horas a 37 °C, a fim de tornar suas extremidades coesas. A ligação destas duas partes foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) por 26 °C por 1 hora.

O produto da ligação foi utilizado para transformação da cepa *E. coli* TOP10F, que permite a replicação estável de plasmídeos com número alto de cópias, promovendo a propagação do plasmídeo. A transformação foi realizada segundo protocolo de transformação por choque térmica, onde foi utilizado 100 µl de Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 100 mM, uma colônia retirada de cultivo em placa de meio LB (Luria Bertani) ágar com 24 horas de *E. coli* TOP10F e plasmídeo/inserto. Os componentes foram adicionados em um microtubo que permaneceu em banho de gelo por 15 minutos, seguidos de uma incubação de 1 minuto a 42 °C e posteriormente 2 minutos novamente em gelo, para que ocorra o choque térmico através das oscilações de temperatura. A transformação foi cultivada em meio LB ágar adicionado com antibiótico ampicilina (100 µg/mL). O cultivo foi mantido por 16 horas a 37 °C. As colônias que se desenvolveram na placa foram cultivadas em 1 mL de meio LB líquido com ampicilina, por 16 horas a 37 °C. Os cultivos foram centrifugados por 3min a 12.000 x g, e a partir do *pellet* de células formado, foi realizada a técnica *MicroPrep*

(JOUGLARD et al. 2002), uma extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1%, corrido por 100 V por 1 hora.

#### 4.1.4. Seleção dos clones e confirmação da clonagem

Os clones que apresentaram tamanho superior quando comparado com o vetor de origem, foram cultivados em 10 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina, por 16h a 37 °C e agitação 150rpm. A extração plasmidial foi realizada de modo adaptado de SAMBROOK; RUSSEL (2001), através de lise alcalina. Para confirmar a presença do inserto nos plasmídeos recombinantes, foi realizada a técnica de PCR com os mesmos parâmetros já citados, e posteriormente o produto foi digerido com a enzima *KpnI* (GGTACC). Esta enzima foi utilizada nessa etapa pois apresenta dois sítios de clivagem na construção, formando dois fragmentos de tamanhos conhecidos. Depois de confirmado por ambas as técnicas a amostra foi enviada para sequenciamento pela a empresa ACTGene análises - POA.

#### 4.1.5. Expressão da rIL-17A

A construção já confirmada pelo sequenciamento foi utilizada para transformação das cepas de *E. coli* de expressão Rosetta™, (DE3) Ril, PlysS, C41 e C43 pelo mesmo método de transformação por choque térmico descrito anteriormente. Inicialmente a expressão foi realizada em pequeno volume, partindo de um pré-inóculo de 2 mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina 100µg/mL para todos os cultivos e cloranfenicol 60µg/mL somente para as cepas Rosetta™, Ril e Plyss, a 37 °C por 18 horas com agitação de 150 rpm. Posteriormente o volume do cultivo foi aumentado para 10 mL contendo os mesmos antibióticos. Os cultivos ficaram incubados as mesmas condições anteriores até atingirem a densidade óptica (D.O. 600nm) de 0,6 (fase log) para iniciar a indução da expressão da proteína recombinante utilizando IPTG (Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo) 1mM. Foram coletadas alíquotas dos cultivos no período de 0, 1, 2, 3, 4 e 24 horas, para avaliação do melhor tempo de expressão. Após 24 horas os cultivos foram centrifugados a 9.000 x g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi eluído em tampão PBS (*phosphate buffered saline*). As amostras das expressões foram preparadas com

669 tampão redutor, desnaturadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida  
670 (SDS-PAGE) na concentração de 15%.

671 Foi selecionada a melhor cepa para expressão dessa proteína recombinante.  
672 O plasmídeo pAE/IL-17A foi inserido novamente na cepa escolhida pelo mesmo  
673 método já descrito de transformação por choque térmico. A transformação foi  
674 propagada em um pré-inóculo de 200 mL de meio LB líquido acrescido de  
675 cloranfenicol e ampicilina na proporção de 1:1, cultivado por 16 horas a 37 °C com  
676 agitação de 150rpm. O pré-inóculo foi transferido para 300 mL de meio LB líquido,  
677 totalizando 500 mL de cultivo final acrescido dos antibióticos na mesma proporção,  
678 que permaneceu em agitação até atingir a D.O. de 0,6 (D.O.<sub>600</sub>), correspondendo a  
679 metade da fase *log* de crescimento bacteriano. Assim, após a coleta de amostra de 1  
680 mL, o cultivo foi induzido com IPTG para concentração final de 1mM, a 37 °C com  
681 agitação constante de 150 rpm. Foi selecionado o melhor período de expressão, até  
682 24h.

683 Com as condições de tempo e volume da expressão já estabelecidas,  
684 objetivando o aumento do rendimento da expressão, foi realizada a fermentação da  
685 proteína em um volume total de 1L com pré-inóculo de 75 mL, temperatura controlada  
686 a 37 °C, agitação de 450rpm, aeração 2,5vvm. Quatro horas após a indução com 1mM  
687 de IPTG, a fermentação foi finalizada e o cultivo centrifugado.

688

#### 689 **4.1.6. Purificação da rIL-17A**

690 O *pellet* celular dos cultivos, foi obtido através de centrifugação (Sorvall RC 6  
691 PLUS – Thermo Electron Corporation) por 10 minutos a 9.000 x *g* e eluído em 25 mL  
692 de tampão de lise Akta Wash (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M; NaCl 0,5M; Imidazol 10mM) e assim a  
693 amostra foi submetida a ondas de ultra-som (Sonicator® – Ohtake Works) para lise  
694 total das células e liberação das proteínas (processo conhecido por sonicação) por 10  
695 minutos de 60Hz com pulso de 30 segundos. Logo após a amostra foi incubada a 4  
696 °C com lisozima 100 µg/mL por 1 hora sob agitação e posteriormente centrifugada  
697 novamente por 15 minutos a 9.000 x *g* e o sobrenadante obtido foi armazenado a 4  
698 °C.

As amostras nos tampões de solubilização, resultante das centrifugações, foram filtradas com membrana com *cut off* de 0,8µm para a retirada de restos celulares antes da purificação. Após a filtração, as amostras foram submetidas à cromatografia de afinidade com o uso da coluna de níquel HisTrap TALON®, a qual liga os resíduos de histidina presentes no *tag* da proteína recombinante (inserida pelo vetor pAE), em sua malha. Com a utilização de tampão com imidazol na sua composição, as proteínas retidas até então retidas, são eluídas. Após este processo as amostras foram verificadas em gel de poliacrilamida 15%.

#### 4.1.7. Caracterização da rIL-17A

Para a caracterização da proteína recombinante, foi utilizada a técnica de *Western blot*. As amostras da proteína foram eletrotransferidas de um gel de SDS, após a migração, para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECLTM, Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com leite em pó 5%, diluído em PBS-T (*phosphate buffered saline* + 0,05% de *Tween* 20). Para detecção da *tag* de histidina presentes na proteína recombinante, foi utilizado anticorpo monoclonal (mAb) anti-6xHis (Invitrogen), por 1 hora, na diluição 1:5000 em PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich), na mesma diluição. Para revelação da reação foi utilizado 0,006 mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução contendo Tris HCl 50mM, Sulfato de Níquel 0,3% e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Entre as etapas houveram lavagens sucessivas da membrana em tampão PBS-T.

#### 4.1.8. Cultivo celular

Foram utilizadas placas de 24 poços (*Kasvi* – modelo K12-024) para cultivar 4 tipos de células diferentes. Foram cultivados esplenócitos de camundongos, esplenócitos bovinos segundo protocolo de (Dummer et al., 2014), PBMC's (células polimorfonucleares) bovinos e células de linhagem do rim bovino – MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) na concentração de 3x10<sup>6</sup> por mL.



As PBMC's foram isoladas por separação de densidades utilizando o reagente Ficoll®-Paque Plus, segundo protocolo do fabricante. As células foram estimuladas a partir de 20 horas de cultivo em meio RPMI com 10µg de proteína rIL-17A, 5 µg de concanavalina A e somente troca de meio. Após 24 horas de estímulo o sobrenadante foi coletado e armazenado, as células foram armazenadas em Trizol® e posteriormente o mRNA celular extraído segundo protocolo do fabricante e armazenados a -70 °C. O mRNA resultante foi molde para síntese de cDNA utilizando KitHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

#### 4.1.9. Reação de qPCR (PCR quantitativo)

A análise de indução de expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias perante ao estímulo de rIL-17A foram quantificadas pela máquina de qPCR Mx30005P QPCR System (Agilent Technologies). Foram utilizados os *primers* descritos na tabela 1.

PRIMER	Tm °	Sequência (5'-3')
BOVINO		
B actina Forward	66.4	TGTCCACCTTCCAGCAAGTG
B actina Reverse	65.1	CTAGAAGCATTGCGGTGGA
IL-2 Forward	68.1	CCTCGAGTCCTGCCACAATG
IL-2 Reverse	64.0	CCGTAGAGCTTGAAGTAGGTGC
IL-4 Forward	67.2	GCCACACGTGCTTGAACAAA
IL-4 Reverse	66.5	TCTTGCTTGCCAAGCTGTTG
IL-17A Forward	67.1	CACAGCATGTGAGGGTCAAAC

IL-17A Reverse	65.0	GGTGGAGCGCTTGTGATAAT
INF-γ Forward	65.9	CAGAAAGCGGAAGAGAAGTCAGA
IFN-γ Reverse	66.7	CAGGCAGGAGGACCATTACG
<b>CAMUNDONGO</b>		
β- actina Forward	65.5	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
β- actina Reverse	66.0	CAATAGTGATGACCTGGCCGT
IL-17 Forward	67.0	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA
IL-17 Reverse	67.0	AGCTTTCCTCCGCATTGA
IFNγ Forward	64.3	GCGTCATTGAATCACACCTG
IFNγ Reverse	64.0	TGAGCTCATTGAATGCTTGG

**Tabela 1:** Sequência e temperatura de melting dos *primers* utilizados na reação de qPCR para células de origem bovinas

Os valores de Ct obtidos pelo qPCR foram analisados pela seguinte fórmula (Livak & Schmittgen, 2001):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \underbrace{(Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping})}_{Estímulo} - \underbrace{(Ct_{Target} - Ct_{Housekeeping})}_{Meio}$$

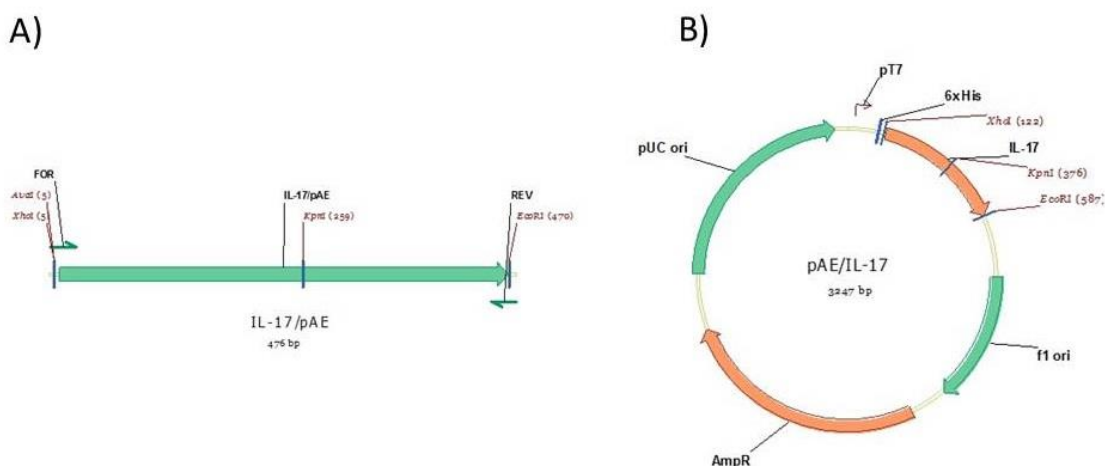
#### 4.1.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 7.00. Foi utilizado teste T simples com valor de  $p < 0,05$ .

## 4.2. Resultados

### 4.2.1. Construção dos iniciadores

O desenho *in silico* foi criado com o software Vector NTI Advance™ (Invitrogen), demonstrando a região a ser amplificada (Figura 2), que compreende uma região de 476 pares de base.



**Figura 2:** Gene da IL-17A. Imagem A) Porção a ser isolada utilizando os iniciadores construídos e suas respectivas enzimas de restrição. Imagem B) Construção pAE/IL-17A.

