



Universidade de Aveiro
Ano 2012

Departamento de Química

**Cláudia Marília Ferreira
da Silva**

Nº Mec.: 36103

Estudo de Células T γ δ em Esclerose Sistémica



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2012

**Cláudia Marília Ferreira
da Silva**

Estudo de Células T γ δ em Esclerose Sistémica

Nº Mec.: 36103

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, do Centro de Histocompatibilidade do centro e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o apoio que me concederam ao longo do meu percurso universitário.

O júri

presidente

Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor Associado da Escola Superior de Saúde da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José António Pereira da Silva

Professor Associado de Medicina e Reumatologia da Universidade de Coimbra, e Chefe do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Coimbra

Doutor Artur Augusto Paiva

Assessor do Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra | Instituto Português do Sangue e da Transplantação

Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis

Marques Domingues

Professor auxiliar do departamento de química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Doutor Artur Paiva, pela oportunidade que me concedeu e ensinamentos constantes ao longo de todo o processo de orientação científica desta dissertação, o meu muito obrigado.

Um grande obrigado à Doutora Rosário Domingues, por todo o carinho, disponibilidade, preocupação e encorajamento constante.

A toda a equipa da citometria de fluxo, em especial ao Tiago Carvalheiro, pela enorme paciência, disponibilidade, aconselhamentos e ensinamentos.

Às médicas do HUC, Dr. Maria João e Dr. Mariana, pela colaboração neste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, em especial à Sara e à Mariana, pela amizade construída ao longo deste projeto.

A todos os meus amigos que me apoiaram ao longo deste processo, aceitando as minhas constantes ausências.

À minha família, em especial aos meus pais, por estarem sempre presentes e por depositarem confiança em mim.

Palavras-chave Autoimunidade, Esclerose Sistêmica, Células T $\gamma\delta$, Compartimentos Funcionais, Atividade Citotóxica, Reportório V γ 9V δ 2, Citocina.

Resumo A Esclerose Sistêmica (SSc) é uma doença autoimune, caracterizada por três processos: dano vascular, reacção autoimune e fibrose. Existem evidências crescentes da existência de alterações de células imunes na SSc, principalmente de subtipos de células T, inclusive células T $\gamma\delta$. Deste modo, este estudo avalia a frequência de células T $\gamma\delta$, distribuição entre os compartimentos funcionais, reportório V γ 9V δ 2, atividade citotóxica e expressão das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α . O presente estudo envolveu 20 controlos saudáveis e 43 doentes, divididos de acordo com: subtipo da SSc em limitada (SScl) e difusa (SScd), presença ou ausência de fibrose pulmonar e úlceras digitais, e duração da doença. A caracterização fenotípica e funcional das células T $\gamma\delta$ foram avaliadas por citometria de fluxo. De maior relevância neste estudo, observou-se: menor frequência de células T $\gamma\delta$ no grupo SSc, do que no grupo controlo; aumento da frequência de células T $\gamma\delta$ com fenótipos *naïve* e efetor no grupo de SSc, principalmente em SScl; aumento da frequência de células T $\gamma\delta$ *naïve* e memória efetora associado à diminuição de células T $\gamma\delta$ memória central em doentes com fibrose pulmonar; maior frequência de células T $\gamma\delta$ com fenótipo efetor associadas a uma diminuição de células T $\gamma\delta$ memória central em doentes com SSc há mais de 10 anos, quando comparado com o grupo há menos de 1 ano; aumento do reportório V γ 9 δ 2 $\bar{}$ em doentes com SSc há mais de 10 anos, quando comparado com há menos de 1 ano, cujo reportório é preferencialmente V γ 9 δ 2 $\bar{}$ e V γ 9 δ 2 $\bar{}$; maior frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina no grupo SSc, particularmente em SScl, e em doentes com a doença há mais de 10 anos; aumento da frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar IL-2 em doentes com SScl. Deste modo, os resultados sugerem que as células T $\gamma\delta$ parecem ter um papel importante na fisiopatologia da SSc.

Keywords Autoimmunity, Systemic Sclerosis, $\gamma\delta$ T cells, Functional compartments, Cytotoxic Activity, Repertoire V γ 9V δ 2, Cytokine.

Abstract Systemic Sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by three processes: vascular damage, autoimmune reaction and fibrosis. There are growing evidences that occurs immune cells alterations, mainly in T cells subtypes, including $\gamma\delta$ T cells. Thus, this study evaluates the frequency of $\gamma\delta$ T cells, their distribution among functional compartments, V γ 9V δ 2 repertoire, cytotoxic activity and cytokine expression of IFN γ , TNF α and IL-2. This study involved 20 healthy controls and 43 patients, divided according to: limited subtype (SScl) and diffuse subtype (SScd), presence or absence of pulmonary fibrosis and digital ulcers, and time of disease after diagnosis. The phenotypic and functional activity of T $\gamma\delta$ cells was assessed by flow cytometry. The most relevance results in this study were: a low frequency of $\gamma\delta$ T cells in SSc group compared to the control group; increased frequency of $\gamma\delta$ T cells with *naïve* and effector phenotypes in SSc group, more evident in SScl; increased frequency of *naïve* and memory $\gamma\delta$ T cells associated to the decrease of central memory cells; higher frequency of $\gamma\delta$ T cells with effector phenotype associated with a decrease of central memory cells in patients with SSc for more than 10 years when compared to patients with less than 1 year; increase of V γ 9⁻V δ 2⁻ repertoire in patients with SSc for more than 10 years, when compared with less than 1 year, which exhibit predominantly a V γ 9⁺V δ 2⁺ and V γ 9⁻V δ 2⁺ repertoire; higher frequency of $\gamma\delta$ T cells expressing granzyme B and perforin in SSc group, particularly in SScl and in patients with disease for more than 10 years; increased frequency of $\gamma\delta$ T cells expressing IL-2 in patients with SScl. Thus, it seems that $\gamma\delta$ T cells play an important role on SSc physiopathology.

ÍNDICE

I. Introdução.....	1
A. O Sistema Imune: Considerações gerais	3
A.1. A resposta imunológica	3
A.2. As células do sistema imune	6
B. Linfócitos T	8
B.1. Maturação dos linfócitos T	9
C. Autoimunidade	23
C.1. Doenças autoimunes	23
C.1.1.5. Relação entre a esclerose sistêmica e as células T $\gamma\delta$	33
II. Objetivos	35
III. Material e Métodos	39
A. Caracterização da população em estudo	41
B. Colheita de amostras e Imunofenotipagem das células do sangue periférico	43
B.1. Caracterização da frequência de células T e células T $\gamma\delta$	43
B.2. Caracterização da frequência das células T $\gamma\delta$ e reportório V γ 9V δ 2 nos diferentes compartimentos funcionais (<i>naïve</i> , memória e efector)	44
B.3. Caracterização da frequência de células T $\gamma\delta$, e suas subpopulações (T $\gamma\delta$ CD27 ⁺ e T $\gamma\delta$ CD27 ⁻), a expressar granzima B e perforina	45
B.4. Caracterização das células T $\gamma\delta$, produtoras de citocinas	47
C. Aquisição das amostras no citômetro de fluxo e análise dos resultados	48
C.1. Quantificação das células T $\gamma\delta$ e suas subpopulações	49
C.2. Quantificação dos diferentes compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$ e respectivos reportórios V γ 9V δ 2	49
C.3. Quantificação das moléculas relacionadas com a citotoxicidade celular, granzima B e perforina das células T $\gamma\delta$	50

C.4. Quantificação da produção de citocinas pelas células T $\gamma\delta$	51
D. Análise estatística	52
IV. Resultados	53
A. Quantificação de células T e T$\gamma\delta$ no sangue periférico.....	55
A.1. Frequência e valor absoluto das células T e T $\gamma\delta$ do sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica, de acordo com o subtipo da doença, presença ou ausência de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais.....	55
B. Quantificação das células T$\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais (<i>naïve</i>, memória e efector) do sangue periférico.....	57
B.1. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com o subtipo de Esclerose Sistémica	57
B.2. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com a presença ou ausência de fibrose pulmonar em doentes com Esclerose Sistémica	57
B.3. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com a presença ou ausência de episódios de úlceras digitais, em doentes com Esclerose Sistémica.....	57
B.4. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com a duração da Esclerose Sistémica	57
C. Quantificação do reportório Vγ9Vδ2 nos diferentes compartimentos funcionais das células T$\gamma\delta$, do sangue periférico	60
C.1. Frequência do reportório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, de acordo com o subtipo de Esclerose Sistémica.....	60
C.2. Frequência do reportório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos de memória, de acordo com a presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais.....	60
C.3. Frequência do reportório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, de acordo com a duração da doença.....	60
D. Quantificação da expressão de granzima B e perforina das células T$\gamma\delta$, do sangue periférico	64
D.1. Frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, em Esclerose Sistémica Difusa e Limitada.	64
D.2. Frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, na presença e ausência de fibrose pulmonar em doentes com Esclerose Sistémica.....	64

D.3. Frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, na presença e ausência de episódios de úlceras digitais em doentes com Esclerose Sistémica	64
E. Frequência de células T$\gamma\delta$ do sangue periférico a produzir citocinas	67
E.1. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com o subtipo da doença.....	67
E.2. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com a presença de fibrose pulmonar	68
E.3. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com a presença de episódios de úlceras digitais.....	68
E.4. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com a duração da doença.....	68
V. Discussão	73
A. Quantificação de células T e T$\gamma\delta$ do sangue periférico.....	75
B. Quantificação das células T$\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais (<i>naïve</i>, memória e efector) do sangue periférico	76
C. Quantificação de células T$\gamma\delta$ em função do repertório Vγ9Vδ2 nos diferentes compartimentos funcionais, do sangue periférico	77
D. Quantificação de células T$\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, do sangue periférico	78
E. Quantificação de células T$\gamma\delta$ produtoras de citocinas, do sangue periférico	79
VI. Conclusão	81
VII. Bibliografia.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-** Imunidade inata e imunidade adquirida. Os mecanismos da imunidade inata são responsáveis por fornecer a defesa inicial contra as infeções. A imunidade adquirida consiste na ativação dos linfócitos, e ocorre posteriormente à imunidade inata. O período após a infeção consiste numa estimativa e pode variar consoante a mesma. Imagem adaptada de [3]..... 4
- Figura 2 -** Revisão simplificada da hematopoiese. Na hematopoiese as HSC (células tronco hematopoiéticas) diferenciam-se e dão origem a duas classes de células, as CLP (células progenitoras linfoides) e as CMP (células progenitoras mieloides). Imagem adaptada de [8]..... 7
- Figura 3 –** Esquema geral do desenvolvimento da célula T no timo. Imagem adaptada de [9]. 11
- Figura 4 -** Estrutura do TCR. Abreviações: C, constante; V, variável; TCR, recetor da célula T; pT α , cadeia pré-TCR α . Imagem adaptada de [19]. 12
- Figura 5 –** Detecção de stresse celular e infeção por parte das células T $\gamma\delta$. As células T $\gamma\delta$ podem reconhecer separadamente, adicionalmente ou sinergicamente três conjuntos de ligandos induzidos em stresse: ligandos do TCR (CD1c e fostoantigénios endógenos e microbianos); ligandos do NKG2D (MICA e MICB); PAMPS e DAMPs reconhecidos por TLRs e Dectina-1. Imagem adaptada de [30]..... 15
- Figura 6 –** Função das células T $\gamma\delta$ nas respostas imune inata e adaptativa. As células T $\gamma\delta$ exibem funções consistentes com ambos os tipos de imunidade. Tal como as células dendrítica, estas células também são capazes de apresentar antigénios às células T $\alpha\beta$. Imagem adaptada de [36]. 17
- Figura 7 -** Células correspondentes à resposta imune inata ou à resposta imune adaptativa, e células que se localizam na interface de ambas as respostas imunes. Imagem adaptada de [38]. 17
- Figura 8 –** Esquema geral da fisiopatologia da SSc. A fisiopatologia da SSc pode resultar de uma predisposição genética juntamente com factores ambientais desconhecidos,

conduzindo a alterações na via vascular, imunológica e fibrótica. Imagem adaptada de [71]. 30

Figura 9 – Representação gráfica da estratégia utilizada, para identificação das células T $\gamma\delta$. (1) Identificação dos linfócitos – amarelo; (2) Identificação dos linfócitos CD3 – vermelho; (3) e (3 e 4) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ – verde..... 49

Figura 10 - Representação gráfica da estratégia utilizada, para avaliação dos compartimentos de memória das células T $\gamma\delta$ e respetivos repertórios. (1) células *naïve* – amarelo, memória central – azul, memória efetora –verde, células efetoras – vermelho; (2) V γ 9⁺V δ 2⁺ - verde, V γ 9⁻V δ 2⁺ - azul, V γ 9⁻V δ 2⁻ - vermelho, V γ 9⁺V δ 2⁻ - roxo..... 50

Figura 11- Representação gráfica da estratégia utilizada, para avaliação da citotoxicidade das células T $\gamma\delta$. (1) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ (CD4⁻CD8⁻) – verde; (2) Identificação das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ (T $\gamma\delta$ CD27⁻ e T $\gamma\delta$ CD27⁺) – roxo e azul, respetivamente; (3) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ que marcam granzima B – roxo; (4) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ que marcam perforina – laranja. 51

Figura 12 - Representação gráfica da estratégia utilizada, para a identificação da produção das citocinas em estudo. (1) IFN γ – roxo; (2) IL-2 – azul; (3) TNF α – laranja. 52

Figura 13 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$, na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Difusa *versus* Controlo; ^b Limitada *versus* Controlo..... 58

Figura 14 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$, na população controlo e em doentes com SSc, na presença e ausência de Fibrose Pulmonar. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Ausência de Fibrose Pulmonar *versus* Controlo; ^b Presença de Fibrose Pulmonar *versus* Controlo. 58

Figura 15 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$, na população controlo e em doentes com SSc, na presença e ausência de

episódios de Úlceras Digitais. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Ausência de Úlceras Digitais *versus* Controlo. .. 59

Figura 16 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$, na população controlo e nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a 1 \leq 10 anos *versus* Controlo; ^b >10 anos *versus* Controlo..... 59

Figura 17 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina. na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Limitada *versus* Controlo; ^c Limitada *versus* Difusa..... 65

Figura 18 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina. na população controlo e em doentes com SSc, na presença e ausência de Fibrose Pulmonar. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Ausência de Fibrose Pulmonar *versus* Controlo; ^b Presença de Fibrose Pulmonar *versus* Controlo. 66

Figura 19 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina. na população controlo e em doentes com SSc, na presença e ausência de episódios de Úlceras Digitais. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Ausência de Úlceras Digitais *versus* Controlo; ^b Presença de Úlceras Digitais *versus* Controlo..... 66

Figura 20 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina. na população controlo e nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a 1 \leq 10 anos *versus* Controlo; ^b >10 anos *versus* Controlo..... 67

Figura 21 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. As diferenças

estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Difusa *versus* Controlo; ^b Limitada *versus* Difusa. 69

Figura 22- Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. 69

Figura 23 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de fibrose pulmonar. 70

Figura 24 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de fibrose pulmonar. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Presença de Fibrose Pulmonar *versus* Controlo; ^b Ausência de Fibrose Pulmonar *versus* Controlo. 70

Figura 25 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de episódios de úlceras 71

Figura 26 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de episódios de úlceras..... 71

Figura 27 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a duração da doença: Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive; Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc. 72

Figura 28 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a duração da doença: Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de

duração da SSc, inclusive; Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc. 72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos dos doentes com SSc.....	42
Tabela 2 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterizar a frequência de células T $\gamma\delta$ e suas subpopulações. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes. ..	43
Tabela 3 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados na caracterização da frequência dos compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$ e repertório V γ 9V δ 2. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes.	45
Tabela 4 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados para avaliar a atividade citotóxica das células T $\gamma\delta$ e suas subpopulações. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes. ..	46
Tabela 5 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados na caracterização funcional das células T $\gamma\delta$. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes.	48
Tabela 6 - Frequência (%) e valor absoluto (cel/ μ L) de células T e células T $\gamma\delta$, do sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da frequência de células T na celularidade total e de células T $\gamma\delta$ no total de células T. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo de SSc, presença ou ausência de fibrose pulmonar ou episódios de úlceras digitais, e duração da doença, em anos (Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive. Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc).	56
Tabela 7 - Frequência (%) do repertório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, no sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da frequência células T $\gamma\delta$ no total de células T. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo de SSc.....	61

Tabela 8 - Frequência (%) do reportório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, no sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da frequência células T $\gamma\delta$ no total de células T. Os doentes foram subdivididos de acordo com a presença ou ausência de fibrose pulmonar, e ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais..... 62

Tabela 9- Frequência (%) do reportório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, no sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com a duração da doença, em anos: Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive. Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc. 63

Abreviaturas

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CLP	Células Progenitoras Linfoides
CMP	Células Progenitoras Mieloides
DN	Duplos Negativos
DP	Duplos Positivos
HSCs	Células Tronco Hematopoiéticas
IELs	Linfócitos Intra-Epiteliais
KGF	Factor de Crescimento dos Queratinócitos
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
MIF	Intensidade Média de Fluorescência
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKRs	Recetores das Células <i>Natural Killer</i>
NKG2D	Recetor das Células <i>Natural Killer</i> , membro 2 do grupo D
SSc	Esclerose Sistémica
SScd	Esclerose Sistémica Difusa
SScl	Esclerose Sistémica Limitada
Tc	Células T citotóxicas
TCR	Recetor das Células T
Th	Células T <i>helper</i>
TLRs	Recetores <i>Toll Like</i>

I. Introdução

A. O Sistema Imune: Considerações gerais

A palavra imunidade provém do latim *immunis* e significa “pessoa privilegiada”. Este termo teve origem após Edward Jenner, em 1798 ter observado indivíduos, que após recuperarem de uma determinada doença infecciosa ficavam protegidos da mesma quando um segundo contacto com o mesmo agente patogénico [1]. Este facto constituiu o desencadear de inúmeros estudos que se perpetuaram até à atualidade. Atualmente sabe-se que o nosso organismo dispõe de um sistema imune, e que este consiste num sistema de defesa notavelmente adaptado, e que foi desenvolvido nos vertebrados de forma a protegê-los contra microrganismos patogénicos invasores [1, 2]. Pode assim definir-se o termo **imunidade** como o somatório de todos os mecanismos de defesa que o nosso organismo dispõe para nos proteger das agressões que o ameaçam. Os mecanismos de defesa resultam de um conjunto de diferentes órgãos, tecidos, células e factores solúveis (citocinas) que de forma coletiva e coordenada são capazes de converter o reconhecimento inicial do agente patogénico em diferentes respostas imunológicas [1-3].

A.1. A resposta imunológica

Cada resposta imunológica resume-se a um processo complexo envolvendo vários componentes, desde as barreiras anatómicas (pele e superfície das membranas das mucosas) até às células especializadas. Funcionalmente, uma resposta imune pode ser dividida em duas atividades relacionadas, sendo estas o **reconhecimento** e a **resposta** [1, 3]. O reconhecimento imune é caracterizado pela sua elevada especificidade, sendo que o sistema imune tem a capacidade de reconhecer as diferenças químicas que distinguem um agente patogénico estranho de um outro, bem como discriminar entre as moléculas estranhas e as células e proteínas do próprio organismo [1]. Uma vez reconhecido o agente patogénico, o sistema imune recruta a participação de uma variedade de células e moléculas a fim de desenvolver uma resposta apropriada, denominada de resposta efetora para neutralizar ou eliminar o agente estranho [1, 2]. Assim sendo, o nosso sistema imune tem a capacidade de converter um reconhecimento inicial numa variedade de diferentes respostas efetoras, sendo que cada uma delas está confinada a um agente patogénico específico [1-4]. Uma futura exposição ao mesmo agente patogénico (mesmo antígeno)

induz uma resposta de memória que ocorre com maior rapidez que a resposta anterior, sendo que esta resposta de memória é assim mais potente e frequentemente mais eficaz na neutralização ou eliminação do mesmo [1, 3]. Este processo de reação do sistema imunológico pode sistematizar-se em dois tipos de respostas, inter-relacionadas na defesa contra os organismos patogénicos (bactérias, vírus, parasitas e fungos), sendo estas definidas por imunidade inata ou natural que medeia as reações iniciais, e por resposta adquirida ou adaptativa que medeia as respostas tardias [1-3]. Estes dois tipos de imunidade encontram-se sinteticamente apresentados na **figura 1**.

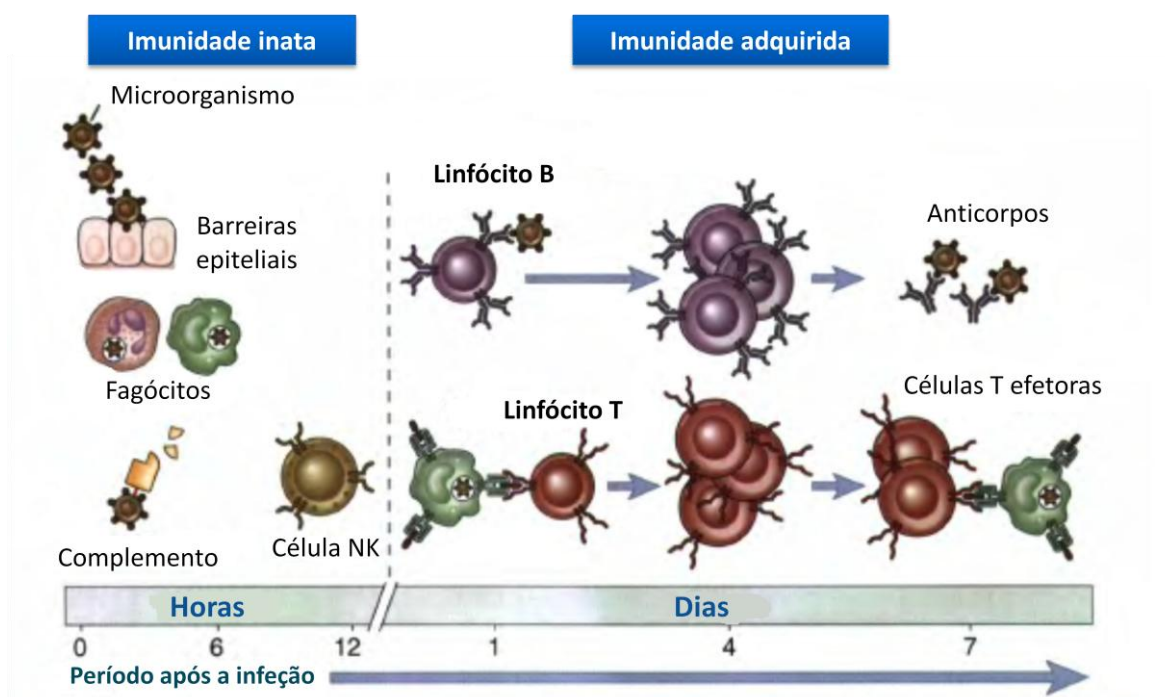


Figura 1- Imunidade inata e imunidade adquirida. Os mecanismos da imunidade inata são responsáveis por fornecer a defesa inicial contra as infeções. A imunidade adquirida consiste na ativação dos linfócitos, e ocorre posteriormente à imunidade inata. O período após a infeção consiste numa estimativa e pode variar consoante a mesma. Imagem adaptada de [3].

A.1.1. Imunidade inata ou natural

A imunidade inata consiste numa primeira linha de defesa inicial e resume-se à resposta imediata a um estímulo agressor, constituída por quatro tipos de **barreiras de defesa** (anatômica, fisiológica, fagocítica e inflamatória) e por **mecanismos de defesa**

celulares (através de células fagocíticas) e **bioquímicos** já existentes, que são programados para responder rapidamente a infeções virais, a tumores e na rejeição de transplantes. Estes mecanismos são inespecíficos, pois não respondem de forma específica a um determinado antigénio, mas respondem antes a estruturas que são comuns a grupos de microrganismos semelhantes, uma vez que não têm a capacidade de distinguir ligeiras diferenças entre estes. Assim, de um modo geral os mecanismos subjacentes à resposta imunológica inata ocorrem essencialmente da mesma maneira a sucessivas infeções, independentemente do número de vezes que o agente invasor contacta com o organismo [2, 3].

Em forma de resumo, a imunidade inata consiste na ação combinada de diferentes componentes: barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e substâncias antibacterianas na superfície deste; células fagocíticas e células NK (do inglês, *natural Killer*); proteínas efetoras no sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação, e citocinas que são responsáveis pela coordenação de diversas atividades celulares [3].

Além disto, a imunidade inata tem também um papel fundamental no desencadear e no controlo da imunidade adquirida. Se a imunidade inata não foi suficiente na eliminação ou neutralização dos antigénios estranhos, então desencadeia-se uma resposta imune adquirida [1, 2].

A.1.2. Imunidade adquirida ou adaptativa

A imunidade adquirida (ou adaptativa) consiste numa resposta imunológica também estimulada pela exposição a antigénios, mas cuja capacidade defensiva aumenta após exposições posteriores [2, 3]. Em oposição às respostas imunes inatas, as respostas imunes adquiridas consistem em reações a antigénios específicos, que usufruem de determinadas características, nomeadamente especificidade antigénica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento do próprio/reconhecimento do não próprio [1, 3]. A **especificidade antigénica** é a característica que permite aos anticorpos reconhecer diferentes antigénios, mesmo quando eles apresentam ligeiras diferenças entre si, como por exemplo, diferirem em apenas um aminoácido. Esta característica está relacionada com o facto do sistema imune possuir uma capacidade extraordinária na produção de uma enorme diversidade de moléculas envolvidas no reconhecimento, e que estas possuem a capacidade de reconhecer biliões de diferentes estruturas, apenas presentes nos antigénios estranhos.

A **memória imunológica** é a característica que permite ao sistema imune “lembrar” e responder com maior intensidade a exposições subsequentes ao mesmo organismo. Esta característica é responsável pelo facto do sistema imune conferir imunidade por toda a vida a muitos agentes infecciosos, após um encontro inicial. Por fim, o sistema imune normalmente responde apenas aos antígenos estranhos, o que indica que este possui a capacidade de **reconhecimento do próprio e do não próprio**[1, 3].

Os linfócitos constituem as principais células envolvidas na imunidade adquirida, podendo esta ser subdividida em imunidade celular e imunidade humoral, consoante o tipo de linfócitos (B ou T) que medeiam a resposta celular. Os linfócitos T constituem os principais efetores da **imunidade celular**, possuindo a capacidade de através da intervenção com outras células e por libertação de citocinas, que levam à ativação de células fagocíticas, reconhecer e lisar as células portadoras dos antígenos estranhos ao nosso organismo. Por outro lado, os linfócitos B são os principais efetores da **imunidade humoral**, uma vez que após estas células estabelecerem contacto com o antígeno, diferenciam-se em plasmócitos, e estes por sua vez libertam anticorpos dirigidos contra o antígeno do microorganismo, facilitando a eliminação e neutralização do mesmo [3, 5].

Em suma, a resposta inata e a resposta adquirida não atuam totalmente independentes uma da outra, mas antes cooperam em vias importantes a fim de produzir uma imunidade mais eficaz [1].

