



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

**A indução da expressão de genes reguladores x inflamatórios em
Linfócitos T após o cocultivo com Células dendríticas
previamente tratadas com peptídeos da Hsp60**

ANDRESSA SILVA DE MESQUITA

TERESINA

2018

ANDRESSA SILVA DE MESQUITA

**A indução da expressão de genes reguladores x inflamatórios em
Linfócitos T após o cocultivo com Células dendríticas previamente
tratadas com peptídeos da Hsp60**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde. Área de concentração - Métodos diagnósticos e análises das condições de saúde.

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva

TERESINA

2018

DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Mestranda: Andressa Silva de Mesquita

Título: A indução da expressão de genes reguladores x inflamatórios em Linfócitos T após o cocultivo com Células dendríticas previamente tratadas com peptídeos da Hsp60

Professor Orientador: Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva

Data da Defesa ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Adalberto Socorro, da Silva

(Presidente)

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior

(1º examinador)

Prof^a. Dra. Ester Miranda Pereira

(2º examinadora)

Prof. Dr. Viriato Campelo

(Suplente)

Dedico a Deus por me sustentar e permitir que esse sonho se tornasse real. A Nossa Senhora pela sua interseção diária, amor e colo de mãe nos momentos mais aflitivos. Aos meus pais e irmão pelo apoio, incentivo, amor e por acreditarem junto comigo que eu seria capaz.

Agradecimentos

“Deus não coloca em nosso coração nenhum desejo que não possa ser realizado”, é exatamente essa frase que resume esses 2 anos intensos de estudo e trabalho. Não poderia começar a agradecer se não a agradecer a Ele, obrigada meu **Deus** por semear em mim esse sonho que agora se torna real, obrigada por me guiar e por me ajudar a enfrentar meus medos. Obrigada por mais esse tijolo colocado na construção da minha vida profissional.

Agradeço imensamente aos meus pais e irmão, **Maria das Graças** e **Airton Antonio**; e **André Mesquita** por tamanho carinho, compreensão e apoio em todos os momentos. Vocês são minha razão e alicerce!

Ao meu namorado, **Vinícius Sobral**, por todo seu amor, por ser meu ponto de equilíbrio e calma, pela compreensão e paciência nos momentos mais estressantes. Amo você!

Ao meu querido Orientador Professor **Dr. Adalberto Socorro**. Pessoa tão íntegra e tão profissional, me faltam palavras para expressar imenso carinho e admiração, apenas o meu **MUITO OBRIGADA!** Obrigada por me ensinar tanto, principalmente os ensinamentos sobre humildade, dedicação ao trabalho, acreditar na capacidade do próximo e por me mostrar a verdadeira função de um mestre. Obrigada por não desistir de mim, por acreditar que eu seria capaz, obrigada por todo o seu incentivo -“Vai dar tudo certo”- Sem dúvida nenhuma saio desta etapa imensamente feliz e com uma inspiração enorme para minha vida profissional.

À querida companheira de profissão e eterna professora, **Ester Miranda**, por todo tempo dedicado, por todo ensinamento e por compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento.

Aos meus amigos, por todo apoio, carinho, admiração e ajuda na realização desse feito.

Ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) da Universidade Federal do Piauí, por toda experiência e conhecimento adquirido ao longo desse período.

Aos colegas de Turma do Mestrado, pela convivência agradável e parcerias nas horas difíceis.

A Universidade Federal do Piauí, sobretudo ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde por proporcionar conhecimentos de qualidade, e oportunidade de conviver e trocar experiências com distintos profissionais. Além, do incentivo à pesquisa na área da saúde. Agradeço em especial a **Edilene** pelas palavras de carinho e pela paciência no período pré-bolsa.

E por fim sou extremamente grata a todos que direta e indiretamente me ajudaram nessa conquista!

“E assim, esperando com paciência, alcançou a promessa”

Hebreus 6:15

RESUMO

A função fisiológica do sistema imune é a defesa contra microrganismos infecciosos. Os linfócitos T realizam papel central na resposta imune adquirida e vem sendo cada vez mais alvo de estudo, devido aos seus mecanismos fisiológicos de auto-regulação. Nosso objetivo, neste trabalho, foi identificar o perfil molecular de mRNA em linfócitos T de moléculas envolvidas em imunorregulação (FOXP3, GATA3, TGF- β , IL-10,) e de outras envolvidas em resposta imune pró-inflamatória (T-bet, IFN- γ , TNF- α), realizamos a interação de antígenos da Hsp60 com essas diferentes DCs em linfócitos, T no contexto de células dendríticas imaturas. Primeiramente Células dendríticas humanas maduras (mDC) e imaturas (iDC) foram geradas, *in vitro*, a partir de monócitos de 16 de indivíduos saudáveis. Estas células foram caracterizadas quanto à (i) morfologia e (ii) imunofenotipagem. Após a cocultura com antígenos da Hsp60, os linfócitos T foram purificados e feita a análise em RT-PCR. Obtivemos DC totalmente diferenciadas, a eficiência de diferenciação de monócitos em DC foi maior do que 90% após a purificação. As análises da morfologia revelaram que ambos os tipos celulares apresentam semelhanças morfológicas: são multiformes e sem vacúolos. No entanto, essas mesmas células apresentaram também algumas diferenças quanto à posição do núcleo e quanto às projeções membranosas. No perfil molecular verificamos um predomínio de modificações reguladoras para os genes TGF- β , TGF- β R, GATA3, TNF- α e T-bet. O peptídeo N7 induziu modificações predominantemente reguladoras em quase todas as condições em que ele foi testado. Em conclusão, verificamos que antígenos da Hsp60 têm a capacidade de ativar, simultaneamente, em linfócitos T, na interação com as células dendríticas, genes funcionalmente antagônicos. Isto reafirma a diversidade funcional da Hsp60. Ademais, identificamos o peptídeo N7 como potencialmente imunorregulador.

Palavras-Chave: Células dendríticas, Hsp60, peptídeos sintéticos, imunorregulação, linfócito T.

ABSTRACT

The physiological function of the system is a defense against infectious microorganisms. T lymphocytes play a central role in the immune response and are increasingly being studied because of their physiological mechanisms of self-regulation. Our objective was to determine the molecular profile of mRNA in T-lymphocytes involved in immunoregulation (FOXP3, GATA3, TGF- β , IL-10) and others involved in a proinflammatory immune response (T-bet, IFN- γ , TNF- α), we performed an interaction of Hsp60 antigens with these different DCs on T lymphocytes in the context of immature dendritic cells. First, mature human dendritic (mDC) and immature (iDC) cells were generated, *in vitro*, from monocytes of 16 from greetings. These cells were characterized for (i) morphology and (ii) immunofenotyping. After coculture with Hsp60 antigens, the T lymphocytes were purified and analyzed in RT-PCR. We obtained fully differentiated DCs, a monocyte division efficiency in DC was greater than 90% after a clearance. As analyzes of the morphology revealed that both types of cellular are reassembled with morphologies: they are multiform and without vacuoles. However, however, these cells similar to some references to the position of the nucleus and to the membranous projections. In the molecular profile we observed a predominance of regulatory modifications for the genes TGF- β , TGF- β R, GATA3, TNF- α and T-bet. The N7 peptide induced dominant regulatory modifications in almost all conditions under which it was tested. In conclusion, we verified that Hsp60 antigens have the ability to simultaneously activate T lymphocytes in the interaction with dendritic cells, functionally antagonistic genes. This reaffirms a functional diversity of Hsp60. In addition, identifiers or peptide N7 as potentially immunoregulatory.