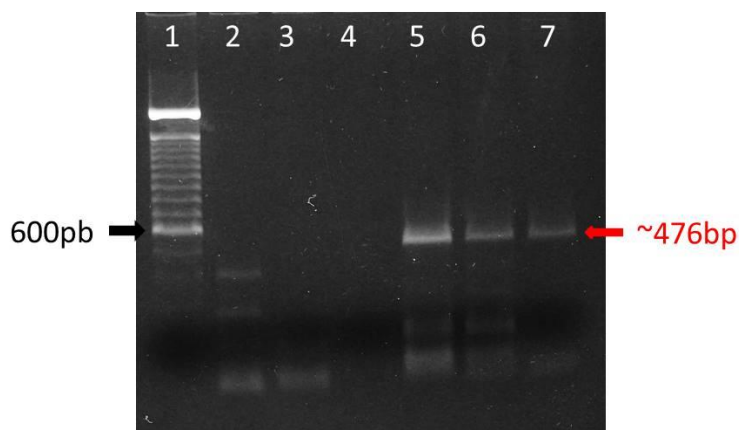
Os *primers* foram construídos com base nessas análises e estão demonstrados na tabela 2.

	TM °C	Sequência (5'-3')
Forward	58,4	GGA CTC GAG ATG GCT TCT ATG AGA AC
Reverse	62,2	CGG AAT TCA GCC AAA TGG CGG ACA A

**Tabela 2:** Sequência dos oligo iniciadores utilizados para obter a sequência da IL-17A

#### **4.2.2. Amplificação da sequência da IL-17A a partir de cDNA de esplenócitos bovinos**

A técnica de PCR foi realizada a partir de amostras de cDNA de esplenócitos bovinos, para a amplificação do gene da IL-17A. A técnica foi realizada utilizando *Taq* DNA Polimerase, com 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento em gradiente de 51 °C, 56 °C e 62 °C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto. Ocorreu a amplificação do fragmento esperado, visto que o produto da reação pode ser observado com tamanho sugerido esperado de 476pb quando submetido a eletroforese. Foram testadas diferentes concentrações de cDNA com diferentes temperaturas de anelamento (Figura 3). Os resultados mostram que a amplificação ocorreu com 1µg (concentração) de cDNA nas diferentes temperaturas de 51 °C, 56 °C e 62 °C. Todas as temperaturas testadas se mostraram eficazes para a amplificação da sequência desejada, porém foi necessário utilizar uma maior quantidade de material genético para a realização da reação em cadeia da polimerase.

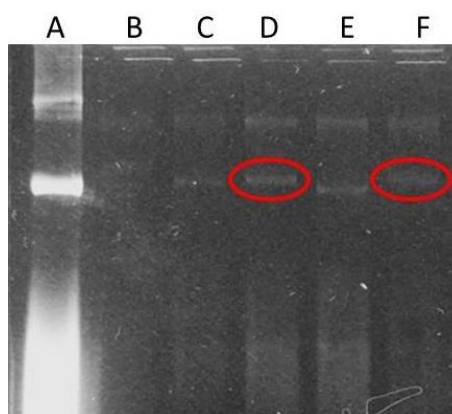


**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose 1%. Produto de amplificação pela reação de PCR das diferentes concentrações de cDNA e temperaturas de anelamento. 1) Marcador *Ladder* 100pb 2) 0,5 µg cDNA a 51 °C 3) 0,5 µg cDNA a 56 °C 4) 0,5 µg cDNA a 62 °C 5) 1 µg cDNA a 51 °C 6) 1 µg cDNA a 56 °C 7) 1 µg cDNA a 62 °C.

#### 4.2.3. Clonagem e seleção dos clones

O produto da PCR e o vetor, foram submetidos a restrição com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (BioLabs). Com as extremidades já coesas, a ligação foi realizada com T4 DNA Ligase (Invitrogen).

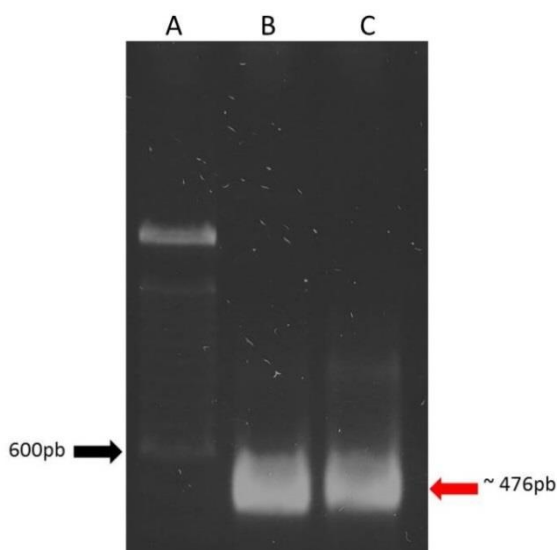
O produto da ligação entre a sequência amplificada de IL-17A no vetor pAE foi transformado em cepa de *E. coli* TOP10F, para identificar em qual dos plasmídeos ocorreu a inserção do gene. Das colônias isoladas foram extraídos plasmídeos (Figura 4).



**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose de 1% - extração plasmídial. O resultado da extração plasmídial de 6 clones de *E. coli*, que cresceram em meio de cultivo suplementado com ampicilina. A

primeira coluna possui o plasmídeo pAE íntegro, usado como controle para comparar com os demais clones.

O resultado do gel de agarose sugeriu que houve inserção do gene da IL-17A em duas colônias, que estão representadas pela coluna D e F na figura 4. A inserção do gene de interesse na construção do plasmídeo foi confirmada pela técnica de PCR, utilizando os *primers* para o gene da IL-17A. O produto obtido apresenta o mesmo tamanho do fragmento obtido inicialmente, comprovando a clonagem e inserção correta no plasmídeo (Figura 5). A primeira confirmação da eficácia dos processos de clonagem e transformação foi comprovada pela extração plasmidial que demonstrou resultados de plasmídeos com número de pares de bases superior ao plasmídeo de origem.



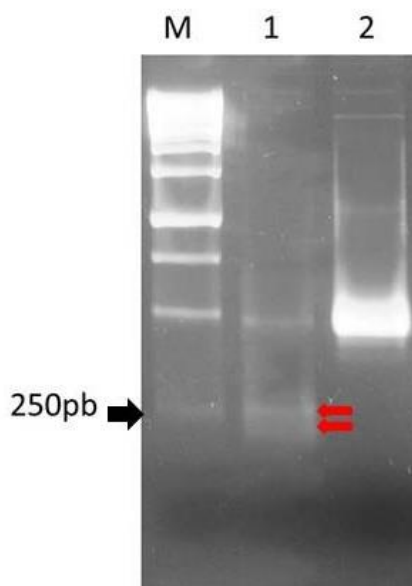
**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1% - confirmação dos clones pAE/IL-17A. A) Marcador de peso molecular *Ladder* 100pb B) PCR do clone da coluna D (Figura 3) C) PCR do clone da coluna F (Figura 3).

#### 4.2.4. Caracterização plasmidial

Para caracterizar os plasmídeos extraídos, o produto da PCR foi submetido a restrição com a enzima *KpnI*, visto que o fragmento apresenta um sítio de clivagem

para esta enzima, que divide o fragmento em dois menores com 257pb e 219pb (Figura 6). Essa digestão serviu para indicar a presença do inserto esperado no plasmídeo em questão.

O produto da reação de PCR foi encaminhado para realização de sequenciamento para a empresa ACTGene, e o *contig* formado foi usado na pesquisa através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search*), apresentando 99% de identidade com a sequência do gene da IL-17 de bovinos, com número de acesso AF412040 no GeneBank.

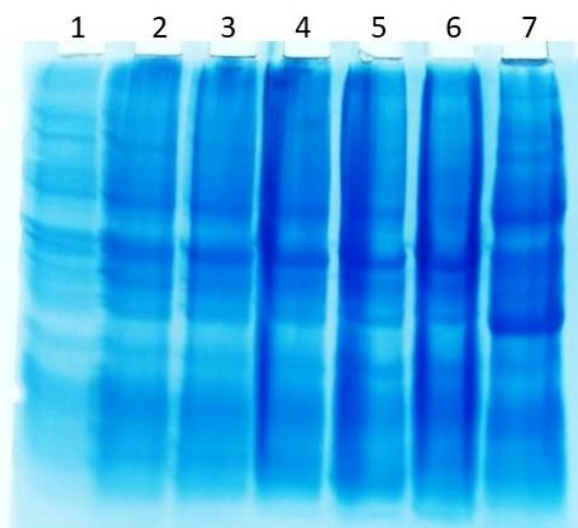


**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose de 1% - digestão do fragmento de IL-17 com *KpnI*. A restrição separa em dois fragmentos menores, sendo um de aproximadamente 257pb e o outro com 219pb. M) Marcador *Ladder* 1kb (Sigma) 1) Produto de PCR digerido com enzima *KpnI* 2) Produto de PCR não digerido.

#### 4.2.5. Expressão da rIL-17A

A expressão da proteína recombinante foi testada em 4 cepas diferentes, no entanto a expressão só pode ser visualizada na cepa Rosetta<sup>TM</sup>, principalmente na quarta hora após a indução com IPTG 1mM e após a purificação (Figura 7).

Essa mesma cepa foi utilizada para expressão da proteína recombinante em fermentador, onde foi cultivada por 4 horas após a indução com IPTG e sob condições controladas.

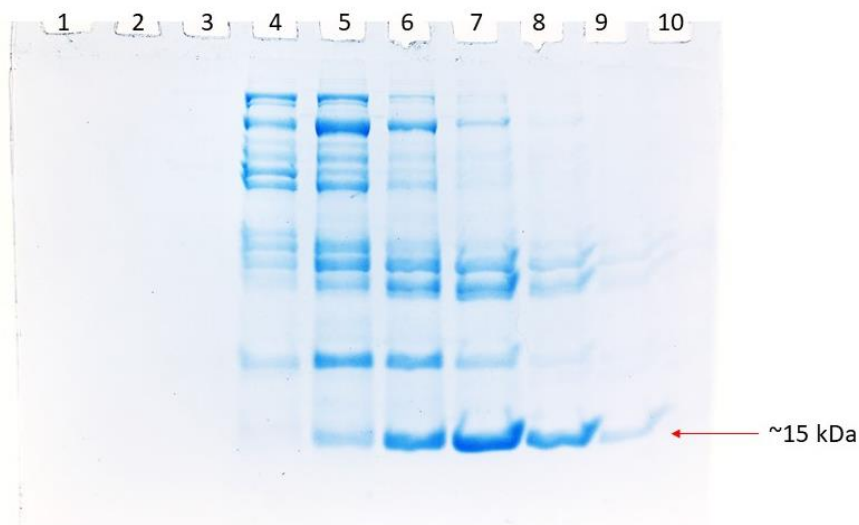


**Figura 7:** SDS-PAGE 15% - Expressão 1) Rosetta antes da indução; 2) 1h pós-indução; 3) 2h pós indução; 4) 3h pós-indução; 5) 4h pós-indução; 6) 24h pós-indução; 7) Rosetta não transformada

#### 4.2.6. Purificação

Após o cultivo finalizado, foram realizadas etapas de centrifugação, lise celular e filtragem em membrana com poros de 0,8mm de diâmetro com o *pellet* celular eluído em tampão de lise Akta Wash. Para a purificação as amostras foram submetidas a cromatografia de afinidade com uso da coluna de níquel HisTrap TALON. Na figura X observa-se a sequência de eluições em 1mL com total de 20 alíquotas. A proteína pode ser recuperada da fração 5 a fração 9 com o peso molecular esperado de aproximadamente 35 kDa (Figura 8).

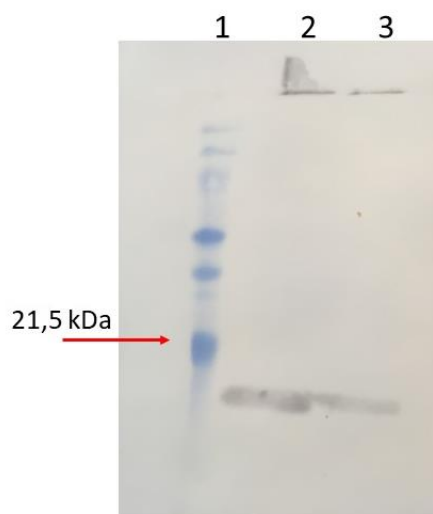




**Figura 8:** SDS-PAGE 15% - Purificação 1-10) Alíquotas de purificação de 1 a 10. A proteína foi eluída em 5 frações.

#### 4.2.7. Caracterização da rIL-17A

A técnica de *Western blot* sugere a confirmação da expressão da proteína recombinante. A proteína com o tamanho esperado de aproximadamente 15 kDa foi reconhecida frente a incubação com anticorpos que se ligam a cauda de histidina presente. Sendo assim, entende-se que o processo de clonagem e de purificação foram realizados com êxito (Figura 9).

