

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^a. 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 meus 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, fungicas 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 RosettaTM. 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 γ , 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 γ , 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 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 TM 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 10 μ g 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, IFNy, 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 IFNy, 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

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

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequência e temperatura de melting dos <i>primers</i> utilizados na reação de qPCR para células de origem bovinas	42
Tabela 2: 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抗ígenos)

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 γ – 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 β -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 - *Retinoid-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 β - *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 efetoras 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 1 INTRODUÇÃO GERAL

2

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

13 Os linfócitos Th17 são a principal fonte de IL-17 no organismo (Park et al.,
14 2005), e são responsáveis principalmente por fornecer proteção ao indivíduo contra
15 infecções bacterianas extracelular, fúngicas, víricas e de parasitos (Sutherland et al.,
16 2014; Zambrano-Zaragoza et al., 2014). As primeiras descrições dos linfócitos Th17,
17 estavam relacionados ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, e foram
18 necessárias outros estudos para demonstrar que microrganismos também eram
19 capazes de induzir uma resposta Th17 (Infante-duarte et al., 2000). Para a
20 diferenciação das linfócitos T CD4+ virgens em linfócitos Th17, se inicia um processo
21 no qual requer a participação de fatores, como as citocinas: TGF-β (Mangan et al.,
22 2006), IL-6 (Bettelli et al., 2006), IL-21 (Leonard et al., 2008) e IL-23 (Yannam et al.,
23 2012), e o fator de transcrição *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR γ t) que
24 caracteriza os linfócitos Th17 (Bi & Yang, 2012).

25 As citocinas são as principais responsáveis pela comunicação celular. Sendo
26 polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que podem variar entre
27 8 a 30kDa. Podem ser produzidas por células, tanto no local da lesão como por células
28 do sistema imune, a partir de ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos.
29 Essas proteínas são armazenadas na forma de moléculas pré-formadas, atuando
30 principalmente de forma parácrina, autócrina e endócrina (Lin et al., 2000).

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

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

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

50 **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

51

52 **2.1. Sistema Imune**

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

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

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

81

82 **2.2. Imunologia Adquirida**

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

92

93 **2.2.1. Linfócitos**

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

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

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

119

120 **2.2.1.1. Linfócitos T**

121 Os linfócitos T provêm de percursos originados na medula óssea, e a partir
122 daí migram para o timo, onde amadurecem. Através de receptores de superfície,
123 conhecidos como TCR (receptores de células T), os linfócitos T são capazes de
124 reconhecer抗ígenos de maneira específica (Bailey et al., 2013). Diferente das células
125 B, os linfócitos T precisam que o抗ígeno seja processado em peptídeos curtos e
126 apresentados em moléculas do sistema principal de histocompatibilidade (MHC), as
127 quais estão divididas em três classes, I, II e III, sendo suas principais I e II (Behl et al.,
128 2012)

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

143

144 **2.2.1.2. Linfócitos Th**

145 Os linfócitos T *helper* (Th) exercem um papel fundamental na adaptação do
146 sistema imunológico que desempenha diversas funções biológicas. Eles interagem
147 com componentes do sistema imune inato e respondem aos estímulos dos抗ígenos
148 apresentados por células apresentadoras de抗ígenos (Zygmunt & Veldhoen, 2011).
149 Os linfócitos TCD4+ virgens podem ser ativados pelo encontro com o抗ígeno via
150 MHC de classe II e diferenciar-se em linfócito T efetores ou linfócito T de memória
151 (Doherty et al., 2016). Dependendo da intensidade da estimulação e presença de
152 determinadas citocinas e outro fatores, os linfócito TCD4+ podem se diferenciar em
153 várias subpopulações de linfócito Th com funções e propriedades específicas (Ivanova
154 & Orekhov, 2015). Essa especialização das funções é regulada por uma série de
155 fatores de transcrição que são ativados em resposta a estímulos específicos e
156 promovem a expressão de padrões distintos de moléculas superficiais. Esses padrões
157 são usados para distinguir diferentes classes de linfócitos Th (Zygmunt & Veldhoen,
158 2011). Embora dados mais recentes sugerem que existe um grau de flexibilidade nas
159 atividades das linhagens de linfócito T e esses linfócitos podem ganhar ou perder
160 algumas características durante a vida. Os subconjuntos Th ainda podem ser
161 identificados pelo perfil de citocinas que secretam (Murphy & Stockinger, 2010). A
162 primeira classificação dividiu em linfócitos efetores CD4+ em dois subconjuntos, Th1
163 e Th2 (Mosmann et al., 1986). Os linfócitos Th1 são induzidos em resposta a agentes
164 patogênicos, como infecções virais, e são caracterizados pela produção de interferon
165 gama (IFN- γ) e por promoverem a ativação dos macrófagos que são eficientes contra
166 patógenos intracelulares. Além disso, dão suporte a funções efetoras de linfócitos T
167 CD8+ e regulam a expressão de outros mediadores em células imunológicas e não
168 imunológicas (Mosser, 2003). Os linfócito Th2 estão principalmente envolvidos na
169 resposta imune humoral e em fornecer ajuda aos linfócito B para produção de
170 anticorpos (Ivanova & Orekhov, 2015), sendo interleucina 4 (IL-4) sua principal
171 citocina secretada, no entanto sabe-se que elas também são capazes de secretar IL-
172 5, IL-6 e IL-1 (Paul & Zhu, 2010). Nos últimos anos, tornou-se evidente que outros
173 subconjuntos de linfócito Th funcionais podem ser induzidos por vários estímulos, *in*
174 *vitro* e *in vivo*. Linfócitos T CD4+ produtores de interleucina 17 (IL-17) diferenciadas
175 em resposta ao estímulo de Fator de Crescimento Beta (TGF- β) e outras citocinas,
176 foram reconhecidas como um subconjunto de linfócitos T *helper*, denominadas Th17

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

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

200

201 **2.3. Linfócitos Th17**

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

209

210 **2.3.1. Diferenciação de T CD4+ em Th17**

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

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

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

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

244

245 **2.3.1.1. Função do TGF-β na diferenciação Th17**

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

256

257 **2.3.1.2. Função da IL-6 na diferenciação Th17**

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

264

265 **2.3.1.3. Função da IL-21 na diferenciação Th17**

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

269 (compartilhada com receptores de outras citocinas) e outra específica para IL-21
270 (Monteleone et al., 2008). Sabendo que o receptor para IL-21 é altamente expresso
271 em células com diferentes funções em diversos lugares, entende-se que essa citocina
272 atua em uma variedade de linhagens linfoïdes e exerce efeitos diversos. A IL-21
273 conduz a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th17. A IL-21 é induzida
274 pela presença da citocina IL-6 e expressão do fator nuclear ROR γ t e estabiliza e
275 mantém as linfócitos Th17 aumentando a sua própria expressão e do receptor de IL-
276 23 (Leonard et al., 2008).

277

278 **2.3.1.4. Função da IL-23 na diferenciação Th17**

279 A IL-23 é produzida principalmente por células dendríticas ativadas e
280 macrófagos em resposta a estímulos microbianos (Morrison et al., 2011). A IL-23 é
281 um heterodímero e parece ter função crucial para a produção de IL-17 (Lowes et al.,
282 2012). A via de sinalização da IL-23 é mediada pela quinase 2 associada a Janus
283 (Jak2), tirosina quinase (Tyk2) e outros membros diversos da família STAT (Parham
284 et al., 2002). Nos linfócitos, a IL-23 induz uma forte fosforilação de STAT3 e uma
285 ativação relativamente fraca para STAT4. Essa fosforilação de STAT3 é essencial
286 para o desenvolvimento de linfócitos Th17 produtoras de IL-17 (Yannam et al., 2012).
287 Essa citocina funciona como um fator de sobrevivência para linfócitos Th17, que são
288 mantidas, mas não induzidas por IL-23. Após a indução inicial dos linfócitos Th17, a
289 presença de IL-23 aparentemente se torna no fator limitante que determina se a
290 resposta Th17 é mantida durante uma resposta imune inflamatória (Veldhoen et al.,
291 2006).