Keywords: Dendritic cells, Hsp60, synthetic peptides, immunoregulation, T lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial Teórico

- Figura 1.** Imunidade inata e adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções..... 22
- Figura 2.** As DC fazem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Como as outras células da imunidade inata, as DCs reconhecem os patógenos por meio dos seus receptores de superfície celular invariáveis para as moléculas patogênicas, e são ativadas por esses estímulos logo no início da infecção..... 27
- Figura 3.** Maturação das células dendríticas. As células dendríticas surgem de uma célula precursora comum de linhagem mieloide na medula óssea e se diferenciam em subgrupos 28

PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS

- Figura 4.** Delineamento geral das etapas do protocolo experimental. Células dendríticas (DC) maduras (mDC) e imaturas (iDC) diferenciadas a partir de monócitos de voluntários saudáveis foram estimuladas com peptídeos sintéticos Derivados da Hsp60 34

Resultados

- Figura 5.** Características morfológicas das células dendríticas humanas geradas *in vitro* a partir de monócitos. (a) Grupo de Células dendríticas imaturas, ainda em uma fase precoce de diferenciação; (b) Células dendríticas maduras em grupos e não grupadas. 46

Figura 6. Curva de dissociação para <i>primers</i> TGF β . Dissociação do amplicon do TGF β com pico único e com Tm de 75°C.....	51
Figura 7. Curva de eficiência para TGF β . Relação diretamente proporcional entre o logaritmo da concentração do mRNA e o ciclo médio de amplificação para essa amostra.	51
Figura 8a. Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N7 da Hsp60 por PCR em tempo real.....	53
Figura 8b. Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N3 da Hsp60 por PCR em tempo real.....	53
Figura 8c. Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo p277 da Hsp60 por PCR em tempo real.....	54
Figura 8d. Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N3 da Hsp60 por PCR em tempo real.....	54

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APC – Célula apresentadora de antígeno

CLA - Antígeno Associado a Linfócito Cutâneo

Ct - cycle threshold

CTLA-4 - Antígeno 4 do linfócito T citotóxico

DC - Célula Dendrítica

DMF – Dimetilformamida

GAPDH - D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase

HOBt - Hidroxibenzotriazol

HPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

HSCs - Células-tronco hematopoiéticas derivadas do sangue do cordão humano

HSP – Proteína de Choque térmico

iDC- Célula Dendrítica imatura

IE – Índice de estimulação

IR – Índice de expressão Relativa

LC - Células de Langerhans

LPS – Lipopolissacarídeos

LT – Linfócito T

mDC – Célula Dendrítica madura

MFI - Mediana de Intensidade de Fluorescência

MLR – Reação linfocitária mista

NK - Célula Natural Killer

NMM - N-metil morfolina

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMC – Células mononucleares periféricas

PRR - Receptor de Reconhecimento Padrão

QR – Quantificação Relativa

RCT - Receptor de célula T

T_m- Temperatura de melting

TBTU – Tetrametilurônio

TLR - Toll-like Receptors

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos.....	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1 Tipos de respostas imunes- Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa	21
3.2 Linfócitos T	23
3.3 Auto-imunidade Fisiológica.....	25
3.4 Proteínas de choque térmico.....	26
3.4.1 Origem.....	26
3.4.2 Subtipos.....	26
3.4.3 Função	26
3.5 Células dendríticas	27
3.5.1 Origem.....	28
3.5.2 Células dendríticas mielóides.....	29
3.5.3 Células dendríticas e resposta imune.....	30
3.5.4 Células dendríticas tolerogênicas	31
3.5.5 Células dendríticas e terapia celular	32
4. PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS	34
4.1 Delineamento Experimental.....	34
4.2 Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos sadios	35
4.3 Obtenção de células T	35
4.4 Obtenção de monócitos	36
4.5 Geração de células dendríticas.....	36
4.6 Caracterização morfológica das Células Dendríticas	37
4.7 Caracterização imunofenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo	37
4.8 Produção dos peptídeos derivados das regiões C Terminal, N- Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana.....	38
4.9 Pulso de DC com antígenos da Hsp60	40
4.10 Separação de linfócitos T para ensaios de PCR em tempo real.....	40
4.11 PCR em tempo Real	41
4.11.1 Extração de RNA	41
4.11.2 Quantificação de RNA	41

4.11.3	Transcrição reversa.....	42
4.11.4	Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)	42
4.11.5	Desenho e padronização dos primers.....	43
4.11.6	Especificidade e adequação dos primers	43
4.11.7	Cálculo da Eficiência.....	44
4.11.8	Crerérios de Validação	44
5.	RESULTADOS.....	45
5.1	Geração de células dendríticas.....	45
5.2	Caracterização morfológica e funcional das células dendríticas.....	46
5.2.1	Caracterização Morfológica	46
5.2.2.	Caracterização imunofenotípica das diferentes células dendríticas	47
5.3	Regulação x inflamação: expressão de mRNA de fatores imunorreguladores (REG) e pró-inflamatórios (INFLAMA) em linfócitos T cocultivados com DC imaturas pulsadas com antígenos da Hsp60.....	47
6.	DISCUSSÃO.....	55
7.	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é uma intrincada rede de tecidos, células e moléculas capaz de montar respostas, contra a maioria dos agentes infecciosos, ao mesmo tempo em que não agride os tecidos próprios em condições fisiológicas.

Dado o seu dinamismo, o sistema imune é capaz de montar dois tipos de respostas com características distintas: a resposta imune inata e a resposta adaptativa. A resposta imune inata, que se caracteriza por não ser específica para um dado patógeno, inclui elementos que carecem de memória imunológica. Tais elementos podem ser (i) celulares: neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC), mastócitos, basófilos, eosinófilos, células “Natural Killer” (NK) e (ii) moleculares: proteínas solúveis constitutivamente presentes nos fluidos biológicos (complemento e defensinas) ou liberadas por células ativadas (citocinas, quimiocinas) (JENEWAY, 2014).

A resposta imune adaptativa tem como características principais o reconhecimento de antígenos polimórficos através de receptores também polimórficos, o desenvolvimento de maior afinidade na interação molecular no reconhecimento antigênico (resposta humoral) e a memória imunológica. As células envolvidas nessa resposta são linfócitos T, NKT e B (PEAKMAN; VERGANI, 2011).

As principais células do sistema imune adaptativo são linfócitos, células apresentadoras de antígenos e células efectoras. Os linfócitos são as células que especificamente reconhecem e respondem a antígenos estranhos, constituindo, assim, os mediadores da imunidade humoral e celular. Os linfócitos T, reconhecem os antígenos dos microrganismos intracelulares e as células T ou auxiliam os fagócitos a destruir esses microrganismos ou matam as células infectadas. Os linfócitos T consistem em populações funcionalmente distintas, os mais bem definidos dos quais são as células T auxiliares (T CD4+) e os linfócitos T citotóxicos (ou citolíticos) (T CD8+) (ABBAS et al, 2015).

O início e desenvolvimento das respostas imunes adaptativas necessitam que os antígenos sejam capturados e apresentados aos linfócitos específicos. As células que servem a este papel são as chamadas células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês antigen-presenting cells). As APCs mais especializadas são as células dendríticas, que capturam antígenos microbianos que se originam do ambiente externo, transportam seus antígenos aos órgãos linfoides e apresentam os antígenos aos linfócitos T imaturos para iniciar as respostas imunes (KARIMI; GERAMIZADEH; MALEK-HOSSEINI, 2015).

O sistema imune é capaz de responder a antígenos estranhos e ao mesmo tempo desenvolver tolerância às células do próprio organismo, a despeito da constante exposição a antígenos próprios. Acredita-se que um dos responsáveis por essa característica, são as proteínas de choque térmico (HSP, do inglês “Heat shock proteins”). As proteínas de choque térmico são evolutivamente antigas famílias de moléculas que estão presentes e consideradas essenciais para a sobrevivência de todos os tipos de células procarióticas e eucariotas. Elas cumprem uma variedade de funções, incluindo a montagem intracelular, o dobramento e translocação de proteínas oligoméricas. Sob condições de estresse celular, eles atuam como agentes citoprotectores, vinculando-se a proteínas dobradas e, assim, protegendo-os da desnaturação. As proteínas de choque térmico também estão envolvidas em vários eventos associados ao desenvolvimento embrionário (TODRYK; GOUGH; POCKLEY, 2003).

Nesta pesquisa, trabalhamos com a hipótese de que, células dendríticas tratadas com peptídeos da Hsp60 humana pudessem direcionar respostas de linfócitos T para perfis reguladores ou inflamatórios dependendo da região da proteína.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar o perfil da expressão gênica em linfócitos T de moléculas envolvidas em imunorregulação (FOXP3, GATA3, TGF β , IL-10,) e em resposta imune pró-inflamatória (T-bet, IFN-g, TNF- α) induzidas na auto-reatividade a antígenos da Hsp60 em cocultura de LT com DC e imaturas.