Uma vez já definido o que é o sistema imune e qual o tipo de respostas imunológicas que este sistema descreve após o reconhecimento do agente patogénico, torna-se importante perceber a origem das células que medeiam estas respostas.

A.2. As células do sistema imune

Todas as células do sistema imune têm origem na medula óssea por um processo designado por **hematopoiese** (Figura 2). A hematopoiese consiste num processo de geração de células sanguíneas a partir de um único tipo de células denominadas por **células tronco hematopoiéticas** (do inglês, *hematopoietic stem cells* - HSCs), que são autorrenováveis e pluripotentes e por isso mantêm o nível populacional de todas as linhagens de células sanguíneas (eritrócitos, granulócitos, monócitos, mastócitos, linfócitos e megacariócitos) através de sucessivas divisões celulares [1, 6]. No início da hematopoiese as HSCs na presença de células do estroma, de componentes da matriz

extracelular e sob a ação de vários factores de crescimento e citocinas, diferenciam-se ao longo de duas vias, dando origem a duas classes, as **células progenitoras linfoides** (do inglês, *lymphoid progenitor cells* - CLP) e as **células progenitoras mieloides** (do inglês, *myeloid progenitor cells* - CMP) [1, 7, 8]. Estas células progenitoras perderam a capacidade de autorrenovação, ficando comprometidas com uma linhagem celular particular. As CLP dão origem às células B, T, NK, e a células dendríticas plasmacitóides, ao passo que as CMP dão origem aos eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, células dendríticas mieloides, mastócitos e plaquetas [1, 6, 8].

O comprometimento de um progenitor linfoide e mielóide a uma determinada via de diferenciação está relacionado com a expressão dos recetores à superfície das células, que são específicos para determinadas citocinas. Na presença das citocinas corretas, as células conseguem proliferar e diferenciarem-se nos tipos celulares correspondentes [3].

No contexto deste trabalho serão abordadas as células $T\gamma\delta$, e portanto para uma melhor compreensão desta subpopulação de células, torna-se importante perceber a população de células em que estas se inserem. Deste modo, o próximo capítulo centra-se numa descrição generalizada dos linfócitos T.

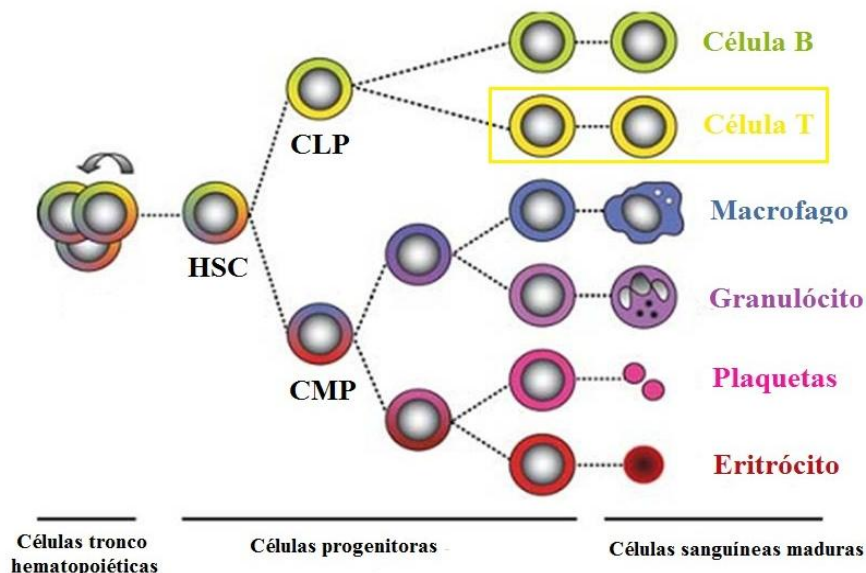


Figura 2 - Revisão simplificada da hematopoiese. Na hematopoiese as HSC (células tronco hematopoiéticas) diferenciam-se e dão origem a duas classes de células, as CLP (células progenitoras linfoides) e as CMP (células progenitoras mieloides). Imagem adaptada de [8].

B. Linfócitos T

Os Linfócitos T, como vimos anteriormente, são células mediadoras da imunidade celular. Tem origem na medula óssea e correspondem a cerca de 70 a 80% de todos os linfócitos que circulam no sangue periférico. Apesar de terem origem na medula óssea, estes migram desta para a glândula do timo, onde sofrem maturação. O nome dos linfócitos T deriva assim do seu local de maturação, ou seja, o timo [1, 3]. Ao longo das inúmeras fases da sua maturação, os linfócitos T passam a expressar vários recetores membranares específicos, entre os quais o **recetor das células T** (do inglês, *T cell receptor* - TCR), o **sistema CD3** e os recetores **CD4** e **CD8** [1].

O reconhecimento do antígeno por parte das células T, só é possível devido ao TCR expresso à superfície destas células. Contudo, o TCR dos linfócitos T só é capaz de reconhecer os antígenos apresentados pelas **células apresentadoras de antígenos** (do inglês, *Antigen-Presenting Cells* - APCs), e apenas quando estes se encontram ligados às proteínas **do complexo major de histocompatibilidade** (do inglês, *Major Histocompatibility Complex* - MHC). As APCs consistem em células especializadas, incluindo os macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, que inicialmente internalizam o antígeno por fagocitose ou endocitose, apresentado posteriormente parte desse antígeno ligado às moléculas MHC na sua superfície [2, 3].

Existem dois tipos principais de moléculas do MHC, as de classe I e as de classe II. Quando uma célula T *naïve* encontra um antígeno combinado com uma molécula MHC à superfície de uma APC, a célula T *naïve* liga-se ao antígeno, prolifera e diferencia-se em **células T memória** ou em **células T efectoras** [1-3].

As células T podem ser subdivididas em duas subpopulações, nomeadamente as **células T citotóxicas** (Tc) e as **células T helper** (Th), que se distinguem uma da outra pela presença de uma glicoproteína de membrana, o CD8 ou o CD4, respetivamente. Quando uma célula Th interage com o complexo antígeno-MHC classe II, esta célula é ativada e torna-se numa célula T efectora secretora de determinadas citocinas que irão favorecer a proliferação e diferenciação das células Tc, em células Tc efectoras com a capacidade de eliminação de células infetadas por vírus, células tumorais e células de tecidos estranhos [1, 9].

Embora existam diferentes classes de linfócitos T, todos eles partilham de um processo de maturação ao longo do timo, que é seguidamente abordado.

B.1. Maturação dos linfócitos T

No timo os linfócitos T passam por diversas fases de proliferação e diferenciação que estão relacionadas com o rearranjo dos genes do TCR e com a expressão de outras glicoproteínas à superfície da membrana destas células, que estão envolvidas no reconhecimento destes e das suas respetivas funções efetoras [1, 10, 11].

Os linfócitos T quando chegam ao timo entram em contacto com as células do estroma tímico, que geram sinais indutivos para o comprometimento celular dos mesmos, e fornecem os estímulos necessários para que se dê a proliferação e o início da maturação destas células, que passam agora a designar-se por **timócitos**[1, 3, 10]. Este processo de maturação está confinado a três estadios (I, II, e III) baseados na expressão das moléculas CD4, CD8 e do complexo TCR-CD3 ao nível da superfície membranar destas células [9, 11].

Já no timo, os linfócitos T sofrem modificações fenotípicas durante a sua migração desde a zona subcapsular (zona mais externa do córtex), passando pelo interior do córtex e terminando na medula onde apenas os linfócitos T maduros abandonam o timo, através da corrente sanguínea para alcançarem os tecidos periféricos. Este processo de maturação ocorre enquanto houver timócitos que continuam a migrar desde a região subcapsular até à região do córtex [1, 9, 11].

Na zona subcapsular os timócitos iniciais (**estadio I**) são caracterizados por não expressarem quer o complexo TCR-CD3, quer os coreceptores CD4 e CD8, sendo denominados por duplos negativos (DN). De facto, os timócitos iniciais ainda não sofreram o rearranjo dos genes do TCR e portanto não expressam proteínas como a RAG-1 e a RAG-2, que são necessárias para que o rearranjo ocorra [1, 12]. As células DN constituem uma população minoritária (2-5% dos timócitos) com intensa atividade proliferativa, que são capazes de se autorrenovarem e de originarem todas as outras populações de linfócitos T [12]. As células DN podem ainda ser subdivididas em quatro subpopulações (DN1, DN2, DN3 e DN4) consoante a presença ou ausência das moléculas CD44 (molécula de adesão) e CD25 (cadeia α do recetor da interleucina 2, IL-2R α) [13]. No estado DN1, as células expressam a molécula CD44 mas não expressam a molécula CD25. Quando estas

mesmas células mantêm a expressão do CD44 mas começam a expressar o CD25, passam à fase DN2. Durante a fase DN2, dá-se o início do rearranjo dos genes para as cadeias γ , δ e β , mas não ocorre o rearranjo da cadeia α do TCR. Entretanto, as células progredem para a fase DN3 onde mantêm a expressão da molécula CD25, mas a expressão do CD44 é interrompida. Nesta fase o rearranjo das cadeias γ , δ e β do TCR permanece. As células que fizeram os rearranjos produtivos de ambos os genes da cadeia γ e δ divergem na transição entre DN2 e DN3 e tornam-se células T $\gamma\delta$ maduras, que constituem apenas uma percentagem inferior a 5% dos timócitos [1, 13]. Contudo, a maioria dos timócitos duplo negativos evoluem numa via diferente, em direção à forma DN4. Ao longo desta via, a cadeia β recém-sintetizada combina-se com uma glicoproteína conhecida como cadeia pré-T α , associam-se ao CD3, e juntamente formam um novo complexo denominado por recetor da célula pré-T (pré-TCR). Após isto, as células na fase DN3 que tiveram um rearranjo produtivo da cadeia β , sofrem intensa proliferação e perdem a expressão do CD25, passando à fase DN4 [1, 12, 14]. Nesta fase de proliferação, inicia-se a expressão dos corecetores CD4 e CD8, e os timócitos passam de duplos negativos (DN) a duplos positivos (DP).

Uma vez no córtex, os timócitos (**estadio II**) perdem a sua atividade proliferativa, ocorre o aumento dos níveis da proteína RAG-2 e dá-se o início do rearranjo da cadeia α do TCR, passando os timócitos a expressar níveis baixos ou intermédios complexo CD3-TCR $\alpha\beta$. Os timócitos que possuem um inadequado TCR, isto é, que não conseguem reconhecer os antígenios-próprios que são apresentados pelas moléculas do MHC, sofrem morte por negligência, e os restantes são sujeitos a uma seleção positiva e negativa [1, 15].

Seguidamente, os timócitos DP que foram selecionados positivamente, continuam a sua migração ao longo do timo e quando ultrapassam a junção cortico-medular (**estadio III**) passam a expressar níveis elevados do complexo TCR $\alpha\beta$ -CD3 e assumem um fenótipo *single positive*, CD4⁺ ou CD8⁺. Estes timócitos constituem cerca de 5 a 10% do total de timócitos na medula do timo, que podem agora através da corrente sanguínea abandonar a medula e passarem a colonizar os tecidos linfoides periféricos [9, 11, 16].

Todo o processo de desenvolvimento das células T encontra-se esquematizado na [figura 3](#).

No âmbito deste trabalho, serão focados em maior detalhe o subtipo de linfócitos T em estudo, denominado por linfócitos T $\gamma\delta$.

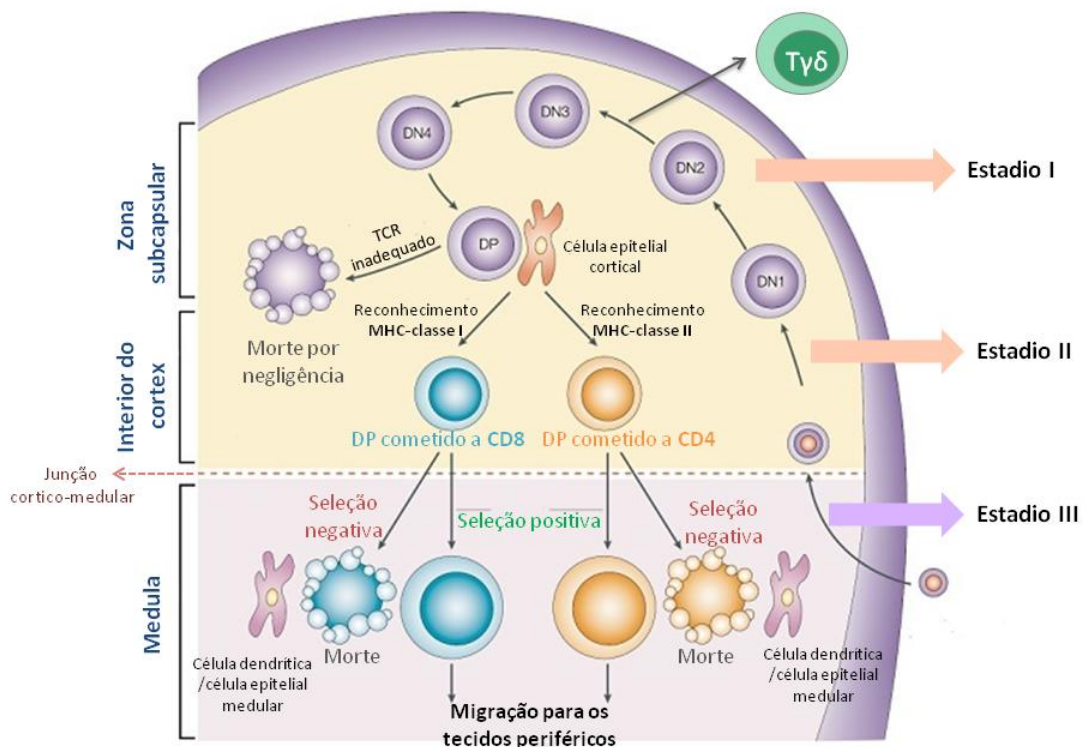


Figura 3 – Esquema geral do desenvolvimento da célula T no timo. Imagem adaptada de [9].

B.2. Um subtipo de linfócitos T – Linfócitos T $\gamma\delta$

Em 1986 foi descoberto um subtipo de linfócitos T, que expressava o CD3, porém não marcava para com um anticorpo monoclonal específico para o recetor das células T $\alpha\beta$, o que demonstrava a inexistência do heterodímero $\alpha\beta$. Posteriormente, estas células foram identificadas e verificou-se que apresentavam um recetor TCR composto por uma cadeia γ e outra δ [1, 17].

B.2.1. Estrutura do recetor dos linfócitos T $\gamma\delta$ –TCR $\gamma\delta$

A estrutura dos domínios do TCR nos linfócitos T $\gamma\delta$, tal como nos linfócitos T $\alpha\beta$ é semelhante à das imunoglobulinas, sendo formada por um domínio variável (V) e um constante (C) [18]. A estrutura do TCR encontra-se exemplificada na [figura 4](#) não só para os linfócitos T $\gamma\delta$ como também para os linfócitos T $\alpha\beta$.

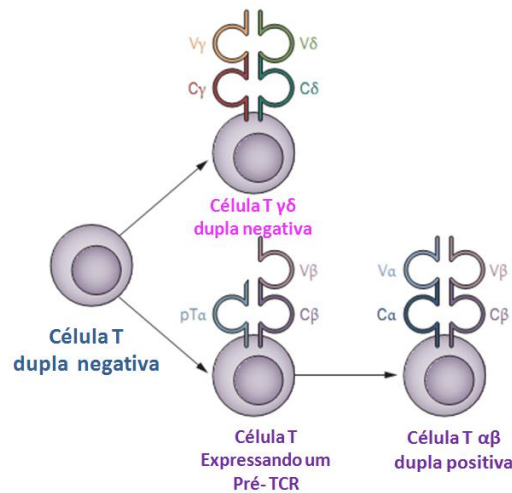


Figura 4 - Estrutura do TCR. Abreviações: C, constante; V, variável; TCR, recetor da célula T; pT α , cadeia pré-TCR α . Imagem adaptada de [19].

A porção constante das cadeias encontra-se ligada à membrana celular, exercendo funções sinalizadoras e efetoras, ao passo que a porção variável fica totalmente exposta ao meio extracelular, e é responsável pela ligação com o complexo MHC-antígeno. Relativamente à porção variável do TCR, esta exibe uma grande diversidade, o que garante o reconhecimento do maior número possível de antígenos, uma vez que a cada estrutura antigénica diferente, está confinada apenas uma molécula de TCR capaz de a reconhecer [3, 18].

A extensa diversidade estrutural do recetor dos linfócitos T $\gamma\delta$ ocorre ao longo da maturação dos linfócitos T, aquando as células T duplamente negativas, são cometidas a um destino $\gamma\delta$, através da recombinação somática dos segmentos de genes V (variável), D (diversidade) e J (junção) de forma a formarem genes funcionais que codifiquem o TCR consoante o resultado do rearranjo inicial dos segmentos de genes para a cadeia β ou γ do TCR [1, 18, 19].

Linfócitos T portadores de um TCR $\gamma\delta$ apresentam frequências relativas diferentes, de acordo com os diferentes tecidos onde estas residem. Seguidamente abordar-se-á a distribuição destas células.

B.2.2. Distribuição dos linfócitos T $\gamma\delta$

A frequência relativa das células T $\gamma\delta$, varia de acordo com a sua localização no organismo, mas também a idade de um indivíduo e a sua história imunológica (por

exemplo, episódios infecciosos), afetam criticamente a frequência destas células num determinado tecido. Estas células representam apenas uma pequena porção entre 1 e 5% de todos os linfócitos T que circulam no sangue periférico de indivíduos saudáveis. No entanto, a sua percentagem é maior ao nível dos tecidos epiteliais, tal como a pele, epitélio intestinal, pulmonar e genital, denominando-se por **linfócitos T $\gamma\delta$ intraepiteliais** (do inglês, *intraepithelial lymphocytes* - IELs) [20]. Estes podem compreender até pelo menos 10% da população de células T, e a sua topografia sugere que estas células funcionam como uma espécie de barreira imunológica inicial contra os organismos invasores, e que a sua relevância patológica em doenças autoimunes deve-se à sua acumulação nos órgãos afetados e à capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias como é o caso da IL-17 [21].

Para além do conhecimento inerente à distribuição das células T $\gamma\delta$, sabe-se que estas células expressam determinados recetores intimamente relacionados com diversas funções. Os seguintes pontos irão abordar os recetores e as funções expressas pelos linfócitos T $\gamma\delta$.

B.2.3. Recetores expressos pelos linfócitos T $\gamma\delta$

Relativamente às características fenotípicas inerentes a este subtipo celular, estas facultam de uma correta identificação e se necessário o isolamento das mesmas. Para tal, e por definição, os marcadores mais fiáveis correspondem às cadeias γ e δ do TCR, sendo que contudo existe à superfície destas células um grande conjunto de moléculas cuja expressão pode ser detetada por citometria de fluxo, utilizando uma ampla variedade de anticorpos monoclonais para sua marcação. Apesar de alguns destes marcadores serem compartilhados pelas células T $\alpha\beta$, e com outras células hematopoiéticas, existem outros marcadores que são preferencialmente expressos num ou noutro subconjunto de células T [19].

A ausência dos corecetores CD4 e CD8 que ocorre na maioria das células T $\gamma\delta$, reflete provavelmente a sua reatividade contra ligandos que não estão associados a moléculas do MHC. Na verdade, as células T $\gamma\delta$ não se restringem ao reconhecimento antigénico por parte das moléculas do MHC. Evidenciou-se que clones de células T $\gamma\delta$ ligavam-se diretamente ao vírus do herpes sem necessidade de apresentação do antigénio pelas moléculas do MHC. Além disto, células T $\gamma\delta$ também se ligam a alguns antigénios

não peptídicos de micobactérias (isopentenil pirofosfacto), o que sugere que algumas células T $\gamma\delta$ ligam-se aos epítomos da mesma forma que os anticorpos [22].

Para além da presença de um TCR $\gamma\delta$ e da ausência dos recetores CD4 e CD8 nas células T $\gamma\delta$, sabe-se que estas exibem um conjunto de recetores à sua superfície, e que esses recetores são especializados na deteção de stresse e infeção celular (figura 5). Esta deteção, de moléculas que são induzidas em situações de stresse é obtida não só através do TCR, como também é alcançada através de moléculas denominadas por moléculas não-TCR, como é o caso dos recetores *Toll like* (TLRs) e dos recetores *natural killer* (NKRs) que podem atuar de forma cooperada ou adicional com o TCR, na ativação de determinadas funções efetoras por parte das células T $\gamma\delta$. Um exemplo de NKRs é o NKG2D (do inglês, *receptor natural killer group 2 member D*), responsável por desencadear respostas citotóxicas. Contudo os mecanismos subjacentes à ativação deste recetor ainda se encontram por clarificar, presumindo-se no entanto que a sua ativação depende provavelmente do contexto tecidual onde ocorre a ativação das células T $\gamma\delta$, bem como da exposição prévia por parte destas células a citocinas inflamatórias [23, 24]. Tais recetores NKRs reconhecem ligandos induzidos em situações de stresse, como é o caso de MICA (do inglês, *MHC class I polypeptide-related sequence A*), MICB (do inglês, *MHC class I polypeptide-related sequence B*), em humanos [25].

Relativamente aos TLRs, estes juntamente com outros recetores de reconhecimento padrão (do inglês, *Molecular Pattern Recognition Receptors* - PPRs), nomeadamente a Dectina-1, possuem a capacidade de reconhecer moléculas patogénicas, mas distintas das moléculas do hospedeiro, as PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) e as DAMPs (do inglês, *danger-associated molecular pattern molecules*). Por sua vez, o reconhecimento destes padrões moleculares, por células dendríticas conduz à libertação de citocinas, nomeadamente a IL-12 e a IL-23, que consequentemente conduzem à ativação indireta das células T $\gamma\delta$ e que resulta na produção das citocinas pró-inflamatórias IFN γ e IL-17, respetivamente [26-28].

Para além dos ligandos já mencionados, existem outros que interagem com o TCR, e que estão relacionados ou não com as moléculas do MHC. Entre estes, destaca-se a molécula CD1 e fostoantígenos endógenos e microbianos [29].

A seguinte figura ilustra os já referidos recetores expressos à superfície de células T $\gamma\delta$ e respetivos ligandos, envolvidos na deteção de stresse celular e infeção.

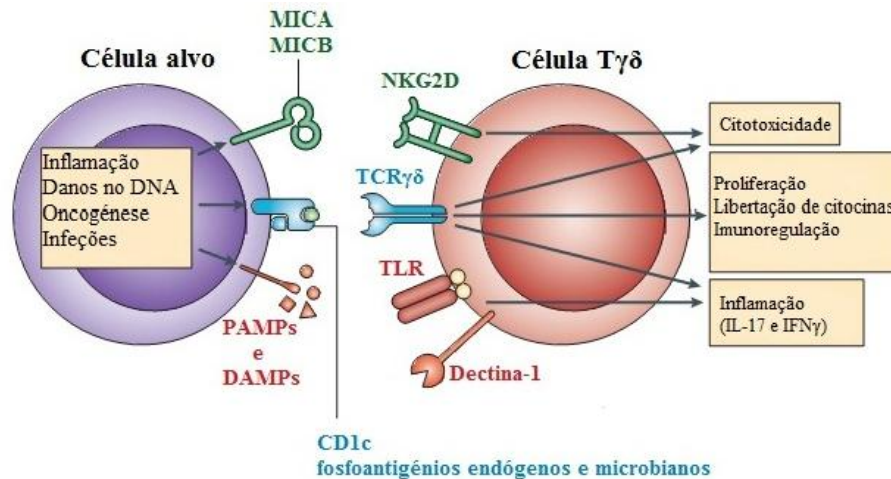


Figura 5 – Detecção de stress celular e infecção por parte das células T $\gamma\delta$. As células T $\gamma\delta$ podem reconhecer separadamente, adicionalmente ou sinergicamente três conjuntos de ligandos induzidos em stress: ligandos do TCR (CD1c e fosfoantígenos endógenos e microbianos); ligandos do NKG2D (MICA e MICB); PAMPs e DAMPs reconhecidos por TLRs e Dectina-1. Imagem adaptada de [30].

B.2.4. Funções desempenhadas pelos linfócitos T $\gamma\delta$

Não se pode considerar que as células T $\gamma\delta$ sejam especializadas em cumprir uma única função. Na verdade, diferentes subtipos destas células apresentam diferentes funções consoante a distribuição ao nível dos tecidos, a estrutura do TCR e o estadió da resposta imune em que estas células se tornam ativadas. Estes factos tornam estas células pertencentes a uma população linfóide heterogénea [31].

Relativamente aos IELs, existem estudos que demonstram o desempenho de um **papel homeostático** por parte destas células, evidenciando a ativação destas células por queratinócitos em stress, bem como a libertação do factor de crescimento dos queratinócitos (do inglês, *keratinocyte growth factor* - KGF), por parte deste subtipo de células T $\gamma\delta$. Estes dados suportam a implicação dos IELs no controlo da integridade epitelial ao nível intestinal, através do reconhecimento de antígenos próprios epiteliais conservados [32, 33]. Deste modo, e uma vez que o factor de crescimento de queratinócitos atua ao nível da regeneração de tecidos, é sugerido que as células T $\gamma\delta$ possuem um papel na manutenção da homeostasia epitelial [34].

Existe um outro subtipo de células T $\gamma\delta$, denominado por células T epidérmicas dendríticas (do inglês, *dendritic epidermal T cells* - DETCs), que constitui mais de 90%

das células T epidérmicas, cuja função consiste em promover a **cicatrização de feridas**, a **reparação dos tecidos**, e proteger eficazmente o epitélio da invasão microbiana e posterior disseminação pelo organismo [35].

A maior característica das células $T\gamma\delta$ consiste no facto destas células **atuarem na interface entre a imunidade inata e a imunidade adquirida**. Um estudo de Brandes *et al.* fornece novas informações acerca da categorização das células $T\gamma\delta$, pois se por um lado, estas células exibem características da imunidade inata, por outro, exibem características da imunidade adaptativa [36, 37]. Entre as características que tornam as células $T\gamma\delta$ pertencentes ao sistema imune inato, destacam-se as seguintes: respondem rapidamente; apresentam um uso limitado dos genes do TCR; expressam TCRs que atuam como recetores de reconhecimento padrão para precursores isoprenoides fosforilados e alquilaminas; demonstram ser células apresentadoras de antígenos profissionais às células $T\alpha\beta$, *in vitro* [36, 37]. Tal como já se referiu, as células $T\gamma\delta$ também podem ser classificadas como parte do sistema imune adaptativo, e as seguintes características apoiam esta afirmação: expressam recetores de superfície que geram memória imunológica; induzem a maturação de células dendríticas; possuem funções efetoras semelhantes às exercidas pelas células $T\alpha\beta$ [36]. As funções das células $T\gamma\delta$ nas respostas imunes inata e adaptativa, encontram-se ilustradas na [figura 6](#).

Assim sendo, suspeita-se que ao contrário da maioria das células do sistema imune, que pertencem a um ou outro sistema, as células $T\gamma\delta$ pertencem a ambos os sistemas imunes, inato e adaptativo ([Figura 7](#)) [38].

