Mariana Dias Batista

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

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho

Coorientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Batista, Mariana Dias

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

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

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Coorientador: Esper Georges Kallas.

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

USP/FM/DBD-348/12

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao Thiago e à Alice.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

LISTA DE FIGURAS

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

Manuscrito 4.1

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

Manuscrito 4.2

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

LISTA DE TABELAS

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

RESUMO

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

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

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

SUMMARY

Batista MD. *Innate and adaptive features of the immune system in psoriasis: phenotypic and functional analyses of natural killer cells and T cells* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUCTION: Psoriasis is a hyper-proliferative inflammatory disease of the skin in which immunological mechanisms play a direct role in disease pathogenesis. CD57 is a marker of replicative inability and immunosenescence on CD8⁺ T cells and its expression is increased in a number of inflammatory conditions. CD57 is also expressed by NK cells and is considered a marker of NK cell maturity, being acquired by more differentiated CD56⁺CD16⁺ NK cells. The expression of CD57 and other NK cell markers in psoriasis has not been thoroughly investigated. **OBJECTIVES:** This study sought to examine the phenotype of NK cells in skin biopsies and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with psoriasis and healthy controls. We also investigated the phenotype and functional characteristics of T cells from psoriasis patients, comparing lesional and unaffected skin. **METHODS:** CD56⁺CD16⁻ and CD56⁺CD16⁺ NK cells were isolated from lesional skin, unaffected skin and PBMC of psoriasis patients, and normal skin and PBMC from healthy controls. The expression of CD57, NKG2A, and NKG2C was assessed by flow cytometry. CD57 expression was also determined on T cells from lesional and unaffected skin by flow cytometry. We assessed functional characteristics of T cells by evaluating the secretion of several inflammatory cytokines (IL-17A, IFN- γ , IL-2, IL-33, TNF- α , IL-21, IL-22 and IL-27), from cell-sorted purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from lesional and unaffected skin of psoriasis patients, by multiplex assays. **RESULTS:** NK cells in psoriasis skin lesions exhibited a distinct phenotype, with CD57 expression significantly reduced and NKG2A expression increased on NK cells in lesional and unaffected skin compared to controls. In relation to T cells, we observed that the frequency of CD57⁺CD4⁺ and CD57⁺CD8⁺ T cells was significantly increased in unaffected skin of psoriasis patients compared to lesional skin. Sorted CD4⁺ T cells from psoriasis lesional skin produced higher levels of IL-17A, IL-22 and IFN- γ compared to unaffected skin. CD8⁺ T cells isolated from lesional skin produced higher levels of IL-17A, IFN- γ , TNF- α and IL-2 compared to unaffected skin. **CONCLUSIONS:** These data suggest that NK cells in psoriasis lesions exhibit an immature phenotype, that has been previously associated with higher functional abilities, and could implicate NK cells in psoriasis pathogenesis. For T cells, the findings of this study suggest lower survival of cells with low replicative ability in lesional skin, due to the local inflammatory environment or to the high cellular turnover in psoriasis.

Key words: psoriasis, innate immunity, natural killer cells, CD57, adaptive immunity, cytokines, NKG2A

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e histopatológicos

A psoríase é doença inflamatória cutânea caracterizada por aumento do *turnover* celular, diminuição da diferenciação de queratinócitos e desequilíbrio imunológico (1). Sua prevalência varia entre 2 e 3% da população (2) e caracteriza-se por pápulas e placas eritematosas recobertas por escamas branco-acinzentadas (1, 3). As escamas resultam de epiderme hiperproliferativa, que se inicia com aumento do índice mitótico dos queratinócitos basais, seguido por maturação prematura de queratinócitos na camada espinhosa, e retenção dos núcleos na camada córnea, levando ao achado histopatológico característico de paraqueratose (1, 4). Em decorrência do caráter hiperproliferativo da doença, o turnover epidérmico, que na pele normal é estimado em 40 dias, está acelerado para 4-6 dias na psoríase (5, 6). A forma mais comum da doença, denominada psoríase vulgar, ocorre em 85-90% dos pacientes; outras variantes clínicas incluem a psoríase em gotas ou gutata e a psoríase pustulosa (3). Sua causa é multifatorial, com contribuição de efeitos ambientais em indivíduos geneticamente predispostos, havendo diversos fatores desencadeantes, que incluem estresse (7, 8), medicações como lítio, antimaláricos, indometacina e beta-bloqueadores (9), doenças infecciosas recentes (especialmente para a forma gutata) (7), fumo (10), alta ingestão de álcool (11) e ferimentos cutâneos (fenômeno de Koebner). A psoríase pode evoluir com comprometimento articular, que ocorre em 5 a 40% dos pacientes (12, 13). Embora a psoríase não acarrete risco de vida, tem curso crônico e impacta diretamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos, que têm maior risco de isolamento social e depressão (14-16). Pacientes com psoríase apresentam síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e neoplasias em prevalência aumentada, que apontam para o caráter inflamatório sistêmico da doença (3, 17, 18).

O estudo de aspectos imuno-patológicos da psoríase contribui para a elucidação de possíveis fatores causais e colabora para o desenvolvimento de arsenal terapêutico.

1.2 Fatores Genéticos

O estudo dos genes implicados na susceptibilidade à doença pode elucidar mecanismos patogénéticos e apontar alternativas terapêuticas (19). O principal determinante genético da psoríase está localizado na região do MHC do cromossomo 6, no *locus PSORS1* (20, 21), porém 9 *loci* cromossômicos podem ser associados à psoríase, denominados *PSORS1* a *PSORS9* (22). Nesta região, o *HLA-C*06:02* está mais intensamente associado à psoríase (23). Há grande variabilidade genética entre os subtipos de psoríase, com maior associação do gene *PSORS1* à forma gutata da doença (24). Entre populações de caucasianos, o alelo HLA-Cw6 confere maior efeito genético, especialmente em casos de psoríase de início recente (25, 26).

Múltiplos outros *loci* já foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento da psoríase, incluindo polimorfismos nos genes do receptor de IL-23 e seu ligante, IL-12B (27-29), além de outros genes, como CDKAL1, associado também à doença de Crohn e *diabetes mellitus*, ADAM33, PTPN22 (30-32) e outros, principalmente associados ao eixo IL-23/IL-17, a via NF-κB, e o complexo de diferenciação epidérmico (29, 33). Recentemente, mutações no gene CARD14, que codifica um regulador epidérmico de NF-κB, foram associadas à psoríase, e correspondem ao *locus PSORS2*. Queratinócitos que contêm essas mutações são capazes de incitar resposta inflamatória a partir da ativação de genes responsivos a NF-κB (34, 35).

A complexidade da genética da psoríase levou ao desenvolvimento de escores de risco genético globais (*global genetic risk scores*), que levam em conta o risco associado a diversos *loci* potencialmente implicados, com aumento na capacidade preditiva de doença (36). Neste sentido, na psoríase há dominância do HLA-C como fator de risco, uma vez que esse teve isoladamente risco equivalente a outros 9 *loci* combinados em estudo de escore de risco genético global (37).

A associação entre HLA-C e psoríase é interessante a partir da perspectiva de implicar as células *natural killer* (NK) na patogênese da doença. Os alelos do HLA-C codificam ligantes para os receptores KIR (*Killer Cell Immunoglobulin Receptors*) expressos por células NK. A interação entre HLA-C e KIR foi investigada na

psoríase, e há associação entre a expressão do receptor ativador de células NK KIR2DS1 com psoríase vulgar e artrite psoriática (38, 39).

1.3 Sistema Imune e Psoríase

Apesar da importância das alterações epiteliais na psoríase, a contribuição de alterações do sistema imune para a patogênese da doença é evidente. Células T e dendríticas presentes em grandes números nas lesões psoriáticas, aliadas ao sucesso terapêutico obtido com drogas imunossupressoras falam fortemente a favor do conceito de doença inflamatória imuno-mediada (1). A interação entre fatores ambientais desencadeantes em indivíduos geneticamente predispostos inicia uma cascata de eventos que englobam tanto mecanismos da imunidade inata como adaptativa, e culminam com a ativação da doença.

1.3.1 Imunidade Inata

1.3.1.1 Células dendríticas plasmocitóides, queratinócitos, células NKT

Após a exposição da epiderme aos fatores desencadeantes (infecções, estresse, fumo, drogas, trauma), os queratinócitos lesados liberam catelicidina LL-37 e outros peptídeos antimicrobianos, como beta-defensinas e psoriasina (S100A7), envolvidos na função de barreira e defesa da pele (40, 41). Peptídeos antimicrobianos também podem ser produzidos por bactérias comensais da pele como *Staphylococcus epidermidis*, e na psoríase alterações da flora microbiana poderiam aumentar a expressão de catelicidinas e beta-defensinas que contribuem para o processo inflamatório (41). Os peptídeos antimicrobianos se complexam a fragmentos de DNA ou RNA próprios, liberados na pele após lise ou morte celular (42, 43). Estes complexos de DNA/RNA próprios associados a LL-37 podem ativar células dendríticas plasmocitóides a produzir IFN- α , de maneira dependente de TLR-9. Assim, o DNA do hospedeiro pode se transformar em estímulo pró-inflamatório que quebra a tolerância imunológica, contribuindo para a cascata inflamatória (43). LL-37 também pode induzir aumento da expressão de TLR-9 por queratinócitos, e em queratinócitos expostos ao ligante de TLR-9 CpG DNA, a produção de IFN tipo I é aumentada por LL-37 (44).

As células dendríticas plasmocitóides estão presentes e ativadas em lesões precoces de psoríase, e o IFN- α pode agir como indutor de lesões de psoríase (45). Além da ativação por peptídeos antimicrobianos, as células dendríticas plasmocitóides podem ser ativadas por outros mecanismos. A interação entre a quemerina e seu ligante, o receptor ChemR23 (também conhecido como CMKLR1- *chemokine-like receptor 1*), é responsável pela migração de células dendríticas plasmocitóides para os tecidos. A expressão de quemerina está aumentada em fibroblastos dérmicos, mastócitos e células endoteliais nas fases iniciais da psoríase, em paralelo à infiltração de células dendríticas plasmocitóides e neutrófilos. Por outro lado, lesões crônicas de psoríase têm baixa expressão de quemerina (46). A histamina também pode influenciar a migração das células dendríticas plasmocitóides para a pele lesional na psoríase, em resposta à estimulação do receptor de histamina H4R (47).

Os queratinócitos têm papel fundamental na patogênese da psoríase. Além de sua diferenciação alterada acarretar hiperplasia epidérmica e paraqueratose, também funcionam como efetores diretos da resposta imune (48). Os queratinócitos respondem às citocinas presentes nas lesões de psoríase (IFN- γ , TNF- α , IL-17) através da produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e expressão quimiocinas, como CCL20, CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que induzem a migração de células dendríticas mielóides e células T efectoras para as lesões (48, 49). IL-17 e IL-22, presentes no ambiente inflamatório da psoríase, aumentam a produção de peptídeos antimicrobianos por queratinócitos, e assim intensificam a resposta inflamatória (50).

Outro tipo celular que pode ter participação na resposta imune inata na psoríase são as células *natural killer* T (NKT). Estas células são linfócitos que além de expressarem o receptor de células T (TCR), expressam também moléculas clássicas de células NK, como CD56, CD16, CD161 e CD94 (51). São ativadas por antígenos glicolipídicos apresentados pela molécula CD1d. O CD1d pode ser expresso por queratinócitos, e na psoríase na pele lesional sua expressão está aumentada (52). A cultura concomitante de células NKT com queratinócitos leva à produção de grandes quantidades de IFN- γ , podendo contribuir para o ambiente inflamatório na psoríase (52). Há evidências que apontam para a presença de números aumentados de células NKT nas lesões de psoríase, porém os mecanismos patogénéticos ainda não foram totalmente elucidados (51).

1.3.1.2 Células *natural killer* (NK)

1.3.1.2.1 Desenvolvimento, diferenciação e aspectos funcionais de células NK

As células *natural killer* (NK) são linfócitos tradicionalmente classificados como pertencentes à resposta imune inata, por sua capacidade de responder rapidamente às células alvo tumorais ou infectadas por vírus sem necessidade de sensibilização prévia (53). São caracterizadas pelo fenótipo CD3- CD56+ (54). Assim como células T e B, as células NK são provenientes de células progenitoras linfóides, e dependem de citocinas como IL-15 para seu desenvolvimento e maturação (55). A partir de células NK imaturas, apenas aquelas que se tornam tolerantes a antígenos próprios no processo de maturação são capazes de desempenhar função efetora na periferia (56). As células NK migram para locais de infecção ou inflamação em resposta à expressão aumentada de quimiocinas, e produzem níveis consideráveis de IFN- γ e TNF- α em resposta a estímulos mediados por receptores ativadores ou citocinas pró-inflamatórias (57). Além de sua capacidade de produção de citocinas, as células NK têm em comum com as células T CD8+ a capacidade citotóxica mediada por perforina e granzimas (53, 57).

As células NK expressam um repertório heterogêneo de receptores inibitórios e ativadores, que são responsáveis pelo seu processo de maturação e pela regulação de sua função efetora na periferia (58). Dentre os receptores expressados, encontram-se as lectinas tipo C, que incluem o receptor inibitório NKG2A e o receptor ativador NKG2C, além do receptor ativador NKG2D, cujos ligantes são as moléculas MICA e MICB (59). Os receptores NKG2A e NKG2C têm uma ação imunoregulatória através de sua ligação ao HLA-E (60). O receptor inibitório NKG2A se liga ao HLA-E com maior afinidade que o receptor ativador NKG2C, o que determina um resultado predominantemente inibitório nos casos de co-expressão (60, 61). Durante o processo de maturação das células NK, há uma tendência à maior expressão de NKG2C em relação ao NKG2A (62). Outros receptores expressos por células NK incluem receptores de citotoxicidade natural, como NKp46, NKp44, NKp30, e os receptores KIR ativadores ou inibitórios (59).

Dentre os mecanismos centrais de defesa do sistema imune contra células infectadas por vírus, encontra-se o reconhecimento direto por células T citotóxicas através de antígenos apresentados pelo MHC classe I (63). Alguns patógenos desenvolveram mecanismos de evasão, nos quais interferem com o processamento ou apresentação de antígenos, levando à diminuição da expressão da molécula de MHC classe I na superfície, para assim prevenir o reconhecimento e lise por linfócitos T citotóxicos (63). As células NK têm a capacidade de lise de células que não expressam o MHC classe I, sendo importantes na contenção dos mecanismos de evasão viral. Assim, se a célula NK entra em contato com uma célula normal, que expressa a molécula de MHC classe I, seus receptores inibitórios ligam-se à molécula de MHC e previnem a lise. Por outro lado, quando encontram células tumorais ou transformadas por vírus que não expressam a molécula de MHC, não há ligação do receptor inibitório de NK, e há ligação direta de receptores ativadores que determinam a lise da célula alvo (64).

As células NK são divididas em dois subtipos de acordo com sua expressão de CD56 e CD16. O fenótipo CD56bright CD16- representa o subtipo mais imaturo e corresponde a 10% das células NK no sangue periférico, sendo fonte importante de citocinas após o reconhecimento das células-alvo (65). Já as células CD56dim CD16+ correspondem a 90% das células NK no sangue periférico (66). O processo de diferenciação das células NK pode ser caracterizado nas fases mais imaturas pela alta expressão de CD56 em associação ao receptor inibitório NKG2A, sem a presença de CD16, passando para o fenótipo mais diferenciado no qual há expressão de CD56 e CD16 associado a CD57. À medida que as células NK se tornam mais diferenciadas, perdem sua capacidade de replicação *in vitro*. Assim, células NK CD57+ têm baixa capacidade de replicação e são menos responsivas a estímulo por IL-12 e IL-18 que as células NK mais imaturas CD57- (67, 68).

CD57, também conhecido como HNK-1 ou Leu-7, é um glicopéptido presente em glicoproteínas de células do sistema nervoso, como por exemplo moléculas de adesão (69). Em linfócitos, pode ser expresso por células T CD4+ ou CD8+ e por células NK, e sua expressão indica senescência replicativa ou exaustão clonal, que se caracterizam por alta susceptibilidade à morte celular, inabilidade de novos ciclos celulares, com capacidade preservada de secreção de citocinas (70). Outro marcador de senescência em linfócitos inclui a redução da expressão de CD28, porém a expressão de CD57 é considerada mais sensível que os demais marcadores para identificar células com

instabilidade proliferativa (71, 72). A expressão de CD57 se correlaciona diretamente com o número de divisões celulares e inversamente com o comprimento do telômero, e assim denota células que sofreram maior número de divisões (70).

As células senescentes, que expressam CD57, podem se acumular em diversas condições patológicas (69). O acúmulo dessas células, apesar de sua baixa capacidade replicativa, é possível através da alteração de mecanismos de apoptose (72). Células CD57⁺ são mais sensíveis a apoptose espontânea *in vitro* que células CD57⁻, por expressarem Fas/ Fas ligante, porém em condições como a infecção por HIV há redução da apoptose concomitante ao aumento de expressão de CD57 (73). A expressão de receptores inibitórios de NK, como NKG2A, poderia justificar a redução da susceptibilidade das células CD57⁺ à apoptose, por induzir ao aumento da produção da molécula anti-apoptótica Bcl-2 (74, 75).