2.2 Específicos

- Induzir a diferenciação de monócitos CD14⁺ de voluntários saudáveis em células dendríticas maduras e imaturas
- Caracterizar morfológicamente as Células Dendríticas maduras e imaturas derivadas de monócitos CD14⁺ de voluntários saudáveis;
- Identificar diferenças imunofenotípicas e funcionais entre as Células Dendríticas maduras e imaturas;
- Verificar qual região da Hsp60 direciona respostas de Linfócitos T para perfis reguladores ou inflamatórios.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Tipos de respostas imunes- Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa

A função fisiológica do sistema imune é a defesa contra microrganismos infecciosos. Entretanto, mesmo substâncias estranhas não infecciosas podem eliciar respostas imunes. Além disso, mecanismos que normalmente protegem os indivíduos contra uma infecção e eliminam substâncias estranhas também são capazes de causar lesão tecidual e doenças em algumas situações. Portanto, uma definição mais inclusiva da resposta imune é uma reação aos componentes de microrganismos, bem como a macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos, e pequenos agentes químicos que são reconhecidos como estranhos, independentemente da consequência fisiológica ou patológica de tal reação (PEAKMAN; VERGANI, 2011).

A imunidade inata (também denominada imunidade natural ou nativa) fornece a primeira linha de defesa contra micro-organismos, essa defesa não é específica para um dado patógeno e inclui elementos que carecem de memória imunológica. Ela consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que estão em vigor mesmo antes da infecção e são preparados para responder rapidamente a infecções. Esses mecanismos reagem aos produtos dos microrganismos e células lesionadas, e elas respondem essencialmente da mesma forma para exposições repetidas. Os mecanismos da imunidade inata são específicos para estruturas que são comuns a grupos de microrganismos relacionados e podem não distinguir pequenas diferenças entre os microrganismos. Os principais componentes da imunidade inata são: (1) barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais; (2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas e células NK e outras células linfoides; e (3) proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação (ABBAS et al, 2015).

Ainda como parte da resposta inata, existem moléculas de superfície celular, que reconhecem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês, “Pathogen-associated molecular patterns”). Dentre essas moléculas, denominadas PRR (Receptor de Reconhecimento Padrão, do inglês, “Pattern-Recognition Receptors”), destaca-se uma família de receptores transmembrânicos do tipo I

denominada “Toll-like Receptors” (TLR). TLRs são principalmente encontrados em macrófagos e células dendríticas, embora possam ser expressos também em outras células. TLRs ligam-se principalmente a produtos microbianos: TLR2, a peptidoglicanos e lipoproteínas; TLR3, a RNA de dupla fita; TLR4, a lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicóico; TLR5, à flagelina bacteriana e TLR9 a DNA CpG. Além dos ligantes acima mencionados, há relatos de que auto-antígenos, dentre eles as HSPs também podem se ligar a TLR (JANEWAY, 2014).

Contra-pondo-se à imunidade inata, existem outras respostas imunes que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos e aumentam em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição subsequente a um microrganismo particular (Figura 1). Pelo fato de esta forma de imunidade se desenvolver como uma resposta à infecção e se adaptar à infecção, ela é chamada de imunidade adaptativa (também denominada imunidade adquirida ou específica). O sistema imune adaptativo reconhece e reage a um grande número de substâncias microbianas e não microbianas. As características que definem a imunidade adaptativa são a habilidade de distinguir entre diferentes substâncias, chamada especificidade, e a habilidade de responder mais vigorosamente a exposições repetidas ao mesmo microrganismo, conhecida como memória. Os componentes exclusivos da imunidade adaptativa são células denominadas linfócitos e seus produtos secretados, tais como anticorpos. Substâncias estranhas que induzem as respostas imunes específicas ou são reconhecidas pelos linfócitos ou anticorpos chamam-se antígenos (ABBAS et al, 2015). Os linfócitos T realizam um papel central na resposta imune adaptativa.

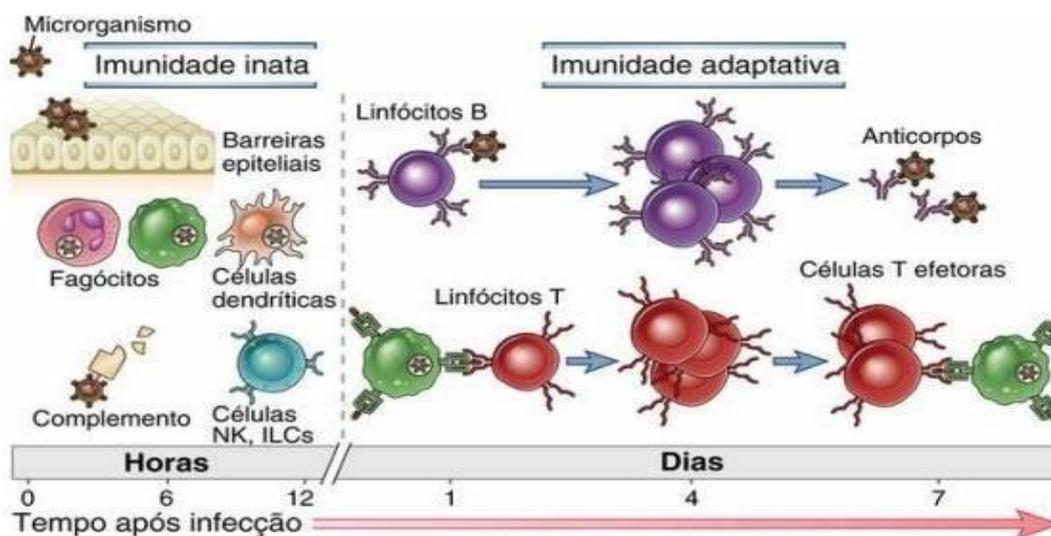


Figura 1. Imunidade inata e adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. As respostas imunes adaptativas se desenvolvem mais tarde e necessitam de ativação de linfócitos. A cinética das respostas imunes inata e adaptativa são aproximações e podem variar em diferentes infecções. ILC, célula linfóide inata; NK, natural killer. Fonte: Abbas et al, 2015

3.2 Linfócitos T

Os linfócitos T se diferenciam no timo, onde são chamados timócitos, a partir de precursores linfóides oriundos da medula óssea (BOROWSKI et al, 2002). Durante o processo de “educação” no timo, os timócitos passam por uma série de mudanças fenotípicas, incluindo a expressão de moléculas de superfície celular, dentre elas, os co-receptores CD4, CD8 e o CD3, que faz parte essencial do RCT (Receptor de célula T). As moléculas CD4 e CD8 são co-expressas em uma fase de desenvolvimento dos linfócitos, no entanto, quando maduros, estes perdem a expressão de uma delas e passam a ser CD4+CD8- ou CD4-CD8+ (ELLMEIER; HAUST; TSCHISMAROV, 2013).

As células T CD4+, que reconhecem principalmente antígenos de origem exógena apresentados no contexto de moléculas MHC de classe II, podem se diferenciar em células Th1 (produtoras de IL-2 e IFN- γ) ou Th2 (produtoras de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Células Th1, em geral, estão envolvidas em respostas inflamatórias, induzindo respostas celulares mediadas por macrófagos, mas também podem auxiliar linfócitos B a produzir anticorpos. As células Th2, além de produzir citocinas com algumas atividades antagônicas às citocinas Th1, estão envolvidas no direcionamento das respostas de células B, induzindo a mudança de isótipo de

imunoglobulinas (para IgG, IgA ou IgE). As células T CD8+, que reconhecem predominantemente antígenos endógenos, apresentados principalmente no contexto de moléculas MHC de classe I, são bem conhecidas por sua atividade citotóxica, e eliminação de células infectadas com patógenos intracelulares (ABBAS et al, 2015).