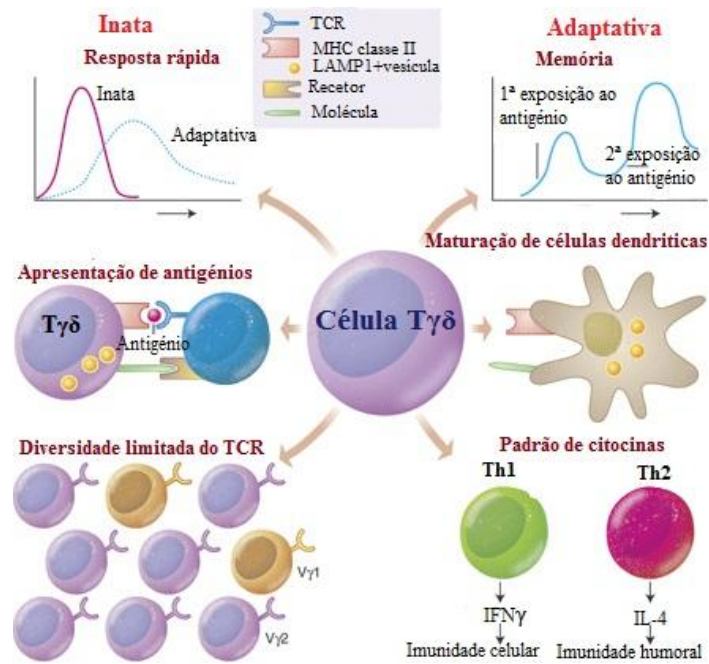


Figura 6 – Função das células T $\gamma\delta$ nas respostas imune inata e adaptativa. As células T $\gamma\delta$ exibem funções consistentes com ambos os tipos de imunidade. Tal como as células dendríticas, estas células também são capazes de apresentar antígenos às células T $\alpha\beta$. Imagem adaptada de [36].

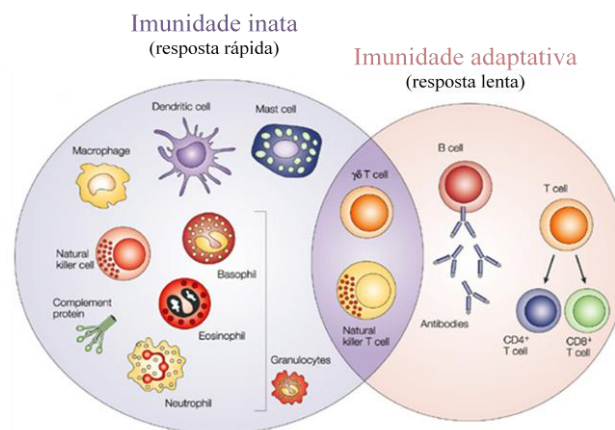


Figura 7 - Células correspondentes à resposta imune inata ou à resposta imune adaptativa, e células que se localizam na interface de ambas as respostas imunes. Imagem adaptada de [38].

Uma outra função das células T $\gamma\delta$ que tem sido alvo de estudo nos últimos tempos, é a sua capacidade de **imunovigilância anti-tumoral**, sugerindo, que subtipos de células T $\gamma\delta$ exibem importantes funções anti-cancerígenas que podem ser potenciadas após a sua ativação com fosfoantígenos sintéticos. Uma vez ativas estas células possuem capacidade de ligação à superfície de células anaplásicas pela proteína hsp70, e libertam para o seu

interior grânulos de perforina citotóxicos, o que conduz à apoptose das mesmas. Como estes fosfoantígenos sintéticos são potenciais drogas imunoestimulatórias, atualmente aceites na imunoterapia do cancro, vários são os ensaios clínicos atualmente em curso, que usam esta nova família de células, como imunoterapia em linfomas e tumores sólidos [38, 39].

As células T $\gamma\delta$ podem assim reforçar uma resposta imune contra células tumorais através da secreção de quimiocinas, tais como proteína inflamatória de macrófagos 1 α (Mip-1 α), proteína inflamatória de macrófagos 1 β (Mip-1 β) e RANTES (do inglês “*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*” atraindo células apresentadoras de antígenos e neutrófilos, que conjuntamente combatem as células tumorais [39].

Os linfócitos T $\gamma\delta$ podem também ser classificados de acordo com as suas atividades funcionais após ativação: **produção de citocinas e quimiocinas; citotoxicidade**[31, 33].

B.2.4.1. Citocinas e recetores de quimiocinas expressos pelos linfócitos T $\gamma\delta$

Relativamente à produção de citocinas, estudos demonstram que subtipos de células T $\gamma\delta$ exibem maior atividade citotóxica do que outros. Por exemplo, células T V δ 2 em humanos, geralmente apresentam uma maior atividade citotóxica, e produzem elevados níveis de IFN γ e TNF α , enquanto as células T δ 1, também em humanos, têm menos potencial citotóxico, e produzem um amplo conjunto de citocinas, incluindo a IL-4 e a IL-17 [40]. A produção de IFN γ pelas células T $\gamma\delta$ é controlada pelos factores de transmissão T-bet e “eomesodermin”, enquanto a produção de IL-4 está correlacionada com o GATA ligação proteína 3 (do inglês, *Gata-binding protein 3* - GATA 3). Por último, a produção de IL-17 é regulada pelo recetor do ácido retinóico relacionado ao recetor órfão- γ t (do inglês, *acid receptor-related orphan receptor- γ t* - ROR γ t)[40-42]. Sabe-se também que a aquisição das funções reguladoras por parte das células T $\gamma\delta$, não requer o factor de transcrição FOXP3 (do inglês, *forkhead box P3*), e que as citocinas IL-5 e IL-13 são produzidas pelas células T $\alpha\beta$ em resposta à IL-4 produzida pelas células T $\gamma\delta$, por sua vez, em resposta à IL-2 [43].

Estudos recentes têm demonstrado a produção de citocinas pelas células T $\gamma\delta$, entre estas encontra-se o TNF α , o IFN γ , a IL-2 e a IL-17. A libertação destas citocinas está intimamente ligada com o desenlace da resposta imune, uma vez que estas atuam de forma

endócrina e os seus efeitos são mediados por recetores específicos que são expressos à superfície de outras células do sistema imune, e que atuam mediante a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular [2, 21, 44].

Na tentativa de um aprimorado conhecimento fenotípico das células T $\gamma\delta$ descobriu-se que nesta população de células pode-se distinguir dois subtipos celulares com base na expressão do recetor CD27 (T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻). Num estudo realizado ao nível dos tecidos periféricos em ratos, verificou-se que aproximadamente 10-30% das células T $\gamma\delta$ não expressam o CD27 (T $\gamma\delta$ CD27⁻) enquanto 70-90% expressam (T $\gamma\delta$ CD27⁺). Denota-se também que a subpopulação de T $\gamma\delta$ CD27⁺ expande mais rapidamente em resposta a uma infeção com *P.berghei* em ratos do que a subpopulação T $\gamma\delta$ CD27⁻. Contudo, ao 6º dia após a infeção, o número de LT $\gamma\delta$ CD27⁻ aumentou em número cerca de 5 vezes, representando aproximadamente 40% das células, denotando-se uma aproximação em número de LT $\gamma\delta$ CD27⁺ e LT $\gamma\delta$ CD27⁻ com o avançar da inflamação [44].

O estudo continuado das células T $\gamma\delta$ em ratos permitiu verificar que após 4 horas de ativação *in vitro*, a população CD27⁺ adquire características típicas das células Th₁ particularmente, uma abundante produção de IFN γ e TNF α , contudo uma produção diminuta de IL-17. No entanto, na análise da população CD27⁻ verificou-se exatamente o oposto, ocorrendo baixa secreção de IFN γ e TNF α e elevada secreção de IL-17 [44].

Para além da expressão de citocinas, as células T $\gamma\delta$ também expressam recetores de quimiocinas à sua superfície, tais como o recetor 5 das quimiocinas-CC (do inglês *CC-chemokine receptor 5* - CCR5) e o recetor 6 das quimiocinas-CC (do inglês *CC-chemokine receptor 6* - CCR6) [40, 45].

B.2.4.2. Citotoxicidade mediada pelas células T $\gamma\delta$

Entre as moléculas citotóxicas expressas pelas células T $\gamma\delta$ destaca-se a presença de moléculas citoplasmáticas, denominadas por **granzima B** e **perforina**, que sugerem que os linfócitos T $\gamma\delta$ possuem um papel similar ao desempenhado pelas células NK [44].

Um estudo de Ribot *et al.* demonstra que as células T $\gamma\delta$ CD27⁻ (efetoras) possuem uma maior capacidade de expressarem no citoplasma granzima B e perforina, sendo que a sua frequência aumenta diretamente com o desenvolvimento inflamatório. Isto leva-nos a pensar que o aumento de granzima B e perforina poderá estar diretamente relacionado com a atividade de uma doença autoimune. Isto verificou-se num estudo feito em Lúpus

Eritematoso Sistémico, em que a frequência de células T $\gamma\delta$ a produzir estas moléculas é maior no grupo de pacientes com a patologia do que no grupo controlo [44].

Para além da existência destas moléculas citotóxicas, as células T $\gamma\delta$ também produzem moléculas líticas ou bacteriostáticas, tais como granulinas e defensinas, e por outro lado, contribuem indiretamente para a remoção do agente patogénico induzindo outras células imunes efetoras a desempenharem funções antibacterianas [46, 47].

Para além das moléculas citotóxicas, as células T $\gamma\delta$ possuem à sua superfície o recetor NKG2D, que possui reatividade contra ligandos conservados relacionados com o MHC, e que se encontram expressos em células transformadas ou infetadas. Este recetor geralmente funciona sinergicamente com o TCR $\gamma\delta$ como um co-estimulador, contudo pode também desencadear respostas citotóxicas [25].

As células T $\gamma\delta$ para além de expressarem as moléculas citotóxicas possuem vias que envolvem recetores que podem induzir a morte de células infetadas ou transformadas, nomeadamente via FAS/FAS Ligando e TRAIL / TRAILR (do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand/ TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*) [48].

B.2.5. Reportório dos linfócitos T $\gamma\delta$

O reportório altamente restrito do TCR das células T $\gamma\delta$, certamente constitui uma das maiores características exibidas por este subtipo de células T, e que as distingue das células T convencionais, as T $\alpha\beta$. Adicionalmente, pode-se afirmar que estas células T $\gamma\delta$ possuem uma característica muito marcante, que é o facto de expressarem diferentes regiões variáveis (V) em distintos locais ao nível dos tecidos, o que sugere que o reconhecimento de um conjunto restrito de antígenios num dado local do corpo pode diferir de um tecido para outro [33].

Atualmente são conhecidos dois subtipos de células T $\gamma\delta$ em humanos, nomeadamente as células V δ 1 e as V γ 9V δ 2. Relativamente ao subtipo de células T $\gamma\delta$, que usam uma cadeia V δ 1 (emparelhada com várias cadeias V γ), estas constituem o primeiro subtipo a surgir no timo do feto humano. Este subtipo localiza-se principalmente ao nível dos tecidos epiteliais (baço e intestino), constituindo assim a população mais frequente entre os linfócitos T $\gamma\delta$ intraepiteliais, tendo sido encontrados em elevada proporção em vários tumores epiteliais humanos e linfomas [49, 50]. O reconhecimento por parte deste subtipo de células ocorre via CD1 ou através de recetores NKG2D.

Quanto às células $T\gamma\delta$ que expressam um TCR que compreende os segmentos variáveis $\gamma 9$ e $\delta 2$ (TCR $V\gamma 9V\delta 2$) e por isso designam-se por células T $V\gamma 9V\delta 2$, estas são raras no timo e na circulação sanguínea após o nascimento, mas durante a infância a sua frequência aumenta, pelo que se acredita que surgem de uma seleção positiva no sangue periférico como resultado da estimulação antigénica [51]. Por sua vez, ao contrário das células T $V\delta 1$, as células T $V\gamma 9V\delta 2$ compreendem, na idade adulta, cerca de 80 a 90% do total de células $T\gamma\delta$ no sangue periférico, constituindo assim o subtipo de células $T\gamma\delta$ mais comum [52, 53]. Esta elevada proporção por parte das células T $V\gamma 9V\delta 2$ poderá estar relacionada com o facto destas, durante a infância, sofrerem uma expansão contínua e adquirirem um fenótipo de memória, provavelmente devido à recorrente exposição a agentes estranhos. Este subtipo de células $T\gamma\delta$ reconhece, expande e liberta citocinas em resposta a compostos não peptídicos, nomeadamente o isopentenil pirofosfato e outros intermediários da via do mevalonato, também a alquilaminas e compostos não-fosfato encontrados em plantas e bactérias[54]. Este tipo de compostos são normalmente intitulados por fosfoantígenos, e tem-se verificado a sua expressão em células tumorais humanas [55]. De facto, as células T $V\gamma 9V\delta 2$ possuem a capacidade de responderem antecipadamente a estados de infeção ou de desregulação celular, exercendo a sua função citotóxica ou alterando o meio em citocinas e quimiocinas, podendo estimular funções efetoras em células NK e células $T\alpha\beta$ [36].

Existem, também, estudos que demonstram a existência de uma elevada expansão de células T $V\gamma 9V\delta 2$ no sangue periférico de pacientes infetados com malária, salmonela, meningite bacteriana, entre outras doenças [56]. Tal como acontece em células tumorais, a resposta das células T $V\gamma 9V\delta 2$ aos agentes infecciosos, resulta do reconhecimento de fosfoantígenos [57]. De facto, existem evidências da expansão do subtipo $V\delta 1$ em pacientes com HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*), e pensa-se que o papel antiviral das células $T\gamma\delta$ está relacionado com a produção de $IFN\gamma$ por subtipos destas células [58].

É de salientar ainda que, o reconhecimento de fosfoantígenos pelas células T $V\gamma 9V\delta 2$ ocorre de modo dependente do TCR, mas como isto ocorre, ainda não é bem conhecido. Pensa-se que o contacto célula-célula, necessário para sua ativação, implica que ou os fosfoantígenos induzam uma modificação estrutural do TCR, ou que moléculas que se desconhece atualmente os apresentem [57].

Para além de todos estes conhecimentos acerca do repertório T V γ 9V δ 2, descobriu-se também que a expressão de determinados recetores à superfície destas células, está correlacionada com a capacidade destas células desenvolverem características de memória [59].

B.2.5.1. Memória imunológica do repertório T V γ 9V δ 2

A expressão de NKRs (do inglês, *NK cell receptors*) à superfície de células T tem sido correlacionada com a aquisição de marcadores de memória por parte destas células, e pode refletir os diferentes estados de memória/função na população de linfócitos T V γ 9V δ 2. Contudo, a capacidade destas células em desenvolver memória imunológica, permanece sob debate. No entanto, um estudo em macacos verificou que as células T V γ 9V δ 2 expandiram em resposta a uma tuberculose induzida, e após a indução de uma segunda tuberculose, a resposta destas células foi muito mais acelerada. Este facto vem a suportar a ideia de que células T V γ 9V δ 2 realmente possuem esta característica adaptativa, a memória imunológica [59]. Pensa-se, contudo, que o desenvolvimento de memória por parte destas células seja diferente daquele exercido por células T convencionais, isto porque células T V γ 9V δ 2 respondem a fosfoantígenos, ao passo que as células convencionais são programadas para responder a antígenos peptídicos estranhos. No entanto verificou-se que células T V γ 9V δ 2 e células T CD8 expostas aos mesmos antígenos sofrem exatamente as mesmas variações.

Com base na expressão dos marcadores CD45RA e CD27 à superfície das células T V γ 9V δ 2, é possível subdividi-las em quatro subtipos: *naïve*; memória central; memória efetora; efetoras. Assim, denomina-se por subpopulação *naïve* o conjunto de células T V γ 9V δ 2 cujo fenótipo é CD27⁺/CD45RA⁺, e por subpopulação **memória central** quando o fenótipo é CD27⁺/CD45RA⁻. Estas duas subpopulações são caracterizadas por apresentarem elevada capacidade de proliferação e funções efetoras diminuídas. As restantes correspondem às subpopulações **memória efetora** (CD27⁻/CD45RA⁻) e **efetoras** (CD27⁻/CD45RA⁺), que possuem baixa atividade proliferativa, apresentando contudo inúmeras funções efetoras [52, 60].

Estudos acerca destas subpopulações evidenciaram uma maior frequência de células CD27⁻ (memória efetora e efetoras terminais) em pacientes que desenvolveram doenças

autoimunes, podendo este aumento estar correlacionado com um aumento da ativação das células CD27⁺ que conseqüentemente se diferenciam em células CD27⁻efetoras [61, 62].

Relativamente à localização das células T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻, as primeiras abundam ao nível dos gânglios linfáticos, ao passo que as últimas predominam preferencialmente nos locais de inflamação apesar de também estarem presentes, mas em menor frequência, nos gânglios linfáticos [63]. Segundo Casseti *et al.*[64], todas as células T $\gamma\delta$ CD27⁺ pertencem à imunidade adaptativa, ao passo que as T $\gamma\delta$ CD27⁻ fazem parte da imunidade inata.

C. Autoimunidade

Paul Ehrlich percebeu no início do século XX, especialmente após a identificação de algumas situações patológicas, que o sistema imune poderia sofrer um “desvio” e atacar os antigénios do próprio organismo em vez de reagir contra os antigénios estranhos [1, 2]. Foi deste modo que surgiu o termo “autoimunidade”, que consiste numa falha dos mecanismos normais de autotolerância, resultando numa resposta inadequada do sistema imune contra os seus próprios componentes [1, 3]. Esta resposta conduziu à identificação de autoanticorpos, responsáveis por danos ao nível das células e dos órgãos do sistema imune. Estes danos sugeriram que o sistema imune pode ser “autoagressivo”, e portanto pode desencadear diversas doenças autoimunes causadas pelo fenómeno de autoimunidade [1-3].

C.1. Doenças autoimunes

Designa-se por doenças autoimunes um conjunto de patologias em que ocorre o fenómeno de autoimunidade. O conjunto destas patologias tem aumentado nos últimos anos e atualmente atinge aproximadamente entre 5 a 7% da população humana, e maioritariamente o sexo feminino, causando muitas vezes enfermidades crónicas debilitantes [1, 2, 65].

A etiologia destas doenças é multifactorial e resulta de uma combinação de factores genéticos e ambientais. Atualmente sabe-se que embora os diversos factores genéticos possam influenciar fortemente a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças autoimunes, é necessário a existência de um indicador ambiental para que ocorra o estabelecimento destas[2].

As diversas doenças autoimunes podem ser classificadas em 2 amplas categorias: órgão-específica e sistêmica. Este trabalho foca especialmente uma doença autoimune sistêmica, denominada por esclerose sistêmica [1, 2].

C.1.1. Esclerose sistêmica

A esclerose sistêmica (do inglês, *Systemic Sclerosis* - SSc) é uma doença reumática e autoimune do tecido conjuntivo. Esta é caracterizada pelo menos por três processos patogênicos: **dano vascular**, **autoimunidade/ativação imune**, e **excessiva deposição de colagênio** na pele e numa série de órgãos internos, nomeadamente pulmões, coração, trato gastrointestinal e rins [66, 67].

A prevalência e incidência da SSc é bastante variável consoante a localização geográfica e a etnia dos doentes. Esta, tal como a maioria das doenças autoimunes, predomina no sexo feminino, tipicamente entre os 40 e os 60 anos de idade, e em relações percentuais que podem variar desde 4:1 a 14:1 quando comparado com doentes do sexo masculino [67, 68].

As manifestações clínicas da SSc variam desde um envolvimento limitado da pele e dos órgãos internos a um envolvimento difuso da pele ocorrendo fibrose ao nível dos órgãos internos, o que resulta no comprometimento ou falha dos mesmos. A maior taxa de mortalidade dos indivíduos com SSc ocorre quando estes possuem um envolvimento pulmonar, e embora a SSc seja uma patologia menos comum quando comparada com outras doenças reumáticas, possui uma das maiores taxas de mortalidade [69, 70].

C.1.1.1. Classificação dos diferentes subtipos de Esclerose Sistêmica

Embora estudos realizados recentemente tenham revelado a existência de outros subtipos de SSc, é frequente categorizar esta doença em dois subtipos, consoante o grau de envolvimento da pele [69, 71]. Em ambos os subtipos de SSc os pacientes desenvolvem episódios do **fenómeno de Raynaud**. O fenómeno de Raynaud foi inicialmente descrito por Maurice Raynaud em 1866 e trata-se da ocorrência de vasoconstrição nas extremidades do corpo, principalmente nos dedos das mãos e dos pés, quando submetidos ao frio. A vasoconstrição em resposta ao frio é normalmente um mecanismo de proteção mediado pelo sistema nervoso simpático, para prevenir a perda de calor [72]. Uma resposta exagerada ao frio nestes pacientes é responsável pela diminuição do fornecimento de

oxigénio, tornando a coloração da pele branca, empalidecida, além de fria e por vezes dormente. Após o consumo total de oxigénio pelas células, este esgota-se e a pele adquire uma coloração azulada, o que se designa por cianose, seguindo-se uma coloração avermelhada devido ao retorno do fluxo sanguíneo [73]. Deste modo, o fenómeno de Raynaud é um dos sintomas mais precoces da SSc, estimando-se que mais de 95% dos pacientes com esta doença sofrem do mesmo, e destes 30% acabam por desenvolver úlceras digitais [73, 74]. Para além do fenómeno de Raynaud, uma das principais manifestações da SSc é a presença de anticorpos antinucleares no soro dos doentes.

Como já referenciado, a SSc é classificada por dois subtipos, sendo estas a forma limitada e a forma difusa da patologia.

A **SSc cutânea limitada** (do inglês, *limited cutaneous Systemic Sclerosis - SScl*) é o subtipo mais comum, em que ocorre um envolvimento limitado da pele, e um envolvimento mínimo dos órgãos internos. Relativamente à pele ocorre o espessamento desta, confinado à face, aos lados do pescoço, e das extremidades distais até aos cotovelos e joelhos, ou apenas até aos pulsos e tornozelos. A SScl possui um prognóstico significativamente melhor quando comparado com o prognóstico da SSc cutânea difusa, no entanto a mortalidade é elevada em ambos os subtipos. Tipicamente na SScl existe uma antecedente e prolongado histórico de **fenómeno de Raynaud**, por vezes severo e normalmente associado a ulcerações digitais e enfarte. Além disto, existem outras manifestações deste subtipo, incluindo **disfunção esofágica**, **calcínose subcutânea**, **esclerodactilia** que corresponde a deformações ao nível dos dedos, que futuramente acabam por adquirir uma contractura fixa em flexão, e **telangiectasia** cutânea que geralmente está confinada às palmas das mãos e ao redor da boca. O conjunto destas cinco manifestações são normalmente denominados por síndrome de CREST (do inglês, *Cancinosis – Raynaud’s Phenomenon – Esophageal dysfunction – Sclerodactyly – Telangiectasias*). Normalmente são necessários dois dos cinco sintomas para ser diagnosticada a doença [75, 76].

A **SSc cutânea difusa** (do inglês, *diffuse cutaneous Systemic Sclerosis - SScd*) inicia-se geralmente com um inchaço simétrico das mãos e dos dedos, que se difunde para os antebraços, braços, tronco e extremidades. Numa grande parte dos pacientes o início de edema ocorre logo após o primeiro episódio do fenómeno de Raynaud, ao contrário do que acontece na SScl onde o edema tem início aquando o fenómeno de Raynaud e tipicamente

antes do início de outros sintomas por vários anos. Dentre estes sintomas, a fibrose cutânea é menos extensiva na SScI do que na SScd, na qual ocorre apenas o espessamento da pele nas extremidades distais [71, 75].

Uma vez já conhecendo os sintomas característicos de ambos os tipos de SSc, torna-se importante perceber quais as possíveis origens destes sintomas, e é neste sentido que o próximo ponto aborda a etiologia desta doença.

C.1.1.2. Etiologia da doença

Apesar das intensas investigações que se tem realizado, as causas que desencadeiam a SSc prevalecem pouco conhecidas e algumas delas são mesmo controversas [77]. No entanto pensa-se que para o estabelecimento desta doença é necessário um conjunto de **factores genéticos, factores ambientais e funções imunes anormais** [78]. Um estudo realizado recentemente em indivíduos do Utah veio a concluir que os factores genéticos têm um importante papel na SSc, uma vez que a presença da doença numa família confere um risco significativo a parentes em primeiro grau [79]. No entanto um estudo realizado em gémeos monozigóticos e dizigóticos veio comprovar que apesar dos factores genéticos constituírem um componente importante na produção de autoanticorpos, são os factores ambientais que possuem o papel mais contributivo na doença [80]. Atualmente aceita-se que para o estabelecimento da SSc é necessário ocorrer uma interação entre os factores genéticos e os factores ambientais, tendo estes últimos um papel crucial e mais importante [78, 80, 81].

Entre os factores ambientais que parecem potenciar o risco de SSc, constam os agentes infecciosos (bactérias e vírus) e os agentes químicos.

Relativamente aos vírus, tem sido abordados com maior detalhe o parvovírus B19 e o citomegalovírus humano (CMVH). Observações indicaram que a produção de autoanticorpos específicos na SSc pode ser devido a uma homologia entre os vírus e os alvos dos autoanticorpos (antigénios próprios) que possuem epítomos que partilham estruturas similares às proteínas de origem viral ou bacteriana, o que sugere que este processo de mimetização molecular pode ter um papel importante na iniciação da resposta dos autoanticorpos a distúrbios característicos da SSc [78, 82]. Em favor desta hipótese um estudo de Dang *et al.* demonstrou que anticorpos contra certas proteínas retrovirais são encontrados no plasma de pacientes com SSc [83].

Num outro estudo, realizado por Ferri *et al.* verificou-se que o parvovírus B19 estava presente no plasma de pacientes com SSc, numa percentagem de 4%, ao passo que nos controlos normais esta percentagem não excedia os 0,6% [84]. Os mesmos autores verificaram posteriormente a presença de uma elevada percentagem (57%) deste vírus na medula óssea de pacientes com SSc, estando porém ausente no sangue, o que sugere que a medula óssea desempenha um papel de reservatório, a partir da qual os parvovírus B19 se alastram para os tecidos [85]. Evidenciou-se também, em biopsias da pele e em culturas de fibroblastos da pele, que pacientes infetados com parvovírus B19 exibiam lesões endoteliais mais severas e mais ativas. Estes achados permitem formular a hipótese de que existe uma correlação direta entre o grau de alterações degenerativas de células endoteliais e o grau de expressão viral, sugerindo que o parvovírus B19 possa desempenhar o papel de propagar a disfunção das células endoteliais [86].