292

293 **2.3.1.5. Fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de** 294 **células Th17**

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

299 Th17 (Ivanov et al., 2006). No entanto, embora em menor quantidade, as células
300 produtoras de IL-17 não estão ausentes em camundongos deficientes de ROR γ t.
301 Outros membros da família dos receptores nucleares retinóides podem atuar de forma
302 semelhante; o ROR α também é expresso seletivamente nos linfócitos Th17 e existem
303 relatos de que desempenha papel similar mas não idêntico ao ROR γ t na diferenciação
304 das linfócitos Th17, sugerindo que a diferenciação dos linfócitos Th17 poderia ser
305 ditada por dois fatores de transcrição específicos da mesma linhagem (Yang et al.,
306 2008). A indução de ROR γ t é dependente de STAT3, que é preferencialmente ativado
307 por IL-6, IL-21 e IL-23 e desempenha um papel importante na regulação da produção
308 de IL-17 em linfócitos T (Chen et al., 2006).

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

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

324

325 **2.3.2. Relação entre Th17 e Treg**

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

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

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

348 O mecanismo pela qual IL-6 e IL-21 vão agir como fatores, depende do controle
349 do balanço de Foxp3/ROR γ t (Zhou et al., 2008). Sabe-se, por exemplo, que
350 camundongos que não expressão Foxp3 aumentam a expressão de ROR γ t e por
351 consequência, de IL-17 (Li et al., 2007). Na presença de TGF- β , as citocinas IL-6 e IL-
352 21 desempenham um papel importante na diferenciação de Th17 por inibição da
353 expressão de Foxp3 direcionado por TGF- β (Mangan et al., 2006). Tanto, ROR α
354 quanto o ROR γ t se associam fisicamente com Foxp3 (Du et al., 2008). Essa
355 associação, é a base molecular para a relação recíproca entre os linfócitos Treg e
356 Th17. A relação recíproca entre Treg e Th17 é ainda mantida por estudos que
357 relataram que camundongos *knout-out* para IL-6 apresentam um defeito grave na
358 geração de linfócitos Th17 e paralelamente um aumento no número de linfócitos Treg
359 (Diller et al., 2016)

360

361 **2.3.3. Funções efetoras das células Th17 na proteção e patogenia**

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

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

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

384

385 **2.4. Família IL-17**

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

390 formam uma família que contém 5 membros (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e
391 IL-17RE). As citocinas IL-17 mostram um alto nível de homologia com a IL-17A (16 a
392 50% de identidade da sequência de aminoácidos), enquanto os outros membros desta
393 família e os receptores da família IL-17 mostram uma homologia estrutural entre seus
394 membros (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). A IL-17A foi descoberta em 1993 e sua
395 principal função é tida como o recrutamento de células polimorfonucleares, agindo na
396 indução da inflamação e defesa do hospedeiro, no entanto a produção patológica leva
397 a inflamação excessiva e provoca danos aos tecidos (Song & Qian, 2013).

398 As fontes celulares e a regulação da IL-17F são semelhantes ás da IL-17A. Os
399 genes que codificam a IL-17A e IL-17F estão localizados no cromossomo 6
400 (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). A IL-17E (ou IL-25) demonstra ser menos
401 semelhante com a IL-17A em termos de sequência de aminoácidos mas também
402 promove respostas imunes mediadas por linfócitos Th2, contribuindo para doenças
403 alérgicas e defesas contra parasitas helmínticos (Jin & Dong, 2013). A IL-17C é
404 produzida por células epiteliais e queratinócitos que em resposta a patógenos ou
405 citocinas inflamatórias também promove a produção de IL-17. Em contrapartida, IL-
406 17B e IL-17D são pouco estudados e suas funções biológicas ainda não são
407 elucidadas (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).

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

414

415 **2.4.1. Papel IL-17**

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

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

425 Estudos demonstraram que *in vitro*, a IL-17 tem capacidade de induzir a
426 expressão de citocinas pró-inflamatórias importantes, como a IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-
427 CSF e TNF a partir de fibroblastos, macrófagos, condrócitos e osteócitos (Veldhoen,
428 2017). A IL-17 também pode aumentar a expressão das quimiocinas CXCL9 e
429 CXCL10 (Kolls et al., 2008). Também nos sítios de barreiras epiteliais, a IL-17 induz
430 proteínas antimicrobianas (AMPs), que são capazes de inibir diretamente, ou mesmo
431 eliminar os microrganismos invasores (Liévin-Le & Servin, 2006).

432 A IL-17 também está ativamente envolvida no recrutamento de células imunes
433 sem envolver quimio-atrativos. De maneira geral, a expressão de IL-17 atuando em
434 sinergia com o TNF, é um poderoso sinal inflamatório que resulta no recrutamento
435 rápido e na presença sustentada de neutrófilos (Veldhoen, 2017). Este efeito induz a
436 uma vasodilatação, mediada por prostaglandina E2 (PGE2) (Shalom-Barak et al.,
437 1998) permitindo o aumento do trânsito de células do sistema imunes; a expressão de
438 MMP (metalproteinases de matriz), que induz a acessibilidade aos tecidos e a
439 sobrevivência e atividade aumentada de células fagocíticas através da indução de C-
440 CSF e GM-CSF (Parsonage et al., 2008).

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

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

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

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

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

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

483

484 **2.4.2. IL-17 na resposta contra microrganismos extracelulares**

485 As respostas controladas pela IL-17 destinam-se principalmente a conter
486 microrganismos, fortalecendo as barreiras epiteliais e induzindo a expressão de
487 proteínas anti-microbianas e o recrutamento de polimorfonucleares (Korn et al., 2009).
488 Quando uma barreira epitelial se rompe, esse evento resulta na secreção de citocinas,
489 como IL-6, IL-23 e IL-1 β que a partir daí, vão conduzir a liberação de IL-17 (Jin & Dong,
490 2013). Ao atuar em conjunto com TNF e IL-22, a IL-17 aumenta rapidamente a
491 produção de AMPs e quimiocinas, que por sua vez, recrutam células imunes adicionais,
492 como os neutrófilos, para o local da lesão (Martin et al., 2009). No trato respiratório,
493 por exemplo, a IL-17A está envolvida na proteção contra *Klebsiella pneumoniae*, que
494 causa infecção pulmonar. Estudos mostraram que em camundongos a ausência do
495 receptor de IL-17 impede as respostas dadas pela presença de IL-17, reduzindo a
496 imunidade e assim o recrutamento de neutrófilos e por consequência aumentando a
497 carga bacteriana e a mortalidade dos animais (Ye et al., 2001).

498

499 **2.4.3. IL-17 na resposta contra microrganismos intracelulares**

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

512

513 **2.4.4. Família de receptor IL-17**

514 Os receptores IL-17 constituem uma família de receptores de citocinas com 5
515 membros, IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE, onde IL-17RA e IL-17RC
516 são os principais receptores de IL-17A (Kuestner et al., 2010). Os membros dessa
517 família têm um domínio transmembranar e um terminal C intracelular. Exceto para IL-
518 17RA, os mRNAs de *splicing* alternativo parecem existir para todos os membros da
519 família IL-17R. Alguns membros dessa família podem formar dímeros ou oligômeros
520 com outras cadeias da mesma família, mas não está claro se também podem de
521 associar com cadeias de famílias de diferentes citocinas (Korn et al. 2009). A IL-17
522 quando encontra seu receptor ativa as vias de proteína quinase ativada por mitógenos
523 (MAPK) e NK- κ B através de TRAF-6 (Schwandner et al., 2000) e interage com o
524 adaptador proximal de membrana Act1 (Qian et al., 2007).

525 IL-17RA liga tanto IL-A quanto IL-17F, embora se ligue com maior afinidade
526 com IL-17A. Esse receptor é altamente expresso em células hematopoiéticas, mas
527 também, embora em níveis mais baixos, em células endoteliais e epiteliais (Moseley
528 et al., 2003). Esse padrão de expressão é curioso, já que as principais respostas
529 mediadas por IL-17 ocorrem nas células epiteliais e de fibroblastos (Shen & Gaffen,
530 2009). A força de sinalização induzida por IL-17A correlaciona-se com os níveis de
531 expressão do seu receptor na superfície celular, e diferente do que acontece com a
532 maioria das citocinas, altos níveis de IL-17AR são necessários para desencadear
533 respostas efetivas (Maitra et al., 2007). Além disso, o receptor de IL-17A parece ter
534 um papel regulador, ele tem a capacidade de limitar a sinalização por internalização.
535 A expressão superficial de IL-17AR diminui rapidamente após a ligação da IL-17A. O
536 receptor internaliza a IL-17A limpando-a do meio inflamatório (Lindemann et al., 2008).