Completada a maturação, os timócitos selecionados são liberados para a periferia, onde podem identificar e reconhecer complexos peptídeo: MHC na superfície de células alvo, através do seu RCT. Se o linfócito T envolvido em tal reconhecimento for de memória, apenas o engajamento do RCT, é suficiente para desencadear uma resposta. No entanto, se tal linfócito não for sensibilizado, sua ativação completa só ocorrerá mediante a liberação de um coestímulo, sem o qual o linfócito torna-se anérgico. Este coestímulo, antigamente referido como segundo sinal, é liberado pelo engajamento de moléculas coestimuladoras presentes na superfície das APCs. As APCs são assim denominadas porque expressam moléculas MHC de classe II e moléculas coestimuladoras constitutivamente na sua membrana celular. Estas células compreendem as DC, os macrófagos e os linfócitos B (LEWIS; TARLTON; COSE, 2008).

Os linfócitos apresentam mecanismos fisiológicos de auto-regulação, por exemplo, após a ativação, linfócitos T expressam CTLA-4 (Antígeno 4 do linfócito T citotóxico, do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), que compete com a molécula CD28 pela ligação com o CD80/CD86 nas APCs, levando a um embargo na transcrição de IL-2 e posterior apoptose do linfócito T (LEWIS; TARLTON; COSE, 2008). Outro mecanismo de auto-regulação, é a expressão de Fas e FasL que induzem a morte do linfócito T por apoptose (HARAKAL et al, 2017). Os mecanismos de regulação periférica da resposta imune incluem ainda a ação de citocinas, predominantemente antiinflamatórias, como o TGF- β e a IL-10 produzidas principalmente por células T reguladoras, e de IL-2, que em uma fase tardia de ativação auxilia na indução de apoptose de células T (PEREIRA et al, 2017).

O envolvimento de linfócitos T na supressão de uma resposta imunológica foi primeiramente relatado no fim dos anos 60, quando se observou que camundongos timectomizados desenvolviam auto-reatividade patológica órgão-específicas (NISHIZUKA; SAKAKURA 1969). Essas doenças auto-imunes podiam

ser inibidas pela transferência de linfócitos T CD4+ de animais saudáveis, sugerindo um papel supressor dessas células sobre respostas patológicas dirigidas a antígenos próprios (Fowell, 1993; TAGUCHI, 1980; TUNG et al, 1987). Durante os anos 70, apesar das dificuldades encontradas para a determinação das características das células chamadas supressoras, mostrou-se a sua atividade antígeno- específica (GERSHON; KONDO, 1970).

3.3 Auto-imunidade Fisiológica

O sistema imune é capaz de responder a antígenos estranhos e ao mesmo tempo desenvolver tolerância às células do próprio organismo, a despeito da constante exposição a antígenos próprios. Essa característica do sistema imune tem levado os imunologistas a discutir o conceito da discriminação imunológica entre o próprio e o não próprio.

A principal teoria aponta para um papel fisiológico da auto-reatividade. Este é o caso da teoria do homúnculo imunológico, proposta por Irun Cohen (1991), que discute a organização do sistema imune e a manutenção da homeostase com base na auto-imunidade fisiológica. De acordo com esta teoria, o sistema imune reconheceria a imagem interna do organismo, pela exposição dos seus antígenos, tanto no timo quanto na periferia, sendo esse reconhecimento fundamental para manutenção da homeostase. A alteração em um dado auto-antígeno (ou no contexto da sua apresentação) ao longo da vida poderia funcionar como um alarme de perigo e poderia desencadear uma resposta imune inflamatória e auto- agressividade tecidual. Assim, dentro da visão de auto-imunidade fisiológica, é possível que células T auto-reativas, naturalmente ativadas, possam ser também mediadoras de respostas protetoras contra auto-imunidade patológica, e que possam regular reações inflamatórias, diminuindo danos imunopatológicos decorrentes de respostas imunes efetoras.

Ainda dentro desta hipótese, o repertório de linfócitos envolvidos na auto-imunidade fisiológica estaria dirigido a três classes principais de antígenos homunculares: moléculas do sistema imune, moléculas de manutenção e moléculas tecido-específicas. Dentre estas, as moléculas de manutenção são as que têm sido melhor estudadas, e algumas delas estão envolvidas em uma série de processos de

homeostase intracelular. Este é o caso das HSPs, que vêm sendo cada vez mais estudadas tanto em modelos de auto-imunidade fisiológica como em modelos de auto-imunidade patológica, como doenças auto-imunes e transplante (NATAF et al, 2017).

3.4 Proteínas de choque térmico

3.4.1 Origem

Os estudos sobre as funções imunológicas das HSPs ganharam maior destaque na década de 80, com a verificação de que HSPs purificadas de tumores continham peptídeos derivados de antígenos tumorais (SRIVASTAVA; DAS, 1984). Essas funções tornaram-se mais evidentes com a descoberta de que complexos HSP/peptídeos eram capazes de desencadear respostas por linfócitos T, tanto CD4+ (ROMAN; MORENO, 1997) quanto CD8+ (BLACHERE et al, 1997). Ademais, peptídeos derivados das próprias HSPs foram encontrados no repertório de peptídeos eluídos de moléculas de MHC, e podem ser apresentados a linfócitos T e desencadear uma resposta imune adaptativa (DE KLEER et al, 2006).

3.4.2 Subtipos

As HSP são moléculas filogeneticamente conservadas presentes em todos os organismos (procariotos e eucariotos) e representam de 1% - 5% de todas as proteínas do compartimento intracelular (BLEOTU et al, 2014). Estas proteínas podem ser classificadas em diferentes famílias, de acordo com seu peso molecular aproximado em kDa: Hsp110, Hsp90, Hsp70, HSP60 e um complexo grupo com peso entre 15 e 30 kDa, designadas como HSPs de baixo peso molecular (DIRESKENELI, 2013). Embora as HSPs estejam constitutivamente expressas nas células em condições fisiológicas, uma das características dessas proteínas é o aumento da sua expressão em situações de estresse celular (BLEOTU et al, 2014).

3.4.3 Função

O aumento da expressão das HSPs em situações de estresse está relacionado à “função” de chaperonas que elas realizam no organismo. Essas moléculas são capazes de se ligar não covalentemente a sítios hidrofóbicos presentes em polipeptídeos e impedir o dano celular letal que o estresse pode ocasionar, de duas

maneiras: (i) auxiliando na resistência à desnaturação protéica e no dobramento e transporte de proteínas intracelulares (Hsp40, Hsp60 e Hsp90) (EDEN et al, 2017); (ii) marcando e direcionando proteínas anormais para degradação (ubiquitina, Hsp104) pelo proteassoma (ENRIQUEZ et al, 2017).

Além de participar na resposta imune adaptativa, essas proteínas também são capazes de ativar a resposta imune inata, sendo algumas HSPs capazes de se ligar às moléculas CD91, CD14 e TLRs (BLEOTU et al, 2014). A ligação desses receptores parece atuar como um “sinal de perigo” para o sistema imune, deflagrando a liberação de mediadores pró-inflamatórios como descrito para a Hsp60 humana e a Hsp65 de bactérias (MENDOZA; WEINBERGER; SWAN, 2016). A atividade funcional das HSPs na resposta imune tem sido objeto de inúmeras investigações. Há relatos de que elas podem induzir tanto respostas inflamatórias quanto anti-inflamatórias (CHEBOTAREVA; BOBKOVA; SHILOV, 2017).

É interessante notar que a maioria desses receptores estão presentes em APCs, notadamente nas células dendríticas, que apresentam um papel fundamental nas respostas imunológicas tanto inata como adaptativa (EDEN et al, 2017). Assim, podemos dizer que, a exemplo do que ocorre com os macrófagos e com o sistema do complemento, tanto as HSPs quanto as células dendríticas funcionam como uma ponte entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

3.5 Células dendríticas

As DC são células profissionais na apresentação de antígenos que desempenham papel fundamental no início da resposta imune dependente de linfócitos T. Essas células, descritas pela primeira vez em 1973 (STEINMAN; COHN, 1973), são uma população celular rara, porém heterogênea, que juntamente com monócitos, macrófagos e neutrófilos constituem as células fagocíticas do sistema imunológico. As DC formam uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (Figura 2). Como as outras células da imunidade inata, as DC reconhecem os patógenos por meio dos seus receptores de superfície celular (JENEWAY, 2014).