O vírus CMVH também tem sido correlacionado com a SSc, supondo-se que este possa desempenhar um papel na patogénese desta doença, devido à sua capacidade de infetar células endoteliais, monócitos/macrófagos e através de citocinas que induzem uma desregulação imune [87]. Num estudo de Ferri *et al.* foi relatado um caso, no qual uma mulher após sofrer uma exposição acidental às águas de esgoto desenvolveu mal-estar, febre alta, mialgias, linfadenopatias e erupções cutâneas. Nas análises detetou-se a presença de anticorpos anti-CMVH, o que levou a sugerir que o CMVH poderia ser um possível factor desencadeante da infeção. Após 2 meses a mesma paciente desenvolveu fraqueza, fenómeno de Raynaud, poliatralgias e lesões isquémicas na ponta dos dedos, sendo diagnosticado à paciente SScl. Durante os dois anos seguintes a condição clínica da paciente piorou progressivamente devido a úlceras recorrentes da pele e dos dedos. Assim sendo, o aparecimento de SSc logo após um episódio agudo de uma infeção viral, levou a sugerir que o CMVH poderia ser um possível factor desencadeante da doença [88]. O papel deste vírus na SSc também foi apoiado pelo facto de que os produtos do gene do CMVH estão envolvidos na indução de fibrose nos fibroblastos dérmicos humanos [87].

Não são apenas as infeções virais que podem estar na origem da SSc, mas também como já foi dito, infeções bacterianas constituem potenciais desencadeadores desta doença. A presença da *Helicobacter pylori* tem sido encontrada em aproximadamente 78% dos pacientes com SSc [89]. Verificou-se que esta bactéria liberta produtos extracelulares provocando uma resposta imune sistémica e local, que se pensa ser responsável pelos

danos ao nível dos tecidos [90]. A persistência de infeções bacterianas em pacientes com SSc pode conduzir a lesões endoteliais e conseqüentemente a uma microvasculopatia típica da doença [91].

Quanto aos fatores ambientais, atualmente pensa-se que a exposição ao pó de sílica e solventes orgânicos poderá constituir um desencadear da SSc [92, 93].

Concluimos assim, que são várias as causas que podem conduzir ao desenvolvimento desta patologia, contudo é necessário ainda mais conhecimento em termos da etiologia, mas principalmente ao nível da patologia. Seguidamente serão abordadas as várias hipóteses patológicas que estabelecem a ligação entre as infeções e o desenvolvimento desta doença.

C.1.1.3. Hipóteses patológicas

Embora os mecanismos exatos que estão envolvidos na patologia da SSc ainda não se encontram bem definidos, existem várias hipóteses que tentam elucidar os processos pelos quais esta doença se desenvolve. Entre as hipóteses que se conhecem, este capítulo irá focar o “mimetismo molecular” e o microquimerismo.

Tal como já foi brevemente descrito no ponto anterior, o “**mimetismo molecular**” consiste num dos mecanismos que conduz à autoimunidade através de anticorpos que são autoreativos. Os anticorpos autoreativos, como o próprio nome indica, atacam o hospedeiro devido a uma homologia existente entre os vírus e os alvos dos anticorpos [94]. Por sua vez, esta homologia pode resultar na apoptose das células endoteliais devido a uma interação destes anticorpos com integrinas à superfície destas células [95]. De facto, as lesões das células endoteliais representam o primeiro episódio na patogénese da SSc, e por sua vez estas normalmente conduzem ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas, o que resulta na diminuição do fluxo sanguíneo, explicando os sintomas referentes ao fenómeno de Raynaud [96, 97]. O fenómeno de Raynaud e a microangiopatia apontam para que juntamente com as lesões das células endoteliais, ocorra uma elevada deposição de proteínas da matriz extracelular, principalmente o colagénio, quer a nível cutâneo ou visceral. Com o agravamento desta patologia ocorre assim o acometimento de vários órgãos, frequentemente rins, pulmões e coração, mas também o trato gastrointestinal [97, 98].

Por sua vez, o **microquimerismo** consiste num fenómeno no qual um indivíduo possui um baixo nível de células derivadas de um outro indivíduo. Estas células microquiméricas podem permanecer no organismo do hospedeiro por muito tempo e passarem a residir nos seus tecidos [71]. Dado que a SSc prevalece tal como a maioria das doenças autoimunes no sexo feminino, estudos têm sido feitos em mulheres. Um desses estudos demonstra que mulheres após gravidez possuem no seu sangue periférico células do feto, e que estas células podem permanecer nestas durante muitos anos [99, 100]. Tendo em conta que células maternas também podem passar para o feto, esta hipótese explicaria a existência da doença em mulheres após gravidez e em homens. Uma vez presentes num dado organismo células de um outro organismo, é possível que devido a factores ambientais, estas células sejam ativadas e manifestações de SSc passem a ser observadas [77, 78]. Está ainda descrito que as células $T\gamma\delta$ podem intervir contra as células microquiméricas residentes induzindo o seu ataque imunológico [101].

C.1.1.4. A fisiopatologia da Esclerose Sistémica

A SSc é caracterizada pelo menos por três processos patogénicos: **dano vascular**, **desregulação imune**, e excessiva deposição de colagénio e outras proteínas da matriz extracelular, na pele e numa série de órgãos internos, resultando na **fibrose** dos mesmos (figura 8) [66, 67].

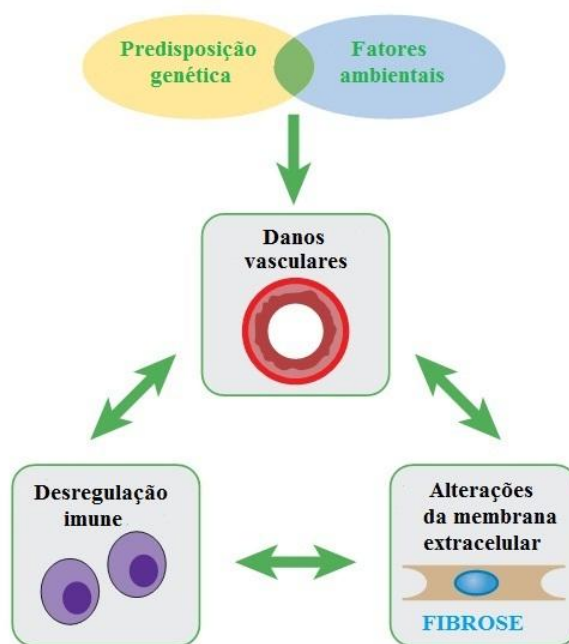


Figura 8 – Esquema geral da fisiopatologia da SSc. A fisiopatologia da SSc pode resultar de uma predisposição genética juntamente com factores ambientais desconhecidos, conduzindo a alterações na via vascular, imunológica e fibrótica. Imagem adaptada de [71].

C.1.1.4.1. Danos vasculares

Estudos suportam a hipótese de que alterações na vasculatura podem ser o primeiro alvo na SSc, procedendo a ocorrência de fibrose em meses ou anos [77]. Normalmente a primeira manifestação ocorre pelo fenómeno de Raynaud, prevendo-se a sua presença em cerca de 95% dos pacientes com SSc [73]. O aumento das lesões vasculares deve-se a um conjunto de factores (citocinas, toxinas, anticorpos direccionados a células endoteliais, entre outros) que conduzem à ativação da apoptose das células endoteliais, sendo que a não reposição destas células acarreta danos persistentes ao nível dos vasos [102]. Por sua vez, a disfunção das células endoteliais, conduz ao aumento da permeabilidade vascular devido ao aumento da expressão das moléculas VCAM-1 (do inglês, *Vascular cell adhesion protein 1*) e ELAM-1 (*Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1*) nestas células, permitindo a ocorrência da infiltração de células inflamatórias, resultando em danos ao nível do endotélio dos vasos [71, 103]. Entre estes danos, destaca-se uma **diminuição do lúmen dos vasos sanguíneos** e a **perda de elasticidade** dos mesmos, devido ao **espessamento da camada íntima e adventícia** que se tornam fibróticas, e que resulta da ativação das células endoteliais, ocorrendo um aumento dos factores de vasoconstrição em detrimento dos factores de vasodilatação [77, 102]. Por sua vez, o estreitamento dos vasos

reflete-se em episódios de isquemia tecidual, fibrose, culminando na disfunção dos órgãos [104].

Para além do que já foi referido, estudos reportam o comprometimento da angiogênese em doentes com SSc. Processo este de formação de novos vasos sanguíneos, essencial em doentes com SSc, por forma a garantir o fornecimento de oxigénio aos tecidos [105, 106].

C.1.1.4.2. Desregulação imune

Embora a ocorrência de danos vasculares e fibrose sejam as grandes marcas da SSc, a desregulação imune também constitui um factor que contribui para a fisiopatologia da doença [107]. De facto, a SSc constitui uma doença autoimune, na qual ocorre a ativação de linfócitos e por sua vez a produção de autoanticorpos, bem como a produção exacerbada de citocinas e quimiocinas. Relativamente à produção de autoanticorpos, verifica a presença de 75 a 90% de autoanticorpos antinucleares no sangue periférico de doentes com esta patologia [99]. Entre estes, encontram-se os **anti-topoisomerase I** (Scl-70), **anti-centrómero** e **anti-RNA polimerase III**, sendo que cada um identifica diferentes subtipos clínicos da doença [108]. Os autoanticorpos anti-centrómero são normalmente mais associados ao subtipo limitado da doença, ao passo que os autoanticorpos anti-topoisomerase I e anti-RNA polimerase III, normalmente estão associados ao subtipo difuso, com pior prognóstico da doença e grande probabilidade de os doentes desenvolverem fibrose pulmonar e crise renal [102].

Alguns estudos sugerem a presença de infiltrados de células T, maioritariamente células T CD4 (*T helper*) na pele e no sangue periférico de doentes com SSc [109, 110]. Há mesmo quem defenda que as células T representam o maior componente de células infiltradas na pele de doentes com SSc, incluindo os subtipos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ que acumulam-se precocemente na pele e nos tecidos intersticiais dos órgãos alvo, em doentes de SSc, mesmo antes de qualquer evidência de danos vasculares e fibrose tecidual [111-113].

Estudos sugerem que o infiltrado de células T na pele ou no sangue periférico, de doentes com SSc, exibem predominantemente um perfil típico das células Th2 [114]. Em concordância de uma polarização Th2 no sangue periférico de doentes com SSc, um estudo com *microarrays* demonstrou a elevada expressão de GATA-3, um factor importante de transcrição que conduz à polarização Th2 [114]. Entre as citocinas do tipo Th2, encontram-

se a interleucina-13 (IL-13) e a interleucina-4 (IL-4), que contribuem para a fibrose via ativação do TGF- β como também por mecanismos independentes deste [115, 116]. A IL-13 demonstra, em estudos *in vitro*, potenciar a proliferação dos fibroblastos, bem como a produção de colagénio [116]. Por sua vez, a IL-4 também potencia a proliferação dos fibroblastos, mas além do colagénio esta estimula a produção de outras proteínas da matriz extracelular. A IL-4 contribui também para o aumento na infiltração de células mononucleares através do aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais [117]. É importante referir que embora várias citocinas e quimiocinas estejam implicadas na indução da inflamação e fibrose, ainda não foi estabelecida nenhuma relação definitiva entre determinadas citocinas e órgãos envolvidos [71].

C.1.1.4.3. Fibrose dos tecidos

A fibrose consiste na principal e última etapa da SSc, e corresponde à característica que distingue esta doença de outras doenças autoimunes. Esta ocorre devido à deposição excessiva de componentes da matriz extracelular, principalmente o colagénio, mas também proteoglicanos, elastina e fibronectina. Está especialmente confinada ao nível da pele, pulmões, trato gastrointestinal e coração, aparecendo também em tendões e ligamentos, o que pode conduzir a uma significativa disfunção dos órgãos, que está intimamente ligada à elevada mortalidade na SSc [77].

Os fibroblastos constituem os principais elementos na produção e remodelação dos componentes da matriz extracelular. Na SSc, observa-se que após a ocorrência de ferimentos, os fibroblastos encontram-se altamente ativados e por isso produzem quantidades exacerbadas de colagénio [71, 77]. Contudo, os fibroblastos não constituem a única fonte de fibrose na SSc. Os miofibroblastos, que se diferenciam a partir dos fibroblastos, são também especializados a produzir componentes da matriz extracelular, nomeadamente colagénio em grandes quantidades. Estas células, por sua vez são a maior fonte de TGF- β que como já foi referido possui um papel na indução de fibrose [118]. No entanto, pensa-se que citocinas, quimiocinas (endotelina-1, por exemplo) e factores de crescimento (factor de crescimento derivado de plaquetas e factor de crescimento do tecido conjuntivo) possam ser responsáveis por manter continuamente os fibroblastos ativos, conduzindo constantemente à fibrose tecidual [119].

C.1.1.5. Relação entre a esclerose sistémica e as células T $\gamma\delta$

Alguns grupos de investigação relatam achados de células T ativas, expressando uma seletiva expansão dos genes da cadeia V δ do recetor das células T $\gamma\delta$, na pele e pulmões de doentes com SSc [113, 120]. Está também descrito que este subtipo de células T possui a capacidade de destruir células endoteliais, suportando assim o seu papel no desenvolvimento e manutenção da SSc [112].

Vários estudos evidenciaram um pequeno aumento no número de células T $\gamma\delta$ na pele de pacientes com SSc, quando comparado com a população controlo, sendo no entanto as diferenças observadas não estatisticamente significativas [111, 120]. Existem poucos e conflituosos dados acerca de um possível envolvimento das células T $\gamma\delta$ na SSc. Contudo parece ser unanime que estas células habitam preferencialmente os locais de inflamação, especialmente a pele. Com o agravamento da SSc tudo indica que estas se acumulam com maior frequência nos tecidos e em menor frequência no sangue periférico. Um estudo realizado por Ricciari *et al.* veio a comprovar que pacientes com SSc possuem uma menor frequência de células T $\gamma\delta$ no sangue periférico (2,2%) quando comparado com indivíduos controlo (3,5%). Isto pode sugerir que estas células possuem um papel na regulação dos mecanismos de controlo subjacentes a uma resposta imune normal, e portanto a sua diminuição deverá resultar no comprometimento destes mecanismos [121].

Existem evidências de que as células T $\gamma\delta$ são ativas e recrutadas via moléculas de adesão para os tecidos alvos em doentes com SSc e que a citotoxicidade endotelial mediada por estas células no sangue periférico de doentes com SSc é estatisticamente maior do que em controlos saudáveis [111, 112, 120]. De facto, as células T $\gamma\delta$ possuem uma morfologia linfóide granular, o que lhes confere atividade citotóxica através da via perforina/granzima [122].

A ideia de que as células T $\gamma\delta$ podem estar envolvidas na fisiopatologia da SSc, foi apoiada pelo facto destas células mostrarem induzir a proliferação de fibroblastos e síntese de colagénio, na pele de doentes com SSc, bem como apresentarem efeitos supressivos em células endoteliais [123].

Apesar das diferenças existentes entre células T $\gamma\delta$ de indivíduos com SSc e controlos saudáveis, não estarem muito bem definidas, sabe-se contudo que células V $\delta 2^-$ encontram-se ativas e aumentadas no sangue periférico de doentes com SSc, sugerindo um possível envolvimento na fisiopatologia da SSc [124, 125].

C.1.1.6. Expressão de citocinas em Esclerose Sistémica

As células $T\alpha\beta$ diferenciam-se em dois subconjuntos principais, Th1 e Th2, de acordo com o perfil de secreção de citocinas. O grupo Th1 é caracterizado pela produção das citocinas envolvidas na resposta imune celular (IL-1, IL-2, IL-12, $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$), ao passo que o grupo Th2 produz maioritariamente as citocinas da resposta imune humoral (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). As citocinas do tipo Th1 são conhecidas por serem citocinas pró-inflamatórias, enquanto citocinas Th2 são pró-fibróticas [126].

Alguns estudos demonstram haver um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, e que este desequilíbrio pode de algum modo contribuir para a patogénese de doenças autoimunes, facto este verificado no Lúpus Eritematoso Sistémico [127]. Prevê-se que existe um maior envolvimento da resposta Th2 do que da resposta Th1, e que este preferencial envolvimento Th2 é apoiado pelos baixos níveis de $IFN\gamma$ encontrados no soro de pacientes com SSc [128].

O marcador CD27 tem sido correlacionado com a separação funcional de subtipos de células $T\gamma\delta$. Como já foi referido, prevê-se que cerca de 10 a 30 % das células $T\gamma\delta$ não expressam o CD27 e portanto são $CD27^-$, enquanto uma percentagem entre 70 a 90% são $CD27^+$ [44]. Células $T\gamma\delta$ $CD27^+$ quando ativadas exibem características típicas Th1, nomeadamente a produção de $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$. Pelo contrário, células $T\gamma\delta$ $CD27^-$ exibem características Th2, tendo sido demonstrado a produção de IL-17 por este subtipo. A citocina IL-17 é conhecida por inibir a angiogénese, bem como promover a proliferação dos fibroblastos, o que leva a considerar que a produção desta citocina pelas células $T\gamma\delta$ $CD27^-$, poderá constituir um papel importante na patogénese da SSc, principalmente nos primeiros estadios da doença [129].

Existem assim vários estudos que suportam que a função de diversas citocinas produzidas pelas células $T\gamma\delta$ pode estar intimamente relacionadas com a patogénese da SSc. Contudo, dados claros ainda não são evidentes, e por isso novos estudos terão de ser feitos.

II. Objetivos

Embora já existam alguns estudos que evidenciam a existência de um papel ativo das células $T\gamma\delta$ na SSc, este ainda não é totalmente bem compreendido, e resultados dos diferentes estudos são controversos.

Este trabalho teve como principal objetivo, contribuir para um melhor conhecimento da fisiopatologia da SSc, particularmente através do estudo das células $T\gamma\delta$ do sangue periférico de doentes com SSc.

De forma a alcançar este objetivo fomos:

- (i) Quantificar a frequência e valor absoluto de células T e células $T\gamma\delta$ do sangue periférico de doentes com SSc e de uma população controlo;
- (ii) Quantificar a frequência de células $T\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, em doentes com SSc e numa população controlo;
- (iii) Quantificar a frequência de células $T\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais (*naïve*, memória central, memória efetora e efetor), em doentes com SSc e numa população controlo;
- (iv) Quantificar a frequência de células $T\gamma\delta$ a expressar o reportório $V\gamma9V\delta2$, nos diferentes compartimentos funcionais em doentes com SSc e numa população controlo;
- (v) Quantificar a frequência de células $T\gamma\delta$, a produzir as citocinas IL-2, $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$, bem como a expressão destas citocinas (dada pela média de intensidade de fluorescência) em doentes com SSc e numa população controlo.

Para uma melhor compreensão acerca do papel desempenhado pelas células $T\gamma\delta$ na SSc, fomos comparar os resultados obtidos, agrupando os doentes com SSc em limitada e difusa, com base na presença de fibrose pulmonar ou úlcera digitais e com base na duração da doença (menos de 1 ano; 1 a 10 anos e mais de 10 anos) desde que foi diagnosticada.

III. Material e Métodos

A. Caracterização da população em estudo

Neste trabalho, realizado entre Setembro de 2011 e Junho de 2012, foram estudados dois grupos distintos de indivíduos: um grupo dos doentes com SSc e um grupo controlo.

O grupo dos doentes afetados pela patologia foi seguido no serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e as amostras do sangue periférico destes doentes, foram recolhidas neste mesmo local. O diagnóstico da doença nos doentes foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* [130] e a subdivisão dos mesmos, com SScI ou SScd foi efetuada segundo Le Roy *et al.* [131]. Este estudo envolveu 43 pacientes com SSc, dos quais 30 estavam na fase limitada da doença (6 do sexo masculino, com uma média de idades igual a $51,8 \pm 11,9$ anos e 24 do sexo feminino, com uma média de idades igual a $57,9 \pm 13,2$ anos) e 13 estavam na fase difusa da doença (3 do sexo masculino, com uma média de idades igual a $60,3 \pm 11,0$ anos, e 10 do sexo feminino, com uma média de idades igual a $54,5 \pm 9,2$). Para cada doente, diversos dados clínicos (tabela 1) foram recolhidos pelo médico reumatologista responsável.

Relativamente ao parâmetro da duração da doença após o diagnóstico, é importante ainda referir que os doentes com SSc foram agrupados em 3 grupos, de acordo com Corriveau, *et al.* [132]: 6 doentes inseriram-se no grupo daqueles que apresentam menos de um ano de duração da doença (inclusive), (*Early-Stage*) - **Grupo 1**; 21 doentes, entre 1 e 10 anos de duração da doença (inclusive), (*Mid-Stage*) - **Grupo 2**; 16 doentes, com mais de 10 anos de duração da doença (*Late-Stage*) - **Grupo 3**.

Em relação ao grupo controlo, as amostras de sangue periférico destes indivíduos, foram recolhidas no Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra | Instituto Português do Sangue e da Transplantação, sendo constituído por 20 indivíduos (4 do sexo masculino, com uma média de idades igual a $55,8 \pm 9,1$ anos, e 16 do sexo feminino, com uma média de idades igual a $51,1 \pm 10,1$ anos) que não apresentavam processo inflamatório, nem história familiar e pessoal de doenças autoimunes, e que se voluntariaram para a dádiva de sangue para este estudo.

O estudo foi aprovado pela comissão de ética local e que todos os intervenientes foram devidamente informados e assinaram o consentimento informado.

Tabela 1 - Dados clínicos dos doentes com SSc.

Dados clínicos	SScl (n=30)	SScd (n=13)
Duração da doença após o diagnóstico (anos)	9,8±8,1	8,5±9,0
Anticorpos		
Anticorpos antinucleares isolados	30,0% (n=9)	0,0%
Anticorpo Scl-70	0,0%	100,0%
Anticorpo anti-centrómero	70,0% (n=21)	0,0%
Espessamento da pele (Score de Rodnan modificado)	10,0±6,4	18,8±10,1
Úlceras ou história	33,3% (n=10)	53,8% (n=7)
Hipertensão pulmonar	6,7% (n=2)	15,4% (n=2)
Fibrose pulmonar	26,7% (n=8)	69,2% (n=8)
Capacidade de difusão pulmonar de monóxido de carbono (DLCO)	96,0±19,5	79,5±19,9
Proteínuria	0,0%	7,7% (n=1)
Crise renal	0,0%	7,7% (n=1)
Tratamento		
Vasodilatadores	100%	100%
IECA	26,7%	30,8%
Corticoides	43,3%	46,2%
Imunossupressores (Metotrexato e/ou azatioprina e/ou micofenolato mofetil)	16,7%	0,0%

B. Colheita de amostras e Imunofenotipagem das células do sangue periférico

No momento da avaliação clínica, foram colhidas amostras de sangue periférico de todos os indivíduos correspondentes ao grupo dos pacientes com SSc e ao grupo controlo, para tubos com ácido etilenodiaminotetracético (K3-EDTA) e tubos com heparina-lítio.

Através da utilização do sangue periférico em K3-EDTA, procedeu-se a: caracterização da frequência de células $T\gamma\delta$; avaliação da atividade citotóxica (granzima B e perforina) nas células $T\gamma\delta$, e nas suas subpopulações $T\gamma\delta CD27^+$ e $T\gamma\delta CD27^-$; caracterização da frequência dos compartimentos das células $T\gamma\delta$ e expressão das cadeias variáveis $\gamma 9$ e $\delta 2$ do TCR (reportório $V\gamma 9V\delta 2$) em cada compartimento (*naïve*, memória central, memória efetora e efectoras). Adicionalmente, o sangue periférico recolhido em heparina, foi utilizado para a caracterização funcional das células $T\gamma\delta$, avaliando a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2.

B.1. Caracterização da frequência de células T e células $T\gamma\delta$

Num tubo de poliestireno, pipetou-se 100 μ L de sangue periférico, e procedeu-se seguidamente à marcação fenotípica de superfície através do uso de anticorpos monoclonais, combinados com os diferentes fluorocromos, e que se encontram representados na [tabela 2](#).

Tabela 2- Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterizar a frequência de células $T\gamma\delta$ e suas subpopulações. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	Localização
Anti-CD3	Azul do pacífico	UCHT1	BD <i>Pharmingen</i>	EUA
Anti- γ/δ TCR	Fluoresceína Isotiocianato	IMMU510	<i>Beckman Coulter</i>	França

Seguidamente homogeneizou-se e o tubo foi colocado a incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos no escuro (protegido da luz), de forma a criar condições

ótimas de ligação dos anticorpos à superfície das células, e evitar potenciais perdas de fluorescências pelos fluorocromos conjugados a estes. Decorrido este tempo, adicionou-se 2 mL de solução lisante, FACS Lysing (BDBiosciences, São José, EUA), com uma diluição de 1:10 em água destilada. Após agitar no vórtex, incubou-se a solução novamente durante 10 minutos e sob as mesmas condições, com a finalidade de se efetuar a lise dos eritrócitos e ocorrer a fixação das membranas dos leucócitos. Adicionalmente os anticorpos monoclonais que não se ligaram à superfície das células foram eliminados pela realização de uma centrifugação (1500rpm, 5 min) na centrífuga Kubota-Corporation (modelo 5910, Tóquio, Japão), seguindo-se a rejeição do sobrenadante e posterior lavagem através da adição de solução tampão salina de fosfacto (PBS, pH7,4, *Gibco BRL-Life Technologies, Vienna, Austria*), numa diluição de 1:10 em água destilada, centrifugação e aspiração do sobrenadante (repetiu-se duas vezes a lavagem com PBS). Por fim, ressuspendeu-se as células em 250 µL da mesma solução tampão.

B.2. Caracterização da frequência das células Tγδ e repertório Vγ9Vδ2 nos diferentes compartimentos funcionais (*naïve*, memória e efetor)

Pipetou-se 250 µL de sangue periférico para um tubo de poliestireno e procedeu-se à marcação com anti-TCRVδ2 ([tabela 3](#)). Seguidamente, e após agitar no vórtex, a solução foi incubada por 20 minutos, protegida da luz e à temperatura ambiente, por forma a garantir as condições ótimas de ligação do anticorpo à superfície das células e evitando a perda de fluorescência pelo fluorocromo conjugado ao anticorpo em questão. Decorrido este tempo lavou-se com PBS e pipetou-se anti-TCRVγ9 ([tabela 3](#)), sendo que após agitação das células no vórtex, a solução incubou novamente 20 minutos. Posteriormente realizou-se uma nova lavagem das células através da adição de 2 mL de PBS, centrifugação (1500rpm, 5 min) e aspiração do sobrenadante. Seguidamente foram adicionados os restantes anticorpos monoclonais representados na [tabela 3](#), agitou-se no vórtex e incubou-se por 10 minutos. Realizou-se duas lavagens das células, pela adição de 2 mL de PBS, centrifugação (1500rpm, 5 min) e aspiração do sobrenadante. Por fim as células foram ressuspendidas em 250µL de PBS.

Tabela 3 -Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados na caracterização da frequência dos compartimentos funcionais das células $T\gamma\delta$ e repertório $V\gamma9V\delta2$. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	Localização
anti-TCRVδ2	Fluoresceína Isotiocianato	B6	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-TCRVγ9	Ficoeritrina	B3	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-CD3	Azul do pacífico	UCHT1	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-CD8	Laranja do pacífico	RPA-T8	<i>BD Biosciences</i>	EUA
anti-CD27	Ficoeritrina Cianina 5	1A4CD27	<i>Beckman Coulter</i>	EUA
anti-CD45RA	Alofocianina	HI100	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-CD4	Alofocianina H7	SK3	<i>BD Biosciences</i>	EUA

B.3. Caracterização da frequência de células $T\gamma\delta$, e suas subpopulações ($T\gamma\delta CD27^+$ e $T\gamma\delta CD27^-$), a expressar granzima B e perforina

Pipetou-se para um tubo de poliestireno 250 μ L de sangue periférico e adicionalmente foram adicionados os marcadores de superfície que se encontram representados na [tabela 4](#), à exceção de anti-granzima B e de anti-perforina.