537

538 **2.4.5. IL-17 em bovinos**

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

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

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

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

570 **3 HIPÓTESES E OBJETIVOS**

571

572 **3.1. Hipótese**

573

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

576

577 **3.2. Objetivo Geral**

578

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

581

582 **3.3. Objetivos Específicos**

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

589 4 CAPÍTULOS

590

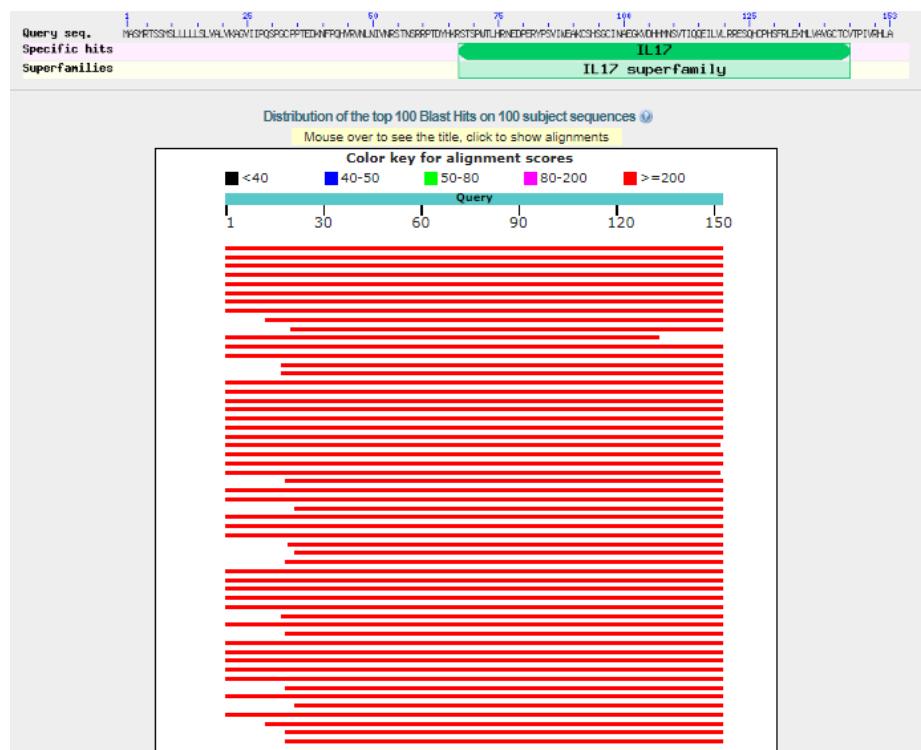
591 4.1. Materiais e Métodos

592

593 4.1.1. Desenho *in silico* dos iniciadores

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

597



598

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

600

601 4.1.2. Amplificação da sequência da IL-17A a partir de cDNA de
 602 esplenócitos bovinos

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

606 o isolamento foi realizado segundo protocolo de Dummer et al., (2014). A técnica foi
607 realizada utilizando *Taq* DNA Polimerase, com 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto,
608 temperatura de anelamento em gradiente de 51 °C, 56 °C e 62 °C por 1 minuto, e 72
609 °C por 1 minuto.

610

611 **4.1.3. Clonagem no plasmídeo pAE do gene IL-17A**

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

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

624 O produto da ligação foi utilizado para transformação da cepa *E. coli* TOP10F,
625 que permite a replicação estável de plasmídeos com número alto de cópias,
626 promovendo a propagação do plasmídeo. A transformação foi realizada segundo
627 protocolo de transformação por choque térmica, onde foi utilizado 100 µl de Cloreto
628 de Cálcio (CaCl₂) 100 mM, uma colônia retirada de cultivo em placa de meio LB (Luria
629 Bertani) ágar com 24 horas de *E. coli* TOP10F e plasmídeo/inserto. Os componentes
630 foram adicionados em um microtubo que permaneceu em banho de gelo por 15
631 minutos, seguidos de uma incubação de 1 minuto a 42 °C e posteriormente 2 minutos
632 novamente em gelo, para que ocorra o choque térmico através das oscilações de
633 temperatura. A transformação foi cultivada em meio LB ágar adicionado com
634 antibiótico ampicilina (100 µg/mL). O cultivo foi mantido por 16 horas a 37 °C. As
635 colônias que se desenvolveram na placa foram cultivadas em 1 mL de meio LB líquido
636 com ampicilina, por 16 horas a 37 °C. Os cultivos foram centrifugados por 3min a
637 12.000 x g, e a partir do *pellet* de células formado, foi realizada a técnica *MicroPrep*

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

640

641 **4.1.4. Seleção dos clones e confirmação da clonagem**

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

652

653 **4.1.5. Expressão da rIL-17A**

654 A construção já confirmada pelo sequenciamento foi utilizada para
655 transformação das cepas de *E. coli* de expressão Rosetta™, (DE3) Ril, PlysS, C41 e
656 C43 pelo mesmo método de transformação por choque térmico descrito
657 anteriormente. Inicialmente a expressão foi realizada em pequeno volume, partindo
658 de um pré-inóculo de 2 mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina 100µg/mL
659 para todos os cultivos e cloranfenicol 60µg/mL somente para as cepas Rosetta™, Ril
660 e Plyss, a 37 °C por 18 horas com agitação de 150 rpm. Posteriormente o volume do
661 cultivo foi aumentado para 10 mL contendo os mesmos antibióticos. Os cultivos
662 ficaram incubados as mesmas condições anteriores até atingirem a densidade óptica
663 (D.O. 600nm) de 0,6 (fase log) para iniciar a indução da expressão da proteína
664 recombinante utilizando IPTG (Isopropil β -D-1-thiogalactopiranósido) 1mM. Foram
665 coletadas alíquotas dos cultivos no período de 0, 1, 2, 3, 4 e 24 horas, para avaliação
666 do melhor tempo de expressão. Após 24 horas os cultivos foram centrifugados a 9.000
667 x g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi eluído em tampão
668 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.₆₀₀), 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 (NaH₂PO₄ 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.

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

707

708 **4.1.7. Caracterização da rIL-17A**

709 Para a caracterização da proteína recombinante, foi utilizada a técnica de
710 *Western blot*. As amostras da proteína foram eletrotransferidas de um gel de SDS,
711 após a migração, para uma membrana de nitrocelulose (HybondTM ECLTM,
712 Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com leite em pó 5%, diluído em
713 PBS-T (*phosphate buffered saline* + 0,05% de *Tween* 20). Para detecção da *tag* de
714 histidina presentes na proteína recombinante, foi utilizado anticorpo monoclonal (mAb)
715 anti-6xHis (Invitrogen), por 1 hora, na diluição 1:5000 em PBS-T. Em seguida a
716 membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado com a
717 enzima peroxidase (Sigma-Aldrich), na mesma diluição. Para revelação da reação foi
718 utilizado 0,006 mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução contendo Tris HCl
719 50mM, Sulfato de Níquel 0,3% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Entre as etapas
720 houveram lavagens sucessivas da membrana em tampão PBS-T.

721

722 **4.1.8. Cultivo celular**

723 Foram utilizadas placas de 24 poços (*Kasvi* – modelo K12-024) para cultivar 4
724 tipos de células diferentes. Foram cultivados esplenócitos de camundongos,
725 esplenócitos bovinos segundo protocolo de (Dummer et al., 2014), PBMC's (células
726 polimorfonucleares) bovinos e células de linhagem do rim bovino – MDBK (*Madin-*
727 *Darby Bovine Kidney*) na concentração de 3x10⁶ por mL.

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

736

737 **4.1.9. Reação de qPCR (PCR quantitativo)**

738 A análise de indução de expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias
 739 perante ao estímulo de rIL-17A foram quantificadas pela máquina de qPCR Mx30005P
 740 QPCR System (Agilent Technologies). Foram utilizados os *primers* descritos na tabela
 741 1.