O conceito de que as células NK participam apenas da resposta imune inata está atualmente em questionamento devido a relatos iniciais de memória em células NK (76). Foi demonstrada expansão clonal de células NK após infecção viral por citomegalovírus (CMV) em camundongos e humanos, e após exposição a haptenos químicos na dermatite de contato alérgica (62, 77, 78). Estas células NK previamente sensibilizadas ao antígeno possuem características de memória, como vida média aumentada e capacidade de mediar respostas imunes secundárias (53). Na infecção murina por CMV, há expansão clonal de células NK que expressam o marcador Ly49H, que se liga de forma específica à molécula m157 presente em células dendríticas infectadas por CMV. Após o período de expansão clonal, estas células NK Ly49H⁺ passam por fase de contração e são capazes de nova resposta nas re-exposições ao vírus (78). Na infecção humana por CMV, observa-se expansão clonal de células NK que expressam NKG2C, o que poderia indicar mecanismo de memória, porém o ligante viral ainda não foi identificado (62). As células NK NKG2C⁺ que expandem após infecção por CMV adquirem CD57 progressivamente e em maior magnitude que células NKG2C⁻, o que poderia denotar que CD57 seria um marcador de células NK que foram levadas a expansão clonal após encontro com patógenos (79, 80). A resposta de memória em células NK está associada a estimulação com combinações de IL-12, IL-15 e IL-18, e células NK pré-ativadas com essas citocinas exibem produções significativamente maiores de IFN- γ em relação àquelas que não sofreram pré-ativação (81). O fenótipo associado à maior produção de IFN- γ após a

pré-ativação *in vitro* incluiu expressão de CD94, NKG2A, NKp46 e CD69, associado à baixa expressão de KIR e CD57 (81).

1.3.1.2.2 Células NK na psoríase

A ação das células NK na patogênese da psoríase é ainda pouco estudada. Células NK são pouco encontradas na pele normal de indivíduos saudáveis (82). Na pele lesional de pacientes com psoríase, células NK foram demonstradas na junção dermo-epidérmica, e poderiam agir sem sensibilização prévia, através da liberação de IFN- γ e, em conjunto com células dendríticas plasmocitóides e mielóides, contribuir para as etapas iniciais do processo de formação das placas (83, 84). Células dendríticas mielóides presentes na psoríase podem contribuir para a ativação de células NK através da secreção de citocinas, especialmente IL-12, potente ativador da produção de IFN- γ por células NK (85), e IL-23, que além de determinar a diferenciação de células T CD4⁺ em Th-17, age sobre células NK induzindo a produção de IL-22, citocina também implicada na patogênese da psoríase (86).

Células NK já foram isoladas na pele lesional na psoríase, e correspondem a 5-8% das células encontradas no infiltrado inflamatório local (84). Essas células pertenciam principalmente ao subtipo CD56bright, correspondendo a células NK mais imaturas com maior capacidade de secreção de citocinas, e expressavam o marcador de ativação CD69. Os sobrenadantes destas células estimuladas por IL-2 determinaram nos queratinócitos a expressão de quimiocinas como CXCL10, CCL5 e CCL20, que são responsáveis pela migração de células NK para a pele. Por sua vez, as células NK presentes nas lesões de psoríase apresentaram alta expressão de CXCR3 e CCR5, ligantes para CXCL10 e CCL5 respectivamente, e moderada expressão de CCR6, ligante de CCL20, o que poderia justificar a migração destas células para a pele (84). Os receptores CXCR3, CCR5 e CCR6 também foram implicados na migração de células NK para a pele na dermatite de contato alérgica (87, 88).

O subtipo de células NK CD56dim CD16⁺ também pode migrar para a pele e outros tecidos em momentos de inflamação. Esta migração, de maneira semelhante às células dendríticas plasmocitóides, é guiada pela interação entre a quemerina e seu receptor, Chem 23 ou CMKLR1, expresso por células NK CD56dim CD16⁺ (89). Na psoríase, foi demonstrada a presença da quemerina na pele lesional, e foi também demonstrada

a migração de células NK CD56dim CD16+ isoladas de PBMCs em resposta à quemerina (90).

Há controvérsias a respeito do comportamento das células NK presentes na circulação nos pacientes com psoríase. Alguns estudos encontraram redução na frequência de células NK CD56bright e CD56dim circulantes em pacientes com psoríase em relação aos controles (83, 91), que poderia decorrer da migração preferencial destas células para os tecidos inflamados, ou de uma menor sobrevivência destas células devido às condições inflamatórias crônicas (91). Por outro lado, outros relatos encontraram níveis normais de células NK circulantes em pacientes com psoríase e controles (88, 90, 92). Nas células NK circulantes de pacientes com psoríase, há aumento da expressão do receptor Fas, que ao se ligar ao seu receptor Fas-ligante induz a apoptose e aumento da produção de TNF- α , citocina chave no processo inflamatório na psoríase (92). Foi também descrita diminuição da expressão de NKG2A em células NK e células T circulantes em casos de psoríase de início recente (até 1 ano de história), enquanto em casos de psoríase crônica em placas foi evidenciado aumento da expressão de NKG2A em células T (92, 93).

1.3.2 Imunidade Adaptativa

1.3.2.1 Células dendríticas mielóides e apresentação de antígeno

Após a ativação inicial das vias de imunidade inata, o IFN- α liberado pelas células dendríticas plasmocitóides ativa outro subtipo de células dendríticas dérmicas, conhecidas como células dendríticas mielóides. Nas lesões de psoríase há números aumentados de células dendríticas mielóides, que ativam células T e têm capacidade pró-inflamatória através da produção de TNF- α e óxido nítrico (94, 95). Células dendríticas mielóides ativadas migram da pele para o linfonodo, para apresentar um antígeno ainda não determinado para células T, levando à diferenciação das células *naïve* a células efectoras, que são capazes de desempenhar citotoxicidade e produção de citocinas (96). Na psoríase, a diferenciação se dá para células CD4+ T helper subtipos 1 e 17 (Th-1 e Th-17, respectivamente), e para células CD8+ T citotóxicas subtipos 1 e 17 (Tc-1 e Tc-17, respectivamente) (97).

A pesquisa do antígeno que desencadeia o processo imune na psoríase levou a diversas hipóteses, ainda sem resultados conclusivos. Algumas evidências apontam para a hipótese de mimetismo molecular, através do qual peptídeos derivados de patógenos, com similaridades a antígenos próprios, ativam células T ou B auto-reativas (98).

A psoríase, em especial a forma gutata, pode ser desencadeada após infecções estreptocócicas. Especula-se se superantígenos possam estar envolvidos nesse processo. SPE-C (exotoxina do *Streptococcus pyogenes* tipo C), que é produzida por cepas de estreptococos isoladas de culturas de secreção faríngea de pacientes com a forma gutata da psoríase, induz a expansão de células T V β 2+, que ao serem ativadas podem expressar o marcador CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*), responsável pela migração para a pele e indução de lesões (99, 100). A partir daí, até 70% dos pacientes com lesões de psoríase em gotas podem evoluir para a psoríase vulgar (101). Isto se deve à permanência de células T ativadas na pele, por mimetismo molecular, através de homologias entre sequências da proteína M estreptocócica e a queratina tipo 1 (102). Superantígenos estafilocócicos como SEB (enterotoxina estafilocócica B) também podem participar da psoríase: sua presença está associada a apresentações clínicas mais graves da doença (103).

1.3.2.2 Células T residentes no tecido

Na primeira exposição a patógenos ou antígenos presentes na pele, as células dendríticas migram para os linfonodos, onde apresentam o antígeno a células T *naïve*, que se diferenciam em células T de memória efetoras, com função de migração para a pele para combate ao antígeno, e células de memória central, que serão ativadas nas exposições subsequentes ao mesmo antígeno (104). As células T de memória efetora que migram para a pele são encontradas em maior concentração no local de exposição ao antígeno, mas estão presentes em toda a superfície cutânea (105).

Essas células T de memória efetoras residem no tecido, não entram em circulação e ficam presentes na pele, preparadas como primeira linha de defesa na exposição a antígenos. Assim, a resposta imune cutânea na re-exposição ao antígeno ocorre através de três mecanismos. Primeiramente, células T de memória efetoras residentes na pele iniciam a resposta diretamente. Além disso, há também o recrutamento de

células T circulantes, que migram para a pele através do aumento de expressão de receptores de adesão vasculares durante a inflamação. Por fim, ocorre a migração de células dendríticas apresentadoras de antígeno para o linfonodo, onde há novo estímulo para a proliferação de células T de memória central, gerando células T de memória efectoras que migrarão para a pele e contribuirão para a resposta imune (104).

Estes conceitos foram demonstrados através de experimentos nos quais se transplantou pele não-afetada de pacientes com psoríase a camundongos imunodeficientes, e se observou a presença de placas psoriáticas típicas, enquanto o transplante de pele normal de indivíduos controles não induziu a formação das lesões (106). O desenvolvimento de placas psoriáticas foi dependente da ativação e proliferação de células T residentes no tecido, presentes mesmo na pele não-afetada, que foram estimuladas a entrar em atividade no local por IFN- α produzido por células dendríticas plasmocitóides em reação ao trauma do transplante (107).

As células T CD4⁺ e CD8⁺ presentes nas lesões de psoríase apresentam fenótipo compatível com memória, por apresentarem a expressão do receptor CD45RO (108). Há expansão seletiva de células T com a mesma especificidade antigênica, caracterizando populações oligoclonais, caracterizadas por aumento da expressão de genes das subfamílias V β 2 e V β 6 do TCR, o que sugere que estas células respondem a um mesmo antígeno ainda não identificado (109). Outros estudos que falam a favor da oligoclonalidade das células T nas lesões de psoríase identificaram restrição no tamanho de subfamílias V β da região complementar determinante 3 (CDR3) do TCR, associadas à expansão oligoclonal de subfamílias V β distintas em cada paciente, o que sugere que para cada paciente um antígeno específico é responsável pela ativação das células T levando às lesões de psoríase (110).

1.3.2.3 Células T CD4⁺: Th-1 e Th-17

A psoríase, assim como outras afecções auto-imunes, foi inicialmente classificada como doença mediada por resposta Th-1, pois há nas lesões grande produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , citocinas classicamente caracterizadas como participantes do espectro Th-1 (111, 112). As células T CD4⁺ naive se diferenciam em células Th-1 quando estimuladas por IL-12, e passam a expressar as quimiocinas CXCR3, CCR5, CXCR6, que direcionam seu padrão migratório (113). A presença de IFN- γ no

ambiente inflamatório da psoríase leva à expressão aumentada de CXCL9, CXCL10 e CXCL11 por queratinócitos, que interagem com o receptor CXCR3 presente em células Th-1 determinando sua migração para as lesões (114).

Mais recentemente, múltiplas evidências enfatizam a importância de outro subgrupo de células T CD4⁺, as células Th-17, na patogênese da psoríase. Após a migração de células dendríticas mielóides da pele para o linfonodo, estas passam a produzir IL-23, que também é produzida por queratinócitos, e participa da diferenciação e proliferação de células Th-17 (115, 116). Além de IL-23, outras citocinas como TGF- β 1, IL-6 e IL-21 são necessárias para a diferenciação de células T CD4⁺ *naïve* para Th-17 (117). A presença de níveis elevados de IL-23 e IL-17 em lesões de psoríase, além da associação de genes relacionados ao receptor de IL-23 com psoríase, apontam a relevância do eixo IL-23/ Th-17 na patogênese da doença (113).

As células Th-17 são estimuladas por IL-23 e podem ser caracterizadas pela expressão de CCR6, CCR4, IL-23R e CD161 (118-120). Produzem IL-17A, IL-17F além de outras citocinas como IL-22 e IL-26 (121). IL-17 está implicada na psoríase, já que os níveis de RNA-mensageiro de IL-17 estão aumentados na pele lesional de pacientes com psoríase em relação aos controles (97). A presença de IL-17 contribui para a liberação de citocinas inflamatórias por queratinócitos, induz angiogênese e expressão de peptídeos antimicrobianos, e leva à expressão de quimiocinas como CCL20, CXCL1, CXCL3 e outras, que contribuem para a migração de neutrófilos para a pele (97, 114, 121). Estudos clínicos recentes com anticorpos monoclonais que bloqueiam especificamente a IL-17 (ixekizumab) ou o seu receptor (brodalumab) encontram-se em fase 2 de experimentação clínica com resultados promissores, o que ressalta a importância desta citocina na patogênese da doença (122, 123).

Outra citocina relevante para a psoríase é a IL-22, que também pode ser produzida por células T CD4⁺ Th-17 ou por células T CD8⁺ (124, 125). IL-22 tem efeitos anti-apoptóticos e indutores de proliferação através da via Stat-3 (126). Seus efeitos na psoríase incluem a indução de proliferação de queratinócitos, através da diminuição da expressão de genes de diferenciação como queratina 1 e filagrina (114). IL-22 pode também induzir peptídeos anti-microbianos como beta-defensinas (127). Na psoríase a expressão de RNA-mensageiro de IL-22 está aumentada na pele lesional e níveis séricos de IL-22 são correlacionados à gravidade da doença (120, 128). O subgrupo

de células T CD4⁺ que produzem IL-22 mas não produzem IL-17 foram denominadas Th-22, e podem também participar da patogênese da psoríase (129).

As células T CD4⁺ podem também produzir IL-21, cuja expressão está aumentada na pele lesional de pacientes com psoríase (130). A IL-21 pode também ser produzida por células NKT, e níveis séricos elevados de IL-21 estão associados com a gravidade da psoríase (130, 131). O receptor de IL-21 é expresso por queratinócitos, células T e B, e também por células NK. Assim, IL-21 poderia contribuir para a ativação desses outros grupos celulares na psoríase (130).

Outras citocinas possivelmente implicadas na patogênese da psoríase são IL-27, produzida por células apresentadoras de antígeno, e IL-33, produzida principalmente por células endoteliais (132, 133). Pacientes com psoríase apresentam aumento dos níveis séricos de IL-27 em relação a controles saudáveis, que se correlacionam com a gravidade da doença, e IL-27 induz diferenciação Th-1 enquanto suprime diferenciação Th-2 e Th-17 (132). A expressão de mRNA de IL-33 está aumentada na pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase, e poderia estimular mastócitos localmente (133).

1.3.2.4 Células T CD8⁺: Tc-1 e Tc17

Células T CD8⁺ localizam-se preferencialmente na epiderme e derme papilar de pacientes com psoríase (134). A migração das células T CD8⁺ da derme para a epiderme depende da interação entre a integrina $\alpha 1\text{-}\beta 1$, presente nas células T e o colágeno tipo IV, presente na membrana basal, e é considerada evento chave na patogênese da psoríase (1). Células T CD8⁺ presentes na epiderme podem contribuir para a patogênese da psoríase através do reconhecimento de antígenos próprios ou externos presentes localmente, com contribuição para o processo inflamatório (125).

Células T CD8⁺ que expressam IL-17 estão presentes em número aumentado nas lesões de psoríase, e produzem TNF- α , IFN- γ , IL-22 e IL-21 (125, 135). Células T CD8⁺ IL-17⁺, denominadas Tc-17, têm características fenotípicas e funcionais semelhantes às células Th-17, enquanto células T CD8⁺ IL-17⁻ são mais semelhantes às células Th-1 (135). Foi também demonstrada em frequência aumentada nas lesões de psoríase a presença de células T CD8⁺ que expressam IL-22 (125).

As células T CD8⁺ podem apresentar expressão de marcadores específicos que denotam exaustão clonal e estimulação antigênica crônica. Após múltiplas divisões celulares, as células tornam-se incapazes de manter as mitoses, e passam a expressar CD57 (69). Células T CD8⁺ expressam CD57 em diversas condições de ativação imunológica crônica, como infecções virais, doenças inflamatórias e malignidades, além de aumentarem após exercício físico intenso e no processo natural de envelhecimento (136-140). Apesar de não serem capazes de proliferação e terem sobrevivência limitada, as células T CD8⁺CD57⁺ mantêm sua capacidade citotóxica, já que apresentam aumento da expressão de genes de citotoxicidade, como perforina, granulolisina e granzima B, além de serem capazes de alta produção de IFN- γ e TNF- α após estimulação, sendo possivelmente destinadas a migrar para tecidos não-linfóides (69, 70, 141, 142). Estas características determinam a senescência replicativa que ocorre em condições de ativação celular crônica, como a infecção pelo HIV (70). Alteração dos mecanismos de apoptose poderia justificar a expansão dessas células CD57⁺ em condições de estimulação antigênica crônica. A *heat shock protein 27* (HSP-27) é proteína protetora contra o estresse celular, e sua produção está diminuída em células CD8⁺CD57⁺ em relação às células CD8⁺CD57⁻. Esta diminuição de HSP-27 em linfócitos mais maduros poderia justificar o aumento de susceptibilidade dessas células à morte celular induzida por ativação, um dos mecanismos clássicos de apoptose (72). A presença e função de células T CD8⁺ CD57⁺ na psoríase não é bem conhecida.

A figura 1.1 sintetiza os diversos mecanismos que convergem para a patogênese da psoríase.

Figura 1.1 Mecanismos patogênicos na psoríase. Indivíduos geneticamente predispostos, quando expostos a fatores desencadeantes, iniciam processo de ativação dos queratinócitos, que culmina com a liberação de IFN- α por células dendríticas plasmocitóides, que por sua vez estimulam células dendríticas mielóides a apresentar antígeno ainda não determinado para células T *naïve*. Estas por sua vez, sob estímulo de IL-12, se diferenciam para a via Th-1, com expressão de CXCR3 e CLA, e migram para a pele. Por outro lado, células T *naïve* sob o estímulo de IL-23 se diferenciam em células Th-17, que expressam CLA, CCR6 e CCR4 e também contribuem para a patogênese da doença. Adaptado de: Nestle, 2009 e Nograles, 2008.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

2.1.1 Investigar se o fenótipo de células NK e células T na psoríase é compatível com imuno-senescência e maior capacidade efetora

2.1.2 Avaliar características funcionais de células T na psoríase

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a expressão do marcador de imunosenescência CD57, do marcador inibitório de células NK NKG2A e do marcador ativador de células NK NKG2C em células T e células NK isoladas de pele lesional, não afetada e células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com psoríase, comparadas àquelas isoladas de pele e CMSP de controles sadios

2.2.2 Avaliar a produção das citocinas IL-17A, IL-22, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-21, IL-27 e IL-33 por células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas da pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase, após expansão em cultura e estímulo com mitógenos.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Os pacientes foram recrutados no Serviço de Dermatologia do *San Francisco General Hospital*, na Universidade da Califórnia, São Francisco, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa daquela instituição e da Universidade de São Paulo (anexos A e B). Todos os pacientes participantes do estudo preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo C). Na primeira fase de recrutamento, foram incluídos 12 pacientes (P1 a P12), que participaram da porção fenotípica do estudo. Em uma fase subsequente, foram incluídos outros 13 pacientes (F1 a F13), que participaram da porção de ensaios funcionais de células T, conforme demonstra a tabela 3.1.