Após homogeneização no vórtex, a incubou-se durante 15 minutos, protegido da luz e à temperatura ambiente, por forma a garantir as condições ótimas de ligação dos anticorpos à superfície das células e evitando a perda de fluorescência pelos fluorocromos conjugados a estes. Seguidamente adicionou-se 2 mL de solução tampão salina de fosfacto (PBS, pH7,4, *Gibco BRL-Life Technologies, Vienna, Austria*) numa diluição de 1:10 em água destilada, para lavagem e centrifugou-se (1500rpm, 5 min) na centrífuga Kubota-Corporation (modelo 5910, Tóquio, Japão). Após se descartar o sobrenadante, as células foram fixadas e permeabilizadas com 200 μ L de solução 1 (Kit Intraprep, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e incubou-se novamente por 15 minutos. Findo este tempo, fez-

se uma lavagem através da adição de 2 mL de PBS, centrifugação (1500rpm, 5 min) e aspiração do sobrenadante. Continuamente procedeu-se à adição de 200µL de solução 2 (Kit Intraprep, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), agitou-se intensamente no vórtex e após incubação durante 2 minutos, adicionou-se os restantes anticorpos monoclonais da [tabela 4](#), anti-granzima B e anti-perforina.

Após agitação no vórtex, incubou-se durante 20 minutos e findo este tempo adicionou-se 2 mL de PBS, centrifugou-se (1500rpm, 5 min) e aspirou-se o sobrenadante (repetiu-se a lavagem por mais duas vezes). Por fim ressuspendeu-se a amostra em 250 µL de PBS.

Tabela 4 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados para avaliar a atividade citotóxica das células T γ δ e suas subpopulações. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	Localização
anti-CD3	Azul do pacífico	UCHT1	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-CD8	Laranja do pacífico	RPA-T8	<i>BD Biosciences</i>	EUA
anti-CD27	Ficoeritrina Cianina 5	1A4CD27	<i>Beckman Coulter</i>	EUA
anti-CD56	Ficoeritrina Cianina 7	N901(NKH-1)	<i>Beckman Coulter</i>	França
anti-γ/δTCR	Alofocianina	B1	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-CD4	Alofocianina H7	SK3	<i>BD Biosciences</i>	EUA
Anti-Granzima B	Ficoeritrina	CLB-GB11	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
Anti-Perforina	Fluoresceína Isotiocianato	δ G9	<i>Beckman Coulter</i>	França

B.4. Caracterização das células T $\gamma\delta$, produtoras de citocinas

B.4.1. Estimulação *in vitro* de linfócitos T

Para a quantificação das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , produzidas pelas células T $\gamma\delta$, as células foram estimuladas *in vitro*, adicionando 500 μ L de RPMI-1640 (Gibco; Painactive SLEy, Escócia, Reino Unido) suplementado com 2 mM L-glutamina, a 500 μ L do sangue periférico. Seguidamente adicionou-se a este meio 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), 50 ng/mL de acetato de forbol de miristato (PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e 1 μ g/mL de Ionomicina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Incubou-se em ambiente húmido e estéril durante 4 horas, a uma temperatura de 37°C e a uma concentração de 5% de CO₂.

B.4.2. Marcação intracitoplasmática das citocinas em estudo

Após as 4 horas de incubação, seguiu-se a marcação intracitoplasmática das citocinas a estudar nas células T $\gamma\delta$. Para tal, pipetou-se para 3 tubos de poliestireno 250 μ L do sangue periférico estimulado em B.4.1., tendo-se adicionado de seguida os anticorpos anti-CD3 e anti-CD8 conjugados com os respetivos fluorocromos, listados na [tabela 5](#).

Seguidamente, e após homogeneização dos tubos no vórtex, estes foram colocados a incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após os 10 minutos de incubação, adicionou-se, a cada tubo, 200 μ L da solução 1 do Kit de fixação e permeabilização Intraprep ((Kit Intraprep, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), de forma a fixar os leucócitos. Depois disto, homogeneizou-se no vórtex e os tubos foram novamente a incubar por mais 10 minutos sob as condições previamente ditas.

Posteriormente seguiu-se a lavagem da amostra em ambos os tubos, pela adição de 2 mL de tampão fosfacto-salino (PBS, phosphate buffered saline) (Dulbecco 1x, Biochrom Ag, Berlim, Alemanha), seguido de uma centrifugação (1500rpm, 5 min) na centrífuga Kubota-Corporation (modelo 5910, Tóquio, Japão). Rejeitou-se o sobrenadante, por forma a eliminar os anticorpos monoclonais que não marcaram. A cada tubo foi adicionado 200 μ L da solução 2 do Kit de fixação e permeabilização Intraprep (Fix & Perm[®] - Cell Permeabilization Kit; Invitrogen[™]; Austria) de forma a se permeabilizar as membranas dos leucócitos e a efetuar a lise dos eritrócitos, tendo-se depois homogeneizado no vórtex.

Seguidamente adicionou-se os restantes anticorpos monoclonais representados na [tabela 5](#), sendo o meio homogeneizado depois no vórtex, e incubado durante 10 minutos sob as mesmas condições previamente ditas. Cessado este tempo lavou-se duas vezes as células com PBS, centrifugou-se (1500rpm, 5 min) e aspirou-se o sobrenadante. Por fim as células foram ressuspendidas em 250µL de PBS.

Tabela 5- Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados na caracterização funcional das células Tγδ. As quantidades de anticorpos monoclonais adicionadas correspondem às recomendadas pelos fabricantes.

Anticorpo Monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	Localização
Anti-CD3	Azul do pacífico	UCHT1	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
anti-CD8	Laranja do pacífico	RPA-T8	<i>BD Biosciences</i>	EUA
Anti-IFN-γ	Isotiocianato de fluoresceína	4S.B3	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
Anti-IL-2	Isotiocianato de fluoresceína	4S.B3	<i>BD Pharmingen</i>	EUA
Anti-TNF-α	Isotiocianato de fluoresceína	MAb11	<i>BD Pharmingen</i>	EUA

C. Aquisição das amostras no citômetro de fluxo e análise dos resultados

A aquisição da amostra, por forma a avaliar a expressão dos marcadores celulares, foi realizada no citômetro de fluxo FACSCantoII (BDB, São José, EUA), que utiliza três lasers (laser díodo, laser de estado sólido e laser de Hélio-Néon) e possibilita a análise até 8 cores (8 fluorescências) simultaneamente. A aquisição das amostras foi realizada com a aplicação informática FACSDiva (BDB, San José, EUA), com aquisição mínima de 200.000 células por amostra, dado que a população de células Tγδ é pouco representada no sangue periférico.

A análise dos resultados foi efetuada através do *software Inficinity* (Cytognos, Espanha) e os valores absolutos, representados em célula por µL de sangue (Cel/µL),

foram calculados através de um analisador hematológico (Coulter ACTdiff2, Beckman Coulter). Para as diversas análises foram utilizadas diferentes estratégias.

C.1. Quantificação das células $T\gamma\delta$ e suas subpopulações

Para a quantificação das células $T\gamma\delta$, estas foram selecionadas tendo em consideração os seguintes pontos: expressam CD3 nas suas membranas; apresentam um TCR formado por uma cadeia γ e uma cadeia δ ; as células $T\gamma\delta$ têm uma alta expressão de CD3. A [figura 9](#) demonstra como foi realizada a identificação destas células.

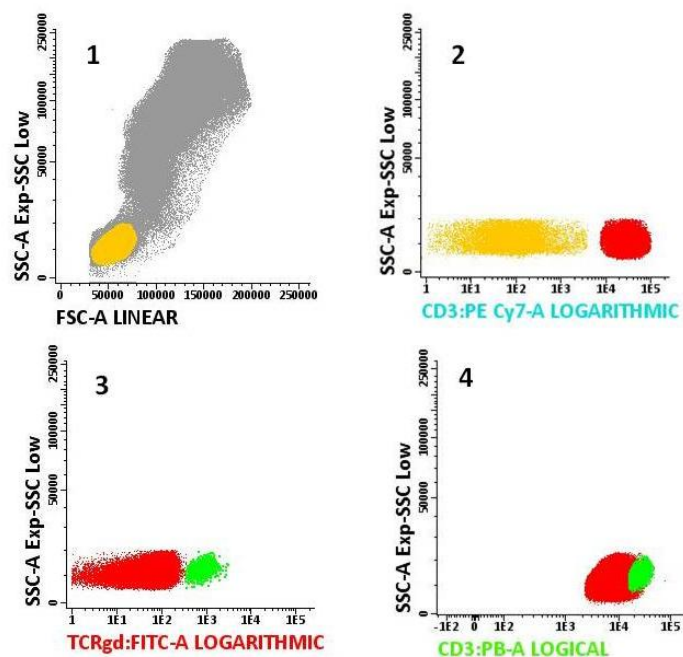


Figura 9 – Representação gráfica da estratégia utilizada, para identificação das células $T\gamma\delta$. (1) Identificação dos linfócitos – amarelo; (2) Identificação dos linfócitos CD3 – vermelho; (3 e 4) Identificação dos linfócitos $T\gamma\delta$ – verde.

C.2. Quantificação dos diferentes compartimentos funcionais das células $T\gamma\delta$ e respetivos reportórios $V\gamma9V\delta2$

Para a quantificação da frequência dos compartimentos de memória, inicialmente foram tidos em consideração os pontos abordados em C.1. Seguidamente, através da expressão de CD27 e CD45RA foram identificados e quantificados os diferentes compartimentos das células $T\gamma\delta$: *naïve* ($CD27^+/CD45RA^+$); memória central

(CD27⁺/CD45RA⁻); memória efetora (CD27⁻/CD45RA⁻); efetor (CD27⁺/CD45RA⁺). Para cada um destes compartimentos, sucedeu-se à quantificação das células que expressam V γ 9 e V δ 2, originando 4 fenótipos diferentes: V γ 9⁺V δ 2⁻; V γ 9⁻V δ 2⁺; V γ 9⁺V δ 2⁺; V γ 9⁻V δ 2⁻.

A [figura 10](#) ilustra como foram obtidos estes parâmetros.

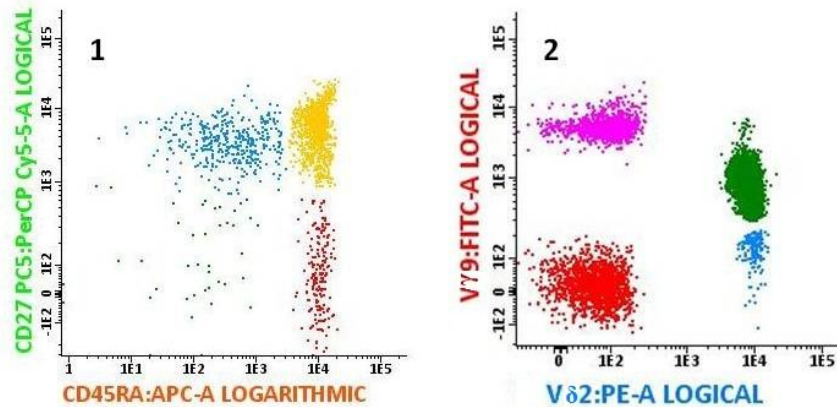


Figura 10 - Representação gráfica da estratégia utilizada, para avaliação dos compartimentos de memória das células T $\gamma\delta$ e respetivos repertórios. (1) células *naïve* – amarelo, memória central – azul, memória efetora – verde, células efetoras – vermelho; (2) V γ 9⁺V δ 2⁻ - verde, V γ 9⁻V δ 2⁺ - azul, V γ 9⁺V δ 2⁺ - vermelho, V γ 9⁻V δ 2⁻ - roxo.

C.3. Quantificação das moléculas relacionadas com a citotoxicidade celular, granzima B e perforina das células T $\gamma\delta$

Para a quantificação da produção destes grânulos citotóxicos produzidos pelas células T $\gamma\delta$, inicialmente foram tidos em consideração os pontos abordados em C.1, bem como também o facto da maioria das células T $\gamma\delta$ serem duplamente negativas para os marcadores CD8 e CD4. Seguidamente foi avaliada a expressão de granzima B e perforina para a população de células T $\gamma\delta$ e subpopulações T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻, através da percentagem de células positivas para cada marcador. A [figura 11](#) exemplifica como foram obtidos estes parâmetros.

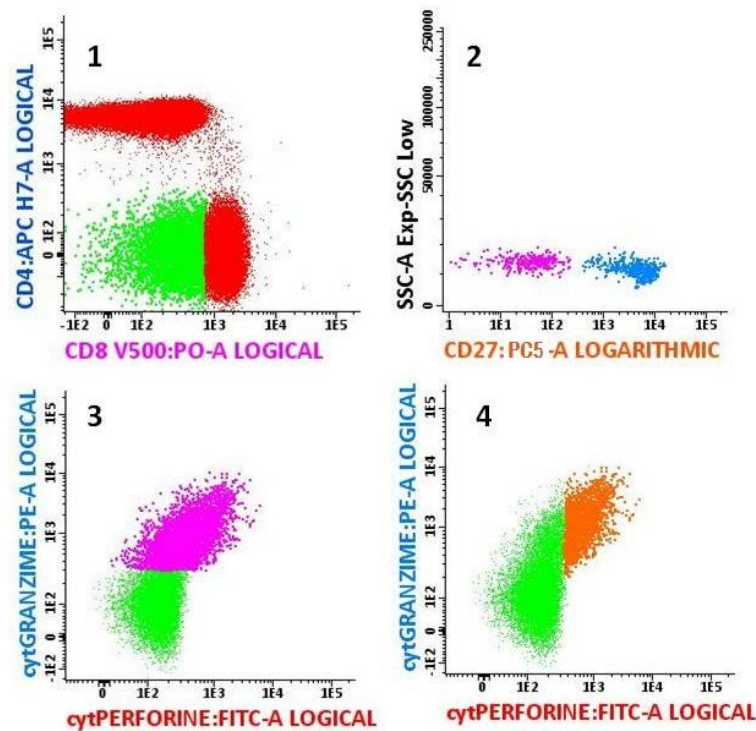


Figura 11- Representação gráfica da estratégia utilizada, para avaliação da citotoxicidade das células T $\gamma\delta$. (1) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ (CD4⁻CD8⁺) – verde; (2) Identificação das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ (T $\gamma\delta$ CD27⁻ e T $\gamma\delta$ CD27⁺) – roxo e azul, respetivamente; (3) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ que marcam granzima B – roxo; (4) Identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ que marcam perforina – laranja.

C.4. Quantificação da produção de citocinas pelas células T $\gamma\delta$

As células T $\gamma\delta$ foram avaliadas do ponto de vista funcional, relativamente à capacidade destas células expressarem as citocinas IL-2, IFN γ e TNF α , após terem sido estimuladas *in vitro*. Para a quantificação da produção destas citocinas, inicialmente foram tidos em consideração os pontos abordados em C.1, para primariamente identificar as células T $\gamma\delta$. Seguidamente foi avaliada a expressão das diferentes citocinas, através das respetivas frequências e intensidades médias de fluorescência (MIF). A [figura 12](#) ilustra como foi realizada a identificação das células T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas em estudo.

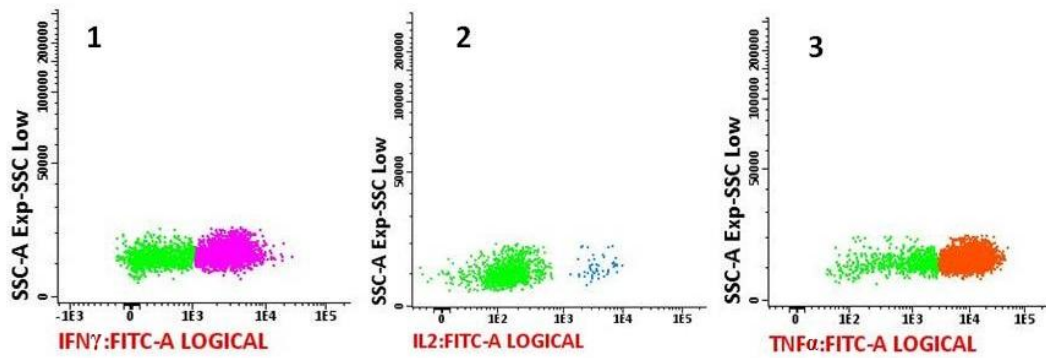


Figura 12 - Representação gráfica da estratégia utilizada, para a identificação da produção das citocinas em estudo. (1) IFN γ – roxo; (2) IL-2 – azul; (3) TNF α – laranja.

D. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *Statistical Package for Social Sciences 17.0* (SPSS Inc., Chicago, EUA), utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney U. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão e mediana e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o *p-value* foi inferior a 0,05.

IV. Resultados

A. Quantificação de células T e T $\gamma\delta$ no sangue periférico

A.1. Frequência e valor absoluto das células T e T $\gamma\delta$ do sangue periférico de doentes com Esclerose Sistêmica, de acordo com o subtipo da doença, presença ou ausência de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais.

Pela análise da [tabela 6](#), verificou-se que a frequência (%) e valor absoluto (cel/ μ L) de células T e células T $\gamma\delta$, encontravam-se diminuídos em doentes com SSc, independentemente do subtipo de doença. Os valores de células T $\gamma\delta$ parecem aproximar-se mais dos valores normais na presença de fibrose pulmonar e de episódios de úlceras digitais. Ocorre uma diminuição significativa da frequência de células T e T $\gamma\delta$ no grupo com mais de 10 anos de duração da doença.

Tabela 6 – Frequência (%) e valor absoluto (cel/μL) de células T e células Tγδ, do sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da frequência de células T na celularidade total e de células Tγδ no total de células T. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo de SSc, presença ou ausência de fibrose pulmonar ou episódios de úlceras digitais, e duração da doença, em anos (Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive. Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc).

		Controlo (n=20)	Subtipo de SSc		Fibrose Pulmonar		Úlceras digitais		Duração da SSc (anos)		
			Difusa (n=13)	Limitada (n=30)	Presença (n=16)	Ausência (n=27)	Presença (n=17)	Ausência (n=26)	Grupo 1 (n=6) ≤1	Grupo 2 (n=21) >1-≤10	Grupo 3 (n=16) >10
Célula T	%	16,00±5,940	11,20±3,840 ^a	13,60±7,190	12,30±5,540	13,20±6,940	11,60±3,400 ^b	13,60±7,550	13,10±6,850	12,10±6,040	13,90±6,980 ^d
	cel/μL	1151±414,9	1015±343,4	1080±672,3	1041±457,1	1072±661,8	985,3±311,1	1103±697,7	1317±560,7	942,4±535,5	1126±656,4
Célula Tγδ	%	5,170±6,290	3,220±3,440	3,550±3,470	3,790±4,280	3,220±2,800	4,530±4,410	2,810±2,580 ^c	3,120±2,380	4,000±3,980	2,750±2,870 ^d
	cel/μL	61,71±80,41	30,54±32,70	24,95±35,34	34,08±39,55	32,21±31,13	39,42±39,87	30,17±30,76	34,47±26,43	38,26±42,45	26,08±21,36

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05:

^a SSc difusa *versus* Controlo; ^b Presença de úlceras digitais *versus* Controlo; ^c Ausência de úlceras digitais *versus* Controlo; ^d >10 anos *versus* Controlo.

B. Quantificação das células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais (*naïve*, memória e efector) do sangue periférico

B.1. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com o subtipo de Esclerose Sistêmica

Pela análise da [figura 13](#), constatou-se que doentes com SSc (ambos os subtipos, difusa e limitada) apresentam maior frequência de células T $\gamma\delta$ *naïve* e efectoras, à custa da diminuição de células memória central e memória efectora, quando comparado com a população controle. Esta diminuição dos compartimentos de memória é mais evidente na SScl.

B.2. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com a presença ou ausência de fibrose pulmonar em doentes com Esclerose Sistêmica

A análise da [figura 14](#) permitiu constatar que pacientes com fibrose pulmonar apresentam uma frequência aumentada de células T $\gamma\delta$ *naïve* e memória efectora associada a uma diminuição de células memória central, quando comparado com doentes sem fibrose pulmonar.

B.3. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com a presença ou ausência de episódios de úlceras digitais, em doentes com Esclerose Sistêmica

Pela análise da [figura 15](#), verificou-se um aumento da frequência do compartimento memória efectora em detrimento do compartimento efector em doentes de SSc com episódios de úlceras digitais, quando comparado com doentes que não apresentam episódios de úlceras digitais.

Significâncias estatísticas são verificadas para a população *naïve* e memória efectora, em doentes que não apresentam episódios de úlceras digitais, em comparação com o grupo controle.

B.4. Frequência das células T $\gamma\delta$ nos compartimentos funcionais, de acordo com a duração da Esclerose Sistêmica

Analisando os diferentes compartimentos funcionais das células T $\gamma\delta$ de acordo com a duração da doença, [figura 16](#), foi possível constatar que doentes com a doença há mais de

10 anos apresentaram uma maior frequência de células efetoras à custa da diminuição de células memória central, comparando com doentes com a doença há menos de 1 ano.

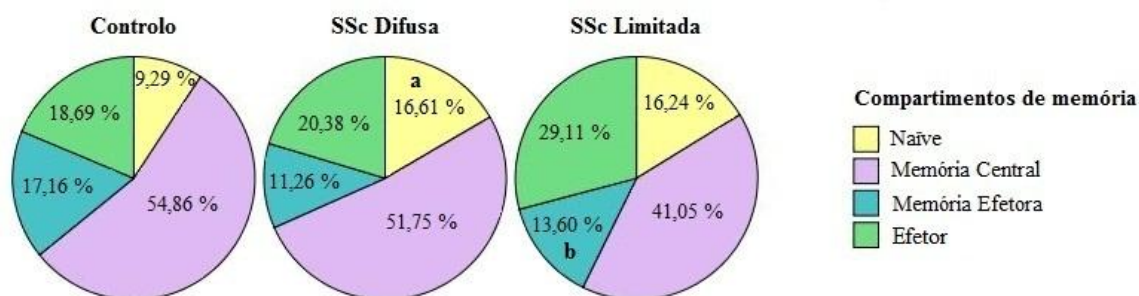


Figura 13 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células Tγδ, na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Difusa versus Controlo; ^b Limitada versus Controlo.

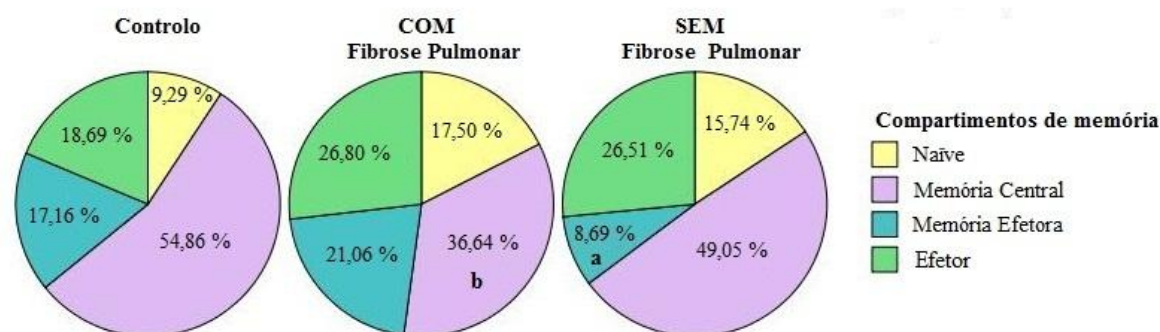


Figura 14 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células Tγδ, na população controlo e em doentes com SSc, na presença e ausência de Fibrose Pulmonar. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Ausência de Fibrose Pulmonar versus Controlo; ^b Presença de Fibrose Pulmonar versus Controlo.

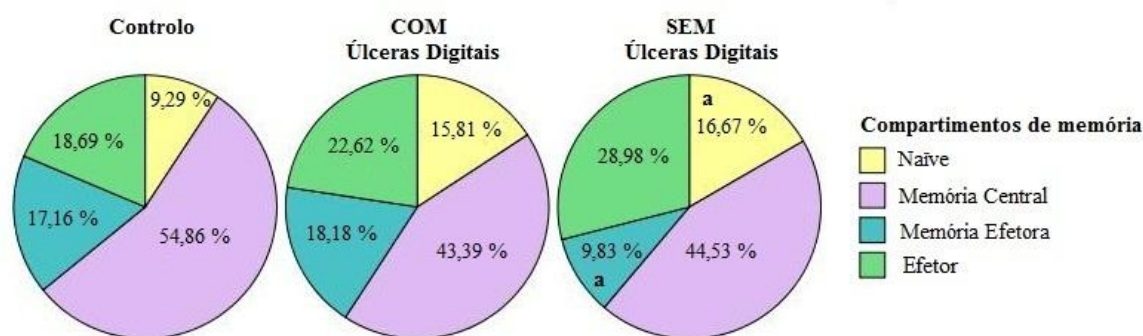


Figura 15 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células $T\gamma\delta$, na população controlo e em doentes com SSc, na presença e ausência de episódios de Úlceras Digitais. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o p value < 0,05: ^a Ausência de Úlceras Digitais versus Controlo.

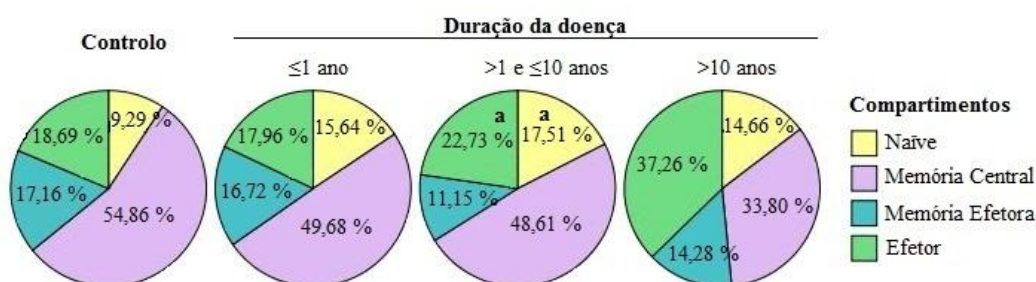


Figura 16 - Representação gráfica da frequência dos compartimentos funcionais das células $T\gamma\delta$, na população controlo e nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o p value < 0,05: ^a 1 ≤10 anos versus Controlo; ^b >10 anos versus Controlo.

C. Quantificação do reportório $V\gamma 9V\delta 2$ nos diferentes compartimentos funcionais das células $T\gamma\delta$, do sangue periférico

C.1. Frequência do reportório de células $T\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, de acordo com o subtipo de Esclerose Sistémica

A [tabela 7](#) representa a frequência do reportório das regiões variáveis da cadeias γ e da cadeia δ do TCR, sendo que são mais utilizadas as $V\gamma 9$ e $V\delta 2$, em cada compartimento funcional (*naïve*, memória e efetor) destas células, na população controlo e em doentes com SSc.