PRIMER	Tm °	Sequência (5'-3')
BOVINO		
B actina Forward	66.4	TGTCCACCTTCCAGCAAGTG
B actina Reverse	65.1	CTAGAACGCATTGCGGTGGA
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
CAMUNDONGO		
β- actina Forward	65.5	AGAGGGAAATCGTGCCTGAC
β- actina Reverse	66.0	CAATAGTGATGACCTGGCCGT
IL-17 Forward	67.0	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA
IL-17 Reverse	67.0	AGCTTCCCTCCGCATTGA
IFNγ Forward	64.3	GCGTCATTGAATCACACCTG
IFNγ Reverse	64.0	TGAGCTCATTGAATGCTTGG

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

744

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

$$747 \quad 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$748 \quad \Delta\Delta Ct = \underbrace{(CtTarget - CtHousekeeping)}_{\text{Estímulo}} - \underbrace{(CtTarget - CtHousekeeping)}_{\text{Meio}}$$

749

750

751 **4.1.10. Análises estatísticas**

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

754

755 **4.2. Resultados**

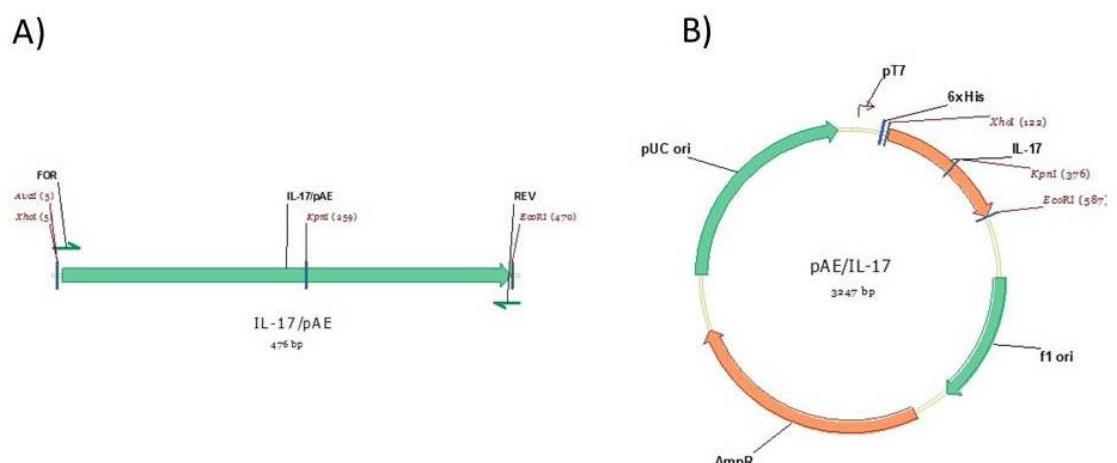
756

757 **4.2.1. Construção dos iniciadores**

758 O desenho *in silico* foi criado com o software Vector NTI Advance™ (Invitrogen),
 759 demonstrando a região a ser amplificada (Figura 2), que compreende uma região de
 760 476 pares de base.

761

762



763

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

766

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

769

770

	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

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

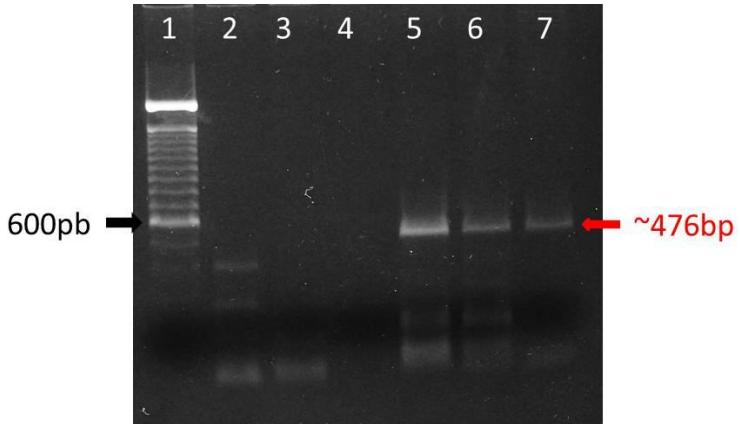
772

773 **4.2.2. Amplificação da sequência da IL-17A a partir de cDNA de**
 774 **esplenócitos bovinos**

775 A técnica de PCR foi realizada a partir de amostras de cDNA de esplenócitos
 776 bovinos, para a amplificação do gene da IL-17A. A técnica foi realizada utilizando *Taq*
 777 DNA Polimerase, com 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento
 778 em gradiente de 51 °C, 56 °C e 62 °C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto. Ocorreu a
 779 amplificação do fragmento esperado, visto que o produto da reação pode ser
 780 observado com tamanho sugerido esperado de 476pb quando submetido a
 781 eletroforese. Foram testadas diferentes concentrações de cDNA com diferentes
 782 temperaturas de anelamento (Figura 3). Os resultados mostram que a amplificação
 783 ocorreu com 1 μ g (concentração) de cDNA nas diferentes temperaturas de 51 °C, 56
 784 °C e 62 °C. Todas as temperaturas testadas se mostraram eficazes para a
 785 amplificação da sequência desejada, porém foi necessário utilizar uma maior
 786 quantidade de material genético para a realização da reação em cadeia da
 787 polimerase.

788

789



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

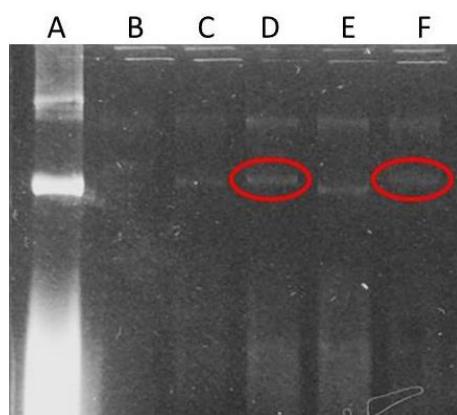
794

795 **4.2.3. Clonagem e seleção dos clones**

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

799 O produto da ligação entre a sequência amplificada de IL-17A no vetor pAE foi
 800 transformado em cepa de *E. coli* TOP10F, para identificar em qual dos plasmídeos
 801 ocorreu a inserção do gene. Das colônias isoladas foram extraídos plasmídeos (Figura
 802 4).

803



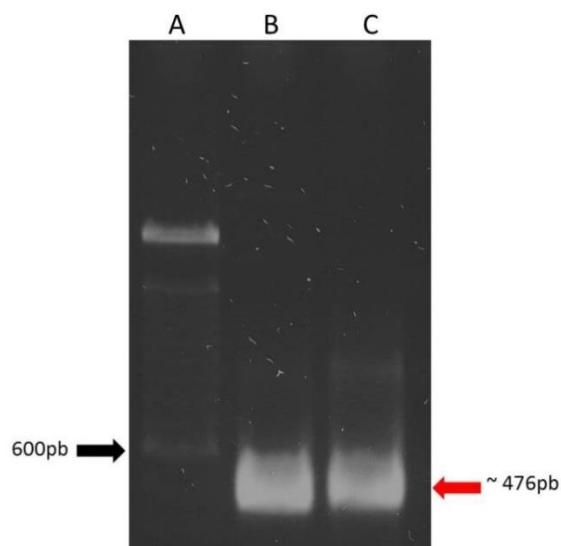
804 **Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose de 1% - extração plasmídial. O resultado da extração
 805 plasmídial de 6 clones de *E. coli*, que cresceram em meio de cultivo suplementado com ampicilina. A

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

808

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

818



819

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

823

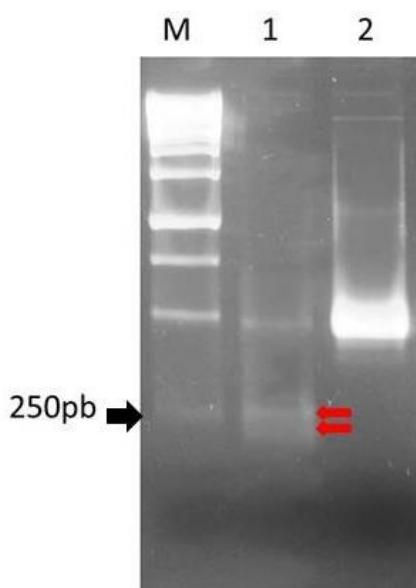
824 **4.2.4. Caracterização plasmidial**

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

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

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

835



836

837 **Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose de 1% - digestão do fragmento de IL-17 com *KpnI*. A restrição
 838 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
 839 digerido.