As DC apresentam uma grande plasticidade funcional que parece depender da sua origem, do seu estado de maturação e da natureza do estímulo sob o qual se

encontra (BOL et al, 2017).

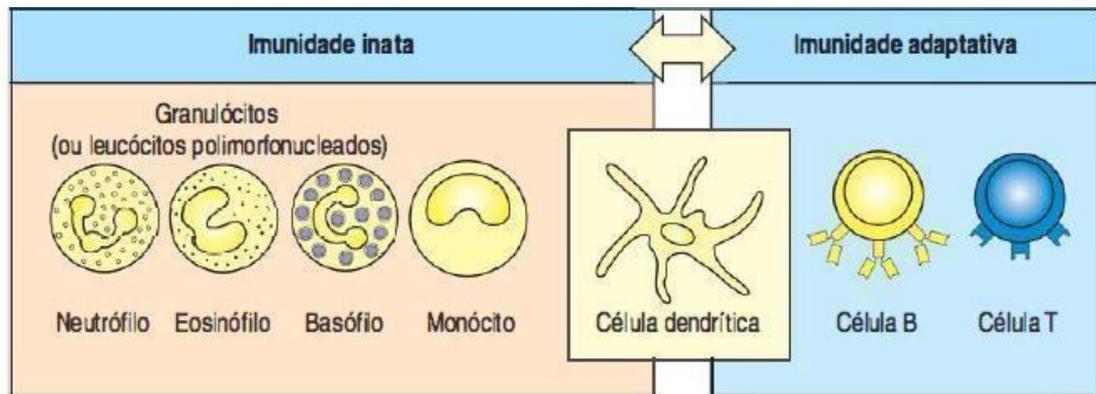


Figura 2. As DC fazem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Como as outras células da imunidade inata, as DCs reconhecem os patógenos por meio dos seus receptores de superfície celular invariáveis para as moléculas patogênicas, e são ativadas por esses estímulos logo no início da infecção. As DCs dos tecidos são fagocíticas e especializadas na ingestão de uma ampla variedade de patógenos e na apresentação de seus antígenos na superfície celular, de modo que possam ser reconhecidos pelas células T. Fonte: Jeneway, 2014

3.5.1 Origem

As DC surgem de uma célula precursora comum de linhagem mieloide, originam-se de precursores derivados de células tronco hematopoiéticas CD34+ da medula óssea e se diferenciam em subgrupos, o principal sendo células dendríticas clássicas e células dendríticas plasmocitoides. As células CD34+ diferenciam-se na medula óssea em dois progenitores: progenitores mielóides comuns e progenitores linfóides comuns. Estes, posteriormente dão origem a precursores que finalmente se diferenciam em células dendríticas. As células dendríticas inflamatórias podem surgir como monócitos em tecidos inflamados, e algumas células dendríticas residentes em tecidos, tais como células de Langerhans na pele, podem se desenvolver a partir de precursores embrionários (ABBAS, 2011; APPEL, 2013; LIU et al, 2017) (Figura 3).

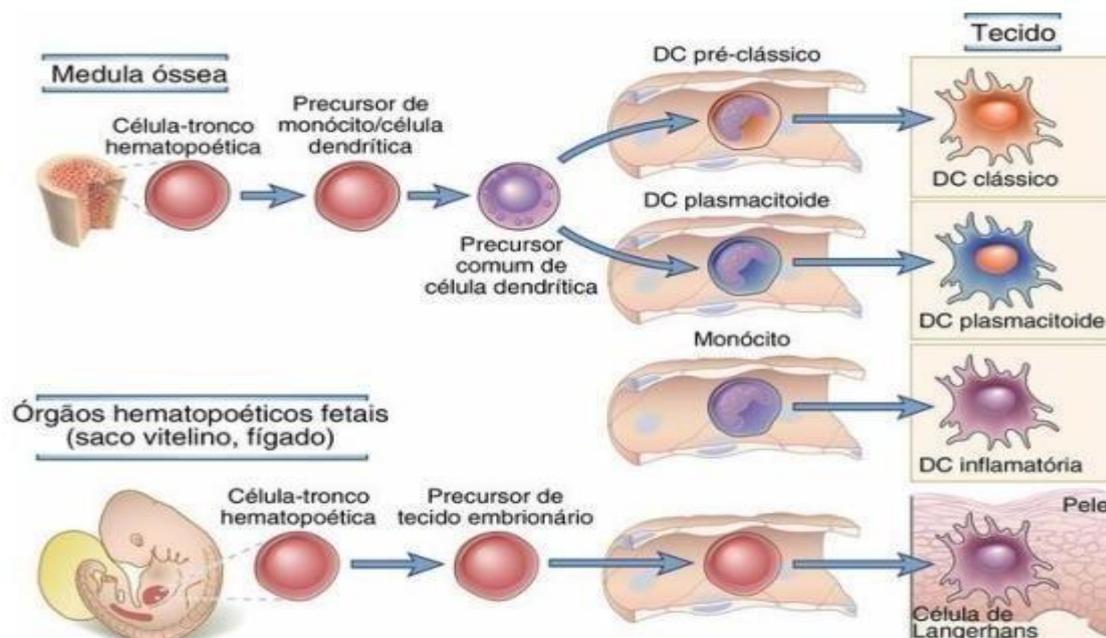


Figura 3. Maturação das células dendríticas. As células dendríticas surgem de uma célula precursora comum de linhagem mieloide na medula óssea e se diferenciam em subgrupos, o principal sendo células dendríticas clássicas e células dendríticas plasmocitoides. As células dendríticas inflamatórias podem surgir como monócitos em tecidos inflamados, e algumas células dendríticas residentes em tecidos, tais como células de Langerhans na pele, podem se desenvolver a partir de precursores embrionários. Fonte: Abbas et al, 2015

3.5.2 Células dendríticas mielóides

Em humanos, os progenitores mielóides comuns dão origem a dois tipos de DC imaturas (CD11c+CD14+ e CD11c+CD14-) e pelo menos um precursor de DC: os monócitos (DOMOGALLA et al, 2017).

Em estudos *in vitro* com células CD34+ humanas foi mostrada a existência de dois subconjuntos de precursores de DC. Estes podem ser distinguidos exclusivamente com base na expressão dos marcadores de superfície celular CD1a e CD14 (CAUX et al, 1996). Os precursores CD1a+ dão origem a DC com as mesmas características fenotípicas (com antígeno Lag, E-caderina e grânulos de Birbeck) de um grupo de células presentes na pele, denominadas células de Langerhans (LC). Em contrapartida, os precursores CD14+ diferenciam-se em DC CD1a+ que expressam CD2, CD9, CD68 e o fator de coagulação XIIIa (presente em DC dérmicas), mas não os antígenos característicos de LC (CANQUE et al, 1998). A diferenciação em um ou outro precursor parece estar associada à expressão da molécula CLA (Antígeno Associado a Linfócito Cutâneo, do inglês, "Cutaneous-lymphocyte-associated antigen") na célula CD34+. De fato, células CD34+CLA+

tratadas com GM-CSF e TNF α diferenciam-se em LC. Células CD34+CLA- tratadas com as mesmas citocinas, nas mesmas condições, diferenciam-se em DC CD1a+ carentes de antígenos característicos de LC (STRUNK et al,1997).

Tanto as DC derivadas de precursores CD14+ quanto aquelas derivadas de precursores CD1a+ são potentes estimuladoras de células T com fenótipo *naive*. No entanto, DC derivadas de precursores CD14+ são 10 vezes mais eficientes na captura de antígenos do que as DC derivadas de precursores CD1a+ (SITTIG et al.).