Pela análise dos resultados verificou-se que na população controlo, os compartimentos memória central e memória efetora são formados maioritariamente pelo reportório $V\gamma 9^+V\delta 2^+$, enquanto os compartimentos *naïve* e efetor são maioritariamente formados pelo reportório $V\gamma 9^-V\delta 2^-$. De uma maneira geral não parecem ocorrer alterações muito significativas na frequência dos diferentes reportórios em SSc, embora pareça haver um aumento da frequência de células $V\gamma 9^-V\delta 2^-$ no compartimento efetor e de $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ no compartimento de memória efetora em SScd.

C.2. Frequência do reportório de células $T\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos de memória, de acordo com a presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais

Através da análise da [tabela 8](#) verificou-se na presença de fibrose pulmonar ou de episódios de úlceras digitais, uma diminuição de células $V\gamma 9^-V\delta 2^-$ nos compartimentos memória efetora e efetor.

C.3. Frequência do reportório de células $T\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, de acordo com a duração da doença

Da análise da [tabela 9](#) observou-se em doentes cuja doença foi diagnosticada há mais de 10 anos um aumento do reportório $V\gamma 9^-V\delta 2^-$ em todos os compartimentos, quando comparado com doentes cuja doença foi diagnosticada há menos de 1 ano, e que exibem predominantemente um reportório $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ e $V\gamma 9^-V\delta 2^+$.

Tabela 7 - Frequência (%) do repertório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, no sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da frequência células T $\gamma\delta$ no total de células T. Os doentes foram subdivididos de acordo com o subtipo de SSc.

			Controlo (n=20)	Subtipo de SSc	
				Difusa (n=13)	Limitada (n=30)
Célula T $\gamma\delta$	Naïve	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	20,7 \pm 23,2	9,64 \pm 8,61 ^a	14,0 \pm 19,1
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,37 \pm 1,09	2,39 \pm 5,30	1,73 \pm 5,82
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	29,3 \pm 32,7	36,7 \pm 38,7	26,9 \pm 28,5
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	49,6 \pm 29,6	51,2 \pm 37,2	57,3 \pm 34,6
	Memória central	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	3,72 \pm 5,58	5,63 \pm 7,57	5,41 \pm 10,5
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,06 \pm 0,12	1,76 \pm 5,19	4,27 \pm 17,3 ^b
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	70,7 \pm 22,4	64,4 \pm 29,2	54,7 \pm 33,7
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	25,6 \pm 22,4	28,2 \pm 22,6	32,3 \pm 28,5
	Memória efetora	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	3,40 \pm 3,79	2,32 \pm 2,49	5,41 \pm 10,5
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,33 \pm 0,70	3,63 \pm 11,4	4,27 \pm 17,3
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	64,7 \pm 31,1	73,9 \pm 32,6	65,7 \pm 29,6
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	31,5 \pm 29,4	20,2 \pm 24,7	24,6 \pm 26,3
	Efetor	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	17,4 \pm 24,3	12,2 \pm 13,8	11,0 \pm 16,8
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,54 \pm 2,16	1,56 \pm 2,80 ^a	3,88 \pm 12,4
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	31,1 \pm 34,6	24,7 \pm 38,8	35,6 \pm 38,1
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	51,0 \pm 36,7	61,5 \pm 36,5	49,5 \pm 37,3

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05:

^a SSc difusa *versus* Controlo ; ^b SSc limitada *versus* Controlo.

Tabela 8 - Frequência (%) do reportório de células T $\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, no sangue periférico da população controle e nos doentes com SSc. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da frequência células T $\gamma\delta$ no total de células T. Os doentes foram subdivididos de acordo com a presença ou ausência de fibrose pulmonar, e ocorrência ou não de episódios de úlceras digitais.

		Controlo (n=20)	Fibrose Pulmonar		Úlceras Digitais		
			Presença (n=16)	Ausência (n=27)	Presença (n=17)	Ausência (n=26)	
Célula T $\gamma\delta$	Naïve	% V $\gamma^9^+V \delta^2^-$	20,7 \pm 23,2	10,2 \pm 14,9	14,3 \pm 18,1	9,54 \pm 14,8 ^d	14,9 \pm 18,2
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^+$	0,37 \pm 1,09	3,48 \pm 7,05	1,04 \pm 4,62	3,23 \pm 6,81	1,08 \pm 4,73
		% V $\gamma^9^+V \delta^2^+$	29,3 \pm 32,7	31,7 \pm 36,1	28,3 \pm 29,0	36,4 \pm 36,4	25,3 \pm 27,6
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^-$	49,6 \pm 29,6	54,6 \pm 36,4	56,3 \pm 34,8	50,9 \pm 36,2	58,7 \pm 34,5
	Memória central	% V $\gamma^9^+V \delta^2^-$	3,72 \pm 5,58	5,49 \pm 6,86 ^c	5,46 \pm 11,0	4,41 \pm 6,83	6,10 \pm 11,1
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^+$	0,06 \pm 0,12	8,58 \pm 24,4	0,93 \pm 4,48	7,80 \pm 23,5	1,04 \pm 4,57
		% V $\gamma^9^+V \delta^2^+$	70,7 \pm 22,4	50,4 \pm 37,5	61,1 \pm 29,5	60,4 \pm 36,6	55,6 \pm 30,3
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^-$	25,6 \pm 22,4	36,2 \pm 31,3	28,5 \pm 24,2	28,0 \pm 28,5	32,9 \pm 26,0
	Memória efetora	% V $\gamma^9^+V \delta^2^-$	3,40 \pm 3,79	4,32 \pm 6,84	4,64 \pm 10,1	3,22 \pm 6,57	5,30 \pm 10,3
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^+$	0,33 \pm 0,70	10,1 \pm 25,6 ^b	0,93 \pm 4,48 ^a	9,29 \pm 24,7	1,01 \pm 4,58
		% V $\gamma^9^+V \delta^2^+$	64,7 \pm 31,1	66,4 \pm 39,7	68,9 \pm 25,0	72,1 \pm 39,2	65,7 \pm 24,2
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^-$	31,5 \pm 29,4	19,2 \pm 23,8	25,5 \pm 26,6	15,4 \pm 22,7	28,0 \pm 26,4
	Efetoras	% V $\gamma^9^+V \delta^2^-$	17,4 \pm 24,3	15,9 \pm 20,4	8,98 \pm 12,8	13,2 \pm 18,5	10,2 \pm 14,4
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^+$	0,54 \pm 2,16	7,17 \pm 17,3 ^b	1,16 \pm 3,21	6,60 \pm 16,6 ^d	1,22 \pm 3,27
		% V $\gamma^9^+V \delta^2^+$	31,1 \pm 34,6	37,2 \pm 44,8	30,0 \pm 34,9	42,9 \pm 42,3	26,3 \pm 34,9
		% V $\gamma^9^-V \delta^2^-$	51,0 \pm 36,7	39,7 \pm 36,4	59,8 \pm 36,2	37,2 \pm 35,1	62,2 \pm 35,6

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05:

^a Ausência de fibrose pulmonar *versus* Controlo; ^b Presença de fibrose pulmonar *versus* Controlo; ^c Ausência de fibrose pulmonar *versus* Presença de fibrose pulmonar; ^d Presença de úlceras digitais *versus* Controlo.

Tabela 9- Frequência (%) do reportório de células $T\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais, no sangue periférico da população controlo e nos doentes com SSc. Os doentes foram subdivididos de acordo com a duração da doença, em anos: Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive. Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc.

			Controlo (n=20)	Duração da SSc (anos)		
				Grupo 1 (n=6) ≤1	Grupo 2 (n=21) >1-≤10	Grupo 3 (n=16) >10
Célula $T\gamma\delta$	Naïve	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	20,7±23,2	16,4±22,2	13,4±19,2	10,4±10,6
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,37±1,09	4,08±9,12 ^d	2,41±6,15	0,08±0,19
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	29,3±32,7	49,9±42,4	26,1±28,4	25,8±29,6
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	49,6±29,6	29,7±30,7 ^d	58,1±34,5	63,7±34,4
	Memória central	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	3,72±5,58	3,36±4,69	4,87±8,93	7,48±12,5
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,06±0,12	17,0±37,8 ^a	2,08±6,02	0,02±0,02
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	70,7±22,4	72,8±41,3	60,6±29,0	45,1±32,5 ^c
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	25,6±22,4	8,46±7,54 ^a	31,3±26,9	41,1±27,0
	Memória efetora	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	3,40±3,79	3,44±4,71	3,67±7,64	6,51±12,5
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,33±0,70	17,0±37,9 ^{a,d}	3,07±9,37	0,02±0,01
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	64,7±31,1	64,9±46,5	64,6±28,9	75,4±25,7
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	31,5±29,4	14,8±30,1	28,6±26,9	18,1±20,8
	Efetoras	% V $\gamma^9^+V\delta^2^-$	17,4±24,3	8,82±9,16	10,9±13,0	13,3±22,5
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^+$	0,54±2,16	12,2±27,0 ^a	1,76±3,80 ^b	1,66±3,78 ^c
		% V $\gamma^9^+V\delta^2^+$	31,1±34,6	49,4±48,1	29,9±36,2	29,2±38,4
		% V $\gamma^9^-V\delta^2^-$	51,0±36,7	29,6±38,4	57,4±33,5	55,8±41,4

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05:

^a ≤1 anos *versus* Controlo; ^b >1-≤10 anos *versus* Controlo; ^c >10 anos *versus* Controlo; ^d ≤1 ano *versus* >10

D. Quantificação da expressão de granzima B e perforina das células T $\gamma\delta$, do sangue periférico

D.1. Frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, em Esclerose Sistémica Difusa e Limitada.

Pela análise da [figura 17](#) verificou-se que a frequência de células (T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻) a produzir granzima B e perforina, é em geral superior em doentes com SSc, maioritariamente no subtipo limitado da doença, quando comparado com a população controlo. Obteve-se significância estatística para todos os tipos de células a produzir granzima B.

Como seria expectável, são as células T $\gamma\delta$ CD27⁻, que compreendem as células com fenótipo de memória efetora e efetor, que tem um perfil mais citotóxico, traduzido pelo aumento da frequência de células a expressar quer perforina quer granzima B.

D.2. Frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, na presença e ausência de fibrose pulmonar em doentes com Esclerose Sistémica

Do mesmo modo, como observado para os subtipos de SSc, verifica-se pela [figura 18](#), que a frequência de células (T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻) a produzir granzima B e perforina é superior em doentes com SSc, quer estes apresentem ou não fibrose pulmonar, quando comparado com a população controlo. No entanto, a frequência de células T $\gamma\delta$, a expressar perforina é superior em doentes com fibrose pulmonar.

D.3. Frequência de células T $\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, na presença e ausência de episódios de úlceras digitais em doentes com Esclerose Sistémica

Pela divisão dos doentes SSc que apresentam ou não episódios de úlceras digitais, observa-se pela [figura 19](#) que tal como no caso de fibrose pulmonar, a frequência de células (T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ CD27⁺ e T $\gamma\delta$ CD27⁻) a produzir granzima B e perforina é mais elevada em doentes com SSc, quando comparado com a população controlo. No entanto, a frequência de células T $\gamma\delta$, a expressar perforina, há semelhança do observado na presença de fibrose pulmonar, é superior em doentes com úlceras digitais, principalmente na subpopulação CD27⁻.

D.4. Frequência de células $T\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, de acordo com a duração da Esclerose Sistémica

Pela análise da frequência de células ($T\gamma\delta$, $T\gamma\delta$ CD27⁺ e $T\gamma\delta$ CD27⁻) a produzir os grânulos citotóxicos em estudo, em função da duração da doença, verificou-se pela [figura 20](#) que, de modo geral, os valores tendem a aumentar progressivamente ao longo dos três grupos (≤ 1 ano, < 1 ano e ≤ 10 anos, ≥ 10 anos). Em geral, verifica-se a existência de significado estatístico para doentes de SSc, cuja doença foi diagnosticada há mais de 10 anos.

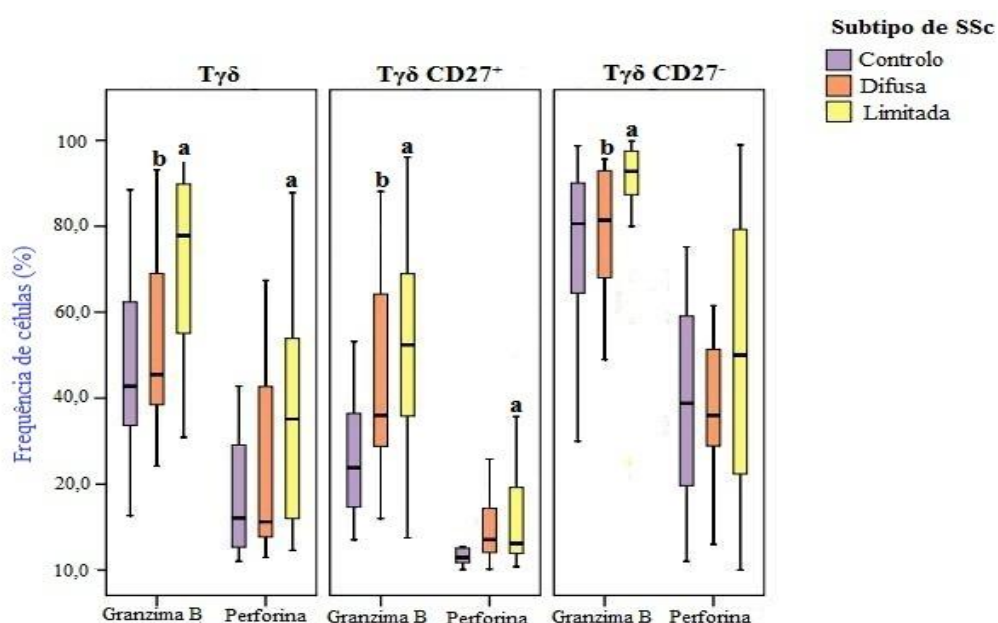


Figura 17 - Representação gráfica da frequência de células $T\gamma\delta$, $T\gamma\delta$ CD27⁺ e $T\gamma\delta$ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina, na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Limitada versus Controlo; ^c Limitada versus Difusa.

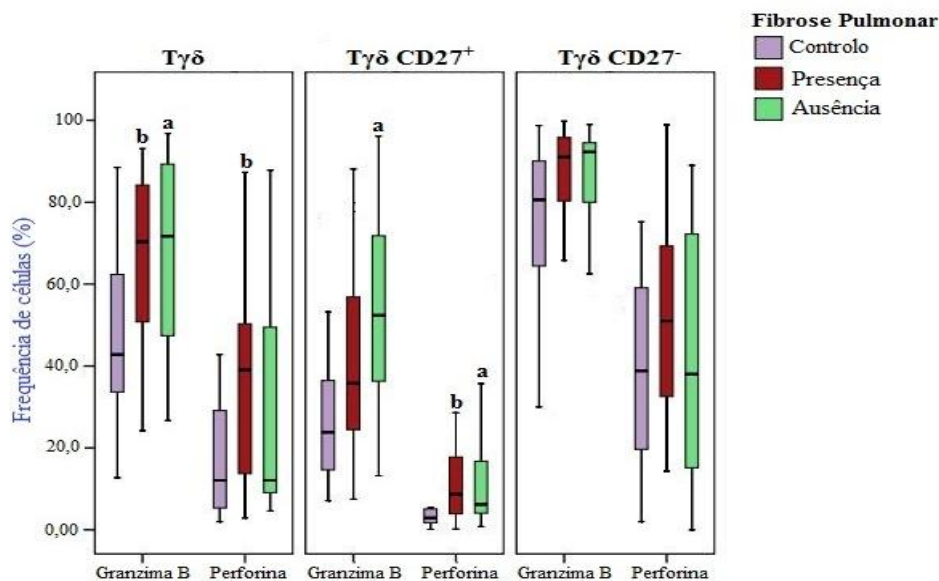


Figura 18 - Representação gráfica da frequência de células Tγδ, Tγδ CD27⁺ e Tγδ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina, na população controle e em doentes com SSc, na presença e ausência de Fibrose Pulmonar. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o p value < 0,05: ^a Ausência de Fibrose Pulmonar *versus* Controle; ^b Presença de Fibrose Pulmonar *versus* Controle.

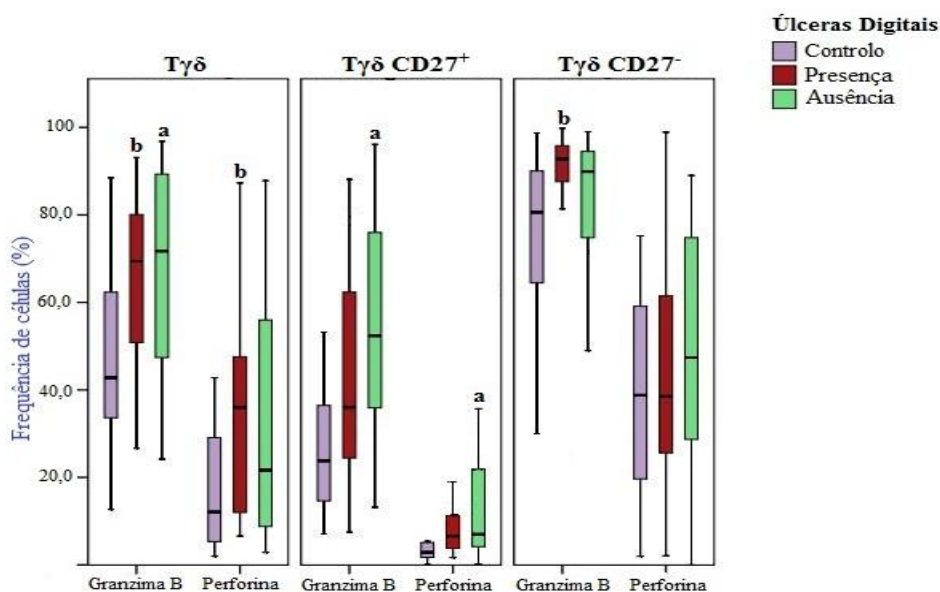


Figura 19 - Representação gráfica da frequência de células Tγδ, Tγδ CD27⁺ e Tγδ CD27⁻ a produzir granzima B e perforina, na população controle e em doentes com SSc, na presença e ausência de episódios de Úlceras Digitais. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o p value < 0,05: ^a Ausência de Úlceras Digitais *versus* Controle; ^b Presença de Úlceras Digitais *versus* Controle.

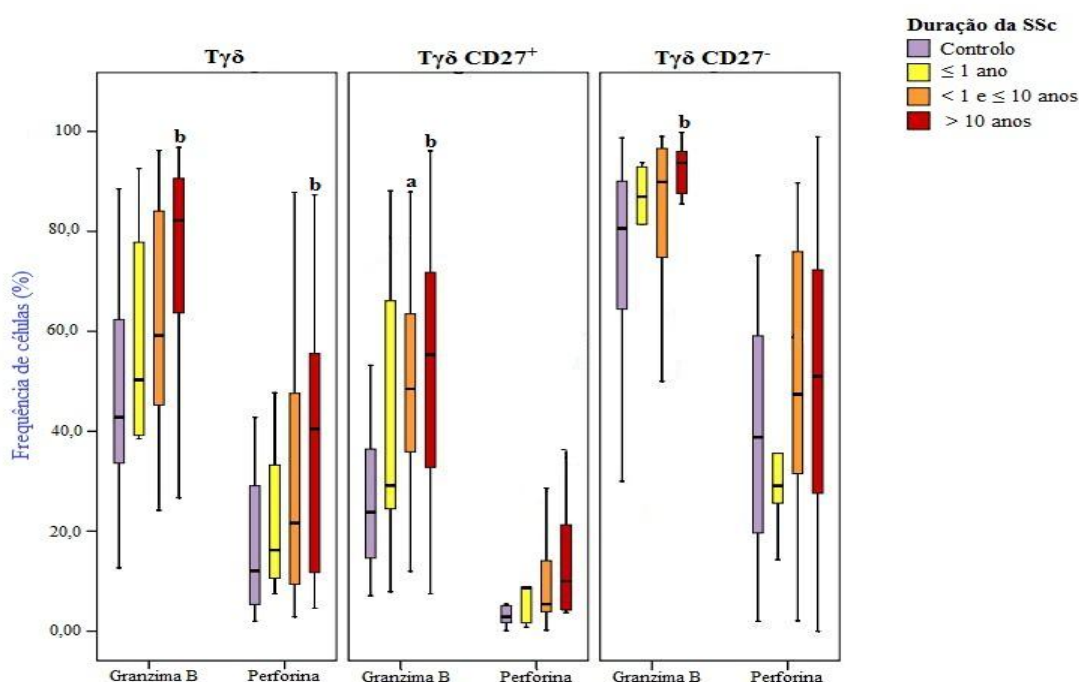


Figura 20 - Representação gráfica da frequência de células $T\gamma\delta$, $T\gamma\delta$ $CD27^+$ e $T\gamma\delta$ $CD27^-$ a produzir granzima B e perforina, na população controlo e nos doentes com SSc agrupados de acordo com a duração da doença, em anos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o p value < 0,05: ^a 1 ≤ 10 anos versus Controlo; ^b > 10 anos versus Controlo.

E. Frequência de células $T\gamma\delta$ do sangue periférico a produzir citocinas

E.1. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com o subtipo da doença

Pela análise da [figura 21](#), constata-se que não existem diferenças estatisticamente significativas relativamente à produção das citocinas $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ em ambos os subtipos da doença. Contudo, verifica-se um aumento estatisticamente significativo da frequência de células a produzir IL-2 para o subtipo difuso, quando comparado com a população controlo. Verifica-se também a existência de significância estatística entre ambos os subtipos da doença.

Relativamente à quantidade de citocina expressa por célula, dada pela média de intensidade de fluorescência (do inglês, *Mean Fluorescence Intensity* - MFI), representada na [figura 22](#), não foram verificadas significâncias estatísticas.

E.2. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com a presença de fibrose pulmonar

Pela análise da [figura 23](#) constatou-se a não ocorrência de diferenças estatisticamente significativas para a frequência de células $T\gamma\delta$ a produzirem as citocinas IL-2, IFN γ e TNF α .

Em relação à quantidade de citocina expressa por célula, dada pela MIF, constatou-se pela [figura 24](#), que ocorre um aumento com significado estatístico, da quantidade de IL-2 nos doentes que apresentam fibrose pulmonar.

E.3. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com a presença de episódios de úlceras digitais

Pela análise das [figuras 25 e 26](#), verificou-se que não ocorreram alterações significativas quer na frequência de células $T\gamma\delta$ a produzirem citocinas quer para a quantidade de citocina por célula, dada pela MIF.

E.4. Frequência de células produtoras de citocinas de acordo com a duração da doença

Agrupando os doentes de SSc de acordo com os anos em que lhes foi diagnosticada a doença ([figuras 27 e 28](#)), verificou-se que não ocorreram alterações significativas quer na frequência de células $T\gamma\delta$ a produzirem citocinas quer para a quantidade de citocina por célula.

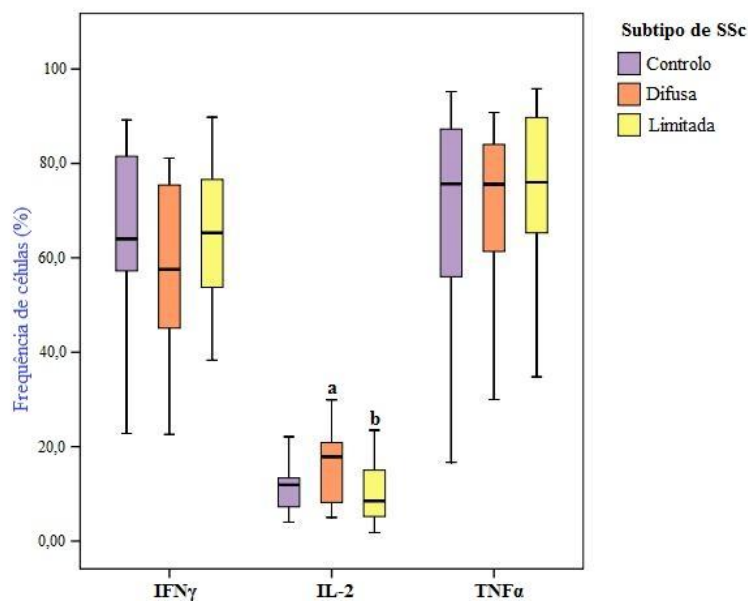


Figura 21 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Difusa versus Controlo; ^b Limitada versus Difusa.

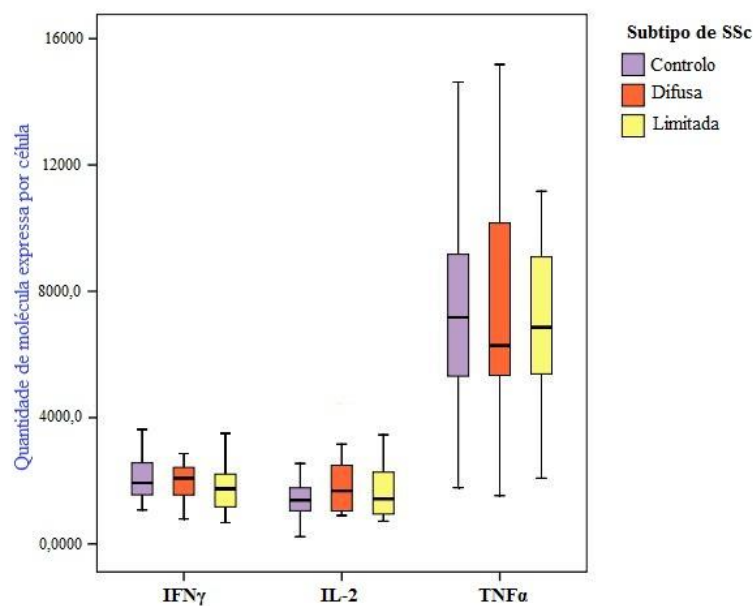


Figura 22- Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e nos diferentes subtipos de SSc.

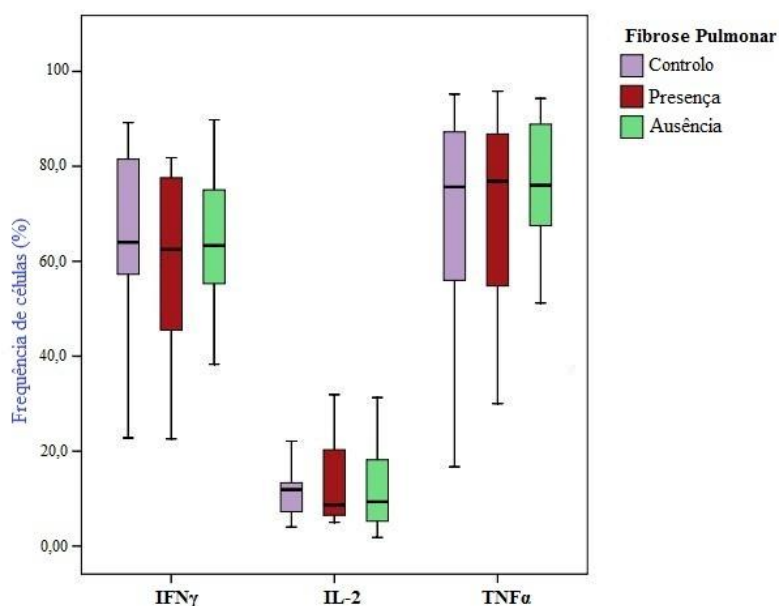


Figura 23 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$ a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de fibrose pulmonar.