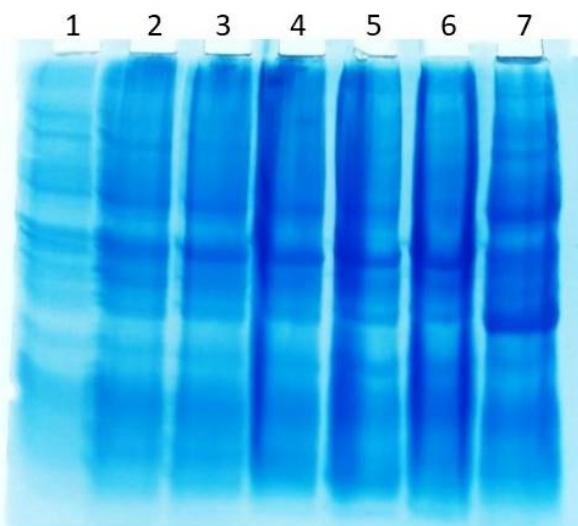
841

842 **4.2.5. Expressão da rIL-17A**

843 A expressão da proteína recombinante foi testada em 4 cepas diferentes, no
 844 entanto a expressão só pode ser visualizada na cepa RosettaTM, principalmente na
 845 quarta hora após a indução com IPTG 1mM e após a purificação (Figura 7).

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

849



850

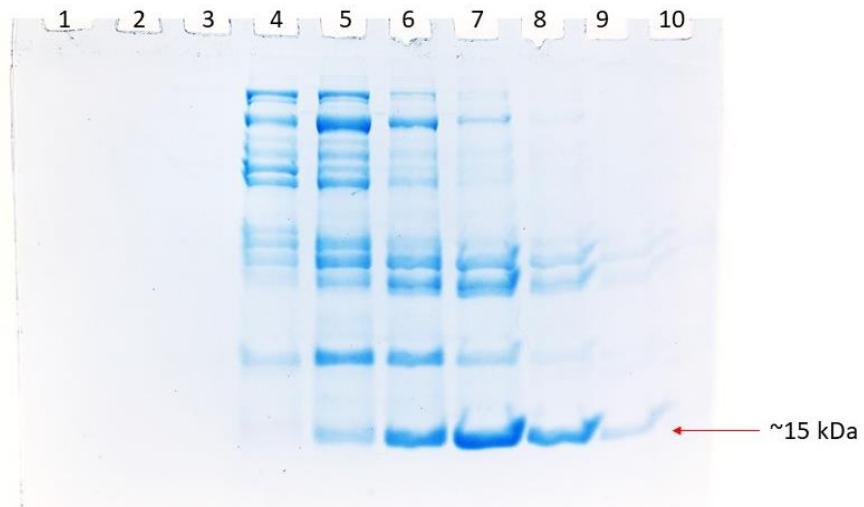
851 **Figura 7:** SDS-PAGE 15% - Expressão 1) Rosetta antes da indução; 2) 1h pós-indução; 3) 2h pós
852 indução; 4) 3h pós-indução; 5) 4h pós-indução; 6) 24h pós-indução; 7) Rosetta não transformada

853

854 **4.2.6. Purificação**

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

862



863

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

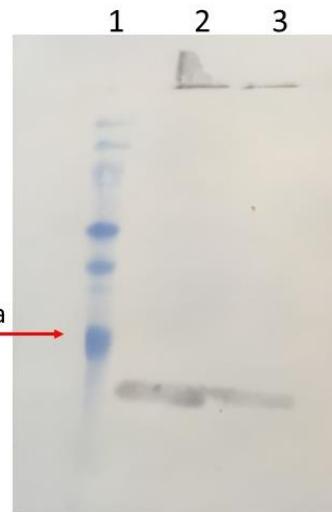
866

867 **4.2.7. Caracterização da rIL-17A**

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

873

874



875

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

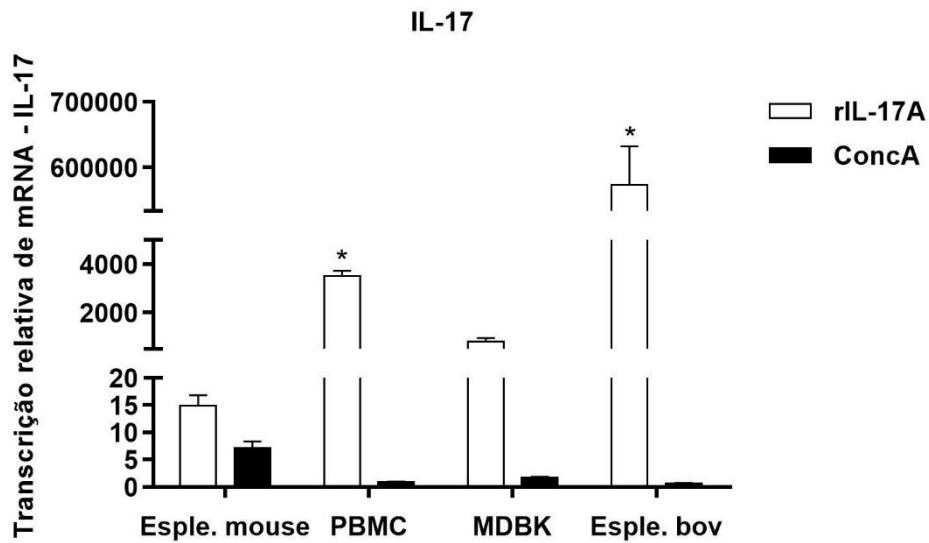
878

879 **4.2.8. qPCR**

880 A realização do qPCR para a determinação dos níveis de transcrição das
881 citocinas foi realizado com temperaturas de desnaturação a 95 °C, anelamento a 60
882 °C e extensão a 72 °C, e geraram os resultados demonstrados nas figuras 10, 11, 12
883 e 13.

884 O gráfico da figura 10 mostra os níveis relativos de transcrição de mRNA de IL-
885 17 em quatro diferentes tipos de célula, sendo eles esplenócitos de camundongos,
886 PBMCs bovinas, MDBK e esplenócitos bovinos. Um grupo dessas células foram
887 estimuladas com 10 μ g de concanavalina A e outro com 10 μ g de rIL-17A. Com base
888 nos dados, pode-se observar que a IL-17A recombinante foi capaz aumentar os níveis
889 de RNA mensageiro de IL-17 em todos os tipos de células.

890



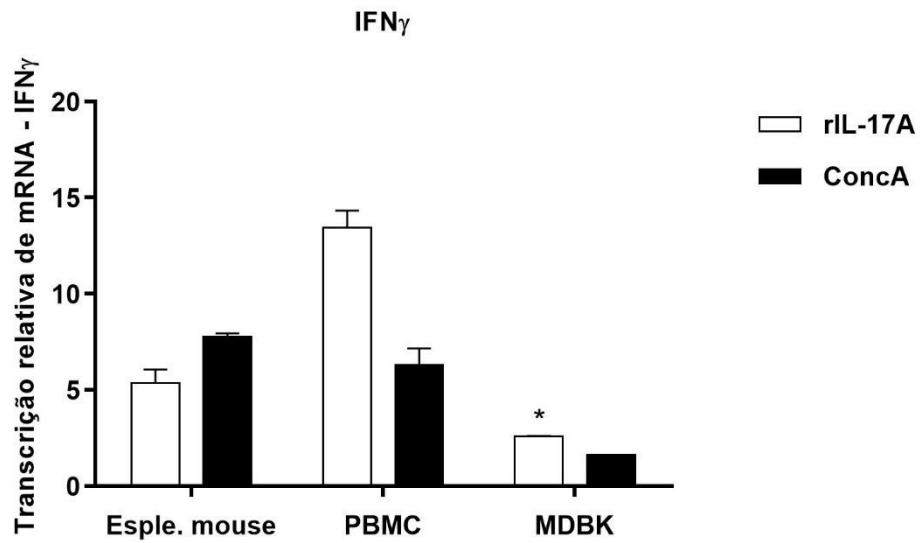
891

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

895

896 No gráfico da figura 11, estão representados os resultados obtidos na reação
 897 de qPCR quanto a transcrição relativa de mRNA de IFN- γ . Foi realizada a avaliação
 898 de três tipos de células, sendo elas, esplenócitos de camundongo, PBMCs bovinas e
 899 células MDBK, estimuladas com 10 μ g de concanavalina A e 10 μ g de rIL-17A. A
 900 proteína recombinante estimulou a transcrição de mRNA do IFN- γ tanto nas células
 901 MDBK quanto em PBMCs bovinas.