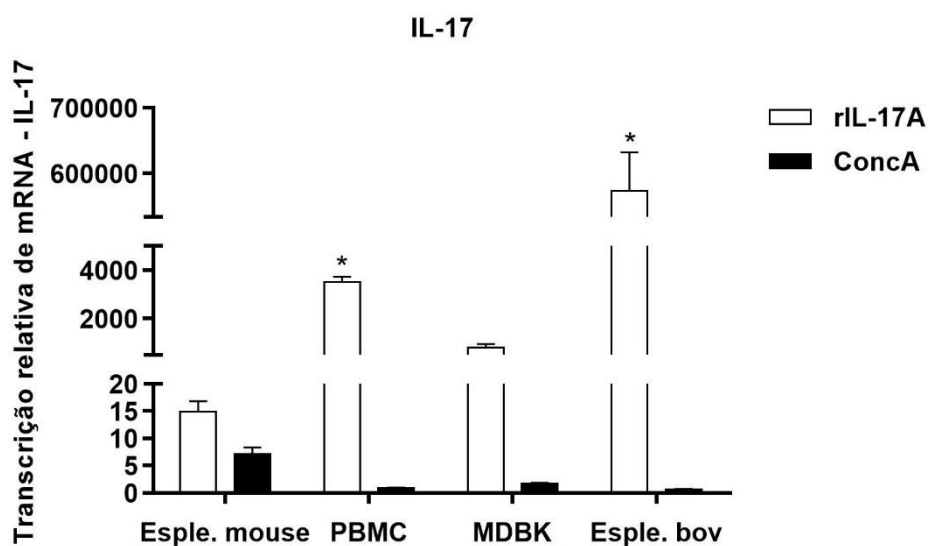


**Figura 9:** Membrana de nitrocelulose – *Western Blot* 1) Marcador de peso molecular, indicando o tamanho de 21,5 kDa; 2 e 3) Amostras positivas de rIL-17A.

#### 4.2.8. qPCR

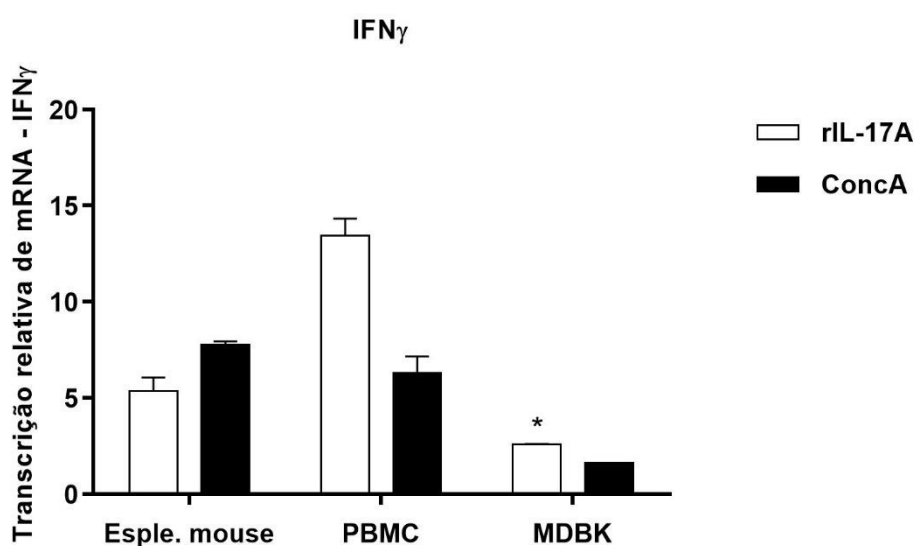
A realização do qPCR para a determinação dos níveis de transcrição das citocinas foi realizado com temperaturas de desnaturação a 95 °C, anelamento a 60 °C e extensão a 72 °C, e geraram os resultados demonstrados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

O gráfico da figura 10 mostra os níveis relativos de transcrição de mRNA de IL-17 em quatro diferentes tipos de célula, sendo eles esplenócitos de camundongos, PBMCs bovinas, MDBK e esplenócitos bovinos. Um grupo dessas células foram estimuladas com 10µg de concanavalina A e outro com 10µg de rIL-17A. Com base nos dados, pode-se observar que a IL-17A recombinante foi capaz aumentar os níveis de RNA mensageiro de IL-17 em todos os tipos de células.



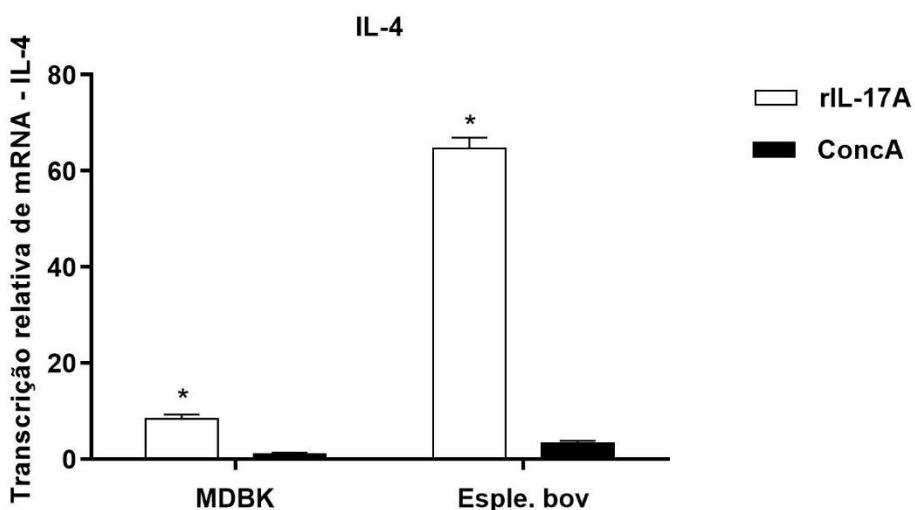
**Figura 10:** Transcrição relativa de mRNA de IL-17. Resultados de qPCR expressos em níveis de transcrição de RNA mensageiro. O estímulo com rIL-17A aumentou os níveis de transcrição do mRNA de IL-17 em todos os tipos de células testados. (\*) = diferença significativa.

No gráfico da figura 11, estão representados os resultados obtidos na reação de qPCR quanto a transcrição relativa de mRNA de IFN- $\gamma$ . Foi realizada a avaliação de três tipos de células, sendo elas, esplenócitos de camundongo, PBMCs bovinas e células MDBK, estimuladas com 10 $\mu$ g de concanavalina A e 10 $\mu$ g de rIL-17A. A proteína recombinante estimula a transcrição de mRNA do IFN- $\gamma$  tanto nas células MDBK quanto em PBMCs bovinas.



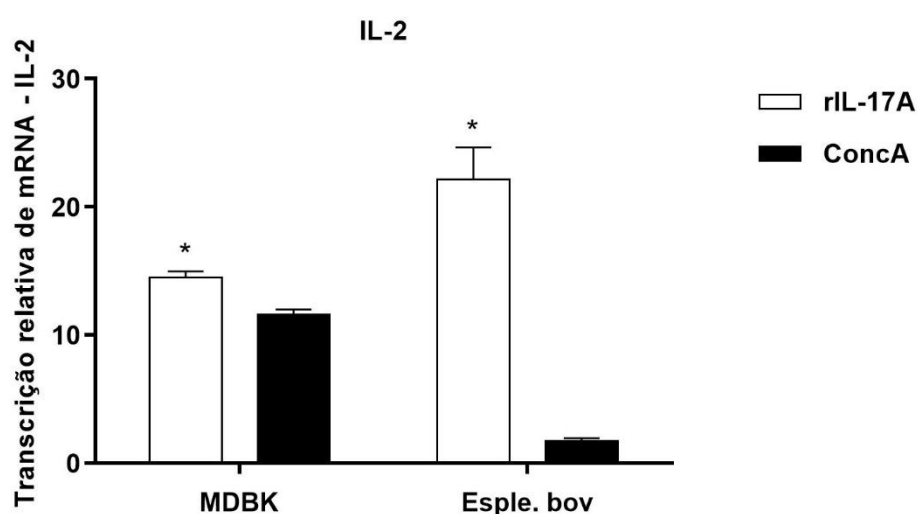
**Figura 11:** Transcrição relativa de mRNA de IFN $\gamma$ . Resultados de qPCR expressos em níveis de transcrição de RNA mensageiro. O estímulo com rIL-17A aumentou os níveis de transcrição do mRNA de IFN $\gamma$  nas PBMCs bovinas e nas células MDBK. (\*) = diferença significativa

A IL-4 teve seus níveis de transcrição de RNA mensageiros aumentados nas duas células testadas quando estimulados com 10 $\mu$ g de rIL-17A. As células MDBK e os esplenócitos bovinos também foram estimulados com concanavalina A. Os resultados estão demonstrados no gráfico da figura 12.



**Figura 12:** Transcrição relativa de mRNA de IL-4. Resultados de qPCR expressos em níveis de transcrição de RNA mensageiro. O estímulo com rIL-17A aumentou os níveis de transcrição do mRNA de IL-4 nas células MDBK e nos esplenócitos bovinos. (\*) = diferença significativa

Nos resultados da transcrição de IL-2, pode-se observar que a rIL-17A pode estimular a transcrição dessa citocina nos dois tipos de células em que foram testadas. As células MDBK e esplenócitos bovinos foram estimuladas com 10µg de rIL-17A e concanavalina A.



**Figura 13:** Transcrição relativa de mRNA de IL-2. Resultados de qPCR expressos em níveis de transcrição de RNA mensageiro. O estímulo com rIL-17A aumentou os níveis de transcrição do mRNA de IL-2 nas células MDBK e nos esplenócitos bovinos. (\*) = diferença significativa.

### 4.3. Discussão

Para a expressão de um fragmento gênico de interesse, a escolha do plasmídeo é essencial para a obtenção do produto final da maneira esperada. Neste trabalho foi escolhido o plasmídeo pAE por suas características importantes durante todo o processo de expressão e recuperação da proteína de interesse. O plasmídeo pAE possui em sua origem de replicação uma capacidade de apresentar de 500 a 700 cópias por célula, o que é um número relativamente alto quando comparado a outros vetores de expressão (Ramos et al., 2004). Outra característica importante é a presença de um gene marcador de seleção, o qual confere resistência a ampicilina. Tal característica proporcionou a possibilidade de selecionar somente as células que

tiveram a inserção do plasmídeo na etapa de clonagem deste trabalho. Um promotor para a transcrição é de importância fundamental para a correta expressão da proteína recombinante de interesse. O promotor de transcrição tem a função de manter os níveis basais de expressão do gene de interesse nulos até o momento da indução (Terpe, 2006). O promotor utilizado no trabalho foi o promotor T7 baseado na regulação do sistema pelo *operon lac*. Este é um controle que utiliza a repressão, e é induzido por um análogo da lactose, o IPTG. Essa substância se associa ao repressor inativando-o e deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase, acarretando a transcrição do gene (Ramos et al., 2004) (Figura 2). A indução da expressão da rIL-17A foi realizada na concentração de 1mM de IPTG, e a expressão foi monitorada, determinando-se que o período de maior rendimento foi 4 horas após a indução.

O sistema de expressão de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli*, é o sistema que domina as expressões bacterianas, e segue sendo a primeira escolha laboratorial para testes e desenvolvimento inicial em atividades comerciais, ou referências para comparação com outras plataformas (Chen, 2012). Nesse sistema as proteínas recombinantes, de maneira geral, não são secretadas e por isso permanecem citoplasmáticas. A expressão de proteínas no citoplasma pode conduzir a algumas más formações estruturais e a formação de corpos de inclusão insolúveis (Rosano & Ceccarelli, 2014). A principal desvantagem da formação de corpos de inclusão é a inatividade da proteína devido ao fato de ela perder sua atividade biológica de origem (Hyun et al., 2006). Neste trabalho o sistema de expressão em *E. coli* foi escolhido devido ao amplo esclarecimento disponível sobre essa plataforma e ao fácil acesso as técnicas necessárias. A proteína foi expressa e obtida de forma solúvel, não havendo necessidade de utilizar tampão com ureia para a solubilização. Esse fato também torna a utilização da rIL-17A mais viável como insumo biotecnológico, visto que a expressão na sua forma solúvel sugere que a proteína tenha mantido sua função biológica ativa.