Tabela 3.1- Características amostrais e demográficas dos pacientes

Paciente	Sexo	Idade	Subtipo de psoríase	Gravidade	Amostras Coletadas	Fatores Predisponentes	Tempo desde o diagnóstico (anos)
P1	M	22	vulgar	moderada	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	estresse/ trauma cutâneo	10
P2	F	35	gutata	moderada	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	nenhum	27
P3	M	61	vulgar	moderada	sangue	trauma cutâneo/ inverno	3
P4	F	84	gutata	grave	sangue	estresse/ inverno	20
P5	M	67	gutata	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	nenhum	7
P6	M	44	gutata	leve	pele lesional/ pele não afetada	estresse	24
P7	M	21	gutata	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	inverno	1
P8	F	41	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	estresse/ consumo de álcool/ inverno	11
P9	M	37	gutata	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	inverno	1
P10	M	67	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	nenhum	9
P11	M	52	gutata	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	nenhum	40
P12	M	61	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	estresse	10
F1	M	50	vulgar	grave	pele lesional/ pele não afetada	estresse	5
F2	F	53	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada	estresse/ inverno	38
F3	M	68	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada	estresse	3
F4	F	53	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada	trauma cutâneo/ inverno	50
F5	M	40	vulgar	moderada	pele lesional/ pele não afetada	estresse/ inverno/ trauma cutâneo	12
F6	M	46	vulgar	moderada	pele lesional/ pele não afetada	nenhum	14
F7*	F	54	vulgar	moderada	pele lesional/ pele não afetada	estresse/ inverno	12
F8	F	27	vulgar	grave	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	estresse/ inverno/ gravidez	8
F9	M	60	vulgar	moderada	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	nenhum	42
F10	F	58	vulgar	moderada	pele lesional/ pele não afetada/ sangue	inverno	37
F11	F	48	vulgar	leve	pele lesional/ pele não afetada	estresse/ inverno/ período pré-menstrual	32
F12	F	55	vulgar	grave	pele lesional/ pele não afetada	estresse/ trauma cutâneo	50
F13	F	32	vulgar	grave	pele lesional/ pele não afetada	estresse	19

Os pacientes apresentavam diagnóstico de psoríase em placas ou gutata, com gravidade classificada com base na área de superfície corporal afetada (*body surface affected area*- BSA), da seguinte maneira: leve- menos de 5%, moderada- 5 a 30%, grave- mais de 30%. Os pacientes tinham o diagnóstico de psoríase há pelo menos 1 ano, estavam sem tratamento tópico ou sistêmico há pelo menos 6 meses, e foram recrutados durante sua primeira consulta no Serviço de Dermatologia. Foram excluídos pacientes que apresentassem outras doenças auto-imunes e infecção pelo

HIV, ou que estivessem em qualquer tipo de tratamento tópico ou sistêmico para a psoríase. Foram coletadas amostras de sangue, pele lesional e pele não afetada dos pacientes. Para a porção fenotípica do estudo, foi possível coletar amostras pareadas de pele lesional, não afetada e sangue de 9 dos 12 pacientes. Para os 3 outros pacientes, coletou-se apenas sangue ou pele, conforme indica a tabela 1. Quando na citometria os números de células identificados após o *gating* eram muito pequenos (abaixo de 30 eventos) os pacientes foram excluídos das análises, conforme demonstram as figuras nos resultados. Na porção funcional do estudo, foram coletadas amostras de pele lesional e não afetada de 13 pacientes, e amostras pareadas de sangue de 3 (tabela 3.1). Foi excluído um paciente da porção funcional do estudo (F7) devido a baixa pureza após o *sorting* celular.

As amostras de sangue de 10 controles sadios foram obtidas após consentimento no Banco de Sangue de Stanford. A mediana de idade dos controles foi de 45 anos, conforme demonstra a tabela 3.2. As amostras de pele normal de 3 controles sadios foram obtidas de tecido descartado após abdominoplastia, em pacientes sem histórico de psoríase ou outras afecções inflamatórias.

Tabela 3.2- Características amostrais e demográficas dos controles

Controles	Sexo	Idade
C1	M	50
C2	F	49
C3	F	63
C4	desconhecido	desconhecida
C5	M	45
C6	M	31
C7	M	59
C8	M	33
C9	F	29
C10	F	28

3.2 Processamento de amostras de pele

As amostras de pele foram coletadas através de biópsia com *punch* de 4mm, uma realizada na borda de lesão ativa de psoríase, e outra em pele não afetada localizada a pelo menos 5 cm de distância das lesões ativas. As amostras foram incubadas em RPMI-1640 com collagenase/dispase na concentração de 1 mg/ml (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), associadas a 10 unidades/ml de DNase I recombinante

(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), a 37°C por 15 minutos, e posteriormente a 4°C durante 8 horas. Após este período, foi realizada a separação mecânica entre a epiderme e a derme, e a epiderme foi tratada com tripsina e EDTA (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em tampão fosfato (PBS), a 37°C por 15 minutos.

Para determinar se havia necessidade de cultura para isolar as células linfomonocitárias da pele, após a separação entre epiderme e derme, foi realizado experimento com amostras de pele normal proveniente de abdominoplastia, no qual se comparou células provenientes da etapa de digestão com colagenase sem tempo nenhum de cultura com outros dois grupos: células cultivadas por 48 horas e por 7 dias. Conforme demonstra a figura 3.1, determinou-se que a melhor viabilidade e separação de células linfomonocitárias se deu no período de 48 horas de cultura.

Figura 3.1 – Determinação do tempo de cultura das células isoladas da pele. A- Citometria realizada a fresco sem cultura. B- 48 horas de cultura. C- 7 dias de cultura

Assim, nas amostras dos pacientes, após a digestão enzimática com colagenase, a epiderme e a derme foram subsequentemente cultivadas separadamente a 37°C por 48 horas, em RPMI-1640 suplementado com soro humano a 10% (Gemini Bio Products, Sacramento, CA, USA), penicilina e estreptomicina a 1%, e tampão HEPES a 1 mol/L (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em placas de cultura de 6 poços. Após esse período, as suspensões celulares foram obtidas filtrando o meio de cultura em filtro de 70 µm (BD, San Jose, CA, USA). Devido aos pequenos números de células obtidos em contagem no hemocítômetro, as células isoladas da epiderme e da derme foram combinadas para produzirem números suficientes para a realização de citometria de

fluxo na porção fenotípica do estudo, e para *sorting* de células T CD4⁺ e CD8⁺ na porção funcional do estudo.

Com o objetivo de determinar se o tratamento com collagenase/dispase poderia alterar o processo de coloração com os fluorocromos para citometria de fluxo, foi realizado experimento no qual se comparou CMSP tratadas com collagenase/dispase com outras que não receberam este tratamento, e após citometria de fluxo não houve diferença entre os grupos.

Foi também realizado experimento piloto com amostra proveniente de abdominoplastia para determinar se a expressão de receptores observada em células isoladas a partir de *punch* de 4mm era representativa da expressão observada após digestão enzimática de amostra maior, de 3x3 cm de pele. Não foi observada diferença entre as amostras, sugerindo que o *punch* de 4mm foi representativo do ambiente inflamatório local.

3.3 Processamento de amostras de sangue

As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacutainer com EDTA, e as CMSP foram isoladas através do gradiente de Ficoll-Hypaque, no período de até 6 horas após a coleta. Após a separação, as CMSP foram lavadas 2 vezes com PBS, e re-suspensas em tampão FACS para citometria de fluxo (PBS com albumina bovina 0.5% e 2mM EDTA).

3.4 Citometria de fluxo

Para a porção fenotípica do estudo, após o isolamento das suspensões celulares, foi realizada fenotipagem para citometria de fluxo. Primeiramente, os receptores Fc nas células foram bloqueados com IgG humana 10 µg/ml (Sigma Aldrich, S. Louis, MI, USA), durante 20 minutos no gelo. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais, descritos na tabela 3.3, por 30 minutos no gelo, depois lavadas duas vezes com tampão FACS, e fixadas com paraformaldeído a 2% (Toussimis, Rockville, MD) em PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo LSR II (BD Biosciences). Por fim, os dados gerados foram analisados através do software FlowJo versão 8.8.6 (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Tabela 3.3- Anticorpos utilizados para citometria de fluxo

Fluorocromo	Anticorpo	Clone	Fator de Diluição	Fornecedor
FITC	CD45	2D1 (HLe-1)	50	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE	NKG2A	131411	10	R&D, Minneapolis, MN, USA
APC	NKG2C	134591	10	R&D, Minneapolis, MN, USA
ECD	CD3	UCHT1	50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
PE-Cy7	CD56	B159	100	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC-Cy7	CD14	M ϕ P9	100	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC-Cy7	CD19	SJ25C1	100	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Pac Blue	CD16	3G8	100	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Alexa 700	CD4	RPA-T4	100	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Qdot605	CD8	3B5	400	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Qdot655	CD57 biotin	NK-1	700	Abcam, Cambridge, MA, USA
Amine Aqua	AARD	/	200	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

As janelas de aquisição (*gating*) utilizadas estão representadas na figura 3.2. Primeiramente, foram selecionadas as células únicas (área e altura do tamanho celular), em seguida foi utilizada a janela de aquisição baseada na granularidade e tamanho celular. Posteriormente, foram excluídas células mortas através de seleção de células Amine-Acqua negativas, e novamente por tamanho e granularidade identificou-se a população de linfócitos. Para identificação mais fidedigna dos linfócitos, foram selecionadas as células CD45+. Posteriormente, em gráfico de CD3 X CD14/CD19, foram selecionadas 2 subpopulações: CD3+CD14-CD19-, para células T, que foram então subdivididas em CD4+ e CD8+, e CD3-CD14-CD19-, para células NK, que foram então subdivididas de acordo com a expressão de CD56 e CD16. Os marcadores CD14 e CD19 foram utilizados para excluir monócitos e linfócitos B, respectivamente.

Figura 3.2- Estratégia de *gating* para citometria de fluxo

3.5 Sorting de células T CD4+ e CD8+

Após o isolamento a fresco de CMSP e de células provenientes das amostras de pele, foi realizada marcação com anticorpos monoclonais, conforme indica a tabela 3.4, por 30 minutos no gelo. As células foram lavadas duas vezes com tampão FACS, e foi realizado *sorting* celular no citômetro FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A estratégia de aquisição realizada envolveu seleção de células únicas, células CD45+, CD3+CD4+ ou CD3+CD8+. No primeiro experimento (n=6), não houve viabilidade das células T CD3+CD4+ após o sorting, e as etapas subsequentes foram realizadas apenas com as células T CD3+CD8+. No segundo experimento (n=7), células T CD3+CD4+ e CD3+CD8+ foram isoladas e utilizadas nas etapas subsequentes. A pureza de todos os procedimentos de sorting foi superior a 95%,

exceto para o paciente F7, cujas amostras obtiveram pureza de 75% e foram excluídas das etapas subsequentes.

Tabela 3.4- Anticorpos utilizados para *sorting* celular

Fluorocromo	Anticorpo	Clone	Fator de Diluição	Fornecedor
FITC	CD45	2D1 (HLe-1)	50	eBioscience, San Diego, CA, USA
ECD	CD3	UCHT1	100	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Alexa 700	CD4	RPA-T4	100	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC-Cy7	CD8	SK1	50	Biolegend, San Diego, CA, USA
Amine Aqua	AARD	/	200	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.6 Cultura de células T

Células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas de pele lesional, não afetada e sangue de pacientes com psoríase foram cultivadas por 8 horas a 37°C e 5% CO₂, numa placa de cultura de 96 poços, fundo em U. Cada amostra foi dividida em dois, e a metade das células foi estimulada com acetato de forbol miristato (PMA) (50ng/ml) e ionomicina (500ng/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e a outra metade das células não recebeu a estimulação. Após o período de 8 horas, a placa foi centrifugada e os sobrenadantes foram retirados. As células foram lavadas com PBS, e meio de cultura contendo IL-2 400 UI/ml foi adicionado. As células foram então para cultura por 7 dias a 37°C e 5% CO₂. No sétimo dia as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram congelados a -20°C para uso subsequente nos ensaios de multiplex.

3.7 Ensaios de Multiplex

A produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17A, IL-22, IL-21, IL-27 e IL-33 foi avaliada através do ensaio de multiplex para citocinas denominado Legendplex (Biolegend, San Diego, CA, USA). Foi montada placa sob encomenda para o ensaio, que continha todas as citocinas simultaneamente. A presença das citocinas foi avaliada nos sobrenadantes coletados após a cultura de células T CD4⁺ e CD8⁺ previamente isoladas por *sorting*. As amostras foram adquiridas no analisador Labscan 200 (Luminex, Austin, TX, USA), utilizando o software Bio-Plex manager versão 6.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Prism versão 4.0a (GraphPad, La Jolla, CA, USA). As análises foram realizadas através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney quando se comparavam 2 grupos, ou do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis quando se comparavam 3 grupos. O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado nas análises de amostras pareadas. Foi utilizado valor mínimo de significância estatística de $p=0.05$. O software SPICE versão 5.2 (Exon NIAID, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para as análises de co-expressão realizadas na porção fenotípica do estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Manuscrito de artigo científico sobre células NK

4.1.1 Folha de Rosto

Title: Skewed Distribution of Natural Killer Cells in Psoriatic Skin Lesions

Running Head: NK Cells in Psoriatic Skin Lesions

Authors: M. D. Batista, MD^{1,2}, E. L. Ho, MD, PhD^{1#}, P. J. Kuebler, PharmD¹, J. M. Milush, PhD¹, L. L. Lanier, PhD³, E. G. Kallas, MD, PhD^{2,4}, V. A. York, BS¹, D. Chang, MD⁵, W. Liao, MD⁶, P. Unemori, MD⁶, K. S. Leslie, M.B.,B.S., FRCP⁶, T. Maurer, MD⁶, D. F. Nixon, MD, PhD^{1*}

Affiliations: ¹Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA, ²Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Department of Microbiology and Immunology and the Cancer Research Institute, University of California, San Francisco, San Francisco, USA, ⁴Instituto de Investigação em Imunologia, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵California Pacific Medical Center - Davies Campus, San Francisco, CA, USA, ⁶Department of Dermatology, University of California, San Francisco, USA. # Current Address: Department of Neurology, University of Washington, Seattle, WA.

O presente manuscrito foi submetido e encontra-se em revisão no periódico Experimental Dermatology (Anexo D).

4.1.2 Abstract

Background: Psoriasis is a hyper-proliferative inflammatory disease of the skin in which immunological mechanisms play a direct role in disease pathogenesis. There have been limited studies of natural killer (NK) cells in psoriasis.

Objectives: To examine the phenotype and functional role of NK cells in skin biopsies and peripheral blood mononuclear cells from patients with psoriasis and healthy controls.

Methods: CD56⁺CD16⁻ and CD56⁺CD16⁺ NK cells were isolated from lesional skin, unaffected skin and PBMC of psoriasis patients, and normal skin and PBMC from healthy controls. The expression of CD57, NKG2A, and NKG2C was assessed by flow cytometry.

Results: NK cells in psoriatic skin lesions were skewed in their expression of CD57, a marker of NK cell maturity, with CD57 expression significantly reduced and NKG2A expression increased on NK cells in lesional and unaffected skin compared to controls.

Conclusions: These data suggest that NK cells in psoriasis lesions exhibit an immature phenotype, but further studies are needed to determine the functional role of these cells in psoriasis.

Key Words: psoriasis, natural killer cells, CD57, immunosenescence

4.1.3 Introduction

Psoriasis is a chronic disease of the skin with significant morbidity, where clinical improvements can be observed with the use of different therapeutic modalities including topical and systemic immunosuppressive agents, anti-cytokine biological therapies, and ultraviolet light therapies. Histologically, psoriasis is characterized by psoriasiform epidermal hyperplasia, parakeratosis, loss of the granular cell layer, and the formation of spongiform pustules (1).

The etiologic cause of psoriasis is unknown, although certain environmental triggers (e.g. infection, skin injury, stress, weather, and medications) are thought to contribute to its onset. The development of psoriatic lesions is thought to be due to the interaction of these triggers in persons with genetic predisposition (1). The major genetic determinant of psoriasis is located within the MHC region on chromosome 6, in a locus known as PSORS1 (2). From this region, HLA-C*06:02 allele is most strongly associated with psoriasis (3). Considerable genetic variability can be observed among different subtypes of psoriasis, with guttate psoriasis being most associated with PSORS1 (4). However, the underlying cellular and molecular mechanisms leading to the hyper-proliferative inflammatory nature of psoriasis remain incompletely understood.

Several studies have characterized the cellular and cytokine immune composition of healthy and psoriatic skin. These studies suggest contributions from both the innate and adaptive immune systems and their interaction with keratinocytes and other skin cells in the pathogenesis of psoriasis (5-7). Increasingly, evidence points to a pro-inflammatory environment with local expansion of activated lymphocytes within psoriatic lesions, elevated IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-22, and IL-23, as well as secretion of antimicrobial peptides such as cathelicidin from keratinocytes (8-10). Although IL-23 may contribute to disease, a role for IL-12 in psoriasis is also described (11). IL-17 and IL-22 co-producing T cells are also considered important contributors to the pro-inflammatory milieu associated with psoriasis pathology (8, 12, 13).