902

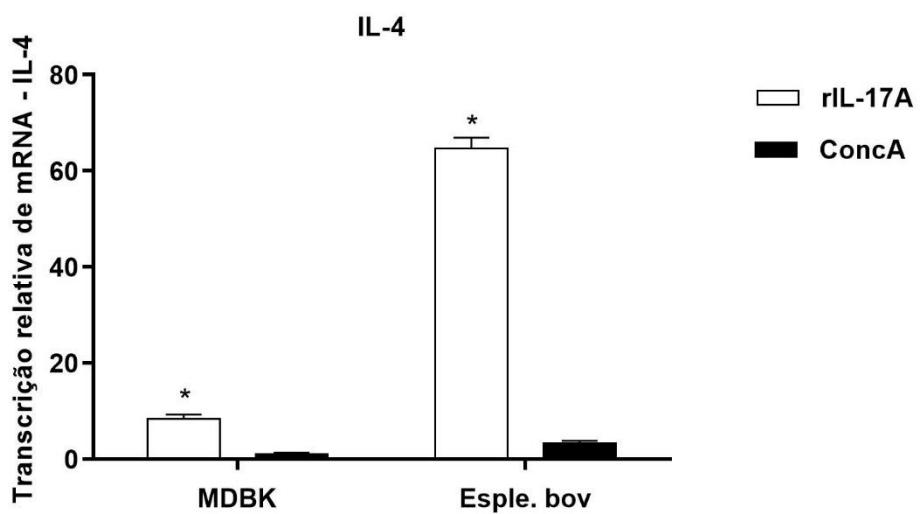


903

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

907

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



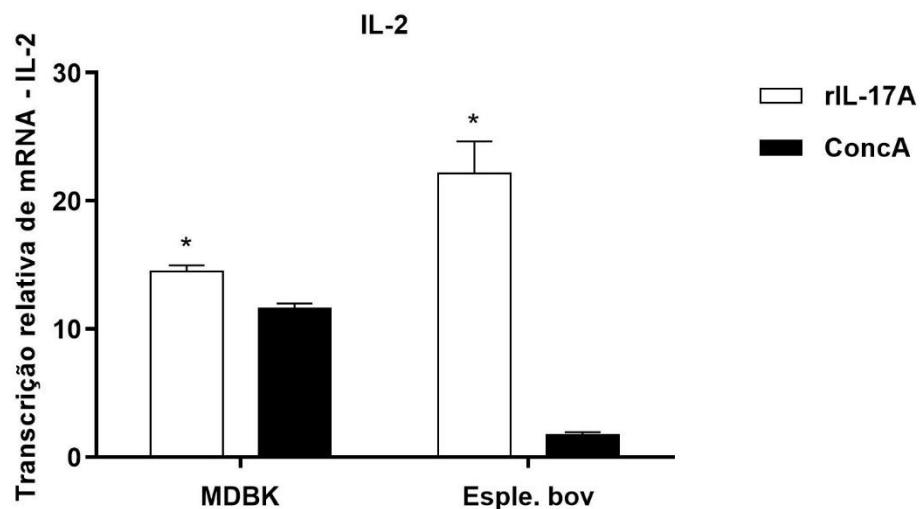
912

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

916

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

921



922

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

926

927 4.3. Discussão

928

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

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

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

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

971 pAE utilizado é responsável por adicionar uma sequência que codifica para uma cauda
972 de 6 histidina ao final da proteína, chamada de His-tag (Ramos et al., 2004). Essa
973 sequência de histidina presente na proteína recombinante tem alta afinidade, e por
974 isso formam complexos, com íons de metais de transição, como por exemplo o Níquel
975 (Ni^{2+}). No trabalho foi utilizado coluna de cromatografia de afinidade com o Ni^{2+}
976 HisTrapTM. Após etapas de lise e filtração para retirar os restos celulares, as proteínas
977 totais eluídas em tampão (NaH_2PO_4 0,2M; NaCl 0,5M; Imidazol 10mM) foram
978 submetidas a purificação na coluna. Depois de se manterem retidas na coluna, as
979 proteínas que continham a cauda de histidina foram eluídas em um tampão de eluição
980 com aumento da concentração de Imidazol, e então fracionadas. A purificação ocorreu
981 da forma prevista, apresentando em gel de poliacrilamida, bandas do tamanho
982 esperado. Esse processo além de resultar na proteína recombinante de interesse na
983 sua forma solúvel, também é uma etapa de confirmação, sugerindo que os processos
984 de clonagem e expressão ocorreram da forma esperada, com a inserção da tag 6XHis
985 no vetor (Figura 8). Os resultados demonstrados em gel de poliacrilamida antes da
986 purificação não permitiram identificar a expressão da proteína, e esse fato pode ser
987 decorrente dos baixos níveis de expressão e devido ao fato do peso molecular da
988 proteína recombinante ser semelhante a outras proteínas de *E.coli* (Figura 7). No
989 entanto, após a purificação as bandas da rIL-17A puderam ser destacadas de forma
990 satisfatória.

991 A principal etapa de confirmação da inserção do plasmídeo, e consequentemente
992 da expressão da proteína recombinante é o reconhecimento da proteína por parte de
993 anticorpos específicos para tal. A técnica utilizada foi *Western Blot* e os resultados
994 mostram que o anticorpo mAb anti-histidina (Invitrogen) reconheceu a sequência
995 adicionada pelo plasmídeo e marcou na membrana de nitrocelulose a proteína no
996 tamanho previsto de sua expressão (Figura 9). Com a rIL-17A caracterizada pelo
997 reconhecimento de anticorpos se abrem possibilidades para a sua utilização como
998 produto biotecnológico em diversas áreas da imunologia, como diagnóstico (José et
999 al., 2014), adjuvantes vacinais (Matsumoto et al., 2017), produção de anticorpos
1000 monoclonais (Mease et al., 2015), entre outros, como já relatado na literatura
1001 utilizando outras citocinas.

1002 Para o estudo de sinalização e atividade biológica da rIL-17A foram realizados
1003 cultivos de diferentes células (esplenócitos murinos, esplenócitos bovinos, células de

1004 linhagem MDBK e PBMCs bovinas), estimuladas com a rIL-17A para teste e
1005 concanavalina A como um controle de viabilidade de células. Todas as células foram
1006 cultivadas sob o mesmo protocolo e foram submetidas aos mesmos estímulos (10 μ g
1007 de ambas proteínas), sendo analisadas por *primers* diferentes e por isso os resultados
1008 serão discutidos separadamente neste trabalho.

1009 A IL-17 é um citocina altamente pró-inflamatória, que tem como principal função
1010 no sistema imune o recrutamento de polimorfonucleares, a partir da indução da
1011 expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, GM-CSF e TNF
1012 (Veldhoen, 2017). A IL-17 também tem a capacidade de induzir a expressão de
1013 proteínas antimicrobianas (AMPs), que por sua vez, inibem diretamente o crescimento
1014 microbiano (Liévin-Le & Servin, 2006). De maneira geral, a expressão da IL-17 *in vivo*
1015 juntamente com ação de outras citocinas pró-inflamatórias, é um sinal inflamatório
1016 forte que resulta na rápida resposta por neutrófilos (Veldhoen, 2017). A IL-17,
1017 juntamente com outras citocinas, possui a capacidade de regular a própria expressão,
1018 desenvolvendo um feedback positivo, que aumenta sua produção e fortalece os
1019 efeitos provocados nos sistema imune, como o aumento das respostas de fase aguda
1020 (Ogura et al., 2008). A rIL-17A produzida neste trabalho, foi utilizada como estímulo
1021 na concentração de 10 μ g/ml, em células de esplenócitos murinos, esplenócitos
1022 bovino, PBMCs e células de linhagem MDBK (Figura 10). Com base nos resultados
1023 de qPCR, a proteína expressa em *E. coli* mostrou que manteve as células do cultivo
1024 viáveis. Além disso, gerou o feedback positivo sobre a transcrição do próprio mRNA
1025 de IL-17, induzindo que as células expressassem ainda mais IL-17 em resposta a este
1026 estímulo. Pode-se afirmar, portanto, que a rIL-17A manteve sua atividade
1027 biologicamente ativa, gerando uma resposta esperada sob o cultivo celular, quando
1028 analisado por qPCR utilizando *primers* para a sequência de IL-17. Muito embora se
1029 tenha conhecimento de que citocinas são proteínas que se mantêm com estruturas e
1030 sequências altamente conservadas entre as espécies (de Oliveira et al., 2011), pode-
1031 se observar que em esplenócitos de camundongos a resposta ao estímulo da rIL-17A,
1032 apesar de haver, ocorre de maneira discreta quando comparado com as demais
1033 células (todas de origem bovina). Isso pode ser justificado devido ao fato da homologia
1034 da sequência de *Bos taurus* e *Mus musculus* ser de 68% de identidade, segundo
1035 dados do GeneBank (Figura 14), e isso altera a especificidade da ligação com o seu
1036 receptor. Ligações mais fracas e menos específicas entre o receptor e seu ligante