A purificação da proteína recombinante é uma etapa determinante em que o produto de interesse é separado das demais proteínas expressas no cultivo. Foi realizada a purificação utilizando a técnica de cromatografia de afinidade. O princípio da técnica consiste na especificidade de ligação da molécula a um ligante imobilizado em matriz cromatográfica (Lin et al., 2015). No processo de clonagem, o plasmídeo

pAE utilizado é responsável por adicionar uma sequência que codifica para uma cauda de 6 histidina ao final da proteína, chamada de His-tag (Ramos et al., 2004). Essa sequência de histidina presente na proteína recombinante tem alta afinidade, e por isso formam complexos, com íons de metais de transição, como por exemplo o Níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). No trabalho foi utilizado coluna de cromatografia de afinidade com o  $\text{Ni}^{2+}$  HisTrap™. Após etapas de lise e filtração para retirar os restos celulares, as proteínas totais eluídas em tampão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2M; NaCl 0,5M; Imidazol 10mM) foram submetidas a purificação na coluna. Depois de se manterem retidas na coluna, as proteínas que continham a cauda de histidina foram eluídas em um tampão de eluição com aumento da concentração de Imidazol, e então fracionadas. A purificação ocorreu da forma prevista, apresentando em gel de poliacrilamida, bandas do tamanho esperado. Esse processo além de resultar na proteína recombinante de interesse na sua forma solúvel, também é uma etapa de confirmação, sugerindo que os processos de clonagem e expressão ocorreram da forma esperada, com a inserção da *tag* 6XHis no vetor (Figura 8). Os resultados demonstrados em gel de poliacrilamida antes da purificação não permitiram identificar a expressão da proteína, e esse fato pode ser decorrente dos baixos níveis de expressão e devido ao fato do peso molecular da proteína recombinante ser semelhante a outras proteínas de *E.coli* (Figura 7). No entanto, após a purificação as bandas da rIL-17A puderam ser destacadas de forma satisfatória.

A principal etapa de confirmação da inserção do plasmídeo, e consequentemente da expressão da proteína recombinante é o reconhecimento da proteína por parte de anticorpos específicos para tal. A técnica utilizada foi *Western Blot* e os resultados mostram que o anticorpo mAb anti-histidina (Invitrogen) reconheceu a sequência adicionada pelo plasmídeo e marcou na membrana de nitrocelulose a proteína no tamanho previsto de sua expressão (Figura 9). Com a rIL-17A caracterizada pelo reconhecimento de anticorpos se abrem possibilidades para a sua utilização como produto biotecnológico em diversas áreas da imunologia, como diagnóstico (José et al., 2014), adjuvantes vacinais (Matsumoto et al., 2017), produção de anticorpos monoclonais (Mease et al., 2015), entre outros, como já relatado na literatura utilizando outras citocinas.

Para o estudo de sinalização e atividade biológica da rIL-17A foram realizados cultivos de diferentes células (esplenócitos murinos, esplenócitos bovinos, células de

linhagem MDBK e PBMCs bovinas), estimuladas com a rIL-17A para teste e concanavalina A como um controle de viabilidade de células. Todas as células foram cultivadas sob o mesmo protocolo e foram submetidas aos mesmos estímulos (10µg de ambas proteínas), sendo analisadas por *primers* diferentes e por isso os resultados serão discutidos separadamente neste trabalho.

A IL-17 é uma citocina altamente pró-inflamatória, que tem como principal função no sistema imune o recrutamento de polimorfonucleares, a partir da indução da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6, GM-CSF e TNF (Veldhoen, 2017). A IL-17 também tem a capacidade de induzir a expressão de proteínas antimicrobianas (AMPs), que por sua vez, inibem diretamente o crescimento microbiano (Liévin-Le & Servin, 2006). De maneira geral, a expressão da IL-17 *in vivo* juntamente com ação de outras citocinas pró-inflamatórias, é um sinal inflamatório forte que resulta na rápida resposta por neutrófilos (Veldhoen, 2017). A IL-17, juntamente com outras citocinas, possui a capacidade de regular a própria expressão, desenvolvendo um feedback positivo, que aumenta sua produção e fortalece os efeitos provocados no sistema imune, como o aumento das respostas de fase aguda (Ogura et al., 2008). A rIL-17A produzida neste trabalho, foi utilizada como estímulo na concentração de 10µg/ml, em células de esplenócitos murinos, esplenócitos bovino, PBMCs e células de linhagem MDBK (Figura 10). Com base nos resultados de qPCR, a proteína expressa em *E. coli* mostrou que manteve as células do cultivo viáveis. Além disso, gerou o feedback positivo sobre a transcrição do próprio mRNA de IL-17, induzindo que as células expressassem ainda mais IL-17 em resposta a este estímulo. Pode-se afirmar, portanto, que a rIL-17A manteve sua atividade biologicamente ativa, gerando uma resposta esperada sob o cultivo celular, quando analisado por qPCR utilizando *primers* para a sequência de IL-17. Muito embora se tenha conhecimento de que citocinas são proteínas que se mantêm com estruturas e sequências altamente conservadas entre as espécies (de Oliveira et al., 2011), pode-se observar que em esplenócitos de camundongos a resposta ao estímulo da rIL-17A, apesar de haver, ocorre de maneira discreta quando comparado com as demais células (todas de origem bovina). Isso pode ser justificado devido ao fato da homologia da sequência de *Bos taurus* e *Mus musculus* ser de 68% de identidade, segundo dados do GeneBank (Figura 14), e isso altera a especificidade da ligação com o seu receptor. Ligações mais fracas e menos específicas entre o receptor e seu ligante



geram sinais e respostas não tão significativos (Gaffen, 2009). As células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney*) são uma linhagem de células epiteliais do tecido renal bovino muito utilizada em laboratórios em todo o mundo para diversas aplicações. O receptor de IL-17 é expresso em todos os tecidos, no entanto tem uma maior expressão nos tecidos hematopoiéticos (Ishigame et al., 2008). Este fato é curioso, pois a maior atividade de IL-17A é em tecido epiteliais, e nessas células o receptor aparece em menor concentração (Gaffen, 2010). Quando o receptor para IL-17A aparece em menor concentração, como é o caso das células MDBK, a resposta e sinalização de IL-17A se torna mais fraca, diferente de outras citocinas que não precisam de altos níveis de expressão do receptor para uma resposta elevada (Maitra et al., 2007). Isso pode justificar o fato dos níveis de transcrição de mRNA da IL-17 quando estimulada com rIL-17A terem sido inferiores em células MDBK quando comparadas com PBMCs e esplenócitos bovino.

Range 1: 21 to 158 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
200 bits(508)	7e-72	Compositional matrix adjust.	94/138(68%)	108/138(78%)	3/138(2%)
Query 19	ALVKAGVIIPQSPGCPPTEDKNFPOHVRVNLNIVNR---	STNSRRPTDYHKRSTSPWTLH	75		
Sbjct 21	A VKA IIPQS CP TE K+F Q+V+VNL + N	+SRRP+DY RSTSPWTLH	80		
Query 76	RNEDPERYPVINEAKCSHSGCINAEGKVDHIMNSVTIQEILVLRRESQHCPSFRLEK	135			
Sbjct 81	RNEDP+RYPVINEA+C H C+NAEGK+DHIMNSV IQEILVL+RE + CP +FR+EK	140			
Query 136	MLVAVGCTCVTPIVRHLA	153			
Sbjct 141	MLV VGCTCV IVR A	158			

**Figura 14:** Resultados BLAST – *blastp suite- 2 sequences*. Dados fornecidos pelo software BLAST, comparando as sequências de IL-17A *Bos taurus* (AF412040.1) e IL-17A *Mus musculus* (U43088.1). O resultado indica uma identidade de 68% entre as sequências homologas.

O IFN- $\gamma$  é um interferon do tipo II, que sinaliza através do complexo receptor IFNGR. Ele é predominantemente produzido por linfócitos T ativados e células NK, sendo seu principal papel a ativação de células imunes durante a infecção principalmente por patógenos intracelulares (Schroder et al., 2004). A deficiência na produção de IFN- $\gamma$  leva a perda de resistência a *Mycobacterium* (Cooper et al., 1993), *Listeria* (Harty & Bevant, 1995) e *Leshimania* (Taylor & Murray, 1997). A produção de IFN- $\gamma$  por células apresentadoras de antígenos, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, pode ser importante na auto-ativação celular e na ativação de

células próximas (Frucht et al., 2001). Estudos que falam sobre a propensão do desenvolvimento da diabetes, relacionam a atividade da IL-17 com IFN- $\gamma$  atuando sinergicamente para iniciar a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis por produzirem a insulina (Kuriya et al., 2013). Também existem relatos onde o IFN- $\gamma$  foi sugerido como um promotor da expansão das células Th17, por gerar um meio inflamatório, com auxílio de citocinas que propiciam a diferenciação de linfócito T CD4+ em linfócitos Th17 (Jandus et al., 2008). Além disso, o IFN- $\gamma$  também se mostrou atuar em sinergia com a IL-17 para induzir a produção de IL-6, constituindo um feedback positivo para o desenvolvimento de linfócitos Th17 (Mok et al., 2010). Para o proteção do hospedeiro contra patógenos intracelulares, a IL-17A e o IFN- $\gamma$  atuam sinergicamente (Zhang et al., 2012), mostrando que mesmo sendo citocinas características de linhagens de células T diferentes, podem ser essencial no controle mutuo. Neste trabalho os dados apresentados na figura 11, mostram que quando as células MDBK e as PBMCs foram estimuladas com rIL-17A houve um aumento na transcrição de mRNA de IFN- $\gamma$ . Esses resultados podem estar relacionados com a capacidade das duas citocinas interagirem e gerarem uma resposta inflamatória mais eficiente contra patógenos intracelulares. Com base nos resultados obtidos, e no conhecimento da ação de ambas citocinas, pode-se dizer que em resposta a um sinal pró-inflamatório, essas células produzem também uma resposta Th1, mesmo que de maneira discreta, paralelamente a uma resposta Th17. Essa resposta de IFN- $\gamma$  também pode estar associada a uma regulação da resposta por IL-17. Para controlar um estímulo de expressão excessiva de IL-17, o IFN- $\gamma$  monta um resposta imune paralela (Park et al., 2005).

A IL-4 é uma citocina característica das células Th2 e é um potente regulador da imunidade. Ela é secretada principalmente por mastócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2 (Gadani et al., 2013). Tem papel importante na mediação da sobrevivência de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas, como imunidade mediada por células Th2 (Fazekas & Groth, 1992), troca de isotipo IgE em linfócitos B (Geha et al., 2003) e reparação tecidual e homeostase, por uma via de ativação de macrófagos que difere da via clássica (Gordon, 2003). Existem relatos que comprovam uma inesperada relação entre resposta Th2 e IL-17 (Lambrecht & Hammad, 2015). Estudos apontam que a IL-17 está associada com o desencadeamento de uma resposta Th2 em um estado altamente patológico (Díaz &

Allen, 2007). Esses relatos estão de acordo com outros anteriores, que dizem que modelos de camundongos para estudo de alergias, com deficiência em IL-17 tem os níveis de citocinas tipo Th2 reduzidas, quando comparados com animais selvagens (Nakajima et al., 2014). Em um âmbito geral, a ativação de inicial de neutrófilos e IL-17 inicia eventos que podem promover uma resposta posterior do tipo Th2, que por sua vez, suprime o recrutamento de células polimorfonucleares excessivo (Allen et al., 2015). No presente trabalho as células estimuladas com rIL-17A promoveram uma transcrição de mRNA de IL-4. Embora a IL-4 seja uma citocina tipo Th2, esse aumento da expressão pode ser justificado pela necessidade de um controle de danos por parte Th2, caso houvesse um estímulo excessivo de IL-17, promovendo danos ao tecido devido ao alto recrutamento de neutrófilos. A interação entre IL-17/neutrófilos e a resposta Th2 é diferente de acordo com tempo e os tipos de células envolvidas (Kinyanjui et al., 2015). Esse feedback entre IL-17 e IL-4 é de importância inestimável em situações em que IL-17 agrava a patologia (Allen et al., 2015).