3.5.3 Células dendríticas e resposta imune

As células dendríticas apresentam pelo menos dois estágios de maturação: imaturo e maduro. As DC imaturas são encontradas principalmente em tecidos não linfóides e são caracterizadas pela baixa expressão das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD58 e pela alta capacidade de endocitose (DOMOGALLA et al, 2017). Além disso, essas células expressam moléculas de MHC de classe II dentro do compartimento intracitoplasmático, e não expressam a glicoproteína de membrana marcadora de maturação de células dendríticas CD83 (LUTZ et al, 2017). O CD83 é uma molécula de adesão celular que se liga a receptores expressos na superfície de monócitos (DOMOGALLA et al, 2017). E que está aumentado na superfície de células dendríticas maduras.

O alto potencial endocítico das DC imaturas é conferido por uma série de receptores de superfície celular que permitem a ligação e a internalização de uma variedade de antígenos incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos e nucleotídeos. A ligação desses antígenos, bem como de algumas citocinas inflamatórias podem ativar vias de sinalização intracelulares que culminam na maturação da DC (VINEY, 2001). Durante a maturação, estas células mobilizam-se dos tecidos não linfóides para os órgãos linfóides secundários através dos vasos linfáticos aferentes. Essa migração é acompanhada por mudanças fenotípicas e morfológicas que incluem: (I) reorganização do citoesqueleto, (II) formação de dendritos, (III) translocação das moléculas de MHC de classe II das vesículas intracelulares para a superfície da célula (apresentação de antígeno), (IV) aumento da expressão de moléculas coestimuladoras e receptores de quimiocinas, (V) secreção de determinadas quimiocinas e citocinas (CLAYTON et al, 2017; SWANDI, 2017). Uma vez no órgão linfóide, as DC migram para as áreas ricas em células T, onde

são maximizadas as chances de interações DC – LT. Dependendo dos sinais coestimulatórios e das citocinas envolvidas no contexto da apresentação do antígeno pelas DC, as respostas dos linfócitos T CD4 podem polarizar para um perfil T1 e/ou T2 (GEGINAT et al, 2015). Os linfócitos assim ativados deixam o órgão linfóide e migram para o tecido inflamado, onde desenvolvem suas funções (LUTZ, 2016).

3.5.4 Células dendríticas tolerogênicas

Os avanços alcançados nos últimos anos no entendimento da imunobiologia das DC têm colocado em evidência o papel que estas células realizam na prevenção de auto-imunidade ou tolerização de células T auto-ímmunes já existentes. Existem dados na literatura mostrando que as células dendríticas podem exercer sua atividade tolerogênica, através de diversos mecanismos não excludentes. Um de tais mecanismos é a indução de apoptose de células T, por DCs CD8⁺ murinas expressando FasL (SUSS; SHORTMAN, 1996). Um outro mecanismo seria a indução de anergia de células T, observada em experimentos nos quais DCs imaturas secretoras de citocinas anti-inflamatórias como TGF-beta e IL-10 são capazes de anergizar células T (STEINBRINK et al, 1999; ENK et al, 1993). Um terceiro mecanismo ainda descrito é a indução e manutenção de células T reguladoras. Nesse sentido, em trabalhos publicados nos últimos anos é sugerido um papel relevante para as DCs na indução de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ reguladores. Foi mostrado que, em humanos, DC alogeneicas imaturas podem induzir populações de células T CD4⁺ com propriedades imunorreguladoras *in vitro*, a partir de repetidas estimulações de células T virgens (JONULEIT et al, 2000; REA et al, 2004).

As DCs são jogadores centrais na iniciação e controle de respostas, regulando o equilíbrio entre tolerância e imunidade. As DC tolerantes são essenciais na manutenção da tolerância central e periférica por indução da supressão clonal de células T e anergias às células T, inibição da memória e respostas das células T efetoras, geração e ativação de células T reguladoras. Portanto, DCs tolerantes são candidatas promissoras para terapia celular específica de doenças alérgicas e autoimunes e para tratamento de rejeição de transplante. Estudos realizados em roedores demonstraram a eficácia e viabilidade de DC tolerogênicas para indução de tolerância em várias doenças inflamatórias. Nos últimos anos, vários protocolos

para a geração de DC tolerogênicas derivadas de monócitos humanos, foram estabelecidos e alguns ensaios de primeira fase I foram conduzidos em pacientes que sofrem de doenças auto-imunes, demonstrando a segurança e eficiência desta imunoterapia baseada em células (DOMOGALLA et al, 2017).

3.5.5 Células dendríticas e terapia celular

O potencial terapêutico das células DC tem sido explorado em vários modelos de doenças auto-imunes, em condições patológicas como AIDS (KUNDU et al, 1998) e câncer (BANCHEREAU et al, 2000) e ainda em protocolos de indução de tolerância aalotransplante.

As DCs são consideradas como as mais potentes células. Desde o desenvolvimento de protocolos para a geração in vitro de DCs, foi explorado sua aplicação em imunoterapia contra várias doenças malignas. Embora a abordagem do uso de DCs apresentadoras de antígeno tumoral em estratégias de vacinação terapêutica mostrou-se que funciona de forma eficaz em camundongos e parece promissor em estudos in vitro, o benefício clínico real para pacientes com o câncer tem sido marginal, tendo espaço para melhoria. Acredita-se que o futuro do cancer será baseado em Imunoterapia com DC (APPEL; YU, 2013).

A vacinação de DC em pacientes com câncer visa induzir ou aumentar uma resposta imune antitumoral eficaz contra antígenos tumorais e foi explorado pela primeira vez em um ensaio clínico em na década de 1990. Mais de duas décadas depois, inúmeros ensaios clínicos foram realizados ou estão em andamento com uma grande variedade de Subconjuntos de DC, protocolos de cultura e regimes de tratamento. A segurança da vacinação de DC e sua capacidade de induzir antitumoral as respostas foram claramente estabelecidas. No entanto, embora pacientes tenham relatado benefícios ao longo prazo, as vacinas de DC ainda não cumpriram sua promessa, talvez principalmente devido à falta de ensaios de fase II / III bem conduzidos em larga escala (BOL et al, 2017).

Estudos ativos com ratos transplantados com células-tronco hematopoiéticas derivadas do sangue do cordão humano (HSCs) tornou-se uma poderosa ferramenta experimental para estudar a heterogeneidade do ser humano, a reconstituição imune e respostas imunes in vivo. No entanto, análises da maturação de células T humanas

em modelos humanizados tem sido dificultada por uma baixa reatividade imune geral e falta de métodos para definir marcadores preditivos de capacidade de resposta, mesmo com a dificuldade, uma análise de correlação desses marcadores refletiu em um impacto específico do tecido imunizado. Isso permitiu uma caracterização do estado de imunização de ratos, com base no conjunto identificado de marcadores (VOLK et al, 2017).

4. PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS

4.1 Delineamento Experimental

O estudo de natureza experimental de caráter investigativo envolveu células mononucleares humanas isoladas a partir do sangue de indivíduos adultos saudáveis, obtidas do descarte de 16 bolsas de sangue usadas como controle de qualidade no Hemocentro de Teresina. A Figura 4 sintetiza o protocolo experimental adotado.

A pesquisa realizada envolveu material biológico humano, e passou por avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, mediante cadastro na Plataforma Brasil, para análise e parecer, levando em conta, portanto, aspectos éticos dispostos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (Nº CAAE 31224813.5.0000.5214) sob o número de parecer 826733.