1037 geram sinais e respostas não tão significativos (Gaffen, 2009). As células MDBK
 1038 (*Madin-Darby bovine kidney*) são uma linhagem de células epiteliais do tecido renal
 1039 bovino muito utilizada em laboratórios em todo o mundo para diversas aplicações. O
 1040 receptor de IL-17 é expresso em todos os tecidos, no entanto tem uma maior
 1041 expressão nos tecidos hematopoiéticos (Ishigame et al., 2008). Este fato é curioso,
 1042 pois a maior atividade de IL-17A é em tecido epitelial, e nessas células o receptor
 1043 aparece em menor concentração (Gaffen, 2010). Quando o receptor para IL-17A
 1044 aparece em menor concentração, como é o caso das células MDBK, a resposta e
 1045 sinalização de IL-17A se torna mais fraca, diferente de outras citocinas que não
 1046 precisam de altos níveis de expressão do receptor para uma resposta elevada (Maitra
 1047 et al., 2007). Isso pode justificar o fato dos níveis de transcrição de mRNA da IL-17
 1048 quando estimulada com rIL-17A terem sido inferiores em células MDBK quando
 1049 comparadas com PBMCs e esplenócitos bovino.

1050

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	ALVKAGVIIPQSPGCPPTEDKNFPQHVRVNLNTVNR	--STNSRRPTDHYKRSTSPWTLH	75				
A VKA IIPQSPGCPPTEDKNFPQHVRVNLNTVNR	CP TE K+F 0-V+VNL + N	+SRP+DY RSTSPWTLH					
Subjct 21	ATVKAAAIIPQSSACPNTEAKDFLQNVKVNLSGAKVSSRRPSDYLNRSTSPWTLH	80					
Query 76	RNEDPERYPSVINEAKCSMSGCTNAEGKVDHHMNSVTIQQEILVLRRESQHCPHSFRLEK	135					
RNEDPERYPSVINEAKCSMSGCTNAEGKVDHHMNSVTIQQEILVLRRESQHCPHSFRLEK	C+NAEGK+DHMMNSV IQQEILVLRRESQHCPHSFRLEK	CP +FR+EK					
Subjct 81	RNEDPERYPSVINEAKCSMSGCTNAEGKLDHHMNSVLQQEILVLRRESQHCPHSFRLEK	148					
Query 136	MLVAVVGCTCVTPIVRHLA	153					
MLVAVVGCTCVTPIVRHLA	MLV VGCTCV IVR A						
Subjct 141	MLVGVGCTCVASIVRQAA	158					

1051

1052 **Figura 14:** Resultados BLAST – *blastp suite- 2 sequences*. Dados fornecidos pelo software BLAST,
 1053 comparando as sequências de IL-17A *Bos taurus* (AF412040.1) e IL-17A *Mus musculus* (U43088.1). O
 1054 resultado indica uma identidade de 68% entre as sequências homologas.

1055

1056 O IFN- γ é um interferon do tipo II, que sinaliza através do complexo receptor
 1057 IFN γ GR. Ele é predominantemente produzido por linfócitos T ativados e células NK,
 1058 sendo seu principal papel a ativação de células imunes durante a infecção
 1059 principalmente por patógenos intracelulares (Schroder et al., 2004). A deficiência na
 1060 produção de IFN- γ leva a perda de resistência a *Mycobacterium* (Cooper et al., 1993),
 1061 *Listeria* (Harty & Bevant, 1995) e *Leshmania* (Taylor & Murray, 1997). A produção de
 1062 IFN- γ por células apresentadoras de抗ígenos, como monócitos, macrófagos e
 1063 células dendríticas, pode ser importante na auto-ativação celular e na ativação de

1064 células próximas (Frucht et al., 2001). Estudos que falam sobre a propensão do
1065 desenvolvimento da diabetes, relacionam a atividade da IL-17 com IFN- γ atuando
1066 sinergicamente para iniciar a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis
1067 por produzirem a insulina (Kuriya et al., 2013). Também existem relatos onde o IFN- γ
1068 foi sugerido como um promotor da expansão das células Th17, por gerar um meio
1069 inflamatório, com auxílio de citocinas que propiciam a diferenciação de linfócito T
1070 CD4+ em linfócitos Th17 (Jandus et al., 2008). Além disso, o IFN- γ também se mostrou
1071 atuar em sinergia com a IL-17 para induzir a produção de IL-6, constituindo um
1072 feedback positivo para o desenvolvimento de linfócitos Th17 (Mok et al., 2010). Para
1073 o proteção do hospedeiro contra patógenos intracelulares, a IL-17A e o IFN- γ atuam
1074 sinergicamente (Zhang et al., 2012), mostrando que mesmo sendo citocinas
1075 características de linhagens de células T diferentes, podem ser essencial no controle
1076 mutuo. Neste trabalho os dados apresentados na figura 11, mostram que quando as
1077 células MDBK e as PBMCs foram estimuladas com rIL-17A houve um aumento na
1078 transcrição de mRNA de IFN- γ . Esses resultados podem estar relacionados com a
1079 capacidade das duas citocinas interagirem e gerarem uma resposta inflamatória mais
1080 eficiente contra patógenos intracelulares. Com base nos resultados obtidos, e no
1081 conhecimento da ação de ambas citocinas, pode-se dizer que em resposta a um sinal
1082 pró-inflamatório, essas células produzem também uma resposta Th1, mesmo que de
1083 maneira discreta, paralelamente a uma resposta Th17. Essa resposta de IFN- γ
1084 também pode estar associada a uma regulação da resposta por IL-17. Para controlar
1085 um estímulo de expressão excessiva de IL-17, o IFN- γ monta um resposta imune
1086 paralela (Park et al., 2005).

1087 A IL-4 é uma citocina característica das células Th2 e é um potente regulador da
1088 imunidade. Ela é secretada principalmente por mastócitos, eosinófilos, basófilos e
1089 linfócitos Th2 (Gadani et al., 2013). Tem papel importante na mediação da
1090 sobrevivência de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas, como imunidade
1091 mediada por células Th2 (Fazekas & Groth, 1992), troca de isotipo IgE em linfócitos B
1092 (Geha et al., 2003) e reparação tecidual e homeostase, por uma via de ativação de
1093 macrófagos que difere da via clássica (Gordon, 2003). Existem relatos que
1094 comprovam uma inesperada relação entre resposta Th2 e IL-17 (Lambrecht &
1095 Hammad, 2015). Estudos apontam que a IL-17 está associada com o
1096 desencadeamento de uma resposta Th2 em um estado altamente patológico (Díaz &

1097 Allen, 2007). Esses relatos estão de acordo com outros anteriores, que dizem que
1098 modelos de camundongos para estudo de alergias, com deficiência em IL-17 tem os
1099 níveis de citocinas tipo Th2 reduzidas, quando comparados com animais selvagens
1100 (Nakajima et al., 2014). Em um âmbito geral, a ativação de inicial de neutrófilos e IL-
1101 17 inicia eventos que podem promover uma resposta posterior do tipo Th2, que por
1102 sua vez, suprime o recrutamento de células polimorfonucleares excessivo (Allen et al.,
1103 2015). No presente trabalho as células estimuladas com rIL-17A promoveram uma
1104 transcrição de mRNA de IL-4. Embora a IL-4 seja uma citocina tipo Th2, esse aumento
1105 da expressão pode ser justificado pela necessidade de um controle de danos por parte
1106 Th2, caso houvesse um estímulo excessivo de IL-17, promovendo danos ao tecido
1107 devido ao alto recrutamento de neutrófilos. A interação entre IL-17/neutrófilos e a
1108 resposta Th2 é diferente de acordo com tempo e os tipos de células envolvidas
1109 (Kinyanjui et al., 2015). Esse feedback entre IL-17 e IL-4 é de importância inestimável
1110 em situações em que IL-17 agrava a patologia (Allen et al., 2015).