A IL-2 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T ativados, e tem envolvimento na maturação dos linfócitos B e T. Também exerce importante papel na regulação da resposta imune (Bayer et al., 2013). A ação efetora ou reguladora da IL-2 vai ser determinada pela quantidade disponível de IL-2, menores quantidades provocam a ação reguladora, enquanto a presença elevada de IL-2 desencadeia sua função efetora (Malek & Bayer, 2004). Essa citocina emergiu como um alvo chave na supressão da auto-imunidade e atuando como um mecanismo de feedback, que rege o limiar das respostas imunes contra antígenos estranhos e impede que ocorra a imunopatologia (Sim & Radvanyi, 2014). Tem se estudado o papel que a IL-2 e outras citocinas desempenham na regulação da diferenciação de linfócitos Treg ou Th17. Entende-se que além de fatores epigenéticos e do estado fisiológicos do indivíduo, a disponibilidade dessas citocinas regulam esta plasticidade entre a expressão de ROR $\gamma$ t ou FoxP3 (Deknuydt et al., 2009). Com base na geração de células Th17 após a deleção genética ou bloqueio de anticorpos em camundongos, a IL-2 foi proposta como inibidora da diferenciação Th17 por linfócitos CD4<sup>+</sup> convencionais (Laurence et al., 2007). Outros estudos no entanto, relacionam a IL-2 com a atenuação da produção de IL-17, e não com a inibição da diferenciação das células produtoras (Stockinger, 2007). Dessa forma o impacto da IL-2 na indução de linfócitos Th17 pode variar significativamente dependendo do subconjunto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Deknuydt et al.,

1130 2009). Os resultados apresentados neste trabalho, sustentam a ideia de que a IL-2  
1131 também funciona como reguladora da resposta imune. Diante de um estímulo da rIL-  
1132 17A as células de origem bovina induziram uma resposta de expressão de IL-2. Essa  
1133 expressão pode ter ocorrido com a intenção de controlar uma resposta exacerbada  
1134 de IL-17, direcionando a diferenciação de linfócito T DC4+ para Treg, e não Th17.

1135

## 5 PERSPECTIVAS

A utilização de cepas de *Escherichia coli* como sistema de expressão para proteínas recombinantes, além de já ser amplamente utilizado e ter todas as vantagens bem descritas na literatura (Rosano & Ceccarelli, 2014), mostrou-se ideal para a expressão da interleucina 17A de *Bos taurus*, realizada neste trabalho. A proteína foi expressa de forma solúvel e pode ser reconhecida por anticorpos específicos, no entanto houve um rendimento baixo na obtenção do produto final. Para isso, aprimoramentos no protocolo de expressão devem ser realizados com o intuito de aumentar a escala de expressão da rIL-17A, e ter um produto final com maior rendimento.

A rIL-17A mostrou que manteve sua atividade biológica sendo capaz de induzir uma resposta imune nos diferentes tipos de células em que foi testada, elevando principalmente os níveis de transcrição de mRNA de IL-17. Para dar sequência ao trabalho é necessário que se utilize outros estímulos como controle nas células, para descartar a possibilidade de que a resposta IL-17 conduzida pelas células, tenha sido devido a um estímulo inespecífico. Também é necessária a avaliação da transcrição do mRNA de outras citocinas do ciclo de resposta Th17 para poder ter mais dados *in vitro* sobre a modulação da resposta imune perante ao estímulo de IL-17A recombinante.

O estudo do bloqueio da atividade da IL-17 em animais experimentais também é um dado relevante a se ter na continuação do trabalho. Portanto podem ser realizados testes envolvendo a produção de anticorpos anti IL-17, objetivando um maior conhecimento da atividade da citocina em questão durante a infecção por patógenos.

Dessa forma, esse insumo biotecnológico tem a aplicação em diversas áreas da imunologia. As perspectivas do trabalho objetivam a utilização da interleucina 17A de *Bos taurus*, como um potencial adjuvante para vacinas contra patógenos intra e extracelulares. Outros autores já relataram a utilização de interleucinas recombinantes atuando nesta área (Matsumoto et al., 2017). Para isso serão necessárias etapas de inoculação em animais experimentais com diferentes concentrações e diferentes desafios. Também serão necessários testes *in vitro* adicionais como ELISA, por

1167 exemplo. A partir destes resultados, podemos começar a avaliar a atividade da  
1168 proteína recombinante no modelo animal alvo, como adjuvante vacinal.

1169

## 1170 6 CONCLUSÃO GERAL

1171

1172 - A construção do plasmídeo com o DNA exógeno de interesse codificante para  
1173 interleucina 17 A de *Bos taurus* foi efetiva;

1174 - A clonagem do plasmídeo em cepa Rosetta™ foi eficiente para a produção da  
1175 proteína recombinante na sua forma solúvel;

1176 - As etapas de purificação e caracterização por *Western Blot* mostraram resultados  
1177 positivos para a confirmação da expressão de rIL-17A de *Bos taurus*;

1178 - A indução de transcrição do mRNA de IL-17 (resultado obtido através da reação de  
1179 qPCR) após o estímulo com a proteína recombinante produzida no trabalho, é  
1180 suficiente para afirmar que ela manteve sua atividade biológica ativa, e não gerou  
1181 efeito tóxico para as células;

1182 - Os efeitos da sinalização da rIL-17A estão de acordo com os dados encontrados na  
1183 literatura.

1184

## 7 REFERÊNCIAS

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V, RIVINO, L., GEGINAT, J., JARROSSAY, D., GATTORNO, M., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. & NAPOLITANI, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17 – producing T helper memory cells. *Nature immunology*. 8(6). p. 639–646.
- ALLEN, J.E., SUTHERLAND, T.E. & RU, D. (2015). IL-17 and neutrophils : unexpected players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology*. 34. p. 99–106.
- AMATYA, N., GARG, A. V & GAFFEN, S.L. (2017). IL-17 Signaling : The Yin and the Yang. *Trends in Immunology*. 38. p. 310–322. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006>.
- BAILEY, M., CHRISTOFORIDOU, Z. & LEWIS, M.C. (2013). The evolutionary basis for differences between the immune systems of man , mouse , pig and ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152(1–2). p. 13–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.022>.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y.J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 18. p. 767–811.
- BAYER, A.L., PUGLIESE, A. & MALEK, T.R. (2013). The IL-2/IL-2R system: From basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation. *Immunologic Research*. 57(1–3). p. 197–209.
- BEDOYA, S.K., LAM, B., LAU, K. & III, J.L. (2013). Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. p. 16 PAGES.
- BEHL, J.D., VERMA, N.K., TYAGI, N., MISHRA, P., BEHL, R. & JOSHI, B.K. (2012). The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review. *ISRN Veterinary Science*. 2012. p. 1–12. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/872710/>.
- BELKAID, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: A dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*. 7(11). p. 875–888.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T.B., OUKKA, M., WEINER, H.L. & KUCHROO, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441(May). p. 235–238.
- BI, Y. & YANG, R. (2012). Direct and Indirect Regulatory Mechanisms in TH17 cell Differentiation and Functions. *Scandinavian Journal of Immunology*. 75. p. 543–552.
- BLANCO, F.C., BIANCO, M.V., MEIKLE, V., GARBACCIO, S., VAGNONI, L., FORRELLAD, M., INÉS, L., ADRIÁN, A. & BIGI, F. (2011). Increased IL-17 expression is associated with pathology in a bovine model of tuberculosis. *Tuberculosis*. 91(1). p. 57–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2010.11.007>.
- BRUSTLE, A., HEINK, S., HUBER, M., ROSENPLA, C., STADELMANN, C., YU, P., ARPAIA, E., MAK, T.W., KAMRADT, T. & LOHOFF, M. (2007). The development of inflammatory



- 1227 T H -17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology*. 8(9). p.  
1228 958–966.
- 1229 BUSSLINGER, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annual*  
1230 *review of immunology*. 22. p. 55–79.
- 1231 CHEN, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: E.  
1232 coli and beyond. *Biotechnology Advances*. 30(5). p. 1102–1107. Available at:  
1233 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>.
- 1234 CHEN, W. & DIJKE, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGF $\beta$   
1235 superfamily. *Nature Publishing Group*. 16(12). p. 723–740. Available at:  
1236 <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.112>.
- 1237 CHEN, Z., LAURENCE, A., KANNO, Y., PACHER-ZAVISIN, M., ZHU, B., TATO, C., YOSHIMURA,  
1238 A., HENNIGHAUSEN, L. & SHEA, J.J.O. (2006). Selective regulatory function of  
1239 Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National*  
1240 *Academy of Sciences of the United States of America*. 103(21). p. 8137–8142.
- 1241 COOPER, B.A.M., DALTON, D.K., STEWART, T.A., GRIFFIN, J.P., RUSSELL, D.G. & ORME,  
1242 I.M. (1993). Disseminated Tuberculosis in Interferon  $\gamma$  Gene-disrupted Mice By  
1243 Andrea M . Cooper,\* Dyana K. Dalton,# Timothy A. Stewart,I John P. Griffin,\*  
1244 David G. Russell,§ and Ian M. Orme\*. *The Journal of experimental medicine*.  
1245 178(December). p. 2243–2247.
- 1246 CROTTY, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>FH</sub>). *Annual Review of*  
1247 *Immunology*. 29(1). p. 621–663. Available at:  
1248 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>.
- 1249 DEKNUYDT, F., BIOLEY, G., VALMORI, D. & AYYOUB, M. (2009). IL-1 $\beta$  and IL-2 convert  
1250 human Treg into TH17 cells. *Clinical Immunology*. 131(2). p. 298–307. Available  
1251 at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.12.008>.
- 1252 DÍAZ, A. & ALLEN, J.E. (2007). Mapping immune response profiles : The emerging  
1253 scenario from helminth immunology. *European Journal of Immunology*. 37. p.  
1254 3319–3326.
- 1255 DÍAZ MARTÍN, D., PRIETO MARTÍN, A., ÚBEDA CANTERA, M. & ÁLVAREZ-MON SOTO, M.  
1256 (2013). Linfocitos T. *Medicine (Spain)*. 11(28). p. 1699–1709.
- 1257 DILLER, M.L., KUDCHADKAR, R.R., DELMAN, K.A., LAWSON, D.H. & FORD, M.L. (2016).  
1258 Balancing Inflammation : The Link between Th17 and Regulatory T Cells.  
1259 *Mediators of Inflammation*. 2016. p. 8 PAGES.
- 1260 DIXON, B.R.E.A., RADIN, J.N., PIAZUELO, M.B. & CONTRERAS, D.C. (2016). IL-17a and  
1261 IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and  
1262 May Contribute to Epithelial Cell Defense against Helicobacter pylori. *PLoS*  
1263 *ONE*. 11(2). p. 19 PAGES.
- 1264 DOHERTY, R., WHISTON, R., CORMICAN, P., FINLAY, E.K., COULDREY, C., BRADY, C.,  
1265 FARRELLY, C.O. & MEADE, K.G. (2016). The CD4 + T cell methylome contributes  
1266 to a distinct CD4 + T cell transcriptional signature in Mycobacterium bovis -  
1267 infected cattle. *Nature Publishing Group*. (August). p. 1–15. Available at:  
1268 <http://dx.doi.org/10.1038/srep31014>.
- 1269 DRINKALL, E., WASS, M.J., CO, T.J. & FLYNN, R.J. (2017). A rapid IL-17 response to