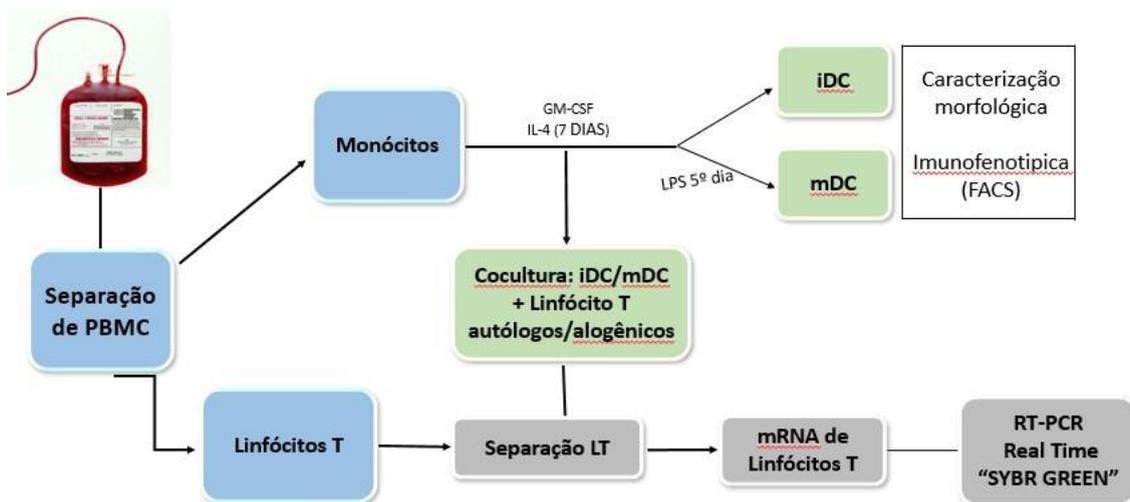


Figura 4. Delineamento geral das etapas do protocolo experimental. Células dendríticas (DC) maduras (mDC) e imaturas (iDC) diferenciadas a partir de monócitos de voluntários saudáveis foram estimuladas com peptídeos sintéticos derivados da Hsp60. DCs estimuladas e não estimuladas com os peptídeos da Hsp60 de foram cocultivadas com linfócitos T autólogos e alogênicos. Os linfócitos T foram purificados das culturas com as DCs. O RNA foi extraído, quantificado e transcrito. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master Mix” uPBMC: células mononucleares periféricas; GM-CSF: fator estimulante de granulócitos e macrófagos; IL-4: interceulina-4; LPS: lipopolissacarídeo; Hsp60: proteína do choque térmico de 60 KDa; CFSE: diacetato de carboxifluoresceína succinimidyl ester.

4.2 Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos sadios

As células mononucleares foram isoladas de rejeitos de bolsas de sangue provenientes de doadores sadios atendidos no HEMOPI.

As amostras de sangue, foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após centrifugação a 350g por 30 minutos, as células mononucleares (PBMC do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foram coletadas, ressuspensas com salina e centrifugadas a 315g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento celular foi lavado duas vezes. Nessas lavagens as células eram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) e centrifugadas novamente a 175g por 8 minutos. As células assim lavadas foram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de soro humano normal inativado, suplementado com 2 mM L-Glutamina, 10 mM HEPES, 0,1 ng/ml de Perflacin (Rhodia, SP-Brasil), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA (DMEM completo). A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

4.3 Obtenção de células T

As células T foram purificadas a partir das PBMC por processo de seleção negativa com contas imunomagnéticas (Pan T cell isolation Kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha) de acordo as instruções do fabricante. Essas células foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com *biotina*) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-*biotina* conjugados às contas). Para a marcação primária usamos 30µl do coquetel de anticorpos para 10^7 e para a marcação secundária usamos 40 µl de anticorpos para 10^7 . Entre as duas etapas de marcação não foi feita qualquer lavagem das células. Em seguida, as PBMC em suspensão foram aplicadas em uma coluna MACS, submetida a um campo magnético. Esse processo permitiu a passagem das células T através da coluna e retenção das células não T na mesma. A pureza dos linfócitos foi

avaliada por citometria de fluxo em citômetro CSCanto II (Becton & Dickinson) e a análise dos dados foi feita através do programa FACS DIVA.

4.4 Obtenção de monócitos

Monócitos enriquecidos a partir de PBMC por processo de separação negativa utilizando-se contas magnéticas (Monocyte isolation kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha), de acordo as instruções do fabricante. Brevemente, as PBMC foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com *biotina*) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-*biotina* conjugados às contas). Para a marcação primária usamos 30µl do coquetel de anticorpos para 10^7 e para a marcação secundária usamos 40 µl de anticorpos para 10^7 . Entre as duas etapas de marcação não foi feita qualquer lavagem das células. Em seguida, as PBMC em suspensão foram aplicadas em uma coluna MACS, submetida a um campo magnético. Esse processo permitiu a passagem de monócitos através da coluna e retenção das células não monocíticas mesma. A pureza dos monócitos foi avaliada por citometria de fluxo em citômetro FACSCanto II (Becton & Dickinson) e a análise dos dados foi feita através do programa FACS DIVA.

4.5 Geração de células dendríticas

Essa técnica foi padronizada em nosso laboratório. Para tanto, monócitos foram ressuspensos em RPMI 1640 (Invitrogen, CA, USA) 5% FCS contendo 20 ng/ml de GM-CSF (R&D system, MN, USA) e 20 ng/ml de IL-4 (R&D System, MN, USA) e plaqueados em placas de cultura celular de 6 poços (Nunc, Denmark) na concentração de 2×10^6 células em 3 ml de meio/poço. As placas foram divididas em dois grupos para a diferenciação em DC: grupos A e B. Todos os grupos foram cultivados por 7 dias a 37 °C em estufa úmida e tensão constante de 5% CO₂. A cada dois dias, trocou-se a metade do meio de cultura celular dos poços de cada placa por meio novo, nas mesmas concentrações (concentração final 20ng/ml de GM-CSF e de IL- 4). O grupo A foi destinado à geração de células dendríticas imaturas (iDC) e foi tratado apenas com GM-CSF e IL-4. O grupo B foi destinado à geração de células dendríticas maduras (mDC) e foi tratado com 200 ng/ml de LPS (Sigma Aldrich) por 48 horas no 5º dia. No 7º dia de cultura as células não aderentes dos dois diferentes

grupos de células foram retiradas das placas, lavadas em meio RPMI 1640 e ressuspensas em meio RPMI 5% FCS numa concentração de 10^6 células/ml.

4.6 Caracterização morfológica das Células Dendríticas

Nós avaliamos a morfologia dos dois grupos de células dendríticas estudadas nesse trabalho. Para tanto ressuspendemos as células em uma densidade de 1×10^6 células/ml de meio RPMI sem soro e colocamos 50 μ l da suspensão celular em cubetas de citocentrífuga para *cytospin*. As células foram centrifugadas a 120 g por 5 minutos. Após a remoção das cubetas, as lâminas de vidro nelas contidas foram retiradas, secadas ao ar livre por 5 minutos, e a região dessas lâminas que continha o sedimento celular foi delimitada utilizando-se uma caneta. As lâminas foram posteriormente coradas por 5 minutos em solução de Giemsa, lavadas em água corrente e analisadas em microscópio ótico quanto ao seu aspecto morfológico. As células foram analisadas morfológicamente quanto ao tamanho, formato presença de dendritos, presença de vacúolos intracitoplasmáticos e posição do núcleo.

4.7 Caracterização imunofenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo

As células dendríticas geradas foram caracterizadas imunofenotipicamente, por citometria de fluxo. As células dos grupos A e B foram caracterizadas no 7º dia de cultura. A caracterização imunofenotípica incluiu marcadores de superfície celular: CD14PE, CD80PE, CD86 FITC, CD83 APC, CD1a FITC e HLA-DR CY (Pharmingen, San Diego, EUA). As células foram ressuspensas em tampão FACS (PBS com 2% de FCS) numa concentração de $1,5 \times 10^6$ células /ml e adicionadas em volume 100 μ l em cada um dos poços de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U (Nunc, Denmark). Em seguida, as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado por inversão da placa. Toda a reação de imunofluorescência foi realizada em banho de gelo. Após a lavagem, adicionamos 25 μ l dos anticorpos monoclonais, previamente titulados, ao sedimento celular, para a detecção dos marcadores de superfície celular acima mencionados. As placas foram incubadas a 4 °C por 30 minutos em banho de gelo e ao abrigo da luz. Terminada a reação, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS por centrifugação a 300g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 400 μ l de tampão FACS. Foram adquiridas 2×10^5 células em um

citômetro FACSCanto II (Becton & Dickinson) e a análise dos dados foi feita através do programa FACS DIVA. A viabilidade destas células foi verificada através de Iodeto de Propidium (PI). As DC CD83+ e HLA DR+ com alta intensidade de imunofluorescência foram consideradas maduras, ao passo que CD83- ou DC CD83+ e HLA DR+ com baixa intensidade de imunofluorescência foram consideradas imaturas. A perda do CD14 e a expressão do CD1a foram os parâmetros de diferenciação dos monócitos em células dendríticas. Em adição à caracterização imunofenotípica dos diferentes grupos de DC, avaliamos a pureza destes utilizando-se marcadores de linfócitos (CD3-cy, BD; CD19-PE, BD; CD56-Cy, BD) e de células NK (CD56-FITC, BD).