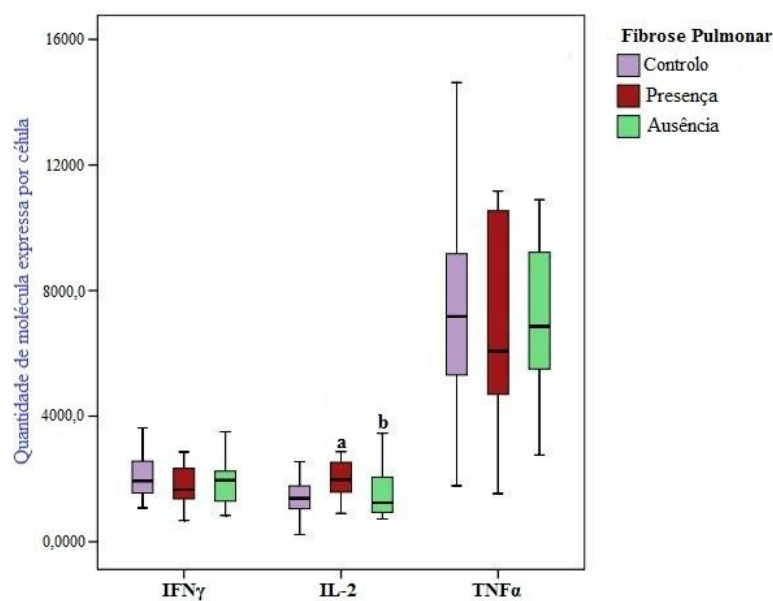


Figura 24 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de fibrose pulmonar. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p value* < 0,05: ^a Presença de Fibrose Pulmonar versus Controlo; ^b Ausência de Fibrose Pulmonar versus Controlo.

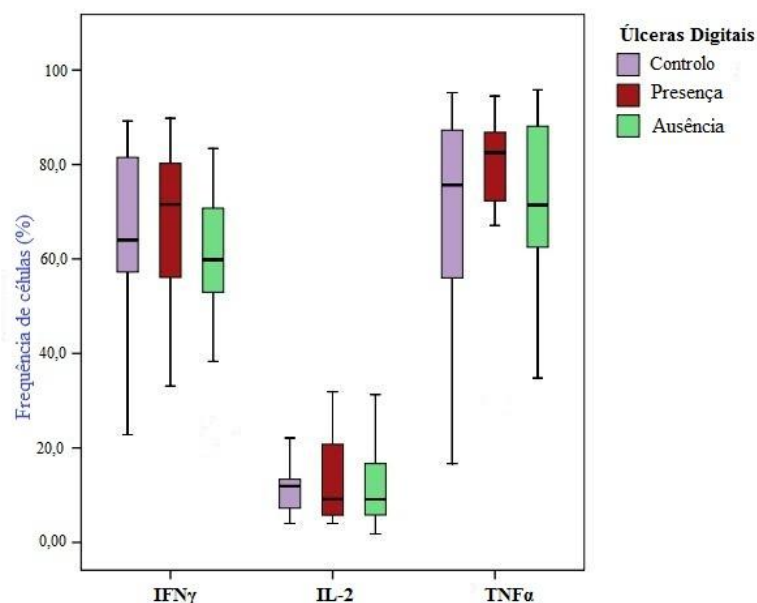


Figura 25 - Representação gráfica da frequência de células $T\gamma\delta$, a produzir as citocinas $IFN\gamma$, IL-2 e $TNF\alpha$, na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de episódios de úlceras

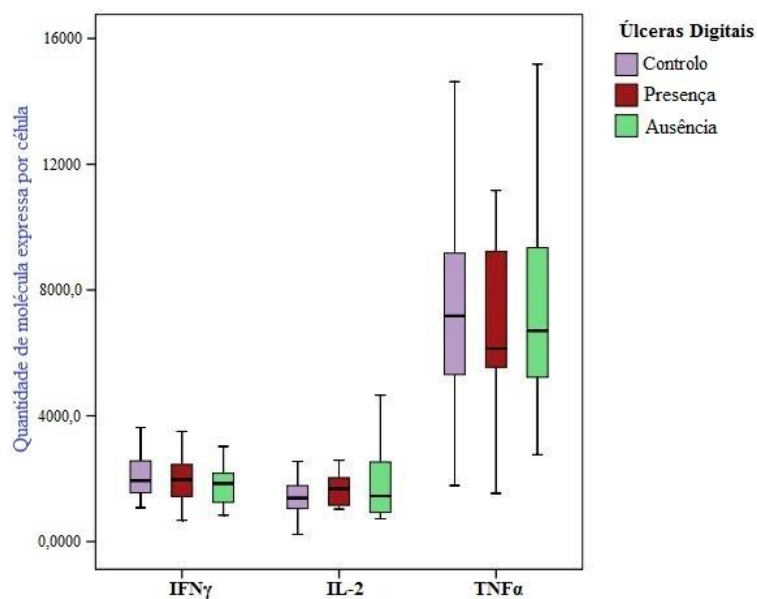


Figura 26 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula $T\gamma\delta$, a produzir as citocinas $IFN\gamma$, IL-2 e $TNF\alpha$, na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a presença de episódios de úlceras.

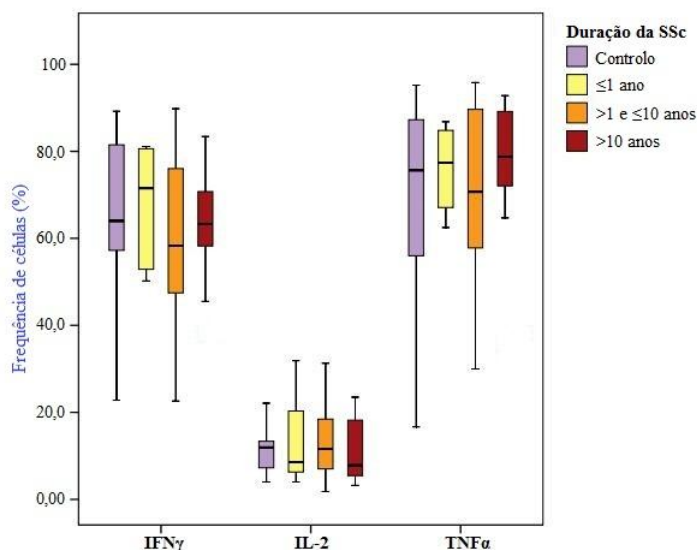


Figura 27 - Representação gráfica da frequência de células T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a duração da doença: Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive; Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc.

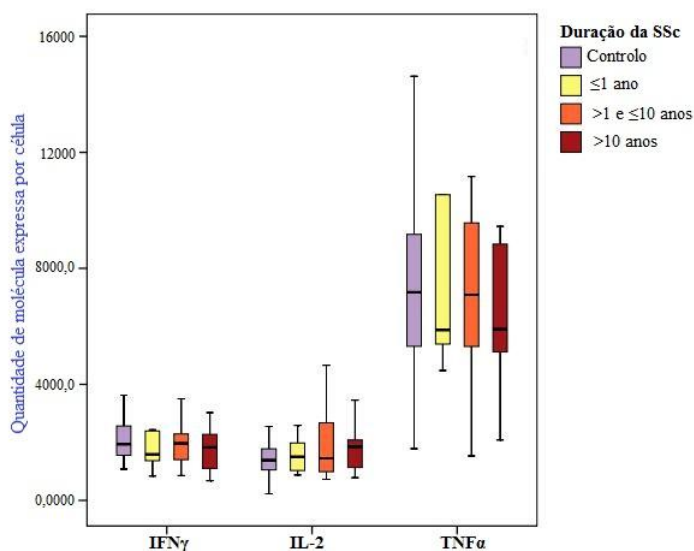


Figura 28 - Representação gráfica da quantidade de molécula expressa por célula T $\gamma\delta$, a produzir as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α , na população controlo e em doentes com SSc, de acordo com a duração da doença: Grupo 1- grupo de doentes com menos de 1 ano de duração da SSc, inclusive; Grupo 2- grupo de doentes com duração da SSc entre 1 e 10 anos, inclusive; Grupo 3- grupo de doentes com mais de 10 anos de duração da SSc.

V. Discussão

A Esclerose Sistémica (SSc), também conhecida por escleroderma ou esclerose sistémica progressiva, é uma doença reumática, autoimune e sistémica do tecido conjuntivo, de etiologia desconhecida. É provavelmente a mais severa doença do tecido conjuntivo, e embora seja considerada uma doença rara, está associada a uma das maiores taxas de mortalidades entre as doenças autoimunes [133-135].

Para além da SSc ser uma doença altamente heterogénea, que segue um curso imprevisível, é uma doença rara, o que por si só já dificulta os estudos inerentes à doença. De facto, alguns dos estudos existentes até à data são controversos, principalmente ao nível da etiologia e fisiopatologia da doença [66].

Alterações funcionais dos linfócitos T que afetam o seu processo de ativação, produção de citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias têm sido implicadas em diversas doenças autoimunes, nomeadamente na SSc [136]. Nos últimos anos, tem-se verificado um interesse crescente no estudo de uma subpopulação de linfócitos T, denominados por linfócitos $T\gamma\delta$, pois por um lado são consideradas células do sistema inato, por outro lado, do sistema imune adaptativo [38]. A função destas células no sistema imune é em grande parte desconhecida, mas pensa-se que a sua relevância patológica em doenças autoimunes ocorre devido à acumulação destas células nos órgãos afetados, e à sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias [112, 137]. Contudo, estudos acerca do papel das células $T\gamma\delta$ ainda são muito escassos e especulativos, e carecem de mais investigação, nomeadamente em SSc. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho consiste na quantificação e caracterização imunofenotípica das células $T\gamma\delta$, com base na expressão de granzima B e perforina, no estudo do seu repertório, e no estudo das citocinas $IFN\gamma$, IL-2 e $TNF\alpha$.

A. Quantificação de células T e $T\gamma\delta$ do sangue periférico

Após tratamento e análise dos resultados, verificou-se que quer as células T, quer o seu subtipo $T\gamma\delta$, tendem a estar diminuídas no sangue periférico de doentes com SSc. Estes dados vão ao encontro de alguns artigos publicados no âmbito desta e de outras doenças autoimunes. Existem mesmo estudos que afirmam que a perda de homeostasia da célula T pode resultar em várias doenças autoimunes, comprovando assim o envolvimento destas células na autoimunidade [138]. De facto, verificou-se a existência de um aparecimento de

infiltrados de células mononucleares, incluindo células T, na pele de doentes com SSc, mesmo antes de evidências de fibrose, indicando o envolvimento destas células mesmo num estadio inicial da doença [139-141]. Este recrutamento de células T, nomeadamente células $T\gamma\delta$ para a pele de doentes com SSc, pode assim explicar a diminuição da frequência e número absoluto destas células na circulação sanguínea, observado neste trabalho [142, 143]. Tendo em mente esta migração das células para os tecidos, seria de esperar nos resultados deste trabalho, uma diminuição de células T e $T\gamma\delta$, no sangue periférico de doentes que possuem fibrose pulmonar ou úlceras digitais, quando comparado com doentes que não apresentam estas duras consequências da SSc. No entanto esta diminuição só ocorre para as células T, não sendo constatada nas células $T\gamma\delta$. Relativamente à relação entre células $T\gamma\delta$ e a ocorrência de fibrose pulmonar ou úlceras digitais em doentes com SSc, são muito escassos os estudos, e mesmo os que existem não são passíveis de comparação porque utilizam diferentes métodos e diferentes critérios de seleção dos doentes.

Adicionalmente um estudo de Holcombe *et al.* [142] constatam que a diminuição de células $T\gamma\delta$ no sangue periférico é mais acentuada em doentes positivos para anticorpos Scl-70, característicos do subtipo difuso da SSc. No entanto neste trabalho, não são verificadas diferenças estatísticas entre os subtipos da doença.

O mesmo estudo de Holcombe *et al.* [142] refere que existe também uma diminuição das células $T\gamma\delta$ mais acentuada nos primeiros anos da doença, o que não acontece nos resultados deste trabalho, pois verifica-se que a diminuição destas células é mais elevada, e estatisticamente significativa em doentes com uma duração da doença superior a 10 anos.

B. Quantificação das células $T\gamma\delta$ nos diferentes compartimentos funcionais (*naïve*, memória e efetor) do sangue periférico

Com base na expressão combinada de CD27 e CD45Ra, procedeu-se à quantificação da frequência de células $T\gamma\delta$ com um fenótipo *naïve*, de memória central, de memória efetora e efetor. Verificou-se que doentes com SSc apresentam um aumento de células $T\gamma\delta$ com fenótipo *naïve* e efetor, em detrimento dos fenótipos de memória (central e efetora). Este facto leva a crer que na doença, e maioritariamente no subtipo limitado, existe uma maior migração para os tecidos periféricos e para os órgãos

linfóides secundários das células de memória, com a consequente diferenciação em células efetoras.

As células T memória central deslocam-se do sangue para os órgãos linfoides secundários, onde facilmente proliferam e diferenciam-se em células T memória efetora, e que estas sendo consideradas células protetoras, migram novamente para o sangue e deste para os tecidos periféricos inflamados [144]. Este aumento da diferenciação em células efetoras é mais acentuado na presença de fibrose pulmonar.

Existem evidências de que células T $\gamma\delta$ memória central e *naïve* expressam o recetor CCR7, que consiste num recetor para as quimiocinas CCL19 e CCL21 [145]. A principal função deste recetor ligado às correspondentes quimiocinas, é facilitar o recrutamento e retenção das células ao nível dos órgãos linfoides secundários a fim de promover uma eficiente exposição das células ao antígeno. Um estudo demonstrou o aumento da expressão destas quimiocinas no soro de doentes com pancreatite autoimune [146]. Adicionalmente, um outro estudo refere que células T memória efetora expressam o recetor CCR6, que consiste num recetor para a quimiocina CCL20, com função de regular a migração de células T para os tecidos inflamados, particularmente para a pele [147]. Contudo ainda não existem estudos que evidenciem o aumento da CCL20 no sangue periférico ou no soro de doentes com SSc, nem mesmo noutras doenças autoimunes. Mais estudos são necessários para clarificar o aumento de células T $\gamma\delta$ memória efetora no sangue periférico de doentes com SSc.

C. Quantificação de células T $\gamma\delta$ em função do repertório V γ 9V δ 2 nos diferentes compartimentos funcionais, do sangue periférico

Numa análise relativa à quantificação de células T $\gamma\delta$ em função do repertório V γ 9V δ 2, nos diferentes compartimentos (*naïve*, memória e efetor) embora existem algumas diferenças, entre os subtipos de SSc e na presença/ausência de fibrose pulmonar ou episódios de úlceras digitais, estas não apresentam significado estatístico. De maior relevância, verificou-se entre doentes com SSc, de acordo com a duração da doença. Um estudo em doentes com síndrome mielodisplásica, constatou uma diminuição do repertório V γ 9⁺V δ 2⁺ no sangue periférico de doentes que tinham doenças autoimunes associadas, sugerindo que esta diminuição ocorreu em grande parte devido ao componente autoimune

[52]. De facto, neste trabalho ocorreu uma diminuição do reportório $V\gamma 9^+V\delta 2^+$, associado ao aumento do reportório $V\gamma 9^-V\delta 2^-$, com o aumento do tempo de doença após o diagnóstico. Isto leva a crer que células $T\gamma\delta$ modificam o reportório do seu TCR ao longo da duração da doença, passando a expressar um outro reportório que não o $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ nem o $V\gamma 9^-V\delta 2^+$, que estão maioritariamente presentes em doentes com duração da doença inferior a 1 ano, após o diagnóstico. Dado a falta de conhecimento inerente às células $T\gamma\delta$, mais estudos no âmbito do reportório destas células em doenças autoimunes são necessários, para que se possa de algum modo clarificar os achados deste trabalho.

D. Quantificação de células $T\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, do sangue periférico

Encontra-se descrito que as células $T\gamma\delta$ quando ativadas apresentam-se grandes e granulares, podendo expressar moléculas características de citotoxicidade, nomeadamente o CD56, o CD16 e o CD57. Para além destas moléculas, as células $T\gamma\delta$ possuem proteínas citoplasmáticas (granzima e perforina) que tornam estas células detentoras de uma capacidade citotóxica ainda mais elevada [19]. Adicionalmente, existem evidências de que células $T\gamma\delta$ exibem citotoxicidade endotelial, e que esta é significativamente maior no sangue periférico de doentes com SSc, do que em controlos saudáveis [112]. A análise dos resultados deste trabalho vai ao encontro destes estudos, verificando-se um geral aumento da células $T\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina, devido ao facto destas células estarem mais ativadas na doença. Este aumento é mais significativo na subpopulação de células $T\gamma\delta CD27^-$, dado que possuem um fenótipo de memória efetora e efetor, tal como se verificou nos resultados anteriores. Contudo, também se evidenciou, um aumento das células $T\gamma\delta CD27^+$ a expressar granzima B e perforina, o que poderá estar correlacionado com uma ativação periférica das células *naïve* em memória central.

Denota-se pelos resultados, que a citotoxicidade destas células é em geral mais elevada em doentes com o subtipo limitado. Contudo, não existem estudos anteriores que comparem a citotoxicidade destas células nos subtipos da SSc.

Verificou-se também nos resultados, que a frequência de células $T\gamma\delta$ a expressar granzima B e perforina aumenta ao longo dos anos de diagnóstico da doença. Um estudo em Lúpus [148] refere que a produção destes grânulos citoplasmáticos está correlacionada

com a atividade da doença. Deste modo, e tendo em conta este estudo, seria de esperar uma diminuição da citotoxicidade e não um aumento, dado que estudos referem uma maior atividade da doença nos primeiros anos.

São necessários mais estudos que relacionam a capacidade citotóxica das células $T\gamma\delta$, dado que o que se conhece até à data é ainda muito escasso.

E. Quantificação de células $T\gamma\delta$ produtoras de citocinas, do sangue periférico

Independentemente do estímulo que desencadeia o dano vascular endotelial sabe-se que ocorre uma consequente ativação da resposta imune com libertação de diversas citocinas. Uma vez que as citocinas são modeladores da atividade funcional de células ou tecidos, durante condições normais ou patológicas, a sua quantificação torna-se útil para um melhor entendimento da fisiopatologia da SSc [126].

As citocinas produzidas pelas células T podem ser classificadas como Th1 ou Th2, estando as Th1 envolvidas na resposta imune celular e as Th2 na resposta imune mediada por anticorpos. Recentemente um outro grupo, denominado por Th17 também foi acrescentado a esta classificação [149].

Durante os últimos anos, vários estudos têm demonstrado que existe um desequilíbrio na resposta Th1/Th2 em doenças autoimunes, e que este pode ter um impacto na fisiopatologia destas doenças. Embora a SSc seja considerada uma doença autoimune Th2, parece que as células $T\gamma\delta$ exibem uma polarização Th1[150].

Neste trabalho, apenas foram quantificadas citocinas Th1 ($IFN\gamma$, IL-2 e $TNF\alpha$) de acordo com: subtipo da doença; presença ou ausência de episódios de úlceras digitais; presença ou ausência de fibrose pulmonar e duração da doença.

Entre as funções que têm sido atribuídas ao $IFN\gamma$, destaca-se o facto desta citocina aumentar a expressão de moléculas de adesão nos fibroblastos, o que pode resultar numa maior interação entre estes e células T ativadas, e por conseguinte a inibição da proliferação dos fibroblastos e da síntese de colagénio, o que se torna favorável na presença de SSc [151, 152]. Existem contudo vários estudos que apontam para uma diminuição da produção desta citocina em pacientes com SSc [128, 153, 154]. Em contrapartida, existe um estudo [150] no qual se observa um aumento estatisticamente

significativo da produção de IFN γ pelas células T $\gamma\delta$, o que vai ao encontro de um estudo idêntico em pacientes com artrite reumatoide [155]. Este estudo [150] demonstra ainda que não existe nenhuma correlação entre a variação da expressão de citocinas pelas células T $\gamma\delta$ e o subtipo de SSc, bem como com o envolvimento de órgãos. Isto vai ao encontro com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que em geral não se verificaram grandes diferenças na frequência de células produtoras de IFN γ , nem da quantidade desta citocina por célula, entre os subtipos da doença e entre a presença ou ausência de úlceras digitais e fibrose pulmonar.

Uma outra citocina quantificada neste estudo foi a IL-2, cujos resultados apontam para um aumento estatisticamente significativo de células T $\gamma\delta$ produtoras desta citocina, em doentes com SScd. A produção de IL-2 está relacionada com a manutenção da resposta imune de células T ativadas, induzindo a proliferação a diferenciação de linfócitos. Um estudo Needleman *et al.* [128] demonstra um aumento desta citocina no plasma de doentes com SSc, maioritariamente no subtipo difuso da doença, em comparação com controlos. Segundo Kahalen e LeRoy [156] este aumento de IL-2 está relacionado com o facto de existir no plasma de controlos saudáveis, um inibidor da IL-2, e que este inibidor está presente em quantidades reduzidas em doentes com SSc.

Relativamente à última citocina estudada neste trabalho, o TNF α , tal como as restantes citocinas que foram quantificadas, constitui uma citocina pró-inflamatória. O TNF α consiste numa das primeiras citocinas a ser produzida em qualquer resposta imune, e a síntese de colagénio pelo TGF β parece ser favorecida com o aumento desta citocina. Em concordância com esta função do TNF α , existem estudos que constatarem um aumento significativo desta citocina no soro de doentes com SSc [153, 154]. Em contrapartida, os resultados deste trabalho relativos à expressão do TNF α pelas células T $\gamma\delta$ e à frequência destas células a produzir esta citocina, demonstraram não haver grandes diferenças entre doentes e controlos, independentemente do subtipo da doença ou da presença de úlceras digitais ou fibrose pulmonar. Na mesma linha dos resultados deste trabalho, um estudo detetou níveis idênticos de TNF α no soro de doentes com SSc e controlos saudáveis [128].

VI. Conclusão

Os resultados observados e mais relevantes neste estudo foram a diminuição da frequência e número absoluto das células $T\gamma\delta$ em doentes com SSc, sobretudo em doentes com uma duração da doença superior a 10 anos, o que pode estar associado ao recrutamento constante destas células para os tecidos.

Verificou-se também que, doentes com a doença há mais de 10 anos apresentavam uma maior frequência de células efectoras, e que estas células possuíam maior atividade citotóxica, o que parece evidenciar um papel importante destas células na fisiopatologia da doença. Estas alterações nos diferentes compartimentos funcionais, parecem também estar associadas a achados clínicos de agressividade da doença.

Observaram-se algumas alterações interessantes na frequência de células $T\gamma\delta$, nos diferentes compartimentos funcionais, que se encontram a expressar os diferentes reportórios $\gamma\delta$. No entanto, e para melhor entender estas alterações, seria importante a caracterização das células $T\gamma\delta$, por exemplo em biopsias de pele, para se verificar se as células que se encontram a infiltrar este tecido teriam um reportório policlonal ou expressariam de forma selectiva um determinado reportório.

Por fim, doentes com SScl apresentam um aumento estatisticamente significativo da frequência de células $T\gamma\delta$ a produzir IL-2, podendo este vir a constituir-se um biomarcador de monitorização da doença.

Tendo em conta o escasso conhecimento que existe sobre o papel que as células $T\gamma\delta$ podem assumir na fisiopatologia da Esclerose Sistémica, são imprescindíveis mais estudos que permitam uma melhor interpretação dos achados obtidos neste trabalho.

VII. Bibliografia

1. Goldsby, R.A., T.J. Kindt and B.A. Osborne, *Kuby Immunology*. Freeman ed. 2007.
2. Arosa, F.A., E.M. Cardoso and F.C. Pacheco, *Fundamentos de Imunologia*. 2007, Lisboa: Lidel-edições técnicas lda.
3. Abbas, A.K., A.H. Lichtman and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. 2003: Saunders.
4. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
5. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
6. Passegue, E., C.H. Jamieson, L.E. Ailles and I.L. Weissman, *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
7. Weissman, I.L., D.J. Anderson and F. Gage, *Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 387-403.
8. Gerrits, A., B. Dykstra, M. Otten, L. Bystrykh and G. de Haan, *Combining transcriptional profiling and genetic linkage analysis to uncover gene networks operating in hematopoietic stem cells and their progeny*. Immunogenetics, 2008. **60**(8): p. 411-22.
9. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
10. Prockop, S. and H.T. Petrie, *Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation*. Semin Immunol, 2000. **12**(5): p. 435-44.
11. Takahama, Y., *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection*. Nature Reviews Immunology, 2006. **6**(2): p. 127-135.
12. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
13. Godfrey, D.I., J. Kennedy, T. Suda and A. Zlotnik, *A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4244-52.

14. Janas, M.L., G. Varano, K. Gudmundsson, M. Noda, T. Nagasawa and M. Turner, *Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4*. *J Exp Med*, 2010. **207**(1): p. 247-61.
15. Gerondakis, S. and U. Siebenlist, *Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(5): p. a000182.
16. Hale, J.S. and P.J. Fink, *Back to the thymus: peripheral T cells come home*. *Immunol Cell Biol*, 2009. **87**(1): p. 58-64.
17. Brenner, M.B., J. McLean, H. Scheft, J. Riberdy, S.L. Ang, J.G. Seidman, P. Devlin and M.S. Krangel, *Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes*. *Nature*, 1987. **325**(6106): p. 689-94.
18. Owen, M.J., *The T-cell receptor for antigen*. *Immunol Suppl*, 1988. **1**: p. 17-9.
19. Tripodo, C., E. Iannitto, A.M. Florena, C.E. Pucillo, P.P. Piccaluga, V. Franco and S.A. Pileri, *Gamma-delta T-cell lymphomas*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. **6**(12): p. 707-17.
20. Allison, J.P. and W.L. Havran, *The Immunobiology of T-Cells with Invariant Gamma-Delta Antigen Receptors*. *Annual Review of Immunology*, 1991. **9**: p. 679-705.
21. O'Brien, R., N. Jin, Y. Huang, M.K. Aydintug, C. Roark and W. Born, *Characteristics of IL-17-producing gammadelta T cells*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 1; author reply 2-4.
22. Schild, H., N. Mavaddat, C. Litzenberger, E.W. Ehrich, M.M. Davis, J.A. Bluestone, L. Matis, R.K. Draper and Y.H. Chien, *The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells*. *Cell*, 1994. **76**(1): p. 29-37.
23. Strid, J., S.J. Roberts, R.B. Filler, J.M. Lewis, B.Y. Kwong, W. Schpero, D.H. Kaplan, A.C. Hayday and M. Girardi, *Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(2): p. 146-54.
24. Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar and A.C. Hayday, *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 605-9.