- 1270 Cryptosporidium parvum in the bovine intestine. *Veterinary Immunology and*  
1271 *Immunopathology*. 191(June). p. 1–4.
- 1272 DU, J., HUANG, C., ZHOU, B., STEVEN, F. & ALERTS, E. (2008). Isoform-Specific  
1273 Inhibition of ROR  $\alpha$  -Mediated Transcriptional Activation by Human FOXP3. *The*  
1274 *Journal of Immunology*. 180. p. 4785–4792.
- 1275 DUMMER, L.A., ARAUJO, I.L., FINGER, P.F., DOS SANTOS, A.G., DA ROSA, M.C.,  
1276 CONCEIÇÃO, F.R., FISCHER, G., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. & LEITE,  
1277 F.P.L. (2014). Immune responses of mice against recombinant bovine  
1278 herpesvirus 5 glycoprotein D. *Vaccine*. 32(21). p. 2413–2419.
- 1279 FAZEKAS, B. & GROTH, D.S. (1992). The Presence of Interleukin 4 during In Vitro  
1280 Priming Determines the Lymphokine-producing Potential of CD4 + T Cells from  
1281 T Cell Receptor Transgenic Mice. *Journal of Experiment Medicine*.  
1282 176(October). p. 1091–1098.
- 1283 FRUCHT, D.M., FUKAO, T., BOGDAN, C., SCHINDLER, H., SHEA, J.J.O., KOYASU, S. &  
1284 SHEA, J.J.O. (2001). IFN-  $\gamma$  production by cells : mechanisms emerge. *Trends in*  
1285 *Immunology*. 22(10). p. 556–560.
- 1286 GADANI, S.P., CRONK, J.C., NORRIS, G.T. & KIPNIS, J. (2013). Interleukin-4: A Cytokine  
1287 to Remember. *Journal of immunology*. 189(9). p. 4213–4219.
- 1288 GAFFEN, S.L. (2010). Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily.  
1289 *Nature Reviews Immunology*. 9(8). p. 556–580.
- 1290 GAFFEN, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL - 17 receptor family. *Nature*  
1291 *Publishing Group*. 9. p. 556–567. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2586>.
- 1292 GAFFEN, S.L., JAIN, R., GARG, A. V & CUA, D.J. (2014). The IL-23–IL-17 immune axis:  
1293 from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Publishing Group*. 14(9). p. 585–  
1294 600. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3707>.
- 1295 GEHA, R.S., JABARA, H.H. & BRODEUR, S.R. (2003). The regulation of immunoglobulin  
1296 e class-switch recombinant. *Nature Reviews Immunology*. 3(September). p.  
1297 721–32.
- 1298 GHORESCHI, K., LAURENCE, A., YANG, X., TATO, C.M., MCGEACHY, M.J., KONKEL, J.E.,  
1299 RAMOS, L., WEI, L., DAVIDSON, T.S., BOULADOUX, N., GRAINGER, J.R., CHEN, Q.,  
1300 KANNO, Y. & WATFORD, W.T. (2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the  
1301 absence of TGF-  $\beta$  signalling. *Nature*. 467. p. 967–971.
- 1302 GOLDMAN, A.S. & PRABHAKAR, B.S. (2008). Immunology Overview. *Web dump*. p. 1–  
1303 37.
- 1304 GORDON, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews*  
1305 *Immunology*. 3(January). p. 23–35.
- 1306 GUO, P., HIRANO, M., HERRIN, B.R., LI, J., YU, C., SADLONOVA, A. & COOPER, M.D.  
1307 (2009). Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature*.  
1308 459(7248). p. 796–801. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08068>.
- 1309 HAMADA, S., UMEMURA, M., SHIONO, T., TANAKA, K., AYANO YAHAGI, BEGUM, M.D.,  
1310 OSHIRO, K., OKAMOTO, Y., WATANABE, H., KAZUYOSHI KAWAKAMI, ROARK, C., BORN,  
1311 W.K., O'BRIEN, R., IKUTA, K., ISHIKAWA, H., NAKAE, S., IWAKURA, Y., OHTA, T. &

- 1312 MATSUZAKI, G. (2008). IL-17A Produced by  $\gamma\delta$  T Cells Plays a Critical Role in  
1313 Innate Immunity against *Listeria monocytogenes* Infection in the Liver1. *Journal*  
1314 *of immunology*. 181(5). p. 3456–3463.
- 1315 HARTY, J.T. & BEVANT, M.J. (1995). Specific Immunity to *Listeria monocytogenes* in  
1316 the Absence of IFN $\gamma$ . *Immunity*. 3. p. 109–117.
- 1317 HIROTA, K., TURNER, J., VILLA, M., DUARTE, J.H. & DEMENGEOT, J. (2013). T H 17 cell  
1318 plasticity in Peyer ' s patches is responsible for induction of T cell-dependent IgA  
1319 responses. *Nature immunology*. 14(4). p. 372–379.
- 1320 HYUN, J., CHANG, K. & YUP, S. (2006). Production of recombinant proteins by high cell  
1321 density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*. 61. p. 876–  
1322 885.
- 1323 INFANTE-DUARTE, C., HORTON, H.F., BYRNE, M.C. & KAMRADT, T. (2000). Microbial  
1324 Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. *The Journal of*  
1325 *Immunology*. 165. p. 6107–6115.
- 1326 ISHIGAME, H., KAKUTA, S., NAGAI, T., KADOKI, M., NAMBU, A., KOMIYAMA, Y., FUJIKADO,  
1327 N., TANAHASHI, Y., AKITSU, A., KOTAKI, H., SUDO, K., NAKAE, S., SASAKAWA, C. &  
1328 IWAKURA, Y. (2008). Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host  
1329 Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses.  
1330 *Immunity*. 30(1). p. 108–119. Available at:  
1331 <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.009>.
- 1332 IVANOV, I.I., MCKENZIE, B.S., ZHOU, L., TADOKORO, C.E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J.J.,  
1333 CUA, D.J. & LITTMAN, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR  $\gamma$  t Directs  
1334 the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17 + T Helper Cells. *Cell*  
1335 *research*. 126. p. 1121–1133.
- 1336 IVANOVA, E.A. & OREKHOV, A.N. (2015). T Helper lymphocyte subsets and plasticity in  
1337 autoimmunity and cancer: An overview. *BioMed Research International*. 2015. p.  
1338 9 PAGES.
- 1339 IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate  
1340 immune system. *Nature Immunology*. 16(4). p. 343–353.
- 1341 IZCUE, A., COOMBES, J.L. & POWRIE, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal  
1342 inflammation. *Annual review of immunology*. 27. p. 313–338.
- 1343 JANDUS, C., BIOLEY, G., RIVALS, J., DUDLER, J., SPEISER, D. & ROMERO, P. (2008).  
1344 Increased Numbers of Circulating Polyfunctional Th17 Memory Cells in Patients  
1345 With Seronegative Spondylarthritides. *Arthritis and rheumatism*. 58(8). p. 2307–  
1346 2317.
- 1347 JIN, W. & DONG, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging*  
1348 *Microbes & Infections*. 2(0). p. E60. Available at:  
1349 <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2013.58>.
- 1350 JOSÉ, M.E.S., FERREIRO, L., SONEIRA, M.E., GONZÁLEZ-BARCALA, F.J., VÁZQUEZ, M.C.,  
1351 GOLPE, A. & SAM, C.M.E. (2014). Utility of Measurement of Interleukin-1 $\beta$  and  
1352 Interleukin-8 in the Diagnosis of Complicated Parapneumonic Pleural Effusions.  
1353 *American Journal of Clinical Patology*. 142. p. 467–473.
- 1354 KELLY, M.N., KOLLS, J.K., HAPPEL, K., SCHWARTZMAN, J.D., SCHWARZENBERGER, P.,

- 1355 COMBE, C., MORETTO, M. & KHAN, I.A. (2005). Interleukin-17 / Interleukin-17  
1356 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal  
1357 Polymorphonuclear Response against *Toxoplasma gondii* Infection. *Infection*  
1358 *and Immunity*. 73(1). p. 617–621.
- 1359 KEZIC, J.M., GLANT, T.T., ROSENBAUM, J.T. & ROSENZWEIG, H.L. (2012). Neutralization  
1360 of IL-17 ameliorates uveitis but damages photoreceptors in a murine model of  
1361 spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 14. p. 9 PAGES.
- 1362 KINYANJUI, M.W., SHAN, J., NAKADA, E.M., QURESHI, S.T., FIXMAN, E.D., KINYANJUI,  
1363 M.W., SHAN, J., NAKADA, E.M. & QURESHI, S.T. (2015). Dose-Dependent Effects  
1364 of IL-17 on IL-13 – Induced Airway Inflammatory Responses and Airway  
1365 Hyperresponsiveness. *Journal of immunology*. 190. p. 3859–3868.
- 1366 KOLLS, J.K., JR, P.B.M. & CHAN, Y.R. (2008). Cytokine-mediated regulation of  
1367 antimicrobial proteins. *Nature immunology*. 11. p. 829–835.
- 1368 KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. & KUCHROO, V.K. (2009a). IL-17 and Th17 Cells.  
1369 *Annual Review of Immunology*. 27(1). p. 485–517. Available at:  
1370 <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>  
1371 .
- 1372 KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. & KUCHROO, V.K. (2009b). IL-17 and Th17 Cells.  
1373 *Annual Review of Immunology*. 27(1). p. 485–517. Available at:  
1374 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>.
- 1375 KRETSCHMER, K., APOSTOLOU, I., HAWIGER, D., KHAZAIE, K., NUSSENZWEIG, M.C. &  
1376 BOEHMER, H. VON (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations  
1377 by foreign antigen. *Nature immunology*. 6(12). p. 1219–1227.
- 1378 KRSTIC, J. & SANTIBANEZ, J.F. (2014). Transforming Growth Factor-Beta and Matrix  
1379 Metalloproteinases : Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid  
1380 Cells. *The Scientific World Journal*. 2014. p. 14 PAGES.
- 1381 KUESTNER, R.E., TAFT, D.W., HARAN, A., BRANDT, C.S., BRENDER, T., HARDER, B.,  
1382 OKADA, S., OSTRANDER, C.D., KREINDLER, J.L., AUJLA, J., REARDON, B., MOORE, M.,  
1383 SHEA, P., SCHRECKHISE, R., BUKOWSKI, R., PRESNELL, S., GUERRA-LEWIS, P.,  
1384 PARRISH-NOVAK, J., JEFF, L., ET AL. (2010). Identification of the IL-17 Receptor  
1385 Related Molecule IL-17RC as the Receptor for IL-17F. *Journal of immunology*.  
1386 179(8). p. 5462–5473.
- 1387 KURIYA, G., UCHIDA, T., AKAZAWA, S., KOBAYASHI, M. & NAKAMURA, K. (2013). Double  
1388 deficiency in IL-17 and IFN-  $\gamma$  signalling significantly suppresses the  
1389 development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 56. p. 1773–1780.
- 1390 LAMBRECHT, B.N. & HAMMAD, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature*  
1391 *immunology*. 16(1). p. 45–56.
- 1392 LAROSA, D.F. & ORANGE, J.S. (2008). 1. Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical*  
1393 *Immunology*. 121(2 SUPPL. 2). p. 364–369.
- 1394 LAURENCE, A., TATO, C.M., DAVIDSON, T.S., KANNO, Y., CHEN, Z., YAO, Z., BLANK,  
1395 R.B.B., MEYLAN, F., SIEGEL, R., HENNIGHAUSEN, L., SHEVACH, E.M. & O'SHEA,  
1396 J.J.J. (2007). Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell  
1397 Generation. *Immunity*. 26(3). p. 371–381.

- 1398 LEONARD, W.J., ZENG, R. & SPOLSKI, R. (2008). Interleukin 21 : a cytokine / cytokine  
1399 receptor system that has come of age. *Journal of Leukocyte Biology*. 84(August).  
1400 p. 348–356.
- 1401 LI, M.O., WAN, Y.Y. & FLAVELL, R.A. (2007). T Cell-Produced Transforming Growth  
1402 Factor- $\beta$  1 Controls T Cell Tolerance and Regulates. *Immunity*. 26(May). p. 579–  
1403 591.
- 1404 LIÉVIN-LE, V. & SERVIN, A.L. (2006). The Front Line of Enteric Host Defense against  
1405 Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms : Mucins , Antimicrobial  
1406 Peptides , and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(2). p. 315–337.
- 1407 LIN, E., CALVANO, S.E. & LOWRY, S.F. (2000). Inflammatory cytokines and cell  
1408 response in surgery. *Surgery*. 127(2). p. 117–126.
- 1409 LIN, Y., RITCHEA, S., LOGAR, A., SLIGHT, S., MESSMER, M., RANGEL-MORENO, J.,  
1410 GUGLANI, L., ALCORN, J.F., STRAWBRIDGE, H., PARK, S.M., ONISHI, R., NYUGEN, N.,  
1411 WALTER, M.J., POCIASK, D., RANDALL, T.D., GAFFEN, S.L., IWAKURA, Y., KOLLS, J.K.  
1412 & KHADER, S.A. (2009). Interleukin-17 Is Required for T Helper 1 Cell Immunity  
1413 and Host Resistance to the Intracellular Pathogen *Francisella tularensis*.  
1414 *Immunity*. 31(5). p. 799–810. Available at:  
1415 <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.025>.
- 1416 LIN, Z., ZHAO, Q., XING, L., ZHOU, B. & WANG, X. (2015). Aggregating tags for column-  
1417 free protein purification. *Biotechnology Journal*. 10. p. 1877–1886.
- 1418 LINDEMANN, M.J., HU, Z., BENCZIK, M., LIU, K.D. & GAFFEN, S.L. (2008). Differential  
1419 Regulation of the IL-17 Receptor by  $\alpha$  c Cytokines. *Journal of Biological*  
1420 *Chemistry*. 283(20). p. 14100–14108.
- 1421 LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data  
1422 using real-time quantitative PCR and. *Methods*. 25. p. 402–408.
- 1423 LOWES, M.A., RUSSELL, C.B., MARTIN, D.A., TOWNE, J.E. & KRUEGER, J.G. (2012). The  
1424 IL-23 / T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses.  
1425 *Trends in Immunology*. 34. p. 171–181. Available at:  
1426 <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.11.005>.
- 1427 MAITRA, A., SHEN, F., HANEL, W., MOSSMAN, K., TOCKER, J., SWART, D. & GAFFEN, S.L.  
1428 (2007). Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal  
1429 transduction and target gene expression. *Proceedings of the National Academy*  
1430 *of Sciences of the United States of America*. 104. p. 1–6.
- 1431 MALEK, T.R. & BAYER, A.L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-  
1432 2. *Nature Reviews Immunology*. 4(9). p. 665–674.
- 1433 MANGAN, P.R., HARRINGTON, L.E., O'QUINN, D.B., HELMS, W.S., BULLARD, D.C., ELSON,  
1434 C.O., HATTON, R.D., WAHL, S.M., SCHOEB, T.R. & WEAVER, C.T. (2006).  
1435 Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T(H)17 lineage.  
1436 *Nature*. 441(7090). p. 231–234.
- 1437 MARTIN, B., HIROTA, K., CUA, D.J., STOCKINGER, B. & VELDHOEN, M. (2009). Interleukin-  
1438 17-Producing gd T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products  
1439 and Environmental Signals. *Immunity*. 31(2). p. 321–330. Available at:  
1440 <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.020>.