1111 A IL-2 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T ativados, e tem
1112 envolvimento na maturação dos linfócitos B e T. Também exerce importante papel na
1113 regulação da resposta imune (Bayer et al., 2013). A ação efetora ou reguladora da IL-
1114 2 vai ser determinada pela quantidade disponível de IL-2, menores quantidades
1115 provocam a ação reguladora, enquanto a presença elevada de IL-2 desencadeia sua
1116 função efetora (Malek & Bayer, 2004). Essa citocina emergiu como um alvo chave na
1117 supressão da auto-imunidade e atuando como um mecanismo de feedback, que rege
1118 o limiar das respostas imunes contra antígenos estranhos e impede que ocorra a
1119 imunopatologia (Sim & Radvanyi, 2014). Tem se estudado o papel que a IL-2 e outras
1120 citocinas desempenham na regulação da diferenciação de linfócitos Treg ou Th17.
1121 Entende-se que além de fatores epigenéticos e do estado fisiológico do indivíduo, a
1122 disponibilidade dessas citocinas regulam esta plasticidade entre a expressão de
1123 ROR γ t ou FoxP3 (Deknuydt et al., 2009). Com base na geração de células Th17 após
1124 a deleção genética ou bloqueio de anticorpos em camundongos, a IL-2 foi proposta
1125 como inibidora da diferenciação Th17 por linfócitos CD4+ convencionais (Laurence et
1126 al., 2007). Outros estudos no entanto, relacionam a IL-2 com a atenuação da produção
1127 de IL-17, e não com a inibição da diferenciação das células produtoras (Stockinger,
1128 2007). Dessa forma o impacto da IL-2 na indução de linfócitos Th17 pode variar
1129 significativamente dependendo do subconjunto de linfócitos T CD4+ (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

1136 **5 PERSPECTIVAS**

1137

1138 A utilização de cepas de *Escherichia coli* como sistema de expressão para
1139 proteínas recombinantes, além de já ser amplamente utilizado e ter todas as
1140 vantagens bem descritas na literatura (Rosano & Ceccarelli, 2014), mostrou-se ideal
1141 para a expressão da interleucina 17A de *Bos taurus*, realizada neste trabalho. A
1142 proteína foi expressa de forma solúvel e pode ser reconhecida por anticorpos
1143 específicos, no entanto houve um rendimento baixo na obtenção do produto final. Para
1144 isso, aprimoramentos no protocolo de expressão devem ser realizados com o intuito
1145 de aumentar a escala de expressão da rIL-17A, e ter um produto final com maior
1146 rendimento.

1147 A rIL-17A mostrou que manteve sua atividade biológica sendo capaz de induzir
1148 uma resposta imune nos diferentes tipos de células em que foi testada, elevando
1149 principalmente os níveis de transcrição de mRNA de IL-17. Para dar sequência ao
1150 trabalho é necessário que se utilize outros estímulos como controle nas células, para
1151 descartar a possibilidade de que a resposta IL-17 conduzida pelas células, tenha sido
1152 devido a um estímulo inespecífico. Também é necessária a avaliação da transcrição
1153 do mRNA de outras citocinas do ciclo de resposta Th17 para poder ter mais dados *in*
1154 *vitro* sobre a modulação da resposta imune perante ao estímulo de IL-17A
1155 recombinante.

1156 O estudo do bloqueio da atividade da IL-17 em animais experimentais também é
1157 um dado relevante a se ter na continuação do trabalho. Portanto podem ser realizados
1158 testes envolvendo a produção de anticorpos anti IL-17, objetivando um maior
1159 conhecimento da atividade da citocina em questão durante a infecção por patógenos.

1160 Dessa forma, esse insumo biotecnológico tem a aplicação em diversas áreas da
1161 imunologia. As perspectivas do trabalho objetivam a utilização da interleucina 17A de
1162 *Bos taurus*, como um potencial adjuvante para vacinas contra patógenos intra e
1163 extracelulares. Outros autores já relataram a utilização de interleucinas recombinantes
1164 atuando nesta área (Matsumoto et al., 2017). Para isso serão necessárias etapas de
1165 inoculação em animais experimentais com diferentes concentrações e diferentes
1166 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

1185 7 REFERÊNCIAS

1186

- 1187 ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V, RIVINO, L., GEGINAT, J., JARROSSAY, D., GATTORNO, M.,
 1188 LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. & NAPOLITANI, G. (2007). Surface phenotype and
 1189 antigenic specificity of human interleukin 17 – producing T helper memory cells.
 1190 *Nature immunology*. 8(6). p. 639–646.
- 1191 ALLEN, J.E., SUTHERLAND, T.E. & RU, D. (2015). IL-17 and neutrophils : unexpected
 1192 players in the type 2 immune response. *Current Opinion in Immunology*. 34. p.
 1193 99–106.
- 1194 AMATYA, N., GARG, A. V & GAFFEN, S.L. (2017). IL-17 Signaling : The Yin and the
 1195 Yang. *Trends in Immunology*. 38. p. 310–322. Available at:
 1196 <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006>.
- 1197 BAILEY, M., CHRISTOFORIDOU, Z. & LEWIS, M.C. (2013). The evolutionary basis for
 1198 differences between the immune systems of man , mouse , pig and ruminants.
 1199 *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152(1–2). p. 13–19. Available at:
 1200 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.022>.
- 1201 BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y.J.,
 1202 PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual
 1203 review of immunology*. 18. p. 767–811.
- 1204 BAYER, A.L., PUGLIESE, A. & MALEK, T.R. (2013). The IL-2/IL-2R system: From basic
 1205 science to therapeutic applications to enhance immune regulation. *Immunologic
 1206 Research*. 57(1–3). p. 197–209.
- 1207 BEDOYA, S.K., LAM, B., LAU, K. & III, J.L. (2013). Th17 Cells in Immunity and
 1208 Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. p. 16 PAGES.
- 1209 BEHL, J.D., VERMA, N.K., TYAGI, N., MISHRA, P., BEHL, R. & JOSHI, B.K. (2012). The
 1210 Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review. *ISRN Veterinary
 1211 Science*. 2012. p. 1–12. Available at:
 1212 <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/872710/>.
- 1213 BELKAID, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: A dangerous necessity. *Nature
 1214 Reviews Immunology*. 7(11). p. 875–888.
- 1215 BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T.B., OUKKA, M., WEINER, H.L. &
 1216 KUCHROO, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of
 1217 pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441(May). p. 235–238.
- 1218 BI, Y. & YANG, R. (2012). Direct and Indirect Regulatory Mechanisms in TH17 cell
 1219 Differentiation and Functions. *Scandinavian Journal of Immunology*. 75. p. 543–
 1220 552.
- 1221 BLANCO, F.C., BIANCO, M.V., MEIKLE, V., GARBACCIO, S., VAGNONI, L., FORRELLAD, M.,
 1222 INÉS, L., ADRIÁN, A. & BIGI, F. (2011). Increased IL-17 expression is associated
 1223 with pathology in a bovine model of tuberculosis. *Tuberculosis*. 91(1). p. 57–63.
 1224 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2010.11.007>.
- 1225 BRUSTLE, A., HEINK, S., HUBER, M., ROSENPLA, C., STADELmann, C., YU, P., ARPAIA, E.,
 1226 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 β
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 7 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_{FH}). *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 β 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 α -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 Experimental 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- γ 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- b 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., SADLONOVÁ, 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 if IFNy. *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.jimmuni.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 γ 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 β and
 1352 Interleukin-8 in the Diagnosis of Complicated Parapneumonic Pleural Effusions.
 1353 *American Journal of Clinical Pathology*. 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., KHAZAEI, 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- γ 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- b 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., RITCHIEA, 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., POCIAS, 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.jimmuni.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 \square 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.jimmuni.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 BLUMENSCHINE, 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=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 MORNILL, 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., KITO, 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.jimmuni.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 + γ δ 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 β 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.jimmuni.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., VELDHOEN, 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., HUMBLES, 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- \square 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- β 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/doifinder/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., PANOPPOULOS, 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., PANOPPOULOS, 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 α and ROR γ . *Imunity*. 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 CXC Chemokine and Granulocyte
1670 Colony-stimulating Factor Expression , Neutrophil Recruitment , and Host
1671 Defense. *Journal of Experiment 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- γ 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- β -induced Foxp3 inhibits T H 17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t
1692 function. *Nature*. 453(May). p. 4–9.
- 1693 ZRIOUAL, S., TOURNADRE, A., LENIEF, V. & MIOSSEC, 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^o ed, Elsevier inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4>.
1699