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes at the interface of the innate and adaptive immune systems. They migrate into sites of infected and damaged tissue in response to elevated levels of pro-inflammatory chemokines and can further produce significant amounts of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ . While innate immune mechanisms may also play a role in the immunopathogenesis of psoriasis, the role of NK cells in psoriasis is less studied (14-16). The interaction between HLA-C and Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs) on NK cells has been investigated in psoriasis, and KIR2DS1 is associated with psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis (17-19). Furthermore, greater expression of HLA-G, a known inhibitor of NK cell cytotoxicity, is observed in the skin of psoriasis patients compared to normal skin (20, 21).

NK cells express a heterogeneous repertoire of germline-encoded receptors that serve to educate them through an appropriate balance of activating and inhibitory signals as they mature (22). These receptors also regulate NK cell effector function (23). Myeloid dendritic cells can influence NK cell function through cytokine secretion (24), particularly IL-12, which is a potent inducer of IFN- γ production by NK cells. We investigated the expression of the inhibitory receptor NKG2A and the activating receptor NKG2C, which have a role in immunosurveillance by binding to HLA-E (25), on NK cells in the skin and blood of patients with psoriasis and healthy controls. Although both NKG2A and NKG2C bind HLA-E, NKG2C binds with a lower affinity than NKG2A (25, 26). However, as NK cells mature, they tend to express more NKG2C and lose NKG2A expression (27).

Although NK cell function (cytotoxicity and cytokine secretion) is related to their stage of development, both immature CD56^{bright}CD16^{neg} and mature CD56^{dim}CD16⁺ NK cell subpopulations secrete IFN- γ , which is critical in the pathogenesis of psoriasis (28). Indeed, one study demonstrated how specific target cell ligands dictate the qualitative and temporal aspects of NK cell cytokine responses resulting in graded responses, depending on the multiplicity of activating receptors engaged. That study suggested the CD56^{dim}CD16⁺ NK cell subpopulation may be the most important source of cytokines upon recognition of aberrant target cells (29). Expression of CD57 identifies terminally differentiated T cells (30). Recently, we,

and others, have shown that CD57 is also expressed on highly mature cells within the CD56dimCD16⁺ NK cell compartment, became NKG2Chi, and finally acquired CD57 (31, 32). This suggests that CD57 might provide a marker of "memory" NK cells (27). These CD57⁺ NK cells have a poor replication capacity in vitro, but a high capacity to produce IFN- γ following stimulation through the activating receptor CD16 (31, 32). More importantly, CD57⁺CD56dimCD16⁺ NK cells are less responsive to stimulation by IL-12 and IL-18 compared to their less mature CD57negCD56dimCD16⁺ counterparts (32). These data suggest that infiltration by less mature CD57negCD56dimCD16⁺ NK cells may fuel the pro-inflammatory environment as they are more capable of responding to activating cytokines.

In view of our finding that CD57 expression can identify NK cell subsets capable of producing high amounts of IFN- γ in response to pro-inflammatory cytokines (32), and our observation that a significant amount of the total IFN- γ produced in response to antigenic stimulation in a polyclonal PBMC population can be attributed to NK cells rather than T cells (33), we examined the phenotype of NK cells in psoriasis by investigating the distribution of CD57⁺ NK cells in lesional and non-lesional skin, as well as peripheral blood of patients with psoriasis compared to controls.

4.1.4 Methods

Study design and skin samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and skin biopsies were collected from patients with psoriasis (lesional and non-lesional skin) (n=12) and PBMC alone were collected from healthy controls (n=10). Normal skin from healthy donors was obtained from discarded tissue following plastic surgery procedures (n=3). All patients gave informed consent and the study was approved by the UCSF Institutional Review Board. Patients with mild to severe psoriasis of both guttate or plaque subtype were included. Severity was assessed based on affected body surface area (BSA), as follows: mild - less than 5% BSA, moderate 5 - 30% BSA, severe - more than 30% BSA. Additionally, patients had a history of psoriasis for at least 1 year and were treatment-free in the last 6 months. Patients undergoing any topical or systemic therapy were excluded.

Skin sample preparation

Tissue samples from psoriasis patients were collected as a 4-mm punch biopsy. One punch biopsy was collected from an active psoriasis lesion (close to the lesion margin) and another from non-lesional skin, at least 5 cm away from an active lesion. Tissue samples were incubated overnight at 4°C in 1 mg/ml collagenase and dispase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and 10 units/ml recombinant DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) in RPMI-1640. The epidermis was subsequently treated with 0.25% trypsin and EDTA (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in PBS at 37°C for 15 minutes. Epidermis and dermis were both cultured separately for 48 hours at 37°C in RPMI-1640 supplemented with 10% pooled human serum (Gemini Bio Products, Sacramento, CA, USA), 1% penicillin and streptomycin, and 1 mol/L HEPES buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 6-well culture plates. Single cell suspensions were obtained after rinsing through a 70 µm cell strainer (BD, San Jose, CA, USA), and cells isolated from epidermis and dermis were subsequently combined to produce sufficient cell numbers for flow cytometry. We also treated PBMC with collagenase and dispase to determine whether NK cell staining within PBMC was perturbed by this treatment. No differences were observed (data not shown).

Flow cytometry

Twelve-parameter flow cytometry was performed using a LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Fc receptors on cells were first blocked using 10 µg/ml human IgG (Sigma Aldrich, S. Louis, MI, USA) for 20 minutes on ice. Cells were then stained for 30 minutes on ice with fluorophore-labeled antibodies, washed with FACS buffer containing PBS, 0.5% bovine serum albumin, and 2mM EDTA, and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS. The data files were analyzed using FlowJo Software version 8.8.6 (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Statistical Analyses

The statistical analyses were performed using Prism Software version 4.0a (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Groups were compared using the Mann-Whitney non-parametric test with a minimum significance value of $p = 0.05$. SPICE software version 5.2 was used for the analyses presented in Figure 2.

4.1.5 Results

Patient Demographics

Twelve subjects with psoriasis were studied, including 9 males and 3 females. The median age was 48 years (range 21 to 84). With respect to psoriasis subtype, 5 subjects had plaque psoriasis and 7 subjects had guttate psoriasis. The majority of subjects had mild disease ($n = 8$), 3 subjects had moderate disease, and 1 subject had severe disease. Matched skin and PBMC samples were available from 9 out of 12 psoriasis subjects. Healthy control PBMC samples were available for 10 individuals, with a median age of 45 years. In patients for whom serum was available, CMV serology was positive. This positivity is representative of the general demographic of the local population.

Distribution and phenotype of NK cells in lesional and non-lesional skin and peripheral blood of psoriasis patients compared to healthy controls

We examined the distribution and phenotype of NK cells in skin and peripheral blood of psoriasis patients and healthy controls. Lymphocytes were identified by forward and side scatter followed by staining with CD45. Within the $CD45^+$ lymphocyte subset, both lesional and non-lesional skin of psoriatic patients had similar frequencies of $CD56^+CD16^+$ NK cells; however, in the blood there was a trend toward an increased frequency of $CD56^+CD16^+$ NK cells in patients compared to healthy controls (Fig. 1a). To assess the maturity of NK cells in the skin and peripheral blood, we measured CD57 expression on $CD56^+CD16^+$ NK cells. The frequency of $CD57^+$ NK cells in lesional skin (less than 10%) was significantly lower than in non-lesional skin ($\sim 40\%$) (Fig. 1b). Interestingly, the non-lesional skin in psoriasis subjects had significantly fewer $CD57^+$ NK cells than in skin of healthy controls. This difference was specific to the skin, as no significant difference in $CD57^+CD56^+CD16^+$ NK cells was observed in the blood of patients compared to healthy controls (Fig. 1b).

An assessment of inhibitory, NKG2A, and activating, NKG2C, receptor expression on skin and peripheral blood $CD56^+CD16^+$ NK cells revealed a significant expansion of $NKG2A^+$ NK cells in lesional and non-lesional skin of patients compared to healthy controls (Fig. 1c). However, the frequency of $NKG2A^+$ NK cells in the peripheral blood was similar between psoriasis patients and healthy controls. In contrast, the proportion of $NKG2C^+$ NK cells was similar in both lesional and non-lesional skin to healthy controls. In the blood, psoriasis patients had a significantly

greater frequency of NKG2C⁺ NK cells compared to healthy controls of similar median age (Fig. 1d).

When we examined co-expression of CD57, NKG2A, and NKG2C on skin NK cells we observed a marked difference between normal skin from healthy donors and lesional and non-lesional skin from psoriasis patients (Fig. 2). The majority of NK cells from the skin of psoriasis patients only expressed NKG2A, particularly in lesional skin. In contrast, the majority of NK cells in the skin of healthy donors contained CD57⁺ NK cells that were NKG2A⁻ and NKG2C⁻. These data suggest NK cells in the skin of psoriasis patients, particularly in the lesion itself, are less mature NK cells. When we compared plaque and guttate psoriasis for all the measured parameters, no difference was found (Supplemental Fig. 1).

Figure 1: (a) Frequency of CD56⁺CD16⁺ NK cells in lesional skin (n=7) and unaffected skin (n=8) of psoriasis patients and skin from healthy controls (n=3), and in the blood of psoriasis patients (n=11) and healthy controls (n=10). (b) CD57⁺CD56⁺CD16⁺ NK cells in skin and the blood. (c) NKG2A expression on CD56⁺CD16⁺ NK cells in skin and the blood. (d) NKG2C expression on CD56⁺CD16⁺ NK cells from skin and PBMC. * = p<0.05, *** = p<0.001. Missing values correspond to samples where number of events was too low for analysis.

Figure 2: Co-expression of CD57, NKG2A, and NKG2C on CD56⁺CD16⁺ NK cells in lesional and unaffected skin of psoriasis patients and normal skin of healthy controls. Both pie charts and bar graphs are shown. Comparisons are made between psoriasis groups (lesional and unaffected skin) in relation to the control group (normal skin). Significant differences ($p < 0.05$) are represented by a (+). A significant difference between groups was noted in CD57 and NKG2A expression alone and in NKG2A and NKG2C co-expression. + = $p < 0.05$.

Supplemental Figure 1: Lack of difference between plaque and guttate psoriasis for the expression of markers on CD56+CD16+ NK cells. (a) CD57. (b) NKG2A. (c) NKG2C.

We also examined the distribution and phenotype of CD56⁺CD16⁻ NK cells. Within the CD45⁺ subset, there was a trend toward an increased frequency of CD56⁺CD16⁻ NK cells in psoriasis lesional and unaffected skin compared to the skin of healthy controls (Fig. 3a). No difference was observed in the blood. Similar to what was observed for the CD56⁺CD16⁺ NK cell subset, CD57 expression on CD56⁺CD16⁻ NK cells was significantly reduced in lesional and non-lesional skin of patients compared to normal skin of healthy controls (Fig. 3b). NKG2A expression was more prominent in lesional skin compared to unaffected skin and normal skin of healthy controls, although this trend did not meet statistical significance (Fig. 3c). No difference was observed for NKG2C expression in the skin or blood of psoriasis patients compared to healthy controls (Fig. 3d). No difference was observed between plaque and guttate psoriasis (Supplemental Fig. 2).

Figure 3: (a) Frequency of CD56⁺CD16⁻ NK cells in lesional skin (n=10) and unaffected skin (n=10) of psoriasis patients and skin from healthy controls (n=3) and in the blood of psoriasis patients and healthy controls. (b) CD57⁺CD56⁺CD16⁻ NK cells in skin and the blood. (c) NKG2A expression on CD56⁺CD16⁻ NK cells in skin and the blood. (d) NKG2C expression on CD56⁺CD16⁻ NK cells from skin and PBMC. * = p<0.05. Missing values correspond to samples where number of events was too low for analysis.

Supplemental Figure 2: Lack of difference between plaque and guttate psoriasis for the expression of markers on CD56+CD16- NK cells: (a) CD57. (b) NKG2A. (c) NKG2C.

4.1.6 Discussion

Psoriasis has been largely considered a disease driven by inflammatory processes. Much recent attention has been given to the role of Th17 and Th22 cell subsets in the immunopathogenic process (12). Genomic studies have reinforced the importance of aberrant inflammation by identifying relationships between inflammatory genes and psoriasis (34, 35). Moreover, the efficacy observed with biologics targeting pro-inflammatory elements further elucidates the contribution of cytokines such as TNF- α , IL-12, and IL-23 (7). Nevertheless, questions remain about what triggers the onset of psoriasis that initiates the cascade of inflammation, as well as the persistence and localization of inflammation to the involved area.

Whether NK cells are involved in the immunopathogenesis of psoriasis has been much less studied relative to other cell types and inflammatory pathways, although genetic and immunological analyses support a role for NK cells in psoriasis. Genetic analyses revealed a susceptibility locus for psoriasis, the A5.1 allele of MICA, a ligand for NKG2D (36). Others have found a psoriasis SNP between HLA-B and MICA (37), and more recently MICA*016 was associated with psoriasis (38). KIR2DS1 is associated with psoriasis vulgaris, and is the only activating KIR receptor that associates to HLA-Cw6 (16-18). NK cells appear to be concentrated at the dermal/epidermal junction (14, 28) and may have a clinically relevant role in psoriasis, as they can function without prior sensitization and possibly act in concert with myeloid and plasmacytoid dendritic cells (DC) to initiate plaque development. Activated NK cells are a source of Th1 cytokines (IFN- γ) and might initiate events in psoriasis with subsequent T cell infiltration (14).

In this study, we found variations in NK cell distribution in blood and tissue of psoriasis patients when compared to healthy subjects without psoriasis. Overall, a trend toward higher CD56⁺CD16⁻ NK cell proportions was observed in skin of psoriasis patients compared to non-psoriasis subjects (Fig. 3a). This could be explained as a consequence of the ongoing inflammatory process in psoriatic plaques resulting in upregulation of integrins and chemokines that lead to increased trafficking to the site of inflammation. CD56^{bright}CD16⁻ NK cells express high levels of the

chemokine receptors CXCR3 and CCR5, which can account for preferential homing to the skin (28). Taken together, the skin of psoriasis patients appears to be primed for a heightened degree of immune stimulation, at least for those in whom active psoriasis plaques exist. The similar distribution of NK cells in lesional and non-lesional tissue and phenotypic differences within the NK cell population suggest underlying functional differences in NK cell maturation in psoriasis.

We, and others, recently described NK cell differentiation as a progression from a less mature phenotype displaying high CD56 expression together with NKG2A but lacking CD16, to a more differentiated phenotype expressing CD16 and CD57 with a decreasing ability to replicate *in vitro* (27, 31, 32). Although we observed no difference between the proportion of CD57+CD56+CD16+ NK cells in the blood of patients and healthy controls, we observed a substantially lower percentage of CD57+CD56+CD16+ NK cells in skin from psoriasis plaques compared to control skin. Interestingly, non-involved skin from patients presented as an intermediate between the two. CD57-CD56+CD16+ NK cells exhibit increased HLA-DR and CD27 expression, as well as Ki67 and CD107a, and correspond to activated cells with a higher turnover and degranulation ability (39). Another possible mechanism that could explain the preferential localization of CD57- NK cells to lesions is their high responsiveness to IL-2 stimulation, as psoriasis lesions contain high levels of IL-2 (40). Importantly, CD57-CD56+CD16+ NK cells are also more sensitive and produce higher amounts of IFN-gamma following cytokine stimulation compared to CD57+CD56+CD16+ NK cells. Furthermore, CD57-CD56+CD16+ NK cells may help perpetuate the inflammation by producing high levels of IFN-gamma that activate surrounding T cells and myeloid cells. In contrast, CD57+CD56+CD16+ NK cells have increased KIR and granzyme B expression and correspond to more mature cells, with lower replicative capacity, but are nonetheless functionally active (32, 39). One previous study has analyzed CD57 expression by immunohistochemistry in psoriasis skin, and found an increased expression of this marker in lesional skin (41). However, that study did not identify which cells expressed CD57, and it is possible that other cell types, such as T cells, which are more abundant in the psoriatic inflammatory infiltrate, were CD57+.

We observed no differences in the proportion of NK cells positive for NKG2A in the

blood; however, there was a significant difference in the proportion of NKG2A⁺ cells in lesional skin when compared to non-lesional and normal skin. NKG2A is inducible by IL-12, which is likely to be highly expressed in the lesions, and might explain why NKG2A is highly expressed. Alternatively, some groups have proposed that the acquisition of functional capacities by NK cells, specifically IFN-gamma production, is correlated with NKG2A expression on CD56⁺CD16⁺ NK cells (42). Our results are in accordance with this observation, as lesional skin NK cells express more NKG2A. Of interest, the expression of NKG2A was increased on circulating CD8⁺ T cells from psoriasis patients, and correlated with PASI scores (43). The proportion of NKG2C⁺ cells in blood showed a modest, but statistically significant difference, whereas skin showed no such difference. This could be due to differences in CMV serostatus because NK cells expressing NKG2C have been shown to be preferentially expanded in CMV seropositive individuals. However, we were unable to determine CMV serostatus on all patients in the study.

Together, these data suggest that psoriasis patients harbor a less differentiated NK cell population in the skin. This appears to be localized to the skin itself, further suggesting a mechanism for selective accumulation of one cell subset over another in psoriasis skin and a fundamental alteration in NK cell populations in patients with psoriasis, which might therefore be amenable to therapeutic intervention. Future studies are needed to determine the significance of these less differentiated NK cells in psoriasis skin lesions.