25. Raulet, D.H. and N. Guerra, *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 568-80.
26. Martin, B., K. Hirota, D.J. Cua, B. Stockinger and M. Veldhoen, *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
27. Devilder, M.C., S. Maillat, I. Bouyge-Moreau, E. Donnadieu, M. Bonneville and E. Scotet, *Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1386-93.
28. Conti, L., R. Casetti, M. Cardone, B. Varano, A. Martino, F. Belardelli, F. Poccia and S. Gessani, *Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 252-60.
29. Chien, Y.H. and Y. Konigshofer, *Antigen recognition by gammadelta T cells*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 46-58.
30. Bonneville, M., R.L. O'Brien and W.K. Born, *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-78.
31. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
32. Jameson, J. and W.L. Havran, *Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 114-22.
33. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**: p. 975-1026.
34. Havran, W.L., *A role for epithelial gammadelta T cells in tissue repair*. Immunol Res, 2000. **21**(2-3): p. 63-9.
35. Jameson, J., K. Ugarte, N. Chen, P. Yachi, E. Fuchs, R. Boismenu and W.L. Havran, *A role for skin gammadelta T cells in wound repair*. Science, 2002. **296**(5568): p. 747-9.
36. Brandes, M., K. Willmann and B. Moser, *Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells*. Science, 2005. **309**(5732): p. 264-8.

37. Born, W.K., C.L. Reardon and R.L. O'Brien, *The function of gammadelta T cells in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 31-8.
38. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
39. Ferrarini, M., E. Ferrero, L. Dagna, A. Poggi and M.R. Zocchi, *Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer*. Trends Immunol, 2002. **23**(1): p. 14-8.
40. Fenoglio, D., A. Poggi, S. Catellani, F. Battaglia, A. Ferrera, M. Setti, G. Murdaca and M.R. Zocchi, *Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to Candida albicans*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6611-8.
41. Chen, L., W. He, S.T. Kim, J. Tao, Y. Gao, H. Chi, A.M. Intlekofer, B. Harvey, S.L. Reiner, Z. Yin, R.A. Flavell and J. Craft, *Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2730-6.
42. O'Brien, R.L., C.L. Roark and W.K. Born, *IL-17-producing gammadelta T cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 662-6.
43. Vermijlen, D., P. Ellis, C. Langford, A. Klein, R. Engel, K. Willmann, H. Jomaa, A.C. Hayday and M. Eberl, *Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4304-14.
44. Ribot, J.C., A. deBarros, D.J. Pang, J.F. Neves, V. Peperzak, S.J. Roberts, M. Girardi, J. Borst, A.C. Hayday, D.J. Pennington and B. Silva-Santos, *CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 427-36.
45. Haas, J.D., F.H. Gonzalez, S. Schmitz, V. Chennupati, L. Fohse, E. Kremmer, R. Forster and I. Prinz, *CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3488-97.
46. Dieli, F., M. Troye-Blomberg, J. Ivanyi, J.J. Fournie, A.M. Krensky, M. Bonneville, M.A. Peyrat, N. Caccamo, G. Sireci and A. Salerno, *Granulysin-*

- dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes.* J Infect Dis, 2001. **184**(8): p. 1082-5.
47. Hamada, S., M. Umemura, T. Shiono, K. Tanaka, A. Yahagi, M.D. Begum, K. Oshiro, Y. Okamoto, H. Watanabe, K. Kawakami, C. Roark, W.K. Born, R. O'Brien, K. Ikuta, H. Ishikawa, S. Nakae, Y. Iwakura, T. Ohta and G. Matsuzaki, *IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver.* J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3456-63.
48. Qin, G., H. Mao, J. Zheng, S.F. Sia, Y. Liu, P.L. Chan, K.T. Lam, J.S. Peiris, Y.L. Lau and W. Tu, *Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses.* J Infect Dis, 2009. **200**(6): p. 858-65.
49. Eberl, M. and H. Jomaa, *A genetic basis for human gammadelta T-cell reactivity towards microbial pathogens.* Trends Immunol, 2003. **24**(8): p. 407-9.
50. Fisch, P., E. Meuer, D. Pende, S. Rothenfusser, O. Viale, S. Kock, S. Ferrone, D. Fradelizi, G. Klein, L. Moretta, H.G. Rammensee, T. Boon, P. Coulie and P. van der Bruggen, *Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity.* Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3368-79.
51. Caccamo, N., F. Dieli, D. Wesch, H. Jomaa and M. Eberl, *Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 663-6.
52. Kiladjian, J.J., G. Visentin, E. Viey, S. Chevret, V. Eclache, J. Stirnemann, J.H. Bourhis, S. Chouaib, P. Fenaux and A. Caignard, *Activation of cytotoxic T-cell receptor gammadelta T lymphocytes in response to specific stimulation in myelodysplastic syndromes.* Haematologica, 2008. **93**(3): p. 381-9.
53. Rincon-Orozco, B., V. Kunzmann, P. Wrobel, D. Kabelitz, A. Steinle and T. Herrmann, *Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D.* J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2144-51.
54. Holtmeier, W. and D. Kabelitz, *gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses.* Chem Immunol Allergy, 2005. **86**: p. 151-83.

55. Bonneville, M. and J.J. Fournie, *Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites*. *Microbes Infect*, 2005. **7**(3): p. 503-9.
56. Chen, Z.W. and N.L. Letvin, *Vgamma2Vdelta2+ T cells and anti-microbial immune responses*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(6): p. 491-8.
57. Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R.L. Modlin, M.B. Brenner, B.R. Bloom and C.T. Morita, *Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(17): p. 8175-9.
58. De Paoli, P., D. Gennari, P. Martelli, G. Basaglia, M. Crovatto, S. Battistin and G. Santini, *A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection*. *Clin Exp Immunol*, 1991. **83**(2): p. 187-91.
59. Shen, Y., D. Zhou, L. Qiu, X. Lai, M. Simon, L. Shen, Z. Kou, Q. Wang, L. Jiang, J. Estep, R. Hunt, M. Clagett, P.K. Sehgal, Y. Li, X. Zeng, C.T. Morita, M.B. Brenner, N.L. Letvin and Z.W. Chen, *Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections*. *Science*, 2002. **295**(5563): p. 2255-8.
60. Dieli, F., F. Poccia, M. Lipp, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano and A. Salerno, *Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites*. *J Exp Med*, 2003. **198**(3): p. 391-7.
61. Munoz, L.E., C. Janko, C. Schulze, C. Schorn, K. Sarter, G. Schett and M. Herrmann, *Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE*. *Autoimmun Rev*, 2010. **10**(1): p. 38-42.
62. Champagne, E., *gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011. **59**(2): p. 117-37.
63. Gioia, C., C. Agrati, R. Casetti, C. Cairo, G. Borsellino, L. Battistini, G. Mancino, D. Goletti, V. Colizzi, L.P. Pucillo and F. Poccia, *Lack of CD27-CD45RA-V gamma 9V delta 2+ T cell effectors in immunocompromised hosts and during active pulmonary tuberculosis*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1484-9.
64. Casetti, R., G. Perretta, A. Taglioni, M. Mattei, V. Colizzi, F. Dieli, G. D'Offizi, M. Malkovsky and F. Poccia, *Drug-induced expansion and differentiation of V gamma 9V delta 2 T cells in vivo: the role of exogenous IL-2*. *J Immunol*, 2005. **175**(3): p. 1593-8.

65. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. N Engl J Med, 2001. **345**(5): p. 340-50.
66. LeRoy, E.C., C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, T.A. Medsger, Jr., N. Rowell and F. Wollheim, *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. J Rheumatol, 1988. **15**(2): p. 202-5.
67. Gu, Y.S., J. Kong, G.S. Cheema, C.L. Keen, G. Wick and M.E. Gershwin, *The immunobiology of systemic sclerosis*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2008. **38**(2): p. 132-160.
68. Chiffrot, H., B. Fautrel, C. Sordet, E. Chatelus and J. Sibilia, *Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review*. Semin Arthritis Rheum, 2008. **37**(4): p. 223-35.
69. Gershwin, M.E., Y.S. Gu, J. Kong, G.S. Cheema, C.L. Keen and G. Wick, *The immunobiology of systemic sclerosis*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2008. **38**(2): p. 132-160.
70. Steen, V.D. and T.A. Medsger, *Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 940-4.
71. Katsumoto, T.R., M.L. Whitfield and M.K. Connolly, *The Pathogenesis of Systemic Sclerosis*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 6, 2011. **6**: p. 509-537.
72. Galluccio, F. and M. Matucci-Cerinic, *Two faces of the same coin: Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 241-3.
73. Botzoris, V. and A.A. Drosos, *Management of Raynaud's phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis*. Joint Bone Spine, 2011. **78**(4): p. 341-6.
74. Wasserman, A. and E. Brahn, *Systemic sclerosis: bilateral improvement of Raynaud's phenomenon with unilateral digital sympathectomy*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **40**(2): p. 137-46.
75. Hachulla, E. and D. Launay, *Diagnosis and classification of systemic sclerosis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **40**(2): p. 78-83.
76. Valentini, G., G. Cuomo, G. Abignano, A. Petrillo, S. Vettori, A. Capasso, D. Cozzolino, G. Del Genio and C. Santoriello, *Early systemic sclerosis: assessment*

- of clinical and pre-clinical organ involvement in patients with different disease features.* Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(2): p. 317-23.
77. Geyer, M. and U. Muller-Ladner, *The pathogenesis of systemic sclerosis revisited.* Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **40**(2): p. 92-103.
 78. Derk, C.T. and S.A. Jimenez, *Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis.* Autoimmun Rev, 2003. **2**(4): p. 181-91.
 79. Frech, T., D. Khanna, B. Markewitz, G. Mineau, R. Pimentel and A. Sawitzke, *Heritability of vasculopathy, autoimmune disease, and fibrosis in systemic sclerosis: a population-based study.* Arthritis and Rheumatism, 2010. **62**(7): p. 2109-16.
 80. Feghali-Bostwick, C., T.A. Medsger, Jr. and T.M. Wright, *Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies.* Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(7): p. 1956-63.
 81. Grossman, C., Z. Dovrish, Y. Shoenfeld and H. Amital, *Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis?* Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 244-7.
 82. Jimenez, S.A., A. Diaz and K. Khalili, *Retroviruses and the pathogenesis of systemic sclerosis.* Int Rev Immunol, 1995. **12**(2-4): p. 159-75.
 83. Dang, H., M.J. Dauphinee, N. Talal, R.F. Garry, J.R. Seibold, T.A. Medsger, Jr., S. Alexander and C.A. Feghali, *Serum antibody to retroviral gag proteins in systemic sclerosis.* Arthritis and Rheumatism, 1991. **34**(10): p. 1336-7.
 84. Ferri, C., G. Longombardo, A. Azzi and K. Zakrzewska, *Parvovirus B19 and systemic sclerosis.* Clin Exp Rheumatol, 1999. **17**(2): p. 267-8.
 85. Ferri, C., K. Zakrzewska, G. Longombardo, D. Giuggioli, F.A. Storino, G. Pasero and A. Azzi, *Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients.* Clin Exp Rheumatol, 1999. **17**(6): p. 718-20.
 86. Magro, C.M., G. Nuovo, C. Ferri, A.N. Crowson, D. Giuggioli and M. Sebastiani, *Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma.* J Cutan Pathol, 2004. **31**(1): p. 43-50.
 87. Pandey, J.P. and E.C. LeRoy, *Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis.* Arthritis and Rheumatism, 1998. **41**(1): p. 10-5.

88. Ferri, C., M. Cazzato, D. Giuggioli, M. Sebastiani and C. Magro, *Systemic sclerosis following human cytomegalovirus infection*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(10): p. 937-8.
89. Kalabay, L., B. Fekete, L. Czirjak, L. Horvath, M.R. Daha, A. Veres, G. Fonyad, A. Horvath, A. Viczian, M. Singh, I. Hoffer, G. Fust, L. Romics and Z. Prohaszka, *Helicobacter pylori infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60*. *Helicobacter*, 2002. **7**(4): p. 250-6.
90. Macchia, G., A. Massone, D. Burrioni, A. Covacci, S. Censini and R. Rappuoli, *The Hsp60 protein of Helicobacter pylori: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases*. *Mol Microbiol*, 1993. **9**(3): p. 645-52.
91. Mayes, M.D., J.A. Whittum-Hudson, C. Oszust, H.C. Gerard and A.P. Hudson, *Lack of evidence for bacterial infections in skin in patients with systemic sclerosis*. *Am J Med Sci*, 2009. **337**(4): p. 233-5.
92. McCormic, Z.D., S.S. Khuder, B.K. Aryal, A.L. Ames and S.A. Khuder, *Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2010. **83**(7): p. 763-9.
93. Aryal, B.K., S.A. Khuder and E.A. Schaub, *Meta-analysis of systemic sclerosis and exposure to solvents*. *Am J Ind Med*, 2001. **40**(3): p. 271-4.
94. Zakrzewska, K., F. Corcioli, K.M. Carlsen, D. Giuggioli, R. Fanci, A. Rinieri, C. Ferri and A. Azzi, *Human parvovirus B19 (B19V) infection in systemic sclerosis patients*. *Intervirology*, 2009. **52**(5): p. 279-82.
95. Tachibana, I., J. Bodorova, F. Berditchevski, M.M. Zutter and M.E. Hemler, *NAG-2, a novel transmembrane-4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(46): p. 29181-9.
96. Sitia, S., F. Atzeni, P. Sarzi-Puttini, V. Di Bello, L. Tomasoni, L. Delfino, F. Antonini-Canterin, G. Di Salvo, V. De Gennaro Colonna, S. La Carrubba, S. Carerj and M. Turiel, *Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases*. *Autoimmun Rev*, 2009. **8**(4): p. 281-6.
97. Langer, H.F., K. Stellos, C. Steingen, A. Froihofer, T. Schonberger, B. Kramer, B. Bigalke, A.E. May, P. Seizer, I. Muller, F. Gieseke, D. Siegel-Axel, S.G. Meuth, A. Schmidt, H.P. Wendel, W. Bloch and M. Gawaz, *Platelet derived bFGF mediates*

- vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(2): p. 315-25.
98. Ferri, C., G. Valentini, F. Cozzi, M. Sebastiani, C. Michelassi, G. La Montagna, A. Bullo, M. Cazzato, E. Tirri, F. Storino, D. Giuggioli, G. Cuomo, M. Rosada, S. Bombardieri, S. Todesco and G. Tirri, *Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients*. Medicine (Baltimore), 2002. **81**(2): p. 139-53.
99. Ariga, H., H. Ohto, M.P. Busch, S. Imamura, R. Watson, W. Reed and T.H. Lee, *Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. Transfusion, 2001. **41**(12): p. 1524-30.
100. Nelson, J.L., D.E. Furst, S. Maloney, T. Gooley, P.C. Evans, A. Smith, M.A. Bean, C. Ober and D.W. Bianchi, *Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma*. Lancet, 1998. **351**(9102): p. 559-62.
101. Giacomelli, R., P. Cipriani, A. Fulminis, J.L. Nelson and M. Matucci-Cerinic, *Gamma/delta T cells in placenta and skin: their different functions may support the paradigm of microchimerism in systemic sclerosis*. Clin Exp Rheumatol, 2004. **22**(3 Suppl 33): p. S28-30.
102. Abraham, D.J., T. Krieg, J. Distler and O. Distler, *Overview of pathogenesis of systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48 Suppl 3**: p. iii3-7.
103. Cerinic, M.M., G. Valentini, G.G. Sorano, S. D'Angelo, G. Cuomo, L. Fenu, S. Generini, S. Cinotti, M. Morfini, A. Pignone, S. Guiducci, A. Del Rosso, R. Kalfin, D. Das and F. Marongiu, *Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis*. Semin Arthritis Rheum, 2003. **32**(5): p. 285-95.
104. Manetti, M., S. Guiducci, L. Ibba-Manneschi and M. Matucci-Cerinic, *Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(6A): p. 1241-54.
105. Grigoryev, D.N., S.C. Mathai, M.R. Fisher, R.E. Girgis, A.L. Zaiman, T. Houston-Harris, C. Cheadle, L. Gao, L.K. Hummers, H.C. Champion, J.G. Garcia, F.M. Wigley, R.M. Tuder, K.C. Barnes and P.M. Hassoun, *Identification of candidate*

- genes in scleroderma-related pulmonary arterial hypertension*. *Transl Res*, 2008. **151**(4): p. 197-207.
106. Cipriani, P., S. Guiducci, I. Miniati, M. Cinelli, S. Urbani, A. Marrelli, V. Dolo, A. Pavan, R. Saccardi, A. Tyndall, R. Giacomelli and M.M. Cerinic, *Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis*. *Arthritis and Rheumatism*, 2007. **56**(6): p. 1994-2004.
107. Charles, C., P. Clements and D.E. Furst, *Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies*. *Lancet*, 2006. **367**(9523): p. 1683-91.
108. Arnett, F.C., *Is scleroderma an autoantibody mediated disease?* *Curr Opin Rheumatol*, 2006. **18**(6): p. 579-81.
109. Hussein, M.R., H.I. Hassan, E.R. Hofny, M. Elkholy, N.A. Fatehy, A.E. Abd Elmoniem, A.M. Ezz El-Din, O.A. Afifi and H.G. Rashed, *Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis*. *J Clin Pathol*, 2005. **58**(2): p. 178-84.
110. Sakkas, L.I. and C.D. Platsoucas, *Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease?* *Arthritis and Rheumatism*, 2004. **50**(6): p. 1721-33.
111. Giacomelli, R., M. Matucci-Cerinic, P. Cipriani, I. Ghersetich, R. Lattanzio, A. Pavan, A. Pignone, M.L. Cagnoni, T. Lotti and G. Toniatti, *Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients*. *Arthritis and Rheumatism*, 1998. **41**(2): p. 327-34.
112. Kahaleh, M.B., P.S. Fan and T. Otsuka, *Gammadelta receptor bearing T cells in scleroderma: enhanced interaction with vascular endothelial cells in vitro*. *Clin Immunol*, 1999. **91**(2): p. 188-95.
113. Prescott, R.J., A.J. Freemont, C.J. Jones, J. Hoyland and P. Fielding, *Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma*. *J Pathol*, 1992. **166**(3): p. 255-63.
114. Tan, F.K., X. Zhou, M.D. Mayes, P. Gourh, X. Guo, C. Marcum, L. Jin and F.C. Arnett, Jr., *Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(6): p. 694-702.

115. Abraham, D.J. and J. Varga, *Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models*. Trends Immunol, 2005. **26**(11): p. 587-95.
116. Doucet, C., D. Brouty-Boye, C. Pottin-Clemenceau, G.W. Canonica, C. Jasmin and B. Azzarone, *Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2129-39.
117. McGaha, T.L., M. Le, T. Koder, C. Stoica, J. Zhu, W.E. Paul and C.A. Bona, *Molecular mechanisms of interleukin-4-induced up-regulation of type I collagen gene expression in murine fibroblasts*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(8): p. 2275-84.
118. Abraham, D.J., B. Eckes, V. Rajkumar and T. Krieg, *New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma*. Curr Rheumatol Rep, 2007. **9**(2): p. 136-43.
119. Uitto, J. and D. Kouba, *Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases*. J Dermatol Sci, 2000. **24 Suppl 1**: p. S60-9.
120. Yurovsky, V.V., P.A. Sutton, D.H. Schulze, F.M. Wigley, R.A. Wise, R.F. Howard and B. White, *Expansion of selected V delta 1+ gamma delta T cells in systemic sclerosis patients*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 881-91.
121. Riccieri, V., G. Parisi, A. Spadaro, R. Scrivo, F. Barone, T. Moretti, G. Bernardini, R. Strom, E. Taccari and G. Valesini, *Reduced circulating natural killer T cells and gamma/delta T cells in patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 2005. **32**(2): p. 283-6.
122. Nakata, M., M.J. Smyth, Y. Norihisa, A. Kawasaki, Y. Shinkai, K. Okumura and H. Yagita, *Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood gamma/delta T cells: implication for their cytotoxic role in vivo*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1877-80.
123. Ohtsuka, T., *Effect of gammadelta T cell supernatant on human skin fibroblast proliferation and collagen production--possible role of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor*. Int J Dermatol, 2008. **47**(11): p. 1135-40.
124. White, B. and V.V. Yurovsky, *Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **756**: p. 382-91.

125. Bendersky, A., N. Markovits and I. Bank, *Vgamma9+ gammadelta T cells in systemic sclerosis patients are numerically and functionally preserved and induce fibroblast apoptosis*. Immunobiology, 2010. **215**(5): p. 380-94.
126. Baraut, J., L. Michel, F. Verrecchia and D. Farge, *Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **10**(2): p. 65-73.
127. Druet, P., R. Sheela and L. Pelletier, *Th1 and Th2 cells in autoimmunity*. Chem Immunol, 1996. **63**: p. 138-70.
128. Needleman, B.W., F.M. Wigley and R.W. Stair, *Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma*. Arthritis and Rheumatism, 1992. **35**(1): p. 67-72.
129. Giacomelli, R., P. Cipriani, R. Lattanzio, M. Di Franco, M. Locanto, I. Parzanese, A. Passacantando, A. Ciocci and G. Tonietti, *Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and correlate with serological and clinical features of the disease*. Clin Exp Immunol, 1997. **108**(1): p. 42-6.
130. *Preliminary Criteria for the Classification of Systemic-Sclerosis (Scleroderma)*. Arthritis and Rheumatism, 1980. **23**(5): p. 581-590.
131. Kahaleh, M.B., G.K. Sherer and E.C. Leroy, *Endothelial Injury in Scleroderma*. Journal of Experimental Medicine, 1979. **149**(6): p. 1326-1335.
132. Corriveau, M.P., I. Boufaied, J. Lessard, S. Chabaud, J.L. Senecal, T. Grodzicky, S. Chartier, Y. Raymond and V.J. Moulin, *The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach*. J Pathol, 2009. **217**(4): p. 534-42.
133. Elhai, M., C. Meune, J. Avouac, A. Kahan and Y. Allanore, *Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(6): p. 1017-26.
134. Steen, V.D. and T.A. Medsger, Jr., *Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma*. Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(11): p. 2437-44.

135. Mayes, M.D., J.V. Lacey, Jr., J. Beebe-Dimmer, B.W. Gillespie, B. Cooper, T.J. Laing and D. Schottenfeld, *Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(8): p. 2246-55.
136. Crispin, J.C., M. Oukka, G. Bayliss, R.A. Cohen, C.A. Van Beek, I.E. Stillman, V.C. Kytтарыs, Y.T. Juang and G.C. Tsokos, *Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8761-6.
137. Roark, C.L., P.L. Simonian, A.P. Fontenot, W.K. Born and R.L. O'Brien, *gammadelta T cells: an important source of IL-17*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 353-7.
138. Giovannetti, A., M. Pierdominici, A. Di Iorio, R. Cianci, G. Murdaca, F. Puppo, F. Pandolfi and R. Paganelli, *Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(3): p. 253-68.
139. Kalogerou, A., E. Gelou, S. Mountantonakis, L. Settas, E. Zafiriou and L. Sakkas, *Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(8): p. 1233-5.
140. Roumm, A.D., T.L. Whiteside, T.A. Medsger, Jr. and G.P. Rodnan, *Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations*. Arthritis and Rheumatism, 1984. **27**(6): p. 645-53.
141. Kraling, B.M., G.G. Maul and S.A. Jimenez, *Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages*. Pathobiology, 1995. **63**(1): p. 48-56.
142. Holcombe, R.F., B.A. Baethge, R.E. Wolf, K.W. Betzing and R.M. Stewart, *Natural killer cells and gamma delta T cells in scleroderma: relationship to disease duration and anti-Scl-70 antibodies*. Ann Rheum Dis, 1995. **54**(1): p. 69-72.
143. Gustafsson, R., T.H. Totterman, L. Klareskog and R. Hallgren, *Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 1990. **49**(1): p. 40-5.

144. Sallusto, F., J. Geginat and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**: p. 745-63.
145. Geginat, J., F. Sallusto and A. Lanzavecchia, *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4⁺ T cells*. Pathol Biol (Paris), 2003. **51**(2): p. 64-6.
146. Seleznik, G.M., T. Reding, F. Romrig, Y. Saito, A. Mildner, S. Segerer, L.K. Sun, S. Regenass, M. Lech, H.J. Anders, D. McHugh, T. Kumagi, Y. Hiasa, C. Lackner, J. Haybaeck, E. Angst, A. Perren, M.L. Balmer, E. Slack, A. Macpherson, M.G. Manz, A. Weber, J.L. Browning, M.C. Arkan, T. Rulicke, A. Aguzzi, M. Prinz, R. Graf and M. Heikenwalder, *Lymphotoxin beta Receptor Signaling Promotes Development of Autoimmune Pancreatitis*. Gastroenterology, 2012. **143**(5): p. 1361-74.
147. Kamiyama, T., H. Watanabe, M. Iijima, A. Miyazaki and S. Iwamoto, *Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells*. J Dermatol, 2012. **39**(10): p. 838-42.
148. Blanco, P., V. Pitard, J.F. Viallard, J.L. Taupin, J.L. Pellegrin and J.F. Moreau, *Increase in activated CD8⁺ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism, 2005. **52**(1): p. 201-11.
149. O'Garra, A., L. Steinman and K. Gijbels, *CD4⁺ T-cell subsets in autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(6): p. 872-83.
150. Giacomelli, R., P. Cipriani, A. Fulminis, G. Barattelli, M. Matucci-Cerinic, S. D'Alo, G. Cifone and G. Tonietti, *Circulating gamma/delta T lymphocytes from systemic sclerosis (SSc) patients display a T helper (Th) 1 polarization*. Clin Exp Immunol, 2001. **125**(2): p. 310-5.
151. Spoelstra, F.M., D.S. Postma, H. Hovenga, J.A. Noordhoek and H.F. Kauffman, *Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts*. Eur Respir J, 1999. **14**(4): p. 759-66.
152. Luger, T.A., R.S. Bhardwaj, S. Grabbe and T. Schwarz, *Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones*. J Dermatol Sci, 1996. **13**(1): p. 5-10.

153. Gourh, P., F.C. Arnett, S. Assassi, F.K. Tan, M. Huang, L. Diekman, M.D. Mayes, J.D. Reveille and S.K. Agarwal, *Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(5): p. R147.
154. Baraut, J., D. Farge, F. Jean-Louis, H. Kesmandt, C. Durant, F. Verrecchia and L. Michel, [*Cytokines in systemic sclerosis*]. *Pathol Biol (Paris)*, 2012. **60**(2): p. 127-39.
155. Chomarat, P., J. Kjeldsen-Kragh, A.J. Quayle, J.B. Natvig and P. Miossec, *Different cytokine production profiles of gamma delta T cell clones: relation to inflammatory arthritis*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(9): p. 2087-91.
156. Kahaleh, M.B. and E.C. LeRoy, *Interleukin-2 in scleroderma: correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration*. *Ann Intern Med*, 1989. **110**(6): p. 446-50.