- 1441 MATSUMOTO, M., ARAKI, K., HAYASHI, K., TAKEUCHI, Y., SHIOZAKI, K., SUETAKE, H. &  
1442 YAMAMOTO, A. (2017). Adjuvant effect of recombinant interleukin-12 in the  
1443 Nocardiosis formalin-killed vaccine of the amberjack *Seriola dumerili*. *Fish and*  
1444 *Shellfish Immunology*. 67. p. 263–269. Available at:  
1445 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.025>.
- 1446 MCGEACHY, M.J., CHEN, Y., TATO, C.M., LAURENCE, A., JOYCE-SHAIKH, B.,  
1447 BLUMENSCHIN, W.M., MCCLANAHAN, T.K., SHEA, J.J.O. & CUA, D.J. (2009). The  
1448 interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17  
1449 – producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology*. 10(3).
- 1450 MEASE, P.J., MCINNES, I.B., KIRKHAM, B., KAVANAUGH, A., RAHMAN, P., VAN DER HEIJDE,  
1451 D., LANDEWÉ, R., NASH, P., PRICOP, L., YUAN, J., RICHARDS, H.B. & MPOFU, S.  
1452 (2015). Secukinumab Inhibition of Interleukin-17A in Patients with Psoriatic  
1453 Arthritis. *New England Journal of Medicine*. 373(14).
- 1454 MEDZHITOV, R. & JANEWAY JR., C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms  
1455 and pathways. *Immunol Rev*. 173. p. 89–97. Available at:  
1456 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10719670)  
1457 [=Citation&list\\_uids=10719670](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10719670).
- 1458 MENSIKOVA, M., STEPANOVA, H. & FALDYNA, M. (2013). Interleukin-17 in veterinary  
1459 animal species and its role in various diseases: A review. *Cytokine*. 64(1). p. 11–  
1460 17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.06.002>.
- 1461 MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S. DE, CRUVINEL,  
1462 W. DE M., ANDRADE, L.E.C. & SILVA, N.P. DA (2010). Sistema imunitário - parte II:  
1463 fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista*  
1464 *Brasileira de Reumatologia*. 50(5). p. 552–580.
- 1465 MOK, M.Y., WU, H.J., LO, Y. & LAU, C.S. (2010). The relation of interleukin 17 (IL-17)  
1466 and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus  
1467 erythematosus. *Journal of Rheumatology*. 37(10). p. 2046–2052.
- 1468 MONTELEONE, G., PALLONE, F. & MACDONALD, T.T. (2008). Interleukin-21 : a critical  
1469 regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses.  
1470 *Trends in Immunology*. 29(April). p. 21–25.
- 1471 MORRILL, K.M., CONRAD, E., LAGO, A., CAMPBELL, J., QUIGLEY, J. & TYLER, H. (2012).  
1472 Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in  
1473 the United States. *Journal of Dairy Science*. 95(7). p. 3997–4005. Available at:  
1474 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5174>.
- 1475 MORRISON, P.J., SARAH, J. & KULLBERG, M.C. (2011). Interleukin- 23 and T helper 17 -  
1476 type responses in intestinal inflammation : from cytokines to T-cell plasticity.  
1477 *Immunology*. 133. p. 397–408.
- 1478 MOSELEY, T. A., HAUDENSCHILD, D.R., ROSE, L. & REDDI, A. H. (2003). Interleukin-17  
1479 family and IL-17 receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 14(2). p. 155–  
1480 174.
- 1481 MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. (1986).  
1482 Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of  
1483 lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore,*  
1484 *Md. : 1950)*. 136. p. 2348–2357.

- 1485 MOSSER, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of*  
 1486 *Leukocyte Biology*. 73(2). p. 209–212. Available at:  
 1487 <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0602325>.
- 1488 MURANSKI, P. & RESTIFO, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and  
 1489 plasticity. *Blood*. 121(13). p. 2402–2414.
- 1490 MURPHY, K.M. & STOCKINGER, B. (2010). Effector T cell plasticity: Flexibility in the face  
 1491 of changing circumstances. *Nature Immunology*. 11(8). p. 674–680. Available at:  
 1492 <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1899>.
- 1493 NAKAJIMA, S., KITOH, A., EGAWA, G., NATSUAKI, Y., NAKAMIZO, S., MONIAGA, C.S.,  
 1494 OTSUKA, A., HONDA, T., HANAKAWA, S., AMANO, W., IWAKURA, Y., NAKAE, S., KUBO,  
 1495 M., MIYACHI, Y. & KABASHIMA, K. (2014). IL-17A as an Inducer for Th2 Immune  
 1496 Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. *Journal of Investigative*  
 1497 *Dermatology*. 134(8). p. 2122–2130. Available at:  
 1498 <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.51>.
- 1499 NEEFJES, J., JONGSMA, M.L.M., PAUL, P. & BAKKE, O. (2011). Towards a systems  
 1500 understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature*  
 1501 *Reviews Immunology*. 11(12). p. 823–836. Available at:  
 1502 <http://dx.doi.org/10.1038/nri3084>.
- 1503 NURIEVA, R., YANG, X.O., MARTINEZ, G., ZHANG, Y., PANOPOULOS, A.D., MA, L.,  
 1504 SCHLUNS, K., TIAN, Q., WATOWICH, S.S., JETTEN, A.M. & DONG, C. (2007).  
 1505 Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.  
 1506 *Nature*. 448(July). p. 2–6.
- 1507 OGURA, H., MURAKAMI, M., OKUYAMA, Y., TSURUOKA, M., KITABAYASHI, C., KANAMOTO,  
 1508 M., NISHIHARA, M., IWAKURA, Y. & HIRANO, T. (2008). Interleukin-17 Promotes  
 1509 Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop. *Immunity*. 29(4). p. 628–  
 1510 636. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.018>.
- 1511 DE OLIVEIRA, C.M.B., SAKATA, R.K., ISSY, A.M., GEROLA, L.R. & SALOMÃO, R. (2011).  
 1512 Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 61(2). p. 255–265.
- 1513 PAPANEOPHYTOU, C.P. & KONTOPIDIS, G. (2014). Statistical approaches to maximize  
 1514 recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein*  
 1515 *Expression and Purification*. 94. p. 22–32. Available at:  
 1516 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>.
- 1517 PAPOTTO, P.H., RIBOT, J.C. & SILVA-SANTOS, B. (2017). IL-17 +  $\gamma\delta$  T cells as kick-  
 1518 starters of inflammation. *Nature immunology*. 18(6). p. 8 PAGES.
- 1519 PAPPU, R., RUTZ, S. & OUYANG, W. (2012). Regulation of epithelial immunity by IL-17  
 1520 family cytokines. *Trends in Immunology*. 33(7). p. 343–349. Available at:  
 1521 <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.02.008>.
- 1522 PARHAM, C., CHIRICA, M., TIMANS, J., TRAVIS, M., CHEUNG, J., PFLANZ, S., ZHANG, R.,  
 1523 SINGH, K.P., VEGA, F., TO, W., WAGNER, J., FARRELL, A.O., MCCLANAHAN, T.,  
 1524 ZURAWSKI, S., HANNUM, C., GORMAN, D., RENNICK, M., KASTELEIN, R.A., MALEFYT,  
 1525 R.D.W., ET AL. (2002). A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is  
 1526 Composed of IL-12R  $\beta$  1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *The*  
 1527 *Journal of Immunology*. 168. p. 5699–5708.

- 1528 PARK, H., LI, Z., YANG, X.O., CHANG, S.H., NURIEVA, R., WANG, Y., WANG, Y., HOOD, L.,  
1529 ZHU, Z., TIAN, Q. & DONG, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates  
1530 tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*. 6(11). p.  
1531 1133–1141.
- 1532 PARSONAGE, G., FILER, A., BIK, M., HARDIE, D., LAX, S., HOWLETT, K., CHURCH, L.D.,  
1533 RAZA, K., WONG, S., TREBILCOCK, E., SCHEEL-TOELLNER, D., SALMON, M., LORD,  
1534 J.M. & BUCKLEY, C.D. (2008). Research article Prolonged , granulocyte –  
1535 macrophage colony-stimulating factor-dependent , neutrophil survival following  
1536 rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha. *Arthritis Res*  
1537 *Ther.*. 10(2). p. 1–12.
- 1538 PAUL, W.E. & ZHU, J. (2010). How are TH2-type immune responses initiated and  
1539 amplified? *Nature Reviews Immunology*. 10(4). p. 225–235. Available at:  
1540 <http://dx.doi.org/10.1038/nri2735>.
- 1541 PECKHAM, R.K., BRILL, R., FOSTER, D.S., BOWEN, A.L., LEIGH, J.A., COFFEY, T.J. &  
1542 FLYNN, R.J. (2014). Two distinct populations of Bovine IL-17+ T-cells can be  
1543 induced and WC1 + IL-17+ ?? 3?? T-cells are effective killers of protozoan  
1544 parasites. *Scientific Reports*. 4. p. 1–5.
- 1545 PECKHAM, R.K., BRILL, R., FOSTER, D.S., BOWEN, A L., LEIGH, J. A, COFFEY, T.J. &  
1546 FLYNN, R.J. (2014). Two distinct populations of Bovine IL-17(+) T-cells can be  
1547 induced and WC1(+)IL-17(+)γδ T-cells are effective killers of protozoan  
1548 parasites. *Scientific reports*. 4. p. 5431. Available at:  
1549 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961164>.
- 1550 QIAN, Y., LIU, C., HARTUPEE, J., ALTUNTAS, C.Z., GULEN, M.F., JANE-WIT, D., XIAO, J., LU,  
1551 Y., GILTIAY, N., LIU, J., KORDULA, T., ZHANG, Q., VALLANCE, B., SWAIDANI, S.,  
1552 ARONICA, M., TUOHY, V.K., HAMILTON, T. & LI, X. (2007). The adaptor Act1 is  
1553 required for interleukin 17 – dependent signaling associated with autoimmune  
1554 and inflammatory disease. *Nature immunology*. 8(3). p. 247–256.
- 1555 RAHAL, E.A., HAJJAR, H., RAJEH, M., YAMOUT, B. & ABDELNOOR, A.M. (2015). Epstein-  
1556 Barr Virus and *Human herpes virus 6* Type A DNA Enhance IL-17 Production in  
1557 Mice. *Viral Immunology*. 28(5). p. 297–302. Available at:  
1558 <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2014.0129>.
- 1559 RAMOS, C.R.R., ABREU, P.A.E., NASCIMENTO, A.L.T.O. & HO, P.L. (2004). A high-copy  
1560 T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins  
1561 with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical*  
1562 *and Biological Research*. 37(8). p. 1103–1109.
- 1563 RAMOS, L., LAURENCE, A., VAHEDI, G., WEI, L., TAKAHASHI, H., DURANT, L., WATFORD,  
1564 W.T., SUN, H., KANNO, Y., POWRIE, F. & SHEA, J.J.O. (2010). Diverse Targets of  
1565 the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and  
1566 Homeostasis. *Immunity*. 32(5). p. 605–615. Available at:  
1567 <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.003>.
- 1568 RANDALL, T.D., CARRAGHER, D.M. & RANGEL-MORENO, J. (2009). Development of  
1569 secondary lymphoid organs. *Annual Review of Immunology*. 26. p. 627–650.
- 1570 ROMAGNOLI, P.A., SHERIDAN, B.S., PHAM, Q., LEFRANÇOIS, L. & KHANNA, K.M. (2016).  
1571 IL-17A – producing resident memory γδ T cells orchestrate the innate immune