4.1.6 References

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2009 Jul 30;361(5):496-509.
2. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 May;6(5):813-20.
3. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 May;78(5):827-51.
4. Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaelsson G, Evans J, et al. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Apr;120(4):627-32.
5. Nickoloff BJ. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J Clin Invest*. [Comment Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 1999 Nov;104(9):1161-4.
6. Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2011 Dec;303(10):691-705.
7. Nograles KE, Brasington RD, Bowcock AM. New insights into the pathogenesis and genetics of psoriatic arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2009 Feb;5(2):83-91.
8. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):677-87.
9. Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jun;127(6):1420-32.
10. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Feb 22;445(7130):866-73.
11. Mak RK, Hundhausen C, Nestle FO. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2009 Dec;100 Suppl 2:2-13.
12. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jun;123(6):1244-52 e2.

13. Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, et al. IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol.* 2009 Aug;86(2):435-43.
14. Cameron AL, Kirby B, Griffiths CE. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol.* 2003 Jul;149(1):160-4.
15. Tobin AM, Lynch L, Kirby B, O'Farrelly C. Natural killer cells in psoriasis. *J Innate Immun.* 2011;3(4):403-10.
16. Dunphy S, Gardiner CM. NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol.* [Review]. 2011;2011:248317.
17. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanchez FO. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):721-30.
18. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2004 May;122(5):1133-6.
19. Luszczek W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M, et al. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol.* 2004 Jul;65(7):758-66.
20. Aractingi S, Briand N, Le Danff C, Viguier M, Bachelez H, Michel L, et al. HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol.* 2001 Jul;159(1):71-7.
21. Cardili RN, Alves TG, Freitas JC, Soares CP, Mendes-Junior CT, Soares EG, et al. Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2010 Oct;163(4):769-75.
22. Sun JC, Lanier LL. Versatility in NK cell memory. *Immunol Cell Biol.* 2011 Mar;89(3):327-9.
23. Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. *Cell.* 2010 Sep 17;142(6):847-56.
24. Flodstrom-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Hoglund P, Ljunggren HG. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2009 Dec;21(6):634-40.
25. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Feb 19;391(6669):795-9.
26. Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Lopez-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4250-60.
27. Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57⁺NKG2C⁺ Natural Killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *PNAS.* 2011.

28. Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pita O, Girolomoni G, Cavani A. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol*. 2006 Jan;36(1):118-28.
29. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010 Mar 18;115(11):2167-76.
30. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2711-20.
31. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3853-64.
32. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3865-74.
33. Loo CP, Long BR, Hecht FM, Nixon DF, Michaelsson J. HIV-1-specific T Cell-dependent natural killer (NK) cell activation: major contribution by NK cells to interferon-gamma production in response to HIV-1 antigens. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009 Jun;25(6):603-5.
34. Roberson ED, Bowcock AM. Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet*. 2010 Sep;26(9):415-23.
35. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol*. 2010 May;130(5):1213-26.
36. Choi HB, Han H, Youn JI, Kim TY, Kim TG. MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. *Tissue Antigens*. 2000 Dec;56(6):548-50.
37. Feng BJ, Sun LD, Soltani-Arabshahi R, Bowcock AM, Nair RP, Stuart P, et al. Multiple Loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. *PLoS Genet*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2009 Aug;5(8):e1000606.
38. Pollock R, Chandran V, Barrett J, Eder L, Pellett F, Yao C, et al. Differential major histocompatibility complex class I chain-related A allele associations with skin and joint manifestations of psoriatic disease. *Tissue Antigens*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jun;77(6):554-61.
39. Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ballmaier M, Bhatnagar N, et al. HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *J Virol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jan;84(2):1183-8.

40. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1990 May 1;171(5):1509-26.
41. Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2002 Nov;294(8):363-9.
42. Beziat V, Descours B, Parizot C, Debre P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;5(8):e11966.
43. Liao YH, Jee SH, Sheu BC, Huang YL, Tseng MP, Hsu SM, et al. Increased expression of the natural killer cell inhibitory receptor CD94/NKG2A and CD158b on circulating and lesional T cells in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Aug;155(2):318-24.

4.2 Manuscrito de artigo científico sobre células T

4.2.1 Folha de Rosto

Title: CD57 expression and cytokine production by T cells in lesional and unaffected skin from patients with psoriasis

Authors:

Mariana D. Batista, MD^{1,2}; Camilla Tincati, MD¹; Jeffrey M. Milush, PhD¹; Emily L. Ho, MD, PhD¹; Lishomwa C. Ndhlovu, MD, PhD¹; Vanessa A. York, BS¹; Esper G. Kallas, MD, PhD^{2,3}; Jorge Kalil, MD, PhD^{2,3}; Sheila M. Keating^{4,5}; Philip J. Norris^{4,5,6}; David Chang, MD⁷; Patrick Unemori, MD⁸; Kieron S. Leslie, M.B.,B.S., FRCP⁸; Toby Maurer, MD⁸; Wilson Liao, MD⁸ and Douglas F. Nixon, MD, PhD¹.

Affiliations: ¹Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA, ²Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Instituto de Investigação em Imunologia, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴Blood Systems Research Institute, San Francisco, CA, USA, ⁵Department of Laboratory Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA, ⁶Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA, ⁷California Pacific Medical Center - Davies Campus, San Francisco, CA, USA, ⁸Department of Dermatology, University of California, San Francisco, USA.

O presente manuscrito foi submetido e encontra-se em revisão no periódico PlosOne (Anexo E).

4.2.2 Abstract

Background: The immunopathogenic mechanisms leading to psoriasis remain unresolved. CD57 is a marker of replicative inability and immunosenescence on CD8⁺ T cells and the proportion of CD57 expressing CD8⁺ T cells is increased in a number of inflammatory conditions.

Methodology: We examined the expression of CD57 on T cells in the skin of patients affected with psoriasis, comparing lesional and unaffected skin. We also assessed functionality of the T cells by evaluating the secretion of several inflammatory cytokines (IL-17A, IFN- γ , IL-2, IL-33, TNF- α , IL-21, IL-22, and IL-27), from cell-sorted purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from lesional and unaffected skin biopsies of psoriasis patients.

Principal Findings: We observed that the frequency of CD57⁺CD4⁺ and CD57⁺CD8⁺ T cells was significantly higher in unaffected skin of psoriasis patients compared to lesional skin. Sorted CD4⁺ T cells from psoriatic lesional skin produced higher levels of IL-17A, IL-22, and IFN- γ compared to unaffected skin, while sorted CD8⁺ T cells from lesional skin produced higher levels of IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF- α , and IL-2 compared to unaffected skin.

Conclusions / Significance: These findings suggest that T cells in unaffected skin from psoriasis patients exhibit a phenotype compatible with replicative inability. As they have a lower replicative capacity, CD57⁺ T cells are less frequent in lesional tissue due to the high cellular turnover.

Keywords: psoriasis, CD57, immunosenescence, CD8⁺ T cells, IL-17, IL-22

4.2.3 Introduction

Psoriasis is an inflammatory skin disease where immunologic imbalance and altered keratinocyte differentiation lead to hyperproliferation of the skin (1). Although psoriasis was initially classified as a Th-1-polarized disease, a clear role for CD4⁺ T cells that produce IL-17A and IL-22 (Th-17 and Th-22 cells) has been established in recent years, primarily at lesional sites, but also in the blood (2-4). The inflammatory milieu is the key determinant for plaque development and maintenance, and each cell type involved in the process has its own characteristic signature cytokines. In psoriasis, IFN- γ , the prototype Th-1 cytokine, interplays with IL-2, TNF- α , IL-17, and IL-22 to contribute to inflammation and altered differentiation (2, 5, 6).

Much debate exists regarding the relative contribution of CD8⁺ T cells to cytokine production in psoriasis, as CD8⁺ T cells may also produce IL-17 and IL-22 (7, 8). CD57 is a marker of replicative inability on T cells. CD57⁺CD8⁺ T cells expand in a number of conditions of chronic immune activation, such as viral infections (9), inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis and Wegener granulomatosis (10, 11), and malignancies (12). CD57⁺CD8⁺ T cells can also be expanded after physical stress (13) and in aging (14). Although these cells exhibit limited proliferative and survival abilities, they nonetheless manifest high cytotoxic properties, being destined to migrate to non-lymphoid tissues without further cycling (12, 15, 16). We sought to investigate the role of CD57 expression on T cells in lesional and non-lesional unaffected skin of psoriasis patients.

4.2.4 Methods

Patient Selection

Twenty psoriasis patients were recruited for this study. Patients provided informed consent and the study was approved by the UCSF Institutional Review Board, according to the declaration of Helsinki. Disease ranged from mild to severe and most patients had a long history of psoriasis (median 12 years). Severity was assessed based on affected body surface area (BSA), as follows: mild - less than 5% BSA, moderate - 5-30% BSA, severe - more than 30% BSA. Subjects included in the study were recruited during their first visit to the Dermatology Clinic at San Francisco General Hospital, and had not used topical or systemic therapy at least 2 months prior to sample collection.

Patients were divided into 2 groups. For the phenotypic portion of the study, 7 psoriasis patients were included. For the functional part of the study (cell sorting and cytokine production), 13 patients were included. Lesional and unaffected skin samples were available for all patients. One patient was excluded from the study due to low post-sorting purity levels.

Skin sample preparation

Skin samples were collected as 4-mm punch biopsies, one from an active psoriasis lesion and another from unaffected skin, at least 5 cm away from an active lesion. The samples were incubated for 15 minutes at 37°C and then overnight at 4°C in 1 mg/ml collagenase/dispase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and 10 units/ml recombinant DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Epidermis and dermis were both cultured separately for 48 hours at 37°C in RPMI-1640 supplemented with 10% pooled human serum (Gemini Bio Products, Sacramento, CA, USA), 1% penicillin and streptomycin, and 1 mol/L HEPES buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 6-well culture plates. Single cell suspensions were obtained after rinsing through a 70-µm cell strainer (BD, San Jose, CA, USA), and cells isolated from epidermis and dermis were subsequently combined to produce sufficient cell numbers for the subsequent experiments.

Flow cytometry

A multi-parameter flow cytometry analysis was performed using an LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Cells were first Fc receptor blocked using 10 µg/ml human IgG (Sigma Aldrich, S. Louis, MI, USA) for 20 minutes on ice. Cells were then stained for 30 minutes on ice with fluorophore-labeled antibodies, washed with FACS buffer, and fixed with 2% paraformaldehyde (Toussimis, Rockville, MD) in PBS. The data files were analyzed using FlowJo Software version 8.8.6 (Tree Star, San Carlos, CA, USA). The gating strategy is demonstrated in Supplemental Figure 1.

CD4+ and CD8+ T cell sorting

Cells were stained using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD45 (eBioscience, San Diego, CA, USA), phycoerythrin-Texas Red (ECD)-conjugated anti-CD3 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), Alexa700-conjugated anti-CD4 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)-conjugated anti-CD8 (Biolegend, San Diego, CA, USA), and Amine Aqua (AARD) for live/dead discrimination (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Freshly isolated PBMCs and skin cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies and AARD antibodies for 30 minutes on ice. Cells were then washed twice with FACS buffer, and sorted on a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). During the first experiment (n = 6), only CD8+ T cells were sorted, using a doublet discrimination gating followed by gating on CD45+ cells and CD3+CD8+ T cells. On the second experiment (n = 7), CD4+ and CD8+ T cells were sorted using a doublet discrimination gating followed by gating on CD45+ cells and finally on CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T cells. The purities of all sorts were greater than 95%. One patient was excluded due to a 75% post-sorting purity level.

T cell cultures

Sorted CD4+ and CD8+ T cells isolated from lesional and unaffected skin and PBMCs from psoriatic patients were cultured for 8 hours at 37°C and 5% CO₂ with or without PMA (50ng/ml) and ionomycin (500ng/ml) stimulation (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in a 96-well U-bottom plate. The plate was centrifuged, the culture supernatant carefully removed, the cells were washed with PBS, and fresh culture media containing IL-2 without PMA and ionomycin was added. The cells were then

placed back in culture at 37°C and 5% CO₂ for 7 days. On day 7 the plate was centrifuged and cell-free supernatants were frozen at -20°C for subsequent use in Luminex analyses.

Luminex assays

Production of IL-17A, IFN- γ , IL-2, IL-33, TNF- α , IL-21, IL-22 and IL-27 were assayed using Multiplex cytokine arrays (Biolegend, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocols. Samples were acquired on a Labscan 200 analyzer (Luminex, Austin, TX, USA) using Bio-Plex manager 6.0 software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). It should be noted that the media for T-cell culture contained IL-2, so the comparative analyses between groups are possible, though the analyte concentrations obtained reflect the IL-2 added in the media.

Statistical Analyses

The statistical analyses were performed using Prism Software version 4.0a (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Groups were compared using the Wilcoxon paired non-parametric test with a minimum significance value of $p = 0.05$.

Supplemental Figure 1. Gating strategy representing lesional skin sample.

4.2.5 Results

Patient demographics

Twenty patients with psoriasis were included in this study, 11 males and 9 females. Severity was distributed as follows: mild (n = 10), moderate (n = 6), and severe (n = 4). The median age was 51 years (inter-quartile range 38-56 years). The most common predisposing factors listed were stress, skin injury, and lack of sun exposure during winter.

Increased CD57 expression on CD4+ and CD8+ T cells in unaffected skin of psoriasis patients

We first determined whether the CD4+ or CD8+ T cell distribution was altered in unaffected skin compared to lesional skin of psoriasis patients. CD45+ leukocytes in skin samples (psoriatic lesions and non-lesional) were assessed by flow cytometry. We observed a significantly higher percentage of CD4+ T cells in lesional skin compared to unaffected skin (Figure 1A). Although there was a trend towards higher percentages of CD8+ T cells in lesional skin, the difference was not significant (Figure 1B).

To determine whether T cells were terminally differentiated, we examined the frequency of CD57+ T cells in the skin (Figure 2A and B). Interestingly, the frequency of CD57+CD4+ and CD57+CD8+ T cells was significantly higher in unaffected skin of psoriasis patients compared to lesional skin (Figures 2A and 2B). CD57 expression in skin was not correlated with the subject's age (data not shown).

Figure 1. T cell distribution in skin of psoriasis patients. Frequency of (A) CD4+ T cells and (B) CD8+ T cells in the skin (lesional and unaffected) from psoriasis patients (n = 7). * = p < 0.05.

Figure 2. CD57 expression on T cells of psoriasis patients. CD57 expression on (A) CD4+ T cells and (B) CD8+ T cells from the skin of psoriasis patients (n = 7). * = $p < 0.05$.

Sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells from lesional skin produce higher levels of cytokines than unaffected skin

Several cytokines have been known to play a role in psoriasis, however, the secretion at different sites and the cell type producing them remains unknown. We therefore performed a selected cytokines Multiplex assay to measure key inflammatory mediators IL-17A, IFN- γ , IL-2, IL-33, TNF- α , IL-21, IL-22, and IL-27.

While unstimulated samples from all compartments did not seem to produce significant cytokine levels, we observed that lesional skin CD4⁺ T cells stimulated with PMA-ionomycin produced higher levels of IL-17A, IL-22, and IFN- γ in relation to unaffected skin from the same patients (Figure 3). There was a trend to higher production of TNF- α and IL-2 by sorted CD4⁺ T cells from lesional skin, while no difference was observed for IL-27 levels (Figure 3).

For CD8⁺ T cells, we observed that the production of IL-17A, IL-22, IFN- γ , TNF- α , and IL-2 were higher in lesional skin than unaffected skin of psoriasis patients (Figure 4).

Despite the fact that IL-21 and IL-33 have been implicated in psoriasis pathogenesis (17-19), we could not find any difference in the production of these cytokines between lesional and unaffected skin of psoriasis patients (data not shown).

Cytokine Production by Sorted CD4+ T Cells

Figure 3. Sorted CD4+ T cell cytokine production. Cytokine production by sorted CD4+ T cells from unaffected and lesional skin from psoriasis patients, with stimulation with PMA-ionomycin. Comparative chart representing IL-17A, IL-22, IL-2, IFN-γ, TNF-α and IL-27. $*$ = $p < 0.05$.

Cytokine Production by Sorted CD8+ T Cells

Figure 4. Sorted CD8+ T cell cytokine production. Cytokine production by sorted CD8+ T cells from unaffected and lesional skin from psoriasis patients, with stimulation with PMA-ionomycin. Comparative chart representing IL-17A, IL-22, IL-2, IFN-γ, TNF-α and IL-27. $*$ = $p < 0.05$, $**$ = $p < 0.01$.

IL-22 levels produced by CD4⁺ T cells were correlated to other cytokines

We next assessed whether the levels of IL-17A or IL-22 produced by lesional skin CD4⁺ or CD8⁺ T cells were correlated to the other cytokines that were tested. Only the levels of IL-22 produced by CD4⁺ T cells isolated from lesional skin were correlated to TNF- α , IFN- γ , and IL-2 (Figure 5). No other associations were found.

Figure 5. IL-22 levels correlate to other cytokines. Correlation of IL-22 levels produced by lesional skin CD4⁺ T cell with (A) TNF- α (B) IFN- γ (C) IL-2.

4.2.6 Discussion

CD57 expression on CD8⁺ T cells determines lack of proliferation ability, associated with short telomeres, defining replicative senescence that occurs in conditions of chronic immune activation, such as HIV-1 infection (16). CD57⁺CD8⁺ T cells exhibit up-regulated expression of cytotoxicity genes, such as perforin, granulysin, and granzyme B, indicating increased cytotoxic ability, and a higher IFN- γ and TNF- α production upon TCR stimulation (15, 20). On CD4⁺ T cells, CD57 expression has also been associated with decreased proliferation capacity, and affects CD4⁺ T cell function, being associated with higher IFN- γ but lower IL-2 production (21). Whether CD57⁺CD4⁺ and CD57⁺CD8⁺ T cells can contribute to psoriasis immunopathogenesis remains poorly understood. One previous study has demonstrated by immunohistochemistry the presence of CD57⁺ cells in psoriasis patients, showing higher numbers in involved epidermis and papillary dermis compared to uninvolved skin, while in reticular dermis, uninvolved skin exhibited higher numbers of CD57⁺ cells (22).

CD57⁺CD8⁺ T cells exhibit a phenotype compatible with increased ability to migrate to tissues without further cycling (12). They express higher levels of CX3CR1 than CD57⁻CD8⁺ T cells, which can dictate their migration to tissues (15). Interestingly, 2 polymorphisms in the CX3CR1 gene were found to be associated with psoriasis (23). One of these was a coding polymorphism with higher frequency in healthy controls compared to cases that is thought to impair the ability of CX3CR1 to adhere to its ligand CX3CL1 (23). These genetic data support the notion that recruitment of CD57⁺ lymphocytes into the skin via the CX3CR1-CX3CL1 axis may be important in the pathogenesis of psoriasis.

In this study, we found higher CD57 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells in unaffected skin of psoriasis patients compared to lesional skin. In recent years, much attention has been given to non-lesional unaffected skin of psoriasis patients, where quiescent auto-reactive T cells named skin-resident T cells have been demonstrated (24). CD57 is a marker of chronic antigenic stimulation. We could hypothesize that some of the quiescent T cells present in non-lesional sites express CD57 as a result of previous antigenic stimulation. We do not know whether the site of unaffected skin biopsy has previously been a lesional site. The persistence of a population of CD8⁺ T

cells in the dermis of resolved psoriasis lesions after treatment has been demonstrated, and points to the possibility of lesional memory (25, 26). Alternatively, as CD57 expression on T cells is associated with a decreased replicative capacity, the high cellular turnover at lesional sites could result in the lower survival of CD57⁺ T cells, leading to the finding of lower CD57 expression in psoriasis lesions.

Th-17 cells constitute a subset of CD4⁺ T cells that have the distinct characteristics of being stimulated by IL-23, and producing IL-17A (27). This subset can be further characterized by the expression of CCR6, CCR4, IL-23R, and CD161 (28-30). IL-17A has been implicated as an important cytokine in the pathogenesis of psoriasis. IL-17 mRNA levels are higher in lesional skin in psoriasis than in normal skin from healthy controls (3, 31). The presence of IL-17A in lesional tissue leads to the release of multiple inflammatory cytokines by keratinocytes, including TNF- α , IL-1, and IL-6 (3, 32). IL-17A can also induce angiogenesis and the production of antibacterial peptides (33). In addition, IL-17A induces keratinocyte expression of chemokine genes that lead to neutrophil migration, thus contributing to overall inflammation (4). That is in contrast with the effects of IFN- γ , which induces preferential expression of CXCL9, CXCL10, and CXCL11, that bind to activated T cells containing CXCR3 (4).

The issue of trafficking IL-17-producing T cells and other inflammatory cells in psoriasis between circulation and tissue remains to be further elucidated. IL-17⁺ CD4⁺ CD8⁺ T cells found in psoriatic lesional tissue express CCR6 and can migrate in response to CCL20, which is expressed by keratinocytes (34). In fact, keratinocyte gene expression of CCL20 and IL-23A is increased after epidermal injury, and could provide a mechanism of IL17⁺ T cell migration through CCR6 and IL-23R (35). However, the increased proportions of IL-17A⁺ T cells in lesional tissue may not be entirely due to migration of inflammatory cells from the circulation. IL-17⁺ T cells could also be induced locally in the skin, through stimulation by myeloid APCs that secrete IL-1 and IL-23 in response to IFN- γ (34).

In this study, we were able to compare the relative production of IL-17 and IL-22, as well as IFN- γ , IL-2, TNF- α , and IL-27, in lesional and unaffected skin on the same individuals. We found that CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from lesional skin have a higher ability to produce IL-17A than their counterparts isolated from unaffected skin. We could hypothesize that T cells in lesional skin have acquired the ability to secrete

this cytokine due to the local inflammatory environment or locally expressed antigens. IL-22 production by CD4⁺ T cells isolated from lesional skin was also higher than unaffected skin. They could correspond to Th-17 cells or Th-22 cells. We could also demonstrate IL-22 production by sorted CD8⁺ T cells from lesional skin in low amounts, in higher levels than unaffected skin. Interestingly, IL-22 production by CD4⁺ T cells isolated from lesional skin correlated with TNF- α , IFN- γ , and IL-2. CD8⁺ T cells isolated from lesional skin exhibited a mixed cytokine profile between Th-17 and Th-1, as higher production of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 was also observed in lesional skin.

In conclusion, we were able to assess phenotypic characteristics and cytokine production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from lesional and unaffected skin from the same patients. We demonstrated that there are phenotypic and functional differences in T cells in different sites in the same individuals. Further studies are needed to elucidate the importance of unaffected tissue in psoriasis.

4.2.7 References

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):496-509.
2. Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Oct;16(10):779-98.
3. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*. 2008 May;128(5):1207-11.
4. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol*. 2008 Nov;159(5):1092-102.
5. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009 Jun;129(6):1339-50.
6. Mak RK, Hundhausen C, Nestle FO. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr*. 2009 Dec;100 Suppl 2:2-13.
7. Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, et al. IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;86(2):435-43.
8. Res PC, Piskin G, de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, Bos JD, et al. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One*. 2010;5(11):e14108.
9. Evans TG, Kallas EG, Luque AE, Menegus M, McNair C, Looney RJ. Expansion of the CD57 subset of CD8 T cells in HIV-1 infection is related to CMV serostatus. *AIDS*. 1999 Jun 18;13(9):1139-41.
10. Arai K, Yamamura S, Seki S, Hanyu T, Takahashi HE, Abo T. Increase of CD57⁺ T cells in knee joints and adjacent bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients: implication for an anti-inflammatory role. *Clin Exp Immunol*. 1998 Feb;111(2):345-52.

11. Iking-Konert C, Vogl T, Prior B, Bleck E, Ostendorf B, Andrassy K, et al. Expression of CD57 on CD8⁺ T lymphocytes of patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis: evidence for continuous activation of CD8⁺ cells. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Jan-Feb;27(1 Suppl 52):S19-24.
12. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol*. 2010 Jan;87(1):107-16.
13. Simpson RJ, Cosgrove C, Ingram LA, Florida-James GD, Whyte GP, Pircher H, et al. Senescent T-lymphocytes are mobilised into the peripheral blood compartment in young and older humans after exhaustive exercise. *Brain Behav Immun*. 2008 May;22(4):544-51.
14. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev*. 2000 Dec 20;121(1-3):77-88.
15. Le Priol Y, Puthier D, Lecureuil C, Combadiere C, Debre P, Nguyen C, et al. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8⁺ CD57⁺ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5145-54.
16. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2711-20.
17. Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, et al. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. Apr;130(4):1034-9.
18. Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 2;107(9):4448-53.
19. Caruso R, Botti E, Sarra M, Esposito M, Stolfi C, Diluvio L, et al. Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1013-5.
20. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan;85(1):88-97.

21. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8415-23.
22. Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2002 Nov;294(8):363-9.
23. Plant D, Young HS, Watson RE, Worthington J, Griffiths CE. The CX3CL1-CX3CR1 system and psoriasis. *Exp Dermatol.* 2006 Nov;15(11):900-3.
24. Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol.* 2010 Feb;130(2):362-70.
25. Clark RA. Gone but not forgotten: lesional memory in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):283-5.
26. Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Lowes MA, Krueger JG. Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):391-400.
27. Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):5948-55.
28. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):639-46.
29. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med.* 2008 Aug 4;205(8):1903-16.
30. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol.* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2010 May;130(5):1373-83.
31. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 Oct;111(4):645-9.
32. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and

cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2271-9.

33. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):950-7.

34. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2007 Jun 1;178(11):6730-3.

35. Kennedy-Crispin M, Billick E, Mitsui H, Gulati N, Fujita H, Gilleaudeau P, et al. Human Keratinocytes' Response to Injury Upregulates CCL20 and Other Genes Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Invest Dermatol*. 2012 Jan;132(1):105-13.

5 DISCUSSÃO

5.1 Casuística

As amostras utilizadas neste estudo foram processadas a fresco, e os pacientes foram incluídos na sua primeira visita ao Serviço de Dermatologia, para assim excluir pacientes em tratamento. Com isso, alguns aspectos da amostragem tornaram-se heterogêneos, como a inclusão de pacientes com gravidades e extensão variadas, e subtipos diferentes de psoríase. A inclusão de psoríase em placas e em gotas poderia resultar em heterogeneidade da amostragem. Porém, como neste estudo buscou-se investigar a expressão do marcador CD57, que está relacionado a imunosenescência e baixa capacidade replicativa, incluímos tanto pacientes com psoríase em gotas, forma mais aguda e recente, como psoríase em placas, forma crônica de longa duração, para investigar se haveria expressão preferencial de CD57 entre os grupos. Não foram evidenciadas diferenças na expressão de CD57 entre os grupos, porém isso pode decorrer dos números reduzidos de pacientes em cada grupo. Também não houve correlação entre o tempo ou gravidade da doença e a expressão de CD57. Seria interessante expandir o número de pacientes em cada grupo para aprofundar a investigação das diferenças entre eles.

5.2 Fenótipo de células NK

A participação das células NK na patogênese da psoríase foi menos investigada em relação a outros tipos celulares e vias inflamatórias. Porém, múltiplas evidências falam a favor de um papel para estas células, possivelmente como contribuintes para a indução da cascata inflamatória pela liberação de IFN- γ (83, 143, 144). Outras evidências indiretas demonstram uma função para as células NK na psoríase, como por exemplo a associação do marcador ativador de NK KIR2DS1, que se liga ao HLA-Cw6, com psoríase vulgar (38, 88, 145).

Neste estudo, foram encontradas variações na distribuição de células NK na pele e sangue de pacientes com psoríase em relação a controles saudáveis. Encontrou-se uma tendência a maior proporção de células NK CD56+CD16- na pele de pacientes com psoríase em relação aos controles. Esta migração preferencial de células NK do sangue para a pele poderia ocorrer devido a uma maior expressão de quimiocinas e

integrinas, como CXCR3 e CCR5, que foram previamente demonstradas em células NK CD56brightCD16- isoladas da pele lesional de pacientes com psoríase (84).

O processo de diferenciação das células NK evolui de fenótipos menos maduros, onde há alta expressão de CD56 sem co-expressão de CD16, associado à presença de NKG2A, para fenótipos mais maduros que mantêm a expressão de CD56 e adquirem CD16 e CD57 (67, 68). Neste estudo, não foi evidenciada diferença nas amostras de sangue entre pacientes e controles sadios em relação à expressão de CD57. No entanto, na pele lesional de pacientes com psoríase foi evidenciada uma menor expressão de CD57 nas células NK em relação à pele de controles sadios. A pele não afetada dos pacientes apresentou expressão intermediária deste receptor. O achado de baixas porcentagens de células NK CD57+ na pele de pacientes com psoríase poderia ocorrer porque essas têm baixa sobrevivência pela inflamação crônica, pelo alto turnover celular, ou por tratamentos farmacológicos previamente instituídos (91). Por outro lado, o achado de maiores concentrações de células NK CD57- nas lesões poderia ocorrer por migração preferencial para a pele, ou porque essas células estariam presentes constitutivamente na pele. Por sua vez, a migração das células NK CD57- para a pele lesional de pacientes com psoríase poderia ser explicada por dois mecanismos. Células NK CD57- apresentam grande resposta a estimulação com IL-2, e a presença de níveis aumentados de IL-2 nas lesões poderia justificar sua migração para o tecido lesional (146). Além disso, demonstrou-se previamente que as células NK CD57- expressam significativamente mais CXCR3, CXCR4 e CCR5 em relação às células CD57+ (67). A maior expressão destas quimiocinas poderia justificar a presença preferencial de células NK CD57- no tecido de pacientes com psoríase.

Funcionalmente, células NK CD57- apresentam alta expressão de HLA-DR e CD27, que denotam ativação, e Ki-67 e CD107a, que denotam proliferação e capacidade de degranulação (147). Além disso, células NK CD56+CD16+CD57- produzem maiores quantidades de IFN- γ após estímulo com IL-12 e IL-18 em relação às células CD57+ (67, 68). As células NK CD57+ apresentam maior expressão de KIR e granzima B, e correspondem a células mais maduras, com menor capacidade de replicação, mas que mantêm capacidade funcional (68, 147).

Não foram observadas diferenças na expressão de NKG2A no sangue entre pacientes com psoríase e controles sadios. Por outro lado, houve diferenças significativas nas proporções de células que expressam NKG2A na pele de pacientes em relação aos

controles. A pele lesional apresentou maior expressão em relação à pele não afetada. A expressão de NKG2A pode ser induzida por IL-12, que é produzida em grandes proporções nas lesões, o que poderia justificar a presença de níveis aumentados de NKG2A. Do ponto de vista funcional, alguns grupos demonstraram que a capacidade de produção de IFN- γ por células NK pode ser correlacionada à expressão de NKG2A (148). Neste estudo, os achados de maiores proporções de células NK que expressam NKG2A na pele lesional poderiam sugerir que as células NK presentes no tecido lesional têm maior capacidade funcional.

Uma questão interessante seria determinar se a expressão do HLA-E, ligante de NKG2A e NKG2C, está aumentada na pele lesional de pacientes com psoríase. Expressão aumentada de HLA-E por queratinócitos já foi demonstrada na síndrome de Stevens-Johnson e na necrólise epidérmica tóxica (149). O HLA-E não é expresso constitutivamente em queratinócitos primários cultivados *in vitro* ou na linhagem celular de queratinócitos HaCaT. Porém, o aumento da expressão de HLA-E foi demonstrado após estimulação dos queratinócitos *in vitro* com IFN- γ (149). Poderia-se especular que nas lesões de psoríase, pelas altas concentrações de IFN- γ , há aumento da expressão de HLA-E nos queratinócitos, e que o receptor inibitório de células NK NKG2A, ligante de HLA-E, teria uma função imunoregulatória.

Não foram evidenciadas diferenças na expressão de NKG2C na pele de pacientes em relação aos controles sadios. No sangue, houve expressão significativamente aumentada de NKG2C nas células NK CD56+CD16+ dos pacientes em relação aos controles sadios. Porém, a expressão de NKG2C em células NK CD56+CD16+ está preferencialmente expandida em indivíduos soropositivos para CMV, e NKG2C poderia ser um marcador específico de infecção por CMV (62). Como não foi possível determinar o perfil sorológico para CMV de todos os pacientes incluídos no estudo, não se sabe se esse achado representa apenas uma diferença na soropositividade para CMV, que é prevalente na região geográfica estudada.

Assim, neste estudo demonstrou-se que na pele de indivíduos com psoríase predomina um fenótipo menos diferenciado de células NK, caracterizado por alta expressão de NKG2A e baixa expressão de CD57. O fato desses achados terem sido demonstrados na pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase, e não no sangue, sugere que as alterações são limitadas aos tecidos afetados. A determinação das características funcionais dessas células, bem como de suas interações com

células dendríticas e células T presentes nas lesões, poderiam fornecer dados adicionais relevantes sobre o papel das células NK na patogênese da psoríase.

5.3 Fenótipo de células T CD4+ e CD8+

A expressão de CD57 em células T CD8+ determina diminuição da capacidade replicativa e define a senescência que ocorre em condições de ativação imunológica crônica (70). Em células T CD4+, a expressão de CD57 está associada a diminuição da capacidade proliferativa com alterações funcionais, que incluem maior produção de IFN- γ e menor produção de IL-2 (150). Neste estudo, investigamos o comportamento de células T CD4+ e CD8+ em relação à expressão de CD57 na pele lesional de pacientes com psoríase em relação à pele não afetada.

A expressão de CD57 na pele de pacientes com psoríase foi investigada previamente, por imunohistoquímica, onde se demonstrou maior expressão de CD57 na epiderme e derme papilar das lesões em relação ao tecido não afetado, enquanto na derme reticular observou-se maior expressão de CD57 nas amostras de pele não afetada (151). No presente estudo, observou-se maior expressão de CD57 em células T CD4+ e CD8+ na pele não afetada. Como a citometria de fluxo foi realizada com amostras de pele total, incluindo epiderme, derme papilar e reticular, e uma maior representatividade da derme reticular poderia justificar esse resultado com base nos achados de imunohistoquímica referidos acima.

A presença de células T CD57+ na pele de pacientes com psoríase poderia ocorrer pelo aumento na expressão de quimiocinas que determinam sua migração. O processo inflamatório nas lesões de psoríase poderia levar ao aumento de expressão nos queratinócitos de receptores de quimiocinas que facilitariam a migração de células T CD8+CD57+. As quimiocinas e receptores que determinam a migração de células T CD8+ da circulação para a pele na psoríase foram determinados, e incluem expressão do marcador CLA, associada à interação entre CXCR6 expresso pelas células T CD8+ e CXCL16 expresso pelos queratinócitos da epiderme (152). Em relação às células T CD8+CD57+, a expressão do receptor CX3CR1 pode determinar a sua migração para tecidos não-linfóides (142). Dois polimorfismos no gene do receptor CX3CR1 foram associados à psoríase. Um desses polimorfismos, presente mais frequentemente em controles sadios que em pacientes com psoríase, limita a capacidade de adesão entre CX3CR1 e seu ligante, CX3CL1 (153). Assim, nos pacientes com psoríase, o

recrutamento das células CD57+ para a pele poderia ocorrer pelo eixo CX3CR1-CX3CL1.