- 1572 response to secondary oral *Listeria monocytogenes* infection. *Proceedings of the*  
 1573 *National Academy of Sciences of the United States of America*. 113. p. 8502–  
 1574 8507.
- 1575 ROSANO, G.L. & CECCARELLI, E. A. (2014). Recombinant protein expression in  
 1576 *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5(APR). p.  
 1577 1–17.
- 1578 RUDNER, X.L., HAPPEL, K.I., YOUNG, E.A. & SHELLITO, J.E. (2007). Interleukin-23 ( IL-23  
 1579 )– IL-17 Cytokine Axis in Murine *Pneumocystis carinii* Infection □. . 75(6). p.  
 1580 3055–3061.
- 1581 SAKAGUCHI, S., VIGNALI, D.A.A., RUDENSKY, A.Y., NIEC, R.E. & WALDMANN, H. (2013).  
 1582 The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*.  
 1583 13(6). p. 461–467. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3464>.
- 1584 SCHRODER, K., HERTZOG, P.J., RAVASI, T. & HUME, D.A. (2004). Interferon- □ : an  
 1585 overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*.  
 1586 75(February). p. 163–189.
- 1587 SCHWANDNER, B.R., YAMAGUCHI, K. & CAO, Z. (2000). Requirement of Tumor Necrosis  
 1588 Factor Receptor – associated Factor ( TRAF ) 6 in Interleukin 17 Signal  
 1589 Transduction. *Journal of Experiment Medicine*. 191(7). p. 1233–1239.
- 1590 SHALOM-BARAK, T., QUACH, J. & LOTZ, M. (1998). Interleukin-17-induced gene  
 1591 expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-  
 1592 activated protein kinases and NF- kappaB. *J.Biol Chem.*. 273(42). p. 27467–  
 1593 27473.
- 1594 SHEN, F. & GAFFEN, S.L. (2009). Structure-function relationships in the IL-17 receptor:  
 1595 Implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*. 41(2). p. 92–104.
- 1596 SHIN, H. (2018). Formation and function of tissue-resident memory T cells during viral  
 1597 infection. *Current Opinion in Virology*. 28. p. 61–67. Available at:  
 1598 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.001>.
- 1599 SIM, G.C. & RADVANYI, L. (2014). The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy.  
 1600 *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 25(4). p. 377–390. Available at:  
 1601 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.018>.
- 1602 SONG, X. & QIAN, Y. (2013). The activation and regulation of IL-17 receptor mediated  
 1603 signaling. *Cytokine*. 62(2). p. 175–182. Available at:  
 1604 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.014>.
- 1605 STANGE, J., HEPWORTH, M.R., RAUSCH, S., KÜHL, A.A., UYTENHOVE, C., HARTMANN, S.,  
 1606 LUCIUS, R. & LUCIUS, R. (2012). IL-22 Mediates Host Defense against an  
 1607 Intestinal Intracellular Parasite in the Absence of IFN- γ at the Cost of Th17-  
 1608 Driven Immunopathology. *The Journal of Immunology*. 188. p. 2410–2418.
- 1609 STOCKINGER, B. (2007). Good for Goose, but Not for Gander: IL-2 Interferes with  
 1610 Th17 Differentiation. *Immunity*. 26(3). p. 278–279.
- 1611 STOCKINGER, B., VELDHOFEN, M. & MARTIN, B. (2007). Th17 T cells : Linking innate and  
 1612 adaptive immunity. *Seminars in Immunology*. 19. p. 353–361.
- 1613 STROM, T.B., OUKKA, M., KORN, T., BETTELLI, E., GAO, W., AWASTHI, A., JA, A. &

- 1614 KUCHROO, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce. *Nature*.  
1615 448(July). p. 484–488.
- 1616 SUN, L., FU, J. & ZHOU, Y. (2017). Metabolism Controls the Balance of Th17 / T-  
1617 Regulatory Cells. *Frontiers in Immunology*. 8(November). p. 1–12.
- 1618 SUTHERLAND, T.E., LOGAN, N., RÜCKERL, D., HUMBLE, A.A., ALLAN, S.M.,  
1619 PAPAYANNOPOULOS, V., STOCKINGER, B., MAIZELS, R.M. & ALLEN, J.E. (2014).  
1620 Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff  
1621 between nematode killing and host damage. *Nature Immunology*. 15(12). p.  
1622 1116–1125.
- 1623 TAYLOR, B.A.P. & MURRAY, H.W. (1997). Intracellular Antimicrobial Activity in the  
1624 Absence of Visceral Leishmaniasis in Interferon-  $\gamma$  Gene-disrupted Mice.  
1625 *Journal of Experimental Medicine*. 185(7). p. 1231–1239.
- 1626 TERPE, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein  
1627 production : from molecular and biochemical fundamentals to commercial  
1628 systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72. p. 211–222.
- 1629 TRAUTWEIN-WEIDNER, K., GLADIATOR, A., NUR, S., DIETHELM, P. & LEIBUNDGUT-  
1630 LANDMANN, S. (2015). IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is  
1631 independent of neutrophils. *Mucosal Immunology*. 8(2). p. 221–231. Available at:  
1632 <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2014.57>.
- 1633 TRENTINI, M.M., OLIVEIRA, F.M. DE, KIPNIS, A. & JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. (2016). The  
1634 Role of Neutrophils in the Induction of Specific Th1 and Th17 during Vaccination  
1635 against Tuberculosis. *Frontiers in Microbiology*. 7. p. 13 PAGES.
- 1636 VELDHOEN, M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nature*  
1637 *Immunology*. 18(6). p. 612–621.
- 1638 VELDHOEN, M., HOCKING, R.J., FLAVELL, R.A. & STOCKINGER, B. (2006). Signals  
1639 mediated by transforming growth factor-  $\beta$  initiate autoimmune encephalomyelitis  
1640 , but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nature immunology*.  
1641 7(11). p. 1151–1156.
- 1642 VIGNALI, D.A.A., COLLISON, L.W. & WORKMAN, C.J. (2008). How regulatory T cells  
1643 work. *Nature Reviews Immunology*. 8(7). p. 523–532. Available at:  
1644 <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2343>.
- 1645 VOLKMAN, H.E., CLAY, H., BEERY, D., CHANG, J.C.W. & SHERMAN, D.R. (2004).  
1646 Tuberculous Granuloma Formation Is Enhanced by a Mycobacterium Virulence  
1647 Determinant. *PLoS ONE*. 2(11). p. E367.
- 1648 WANG, J. & REINHERZ, E.L. (2012). The structural basis of  $\alpha\beta$  T-lineage immune  
1649 recognition: TCR docking topologies, mechanotransduction, and co-receptor  
1650 function. *National Institutes of Health*. 250(1). p. 102–119.
- 1651 WATTEGEDERA, S.R., CORRIPIO-MIYAR, Y., PANG, Y., FREW, D., MCNEILLY, T.N.,  
1652 PALAREA-ALBALADEJO, J., MCINNES, C.J., HOPE, J.C., GLASS, E.J. & ENTRICAN, G.  
1653 (2017). Enhancing the toolbox to study IL-17A in cattle and sheep. *Veterinary*  
1654 *Research*. 48(1). p. 1–20.
- 1655 YANG, X.O., PANOPoulos, A.D., NURIEVA, R., CHANG, S.H., WANG, D., WATOWICH, S.S.  
1656 & DONG, C. (2007). STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of

- 1657 Inflammatory Helper T Cells \*. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(13). p.  
1658 9358–9363.
- 1659 YANG, X.O., PAPPU, B.P., NURIEVA, R., AKIMZHANOV, A., KANG, H.S., CHUNG, Y., MA, L.,  
1660 SHAH, B., PANOPOULOS, A.D., SCHLUNS, K.S., WATOWICH, S.S., TIAN, Q., JETTEN,  
1661 A.M. & DONG, C. (2008). T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by  
1662 Orphan Nuclear Receptors ROR  $\alpha$  and ROR  $\gamma$ . *Immunity*. 28(1). p. 29–39.
- 1663 YANNAM, G.R., GUTTI, T. & POLUEKTOVA, L.Y. (2012). IL-23 in Infections , Inflammation  
1664 , Autoimmunity and Cancer : Possible Role in HIV-1 and AIDS. *J Neuroimmune*  
1665 *Pharmacol.* 7. p. 95–112.
- 1666 YE, P., RODRIGUEZ, F.H., KANALY, S., STOCKING, K.L., SCHURR, J., SCHWARZENBERGER,  
1667 P., OLIVER, P., HUANG, W., ZHANG, P., ZHANG, J., SHELLITO, J.E., BAGBY, G.J.,  
1668 NELSON, S., CHARRIER, K., PESCHON, J.J. & KOLLS, J.K. (2001). Requirement of  
1669 Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung CXCL Chemokine and Granulocyte  
1670 Colony-stimulating Factor Expression , Neutrophil Recruitment , and Host  
1671 Defense. *Journal of Experimental Medicine*. 194(4). p. 519–527.
- 1672 ZAMBRANO-ZARAGOZA, J., ROMO-MARTÍNEZ, E., DURÁN-AVELAR, M., GARCÍA-  
1673 MAGALLANES, N. & VIBANCO-PÉREZ, N. (2014). Th17 cells in autoimmune and  
1674 infectious diseases. *International Journal of Inflammation*. 2014(II). p. 12.
- 1675 ZHANG, Y., WANG, H., REN, J., TANG, X., JING, Y. & XING, D. (2012). IL-17A Synergizes  
1676 with IFN-  $\gamma$  to Upregulate iNOS and NO Production and Inhibit Chlamydial  
1677 Growth. *PLoS ONE*. 7(6). p. E39214.
- 1678 ZHAO, G.H., CHENG, W.Y., WANG, W., JIA, Y.Q., FANG, Y.Q., DU, S.Z. & YU, S.K.  
1679 (2014). The expression dynamics of IL-17 and Th17 response relative cytokines  
1680 in the trachea and spleen of chickens after infection with *Cryptosporidium*  
1681 *baileyi*. *Parasites and Vectors*. 7(1). p. 1–7.
- 1682 ZHAO, G.H., FANG, Y.Q., RYAN, U., GUO, Y.X., WU, F., DU, S.Z. & CHEN, D.K. (2015).  
1683 Dynamics of Th17 associating cytokines in *Cryptosporidium parvum* -infected  
1684 mice. *Parasitology Research*. 2. p. 879–887.
- 1685 ZHOU, L., IVANOV, I.I., SPOLSKI, R., MIN, R., SHENDEROV, K., EGAWA, T., LEVY, D.E.,  
1686 LEONARD, W.J. & LITTMAN, D.R. (2007). IL-6 programs T H -17 cell differentiation  
1687 by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature*  
1688 *immunology*. 8(9). p. 967–974.
- 1689 ZHOU, L., LOPES, J.E., CHONG, M.M.W., IVANOV, I.I., MIN, R., VICTORA, G.D., SHEN, Y.,  
1690 DU, J., RUBTSOV, Y.P., RUDENSKY, A.Y., ZIEGLER, S.F. & LITTMAN, D.R. (2008).  
1691 TGF-  $\beta$  -induced Foxp3 inhibits T H 17 cell differentiation by antagonizing ROR  $\gamma$  c  
1692 t function. *Nature*. 453(May). p. 4–9.
- 1693 ZRIOUAL, S., TOURNADRE, A., LENIEF, V. & MIOSEC, P. (2009). Genome-Wide  
1694 Comparison between IL-17A- and IL-17F-Induced Effects in Human Rheumatoid  
1695 Arthritis Synoviocytes 1. *The Journal of Immunology*. 182. p. 3112–3120.
- 1696 ZYGMUNT, B. & VELDHOEN, M. (2011). *T Helper Cell Differentiation. More than Just*  
1697 *Cytokines* 1<sup>o</sup> ed, Elsevier inc. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4)  
1698 [387664-5.00005-4](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4).
- 1699