Foi interessante nos resultados deste estudo o achado de maiores proporções de células CD4+CD57+ e CD8+CD57+ na pele não afetada de pacientes com psoríase em relação à pele lesional. Recentemente, diversos estudos têm dado atenção à pele não afetada de pacientes com psoríase, e determinou-se nela a presença de células T auto-reativas, quiescentes, capazes de iniciar o processo inflamatório se estimuladas por citocinas como IFN- α , denominadas células T residentes no tecido (104). Poderia especular-se que essas células quiescentes apresentam maior expressão de CD57, que representa expansão clonal prévia. Não se sabe se a pele que se apresentava como não afetada no momento da biópsia já foi previamente local de lesão. Recentemente, foi determinado que locais que apresentaram lesões de psoríase previamente mantêm a presença de células T CD8+, residentes no tecido, firmando o conceito de memória lesional (154, 155). Esta poderia ser outra forma de justificar o achado de células CD8+CD57+ no tecido não afetado de pacientes com psoríase. Por outro lado, o alto turnover celular nas lesões de psoríase não favorece a sobrevivência de células com baixa capacidade replicativa, como as células CD57+.

5.4 Ensaios funcionais de células T

Neste estudo, através de ensaios funcionais realizados com células T CD4+ e CD8+ isoladas por *sorting* celular, foi possível investigar a produção de diversas citocinas, incluindo IL-17A, IL-22, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-21, IL-27 e IL-33, na pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase. Essas citocinas foram previamente implicadas na patogênese da psoríase, porém para algumas delas não está completamente determinada a célula de origem (130, 132, 133). Assim, buscou-se identificar se células T CD4+ e CD8+ eram a fonte dessas citocinas citadas, e se havia diferença entre os níveis de citocinas expressados na pele lesional e não afetada.

Células T CD4+ e CD8+ isoladas da pele lesional têm maior capacidade de produção de IL-17A que aquelas isoladas da pele não afetada. Esse achado pode indicar que as células T adquiriram a capacidade de secreção dessa citocina em resposta a fatores inflamatórios locais ou antígenos expressos localmente. Células T CD4+ isoladas da pele lesional também produziram maiores níveis de IL-22, e essas poderiam representar células Th-17 ou Th-22. Os níveis de IL-22 se correlacionaram aos níveis

de TNF- α , IFN- γ e IL-2. Foi possível demonstrar produção de IL-22 por células T CD8⁺ isoladas da pele lesional, em baixos níveis, porém significativamente maiores que os níveis produzidos por células isoladas da pele não afetada. As células T CD8⁺ isoladas da pele lesional exibiram perfil misto entre Th-1 e Th-17, já que produziram altos níveis de IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-2.

Embora estejam presentes em números significativamente menores que as células T $\alpha\beta$, as células $\gamma\delta$ também podem expressar os receptores CD4 e CD8, e podem contribuir para a produção de citocinas observada no tecido lesional. Foi demonstrada a presença de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 na pele de pacientes com psoríase em maiores números que em controles sadios (156). Porém, células $\gamma\delta$ correspondem a apenas 4% das células T dérmicas (157). Neste estudo, demonstramos que células T CD3⁺ isoladas da pele lesional de pacientes com psoríase produzem IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF- α , and IL-2 em níveis maiores que na pele não afetada. Não foi possível determinar se essas células eram $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, porém consideramos mais provável se tratarem de células $\alpha\beta$, e que células $\gamma\delta$ poderiam contribuir em pequenas proporções à produção de IL-17 observada.

Assim, demonstrou-se diferenças funcionais nas células T isoladas da pele lesional e não afetada dos mesmos indivíduos. Há produção preferencial de citocinas por células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas de tecido lesional. Essa diferença funcional poderia refletir alterações na migração e trânsito de células inflamatórias entre diferentes tecidos.

6 CONCLUSÕES

- Células NK na pele lesional e não afetada de pacientes com psoríase apresentam fenótipo compatível com baixa diferenciação e alta capacidade efetora, caracterizado pela baixa expressão de CD57 e alta expressão de NKG2A
- Células T CD4+ e CD8+ na pele não afetada de pacientes com psoríase apresentam fenótipo compatível com estimulação antigênica crônica e imuno-senescência, caracterizadas pela alta expressão de CD57, que pode refletir menor sobrevivência de células CD57+ no tecido lesional em decorrência do alto *turnover* celular
- Células T CD4+ isoladas da pele lesional de pacientes com psoríase apresentam perfil funcional diferente daquelas isoladas de amostras de pele não afetada, com produção significativamente maior de IL-17A, IL-22 e IFN- γ
- Células T CD8+ isoladas da pele lesional de pacientes com psoríase apresentam perfil funcional diferente daquelas isoladas de amostras de pele não afetada, com maior produção de IL-17A, IL-22, IFN- γ , TNF- α e IL-2

7 ANEXOS

ANEXO A Aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade da Califórnia, San Francisco

COMMITTEE ON HUMAN RESEARCH
OFFICE OF RESEARCH, Box 0962
UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO
www.research.ucsf.edu/chr/Apply/chrApprovalCond.asp
chr@ucsf.edu
(415) 476-1814

CHR APPROVAL LETTER

TO: Wilson Liao, MD
Box 0793

Pui-Yan Kwok, M.D., Ph.D.
Box 0793,

RE: Genetic Risk Factors for Inflammatory Skin Disease

The Committee on Human Research (CHR) has reviewed and approved this application to involve humans as research subjects. This included a review of all documents attached to the original copy of this letter.

Specifically, the review included but was not limited to the following documents:

Parent Consent Form, Dated 7/29/09

Assent Form, Dated 7/29/09

Adult/Adolescent Consent Form, Dated 7/29/09

Adult/Adolescent Consent Form, Dated 7/29/09

Adult Control Consent Form, Dated 7/29/09

The CHR is the Institutional Review Board (IRB) for UCSF and its affiliates. UCSF holds Office of Human Research Protections Federalwide Assurance number FWA00000068. See the CHR website for a list of other applicable FWA's.

COMMENT: First, research involving minors may be approved by the CHR only if the research satisfies specific conditions in federal regulations (Subpart D of 45 CFR 46 and 21 CFR 50). The members decided that enrolling minors in this study is acceptable under the provision of federal regulations (45 CFR 46.406, 21 CFR 50.53). The research involves greater than minimal risk (though only a minor increase over minimal risk) and no prospect of direct benefit to individual subjects, but is likely to yield generalizable knowledge about the subject's disorder or condition. The assent of the minors will be obtained, as will the permission of both parents (unless one parent is deceased, unknown, incompetent, or not reasonably available, or when only one parent has legal responsibility for the care and custody of the child).

APPROVAL NUMBER: H12209-29620-04. This number is a UCSF CHR number and should be used on all correspondence, consent forms and patient charts as appropriate.

APPROVAL DATE: September 1, 2009

EXPIRATION DATE: September 25, 2010

Full Committee Review

GENERAL CONDITIONS OF APPROVAL: Please refer to www.research.ucsf.edu/chr/Apply/chrApprovalCond.asp for a description of the general conditions of CHR approval. In particular, the study must be renewed by the expiration date if work is to continue. Also, prior CHR approval is required before implementing any changes in the consent documents or any changes in the protocol unless those changes are required urgently for the safety of the subjects.

HIPAA "Privacy Rule" (45CFR164): This study requires individual consent/authorization for use and/or disclosure of Protected Health Information (PHI).

Sincerely,

Reese T. Jones, M.D.
Chair, Committee on Human Research

cc:

ANEXO B Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 04/01/2012, APROVOU **ad-referendum** o **Protocolo de Pesquisa nº 494/11 intitulado: “AVALIAÇÃO DE ASPECTOS INATOS E ADAPTATIVOS DO SISTEMA IMUNE NA PSORÍASE: ANÁLISE FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS NATURAL KILLER E CÉLULAS T”** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Jorge Elias Kalil Filho

Pesquisador (a) Executante: Mariana Dias Batista

CEP-FMUSP, 05 de Janeiro de 2012.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO C Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO (UCSF) & SAN FRANCISCO GENERAL HOSPITAL (SFGH) CONSENT TO PARTICIPATE IN A RESEARCH STUDY AND DONATE SPECIMENS FOR FUTURE RESEARCH FOR ADULTS AND ADOLESCENTS 13 AND OLDER

Genetic Risk Factors for Inflammatory Skin Disease

This is a request that you donate saliva, blood, or a skin sample for medical research. The researchers, Wilson Liao M.D., Kari Connolly M.D., Lindy Fox, M.D., Michael Rosenblum, M.D., PhD., Vera Price M.D., Kieron Leslie M.D., Kanade Shinkai M.D., and Kelly Cordoro M.D. from the UCSF Department of Dermatology will explain this research to you.

Medical research includes only people who choose to take part. Take your time to make your decision about participating. You may discuss your decision with your family and friends and with your health care team. If you have any questions, you may ask the researchers.

You are being asked to take part in this study because you have an inflammatory skin condition. New research technologies may allow scientists to discover the genes that cause these skin conditions—but volunteers are needed to donate samples for these studies.

Why is this research being done?

The purpose of this study is to identify the genes that predispose to inflammatory skin diseases. By identifying these genes, better treatments can be developed in the future. This study is funded by the UCSF Department of Dermatology.

How many people will take part in this research?

About 1000 people from San Francisco will participate in this study.

What will happen if I agree to participate in the study and donate my sample?

If you agree to participate and let researchers collect and store your saliva, blood, or skin for future research, the following will happen:

- You will take 5 minutes to fill out a questionnaire. This questionnaire will ask you about when your condition started, how it appears, your response to medications, past medical history, and your ethnic background.
- You will meet with a study physician and undergo a 5 minute skin exam to document what your skin condition looks like now.
- You will donate a small amount of saliva (1 tablespoon), blood (2-3 tablespoons), or skin (size of a pencil eraser) according to your choice. After this step, you are

finished with the study. One additional visit for suture removal may be necessary if you donate a skin sample.

- DNA, RNA, and protein from your sample will be analyzed to identify genes predisposing to your skin condition.
- We may give your sample and information to other scientists or companies not at UCSF but **we will not** give them your name, address, phone number, or any other information that would identify you. Reports about any research will not be given to you, your doctor, or placed in any medical record. The research will not change the care you receive. Your specimen and any information about you will be kept until it is used up or destroyed. It may be used to develop new drugs, tests, treatments or products. In some instances these may have potential commercial value. Your personal health information cannot be used for additional research without additional approval from either you or a review committee.
- Your extra sample will be kept indefinitely in a tissue bank. If you decide later that you do not want your sample and information to be used for future research, you can tell us, and we will destroy any remaining identifiable sample and information if it is no longer needed for your care.

What risks are involved with donating specimens for research?

- If you donate saliva, no significant risks are expected. If you donate blood, no risks above and beyond a standard blood draw are expected, including temporary discomfort from the needle stick, bruising, and rarely, infection. If you donate a skin biopsy sample, there is a small risk of bleeding, infection, and rarely, allergic reaction to the anesthetic.
- Confidentiality: Donating specimens may involve a loss of privacy, but information about you will be handled as confidentially as possible. Any information that requires mandatory reporting to state or federal officials, such as signs of physical abuse, will be reported to the appropriate agencies. Your name will not be used in any published reports from research performed using your specimen. The manager of tissue bank, Dr. Wilson Liao, and select tissue bank staff members will have access to information about you but they will not release any identifying information about you to researchers using your specimen. The UCSF Committee on Human Research and other University of California personnel also may see information about you to check on the tissue bank. Once your health information is disclosed to the research team it is not protected under the Health Information Portability and Accountability Act (HIPAA). The tissue bank staff will continue to protect your personally identifiable health information as described in this consent form. The University of California complies with the requirements of HIPAA and its privacy regulations, and with all other applicable laws that protect the confidentiality of your health information.
- To help us protect your privacy, we have obtained a Certificate of Confidentiality from the National Institutes of Health. With this Certificate, the researchers cannot be forced to disclose information that may identify you, even by a court subpoena, in any federal, state, or local civil, criminal, administrative, legislative, or other proceedings. **Exceptions:** A Certificate of Confidentiality does not prevent

researchers from voluntarily disclosing information about you, without your consent. For example, we will voluntarily disclose information about incidents such as child abuse, and intent to hurt yourself or others. In addition, a Certificate of Confidentiality does not prevent you or a member of your family from voluntarily releasing information about yourself or your involvement in this research. If an insurer, employer, or other person obtains your written consent to receive research information, then the researchers may not use the Certificate to withhold that information. Finally, the Certificate may not be used to withhold information from the Federal government needed for auditing or evaluating Federally funded projects or information needed by the FDA.

What happens if I am injured because I took part in this study?

Treatment and Compensation for Injury: If you are injured as a result of being in this study, treatment will be available. The costs of the treatment may be covered by the University of California depending on a number of factors. The University does not normally provide any other form of compensation for injury. For further information about this, you may call the office of the Committee on Human Research at 415- 476-1814.

What are the benefits of donating specimens for research?

There will be no direct benefit to you from allowing your specimen to be used for research. However, by better understanding what causes your skin condition, we hope this information will help in the future treatment of patients like yourself.

What financial issues should I consider before donating?

You will not be charged for donating your specimen. You will not be paid for donating your specimen. If any new products, tests or discoveries that result from this research have potential commercial value, you will not share in any financial benefits. UCSF may receive payment from researchers requesting specimens in order to cover the costs of collecting and storing the specimens.

What alternatives do I have?

You may choose not to participate in this study.

What are my rights if I take part in this study?

Taking part in this study is your choice. You may choose either to take part or not to take part in the study. No matter what decision you make, there will be no penalty to you and you will not lose any of your regular benefits. Leaving the study will not affect your medical care. You can still get your medical care from our institution. In the case of injury resulting from this study, you do not lose any of your legal rights to seek payment by signing this form.

Who can answer my questions about the study?

You can talk to the researchers about any questions or concerns you have about this study. Contact Dr. Wilson Liao at 415-514-3879.

For questions about your rights while taking part in this study, call the office of the **Committee on Human Research**, UCSF's Institutional Review Board (a group of people who review the research to protect your rights) at **415-476-1814**.

Consent

Please read each sentence below and think about your choice. After reading each sentence, put your initials in the "Yes" or "No" boxes. If you have any questions, please talk to your doctor or nurse, or call our research review board at IRB's phone number.

No matter what you decide to do, it will not affect your care.

1. I wish to donate the following sample(s) for use in research to learn about inflammatory skin disease:

	<i>Yes</i>	<i>No</i>
<i>Saliva:</i>		
<i>Blood:</i>		
<i>Skin Biopsy:</i>		

2. My sample(s) may be kept for use in research to learn about, prevent or treat other health problems.

<i>YES</i>	<i>NO</i>
------------	-----------

3. Someone may contact me in the future to ask me to take part in more research.

<i>YES</i>	<i>NO</i>
------------	-----------

You have been given copies of this consent form and the Experimental Subject's Bill of Rights to keep.

PARTICIPATION IN RESEARCH IS VOLUNTARY. You have the right to decline to participate or to withdraw at any point in this study without penalty or loss of benefits to which you are otherwise entitled.

If you wish to participate in this study, you should sign below, and you will be asked to sign a separate form authorizing use, creation, and disclosure of protected health information about you.

 Date Subject's Signature
 Subject is Adolescent

 Date Parent #1 Signature if

 Date Person Obtaining Consent
 Subject is Adolescent

 Date Parent #2 Signature if

Date Witness / Translator Signature

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO
EXPERIMENTAL SUBJECT'S
BILL OF RIGHTS

The rights below are the rights of every person who is asked to be in a research study. As an experimental subject I have the following rights:

- 1) To be told what the study is trying to find out,
- 2) To be told what will happen to me and whether any of the procedures, drugs, or devices is different from what would be used in standard practice,
- 3) To be told about the frequent and/or important risks, side effects, or discomforts of the things that will happen to me for research purposes,
- 4) To be told if I can expect any benefit from participating, and, if so, what the benefit might be,
- 5) To be told of the other choices I have and how they may be better or worse than being in the study,
- 6) To be allowed to ask any questions concerning the study both before agreeing to be involved and during the course of the study,
- 7) To be told what sort of medical treatment is available if any complications arise,
- 8) To refuse to participate at all or to change my mind about participation after the study is started. This decision will not affect my right to receive the care I would receive if I were not in the study,
- 9) To receive a copy of the signed and dated consent form,
- 10) To be free of pressure when considering whether I wish to agree to be in the study.

If I have other questions I should ask the researcher or the research assistant. In addition, I may contact the Committee on Human Research, which is concerned with protection of volunteers in research projects. I may reach the committee office by calling: (415) 476-1814 from 8:00 AM to 5:00 PM, Monday to Friday, or by writing to the Committee on Human Research, Box 0962, University of California, San Francisco, CA 94143.

Call 476-1814 for information on translations.

ANEXO D Comprovação de submissão ao periódico Experimental Dermatology

rodil@uni-muenster.de via manuscriptcentral.com

29-Mar-2012

Dear Dr. Batista:

Thank you for your submission to Experimental Dermatology. Your manuscript "Skewed Distribution of Natural Killer Cells in Psoriatic Skin Lesions" has been received, and you will be notified in the next several weeks regarding its review.

If you have any questions or concerns about this review, please contact the editorial staff at rodil@uni-muenster.de

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Yours sincerely,

Monica Rodil

Editorial Assistant

Experimental Dermatology

rodil@uni-muenster.de

<http://mc.manuscriptcentral.com/exd>

ANEXO E Comprovação de submissão ao periódico PLoS One

Dear Dr. Batista,

On Jul 31 2012 10:01AM, we received your Research Article entitled "CD57 expression and cytokine production by T cells in lesional and unaffected skin from patients with psoriasis" by Mariana Dias Batista, M.D.; Camilla Tincati; Jeffrey M. Milush; Emily L. Ho; Lishomwa C. Ndhlovu; Vanessa A. York; Esper G. Kallas; Jorge Kalil; Sheila M. Keating; Philip J. Norris; David Chang; Patrick Unemori; Kieron S. Leslie; Toby Maurer; Wilson Liao; Douglas F. Nixon.

Your manuscript has been assigned the manuscript number: PONE-D-12-23498.

We will keep you informed about the progress of your manuscript or you can check the status by logging into your account.

Please be aware that you will NOT be required to complete the 'Open-Access Agreement' field until your manuscript is accepted for publication. You may also be asked to provide your article and figure files in a different format at this time (please see the 'Format Requirements' section of the Manuscript Guidelines for more information: <http://www.plosone.org/static/guidelines.action#format>)

Please visit everyONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for authors who have published with us (as well as our readers), where you will be able to find out what the journal is thinking, changing and doing.

Thank you for submitting to PLOS ONE.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact <http://pone.edmgr.com/>.

Thank you for choosing PLOS ONE.

Best wishes,

Damian Pattinson, PhD
Executive Editor, PLOS ONE

8 REFERÊNCIAS

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):496-509.
2. Schafer T. Epidemiology of psoriasis. Review and the German perspective. *Dermatology*. 2006;212(4):327-37.
3. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*. 2007 Jul 21;370(9583):263-71.
4. Pinkus H, Mehregan AH. The primary histologic lesion of seborrheic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1966 Jan;46(1):109-16.
5. Halprin KM. Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br J Dermatol*. 1972 Jan;86(1):14-9.
6. Bergstresser PR, Taylor JR. Epidermal 'turnover time'--a new examination. *Br J Dermatol*. 1977 May;96(5):503-9.
7. Naldi L, Peli L, Parazzini F, Carrel CF, Psoriasis Study Group of the Italian Group for Epidemiological Research in D. Family history of psoriasis, stressful life events, and recent infectious disease are risk factors for a first episode of acute guttate psoriasis: results of a case-control study. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Mar;44(3):433-8.
8. Manolache L, Petrescu-Seceleanu D, Benea V. Life events involvement in psoriasis onset/recurrence. *Int J Dermatol*. 2010 Jun;49(6):636-41.
9. Tsankov N, Kazandjieva J, Drenovska K. Drugs in exacerbation and provocation of psoriasis. *Clin Dermatol*. 1998 May-Jun;16(3):333-51.
10. Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV. Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms. *Br J Dermatol*. 2011 Dec;165(6):1162-8.
11. Cassano N, Vestita M, Apruzzi D, Vena GA. Alcohol, psoriasis, liver disease, and anti-psoriasis drugs. *Int J Dermatol*. 2011 Nov;50(11):1323-31.
12. Christophers E, Barker JN, Griffiths CE, Dauden E, Milligan G, Molta C, et al. The risk of psoriatic arthritis remains constant following initial diagnosis of psoriasis among patients seen in European dermatology clinics. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 May;24(5):548-54.
13. Foulkes AC, Grindlay DJ, Griffiths CE, Warren RB. What's new in psoriasis? An analysis of guidelines and systematic reviews published in 2009-2010. *Clin Exp Dermatol*. 2011 Aug;36(6):585-9; quiz 8-9.
14. Devrimci-Ozguven H, Kundakci TN, Kumbasar H, Boyvat A. The depression, anxiety, life satisfaction and affective expression levels in psoriasis patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2000 Jul;14(4):267-71.
15. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB, Jr., Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Sep;41(3 Pt 1):401-7.
16. Tristani-Firouzi P, Krueger GG. Efficacy and safety of treatment modalities for psoriasis. *Cutis*. 1998 Feb;61(2 Suppl):11-21.
17. Gisondi P, Tessari G, Conti A, Piaserico S, Schianchi S, Peserico A, et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. *Br J Dermatol*. 2007 Jul;157(1):68-73.
18. Ludwig RJ, Boehncke WH. Psoriasis and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2007 Jan 24;297(4):362; author reply -3.
19. Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, Samuelsson L, et al. Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to

- chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J Invest Dermatol*. 2004 Jun;122(6):1401-5.
20. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet*. 1997 May;6(5):813-20.
 21. Nair RP, Stuart P, Henseler T, Jenisch S, Chia NV, Westphal E, et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet*. 2000 Jun;66(6):1833-44.
 22. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep;5(9):699-711.
 23. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*. 2006 May;78(5):827-51.
 24. Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaelsson G, Evans J, et al. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*. 2003 Apr;120(4):627-32.
 25. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol*. 1980 Feb;102(2):179-84.
 26. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 1985 Sep;13(3):450-6.
 27. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, et al. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet*. 2007 Sep;122(2):201-6.
 28. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, et al. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2008 Jul;128(7):1653-61.
 29. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*. 2009 Feb;41(2):199-204.
 30. Wolf N, Quaranta M, Prescott NJ, Allen M, Smith R, Burden AD, et al. Psoriasis is associated with pleiotropic susceptibility loci identified in type II diabetes and Crohn disease. *J Med Genet*. 2008 Feb;45(2):114-6.
 31. Li Y, Liao W, Chang M, Schrod J, Bui N, Catanese JJ, et al. Further genetic evidence for three psoriasis-risk genes: ADAM33, CDKAL1, and PTPN22. *J Invest Dermatol*. 2009 Mar;129(3):629-34.
 32. Feng BJ, Sun LD, Soltani-Arabshahi R, Bowcock AM, Nair RP, Stuart P, et al. Multiple Loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. *PLoS Genet*. 2009 Aug;5(8):e1000606.
 33. Genetic Analysis of Psoriasis C, the Wellcome Trust Case Control C, Strange A, Capon F, Spencer CC, Knight J, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet*. 2010 Nov;42(11):985-90.
 34. Jordan CT, Cao L, Roberson ED, Duan S, Helms CA, Nair RP, et al. Rare and Common Variants in CARD14, Encoding an Epidermal Regulator of NF-kappaB, in Psoriasis. *Am J Hum Genet*. 2012 Apr 17.
 35. Jordan CT, Cao L, Roberson ED, Pierson KC, Yang CF, Joyce CE, et al. PSORS2 is Due to Mutations in CARD14. *Am J Hum Genet*. 2012 Apr 17.

36. Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. Prediction of individual genetic risk to disease from genome-wide association studies. *Genome Res.* 2007 Oct;17(10):1520-8.
37. Chen H, Poon A, Yeung C, Helms C, Pons J, Bowcock AM, et al. A genetic risk score combining ten psoriasis risk loci improves disease prediction. *PLoS One.* 2011;6(4):e19454.
38. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2004 May;122(5):1133-6.
39. Luszczyk W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M, et al. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol.* 2004 Jul;65(7):758-66.
40. Buchau AS, Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol.* 2007 Nov-Dec;25(6):616-24.
41. Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol.* 2011 Oct;131(10):1974-80.
42. Ganguly D, Chamilo G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.* 2009 Aug 31;206(9):1983-94.
43. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):564-9.
44. Morizane S, Yamasaki K, Muhleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol.* 2012 Jan;132(1):135-43.
45. Funk J, Langeland T, Schrumpf E, Hanssen LE. Psoriasis induced by interferon-alpha. *Br J Dermatol.* 1991 Nov;125(5):463-5.
46. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, Daniele R, Bosisio D, Madonna S, et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med.* 2009 Jan 16;206(1):249-58.
47. Gschwandtner M, Mommert S, Kother B, Werfel T, Gutzmer R. The histamine H4 receptor is highly expressed on plasmacytoid dendritic cells in psoriasis and histamine regulates their cytokine production and migration. *J Invest Dermatol.* 2011 Aug;131(8):1668-76.
48. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):679-91.
49. Bos JD, de Rie MA, Teunissen MB, Piskin G. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol.* 2005 Jun;152(6):1098-107.
50. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006 Oct 2;203(10):2271-9.
51. Peternel S, Kastelan M. Immunopathogenesis of psoriasis: focus on natural killer T cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009 Oct;23(10):1123-7.
52. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, Huang BB, Modlin R, Spada FM, et al. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):4076-85.
53. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct;11(10):645-57.

54. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989 Jun 1;169(6):2233-8.
55. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:657-79.
56. Sun JC, Lanier LL. Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1819-28.
57. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:405-29.
58. Sun JC, Lanier LL. Versatility in NK cell memory. *Immunol Cell Biol*. 2011 Mar;89(3):327-9.
59. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):495-502.
60. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):795-9.
61. Vales-Gomez M, Reyburn HT, Erskine RA, Lopez-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J*. 1999 Aug 2;18(15):4250-60.
62. Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 6;108(36):14725-32.
63. Spriggs MK. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:101-30.
64. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990 Jul;11(7):237-44.
65. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaelsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*. 2010 Feb 11;115(6):1166-74.
66. Lanier LL, Le AM, Cwirla S, Federspiel N, Phillips JH. Antigenic, functional, and molecular genetic studies of human natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes not restricted by the major histocompatibility complex. *Fed Proc*. 1986 Nov;45(12):2823-8.
67. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3853-64.
68. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3865-74.
69. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol*. 2010 Jan;87(1):107-16.
70. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2711-20.
71. Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Hicks R, Sissons JG, Carmichael AJ. Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes

within the CD57+ CD28- CD8+ T-cell population. *Immunology*. 1999 Nov;98(3):443-9.

72. Wood KL, Twigg HL, 3rd, Doseff AI. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. *Front Biosci*. 2009;14:3771-81.

73. Wood KL, Knox KS, Wang Y, Day RB, Schnizlein-Bick C, Twigg HL, 3rd. Apoptosis of CD57+ and CD57- lymphocytes in the lung and blood of HIV-infected subjects. *Clin Immunol*. 2005 Dec;117(3):294-301.

74. Gunturi A, Berg RE, Forman J. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):1737-45.

75. Ugolini S, Arpin C, Anfossi N, Walzer T, Cambiaggi A, Forster R, et al. Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2001 May;2(5):430-5.

76. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:83-94.

77. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):507-16.

78. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):557-61.

79. Sun JC, Lopez-Verges S, Kim CC, DeRisi JL, Lanier LL. NK cells and immune "memory". *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):1891-7.

80. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*. 2012 Mar 15;119(11):2665-74.

81. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*. 2012 Sep 14.

82. Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, et al. Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):75-82.

83. Cameron AL, Kirby B, Griffiths CE. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2003 Jul;149(1):160-4.

84. Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pita O, Girolomoni G, Cavani A. CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol*. 2006 Jan;36(1):118-28.

85. Flodstrom-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Hoglund P, Ljunggren HG. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2009 Dec;21(6):634-40.

86. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 2009 Feb 5;457(7230):722-5.

87. Carbone T, Nasorri F, Pennino D, Eyerich K, Foerster S, Cifaldi L, et al. CD56highCD16-CD62L- NK cells accumulate in allergic contact dermatitis and contribute to the expression of allergic responses. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):1102-10.

88. Dunphy S, Gardiner CM. NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:248317.

89. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3625-32.

90. Skrzeczynska-Moncznik J, Stefanska A, Zabel BA, Kapinska-Mrowiecka M, Butcher EC, Cichy J. Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(2):355-60.
91. Luci C, Gaudy-Marqueste C, Rouzaire P, Audonnet S, Cognet C, Hennino A, et al. Peripheral natural killer cells exhibit qualitative and quantitative changes in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2012 Apr;166(4):789-96.
92. Son SW, Kim EO, Ryu ES, Kim TJ, Kim JN, Choi JE, et al. Upregulation of Fas and downregulation of CD94/NKG2A inhibitory receptors on circulating natural killer cells in patients with new-onset psoriasis. *Br J Dermatol.* 2009 Aug;161(2):281-8.
93. Liao YH, Jee SH, Sheu BC, Huang YL, Tseng MP, Hsu SM, et al. Increased expression of the natural killer cell inhibitory receptor CD94/NKG2A and CD158b on circulating and lesional T cells in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.* 2006 Aug;155(2):318-24.
94. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 1994 Jul;94(1):202-9.
95. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin SL, Nussbaum R, et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 27;102(52):19057-62.
96. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity.* 2011 Dec 23;35(6):857-69.
97. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol.* 2008 May;128(5):1207-11.
98. Schon MP, Boehncke WH, Brocker EB. Psoriasis: Clinical manifestations, pathogenesis and therapeutic perspectives. *Discov Med.* 2005 Jun;5(27):253-8.
99. Lewis HM, Baker BS, Bokth S, Powles AV, Garioch JJ, Valdimarsson H, et al. Restricted T-cell receptor V beta gene usage in the skin of patients with guttate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.* 1993 Nov;129(5):514-20.
100. Leung DY, Travers JB, Giorno R, Norris DA, Skinner R, Aelion J, et al. Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest.* 1995 Nov;96(5):2106-12.
101. Macias ES, Pereira FA, Rietkerk W, Safai B. Superantigens in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Mar;64(3):455-72; quiz 73-4.
102. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today.* 1995 Mar;16(3):145-9.
103. Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol.* 2005 Jul;53(1):67-72.
104. Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol.* 2010 Feb;130(2):362-70.
105. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol.* 2009 May;10(5):524-30.
106. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role

- for resident T cells and tumor necrosis factor- α . *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):731-6.
107. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):135-43.
 108. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes Immun*. 2007 Jan;8(1):1-12.
 109. Menssen A, Trommler P, Vollmer S, Schendel D, Albert E, Gurtler L, et al. Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol*. 1995 Oct 15;155(8):4078-83.
 110. Bour H, Puisieux I, Even J, Kourilsky P, Favrot M, Musette P, et al. T-cell repertoire analysis in chronic plaque psoriasis suggests an antigen-specific immune response. *Hum Immunol*. 1999 Aug;60(8):665-76.
 111. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol*. 1993 Nov;101(5):701-5.
 112. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon- γ , interleukin-2, and tumor necrosis factor- α , defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol*. 1999 Nov;113(5):752-9.
 113. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009 Jun;129(6):1339-50.
 114. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol*. 2008 Nov;159(5):1092-102.
 115. Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1908-15.
 116. Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):5948-55.
 117. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
 118. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):639-46.
 119. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1903-16.
 120. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010 May;130(5):1373-83.
 121. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):950-7.

122. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2012 Mar 29;366(13):1190-9.
123. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med*. 2012 Mar 29;366(13):1181-9.
124. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):648-51.
125. Res PC, Piskin G, de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, Bos JD, et al. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One*. 2010;5(11):e14108.
126. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol*. 2011 Mar;23(3):159-63.
127. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2006 May;36(5):1309-23.
128. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3695-702.
129. Nogales KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jun;123(6):1244-52 e2.
130. Caruso R, Botti E, Sarra M, Esposito M, Stolfi C, Diluvio L, et al. Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1013-5.
131. He Z, Jin L, Liu ZF, Hu L, Dang EL, Feng ZZ, et al. Elevated serum levels of interleukin 21 are associated with disease severity in patients with psoriasis. *Br J Dermatol*. 2012 Jul;167(1):191-3.
132. Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, et al. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010 Apr;130(4):1034-9.
133. Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 2;107(9):4448-53.
134. Paukkonen K, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of CD8 + T cells and CD11c + macrophages into the epidermis. *Arch Dermatol Res*. 1992;284(7):375-9.
135. Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, et al. IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;86(2):435-43.
136. Evans TG, Kallas EG, Luque AE, Menegus M, McNair C, Looney RJ. Expansion of the CD57 subset of CD8 T cells in HIV-1 infection is related to CMV serostatus. *AIDS*. 1999 Jun 18;13(9):1139-41.

137. Arai K, Yamamura S, Seki S, Hanyu T, Takahashi HE, Abo T. Increase of CD57+ T cells in knee joints and adjacent bone marrow of rheumatoid arthritis (RA) patients: implication for an anti-inflammatory role. *Clin Exp Immunol*. 1998 Feb;111(2):345-52.
138. Iking-Konert C, Vogl T, Prior B, Bleck E, Ostendorf B, Andrassy K, et al. Expression of CD57 on CD8+ T lymphocytes of patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis: evidence for continuous activation of CD8+ cells. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Jan-Feb;27(1 Suppl 52):S19-24.
139. Simpson RJ, Cosgrove C, Ingram LA, Florida-James GD, Whyte GP, Pircher H, et al. Senescent T-lymphocytes are mobilised into the peripheral blood compartment in young and older humans after exhaustive exercise. *Brain Behav Immun*. 2008 May;22(4):544-51.
140. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev*. 2000 Dec 20;121(1-3):77-88.
141. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan;85(1):88-97.
142. Le Priol Y, Puthier D, Lecureuil C, Combadiere C, Debre P, Nguyen C, et al. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5145-54.
143. Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2011 Dec;303(10):691-705.
144. Tobin AM, Lynch L, Kirby B, O'Farrelly C. Natural killer cells in psoriasis. *J Innate Immun*. 2011;3(4):403-10.
145. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanchez FO. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2005 Oct;125(4):721-30.
146. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990 May 1;171(5):1509-26.
147. Hong HS, Eberhard JM, Keudel P, Bollmann BA, Ballmaier M, Bhatnagar N, et al. HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *J Virol*. 2010 Jan;84(2):1183-8.
148. Beziat V, Descours B, Parizot C, Debre P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One*. 2010;5(8):e11966.
149. Morel E, Escamochero S, Cabanas R, Diaz R, Fiandor A, Bellon T. CD94/NKG2C is a killer effector molecule in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Mar;125(3):703-10, 10 e1-10 e8.
150. Palmer BE, Blyveis N, Fontenot AP, Wilson CC. Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8415-23.
151. Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2002 Nov;294(8):363-9.

152. Gunther C, Carballido-Perrig N, Kaesler S, Carballido JM, Biedermann T. CXCL16 and CXCR6 are upregulated in psoriasis and mediate cutaneous recruitment of human CD8+ T cells. *J Invest Dermatol.* 2012 Mar;132(3 Pt 1):626-34.
153. Plant D, Young HS, Watson RE, Worthington J, Griffiths CE. The CX3CL1-CX3CR1 system and psoriasis. *Exp Dermatol.* 2006 Nov;15(11):900-3.
154. Clark RA. Gone but not forgotten: lesional memory in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):283-5.
155. Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Lowes MA, Krueger JG. Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes. *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):391-400.
156. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, et al. Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity.* 2011 Oct 28;35(4):596-610.
157. Ebert LM, Meuter S, Moser B. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):4331-6.