4.8 Produção dos peptídeos derivados das regiões C Terminal, N-Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana

Os peptídeos derivados das regiões C-Terminal, N-Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana foram sintetizados a partir da sequência Hsp60 humana (Jindal et al, 1898; em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e podem ser vistos na Tabela 1.

Foi utilizado o programa TEPITOPE para a escolha dos peptídeos. Este programa é um algoritmo para predição de ligação de peptídeos às moléculas HLA-DR (25 diferentes moléculas), mostrando dentro da Hsp60 as regiões com maior probabilidade de ligação às diferentes moléculas HLA-DR que constituem peptídeos potencialmente apresentados para o reconhecimento por linfócitos T. Após a análise no TEPITOPE e seleção de peptídeos com maior probabilidade de ligação a um maior número de moléculas HLA-DR, as seqüências geradas foram comparadas às seqüências de peptídeos já descritas na literatura como sendo pró-inflamatória ou imunoreguladora.

As sínteses de peptídeos em fase sólida foram realizadas em um sintetizador múltiplo de oito canais da Shimadzu Inc, Kyoto, Japan, modelo PSSM-8 e em um sintetizador múltiplo de 96 canais da Advanced Chemtech, EUA, modelo Apex 396.

As sínteses foram feitas utilizando a metodologia Fmoc de acordo com Moudgil *et al.* (1997). No sintetizador PSSM-8, os aminoácidos foram previamente ativados com tetrafluoroborato de tetrametilurônio (TBTU), hidroxibenzotriazol

(HOBt) e N-metil morfolina (NMM) (Richelieu Biotechnology, França) por 5 minutos em dimetilformamida (DMF) (Lab Synth, São Paulo, Brasil) com 0,1% Triton X-100.

Os acoplamentos foram realizados usando-se um equivalente a cinco vezes de excesso de aminoácido na direção usual de carboxi para o amino-terminal sobre a resina TGR, grau de substituição de 0,20 mmol/g (Novabiochem, San Diego, USA) durante 1 hora. No sintetizador Apex 396 os reagentes TBTU, HOBt e NMM foram adicionados concomitantemente aos aminoácidos nos vasos de reação e os acoplamentos realizados durante 1 hora. Em ambos os equipamentos, as desproteções do grupo Fmoc foram feitas com 500µl de piperidina (Merck, Darmstadt, Alemanha) 20% em DMF+ 0,1% Triton X-100 + 0,1 M de HOBt por 2 séries de 15 minutos, seguidas de 5 lavagens com 600µl DMF por 1 minuto cada. Os peptídeos foram clivados da resina por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA): fenol:anisol:água:etanoditiol a 82,5:5,0:5,0:5,0:2,5 (v/v), extraídos com ácido acético glacial 95% e liofilizados em liofilizador Super Modulyo modelo Pirani 501 (Boc-Edwards Inc, EUA).

Os peptídeos foram analisados em HPLC dotados de bombas Shimadzu Inc. Japan, modelo LC-10AD, detector de UV Shimadzu Inc. Japão, modelo SPD-10AV e analisados em software Class LC10 versão 1.41 para Windows da mesma empresa. Utilizou-se como fase móvel, acetonitrila grau HPLC (Malinkrodt, Nova Jersey, USA ou JT Baker, Nova Jersey, EUA), ácido fosfórico (Lab Synth, São Paulo, Brasil) e água, obtida em destilador Milli-Ro (Millipore Inc, EUA). As condições de desenvolvimento da análise de HPLC foram: solvente A composto de ácido ortofosfórico 0,1% em água e solvente B composto por acetonitrila e solvente A na proporção de 9:1. As análises foram realizadas empregando-se coluna C-18 (CLC-ODS Shimadzu, 4,6 x 250 mm) e detectadas a um comprimento de onda de 220 nm em sistema de gradiente 5-95% de solvente B em 30 minutos a um fluxo de 1,0 ml/min.

As purificações dos peptídeos foram realizadas em HPLC semi- preparativo, bombas Shimadzu modelo LC-8A, detector de UV-Vis Shimadzu modelo SPD-6AU usando-se coluna C-18 (22,5 x 250,0 mm) com os seguintes sistemas de solvente: TFA 0,1% em água como solvente A e acetonitrila e solvente A na proporção de

9:1 como solução B em um gradiente de 1% do solvente B por minuto durante 30 a 90 minutos a um fluxo de 3 ml/ min até que se observava a completa saída do peptídeo. As leituras foram realizadas a 220nm. O grau de pureza dos peptídeos foi determinado através da integração da área obtida nos gráficos de HPLC.

Tabela 1. Sequências dos peptídeos da Hsp60

Peptídeo * Resíduo aa	Quantidade aa	Seqüência
Região N-Terminal		
N2 (16-35)	20	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD
N3 (31-50)	20	KFGADARALMLQGVDLLADA
N4 (46-65)	20	LLADAVAVTMGPKGRTVIIIE
N6 (76-95)	20	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
N7 (87-110)	24	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
N10 (136-155)	20	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL
Região Intermediária		
I4 (269-289)	21	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN
I8 (353-352)	20	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ
I9 (372-391)	20	QEIIQLDVTTSEYEKEKLN
Região C-Terminal		
p277 (437-460)	24	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED
C3 (449-468)	20	PALDSLTPANEDQKIGIEII
C4 (464-483)	20	GIEIIRTLKIPAMTIAKNA
C9 (539-558)	20	LTTAEVVVTEIPKEEKDPGM

*A localização dos resíduos de aminoácidos de cada peptídeo, em relação à sequência da Hsp60 humana, encontra-se destacada entre parêntese (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.9 Pulso de DC com antígenos da Hsp60

Para a realização dos ensaios funcionais propostos neste trabalho nós trabalhamos com células dendríticas pulsadas com antígenos da Hsp60. O pulso das células, que foi realizado em placas de 6 poços (Nunc, Denmark) contendo 1×10^6 células em 1 ml de RPMI 1640 e 5mM dos peptídeos derivados da Hsp60.

4.10 Separação de linfócitos T para ensaios de PCR em tempo real

Linfócitos T autólogos foram cultivados com células dendríticas imaturas por 5 dias. Ao término desse período os linfócitos T foram purificados das culturas com as DCs por meio de separação negativa imunomagnética (Pan T cell isolation Kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha) de acordo as

instruções do fabricante. As células das coculturas foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com *biotina*) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-*biotina* conjugados às contas). Para a marcação primária usamos 30 µl do coquetel de anticorpos para 10^7 e para a marcação secundária usamos 40 µl de anticorpos para 10^7 . Entre as duas etapas de marcação não foi feita qualquer lavagem das células. Em seguida, as PBMC em suspensão foram aplicadas em uma coluna MACS, submetida a um campo magnético. Esse processo permitiu a passagem das células T através da coluna e retenção das células dendríticas. A pureza dos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo em citômetro FACSCanto II (Becton & Dickinson) e a análise dos dados foi feita através do programa FACS DIVA.

4.11 PCR em tempo Real

4.11.1 Extração de RNA de Linfócitos T

O RNA foi extraído pelo método baseado em Chomzynski et al (1987), o qual utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total. Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe as células mantendo a integridade do RNA. Este material foi mantido a -80°C até o momento da transcrição.

4.11.2 Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, Fullerton, CA, USA) nos comprimentos de onda (L) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão entre 1,6 a 1,9. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a 1 corresponde a 40 µg de RNA / ml no comprimento de onda de 260 nm. Além disto, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para visualização da integridade das amostras, observando as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA.

4.11.3 Transcrição reversa

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com 5µg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1µl de oligo dT (500 µg/ml), 1µl de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC q.s.p. 20µl. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, USA). Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4µl de tampão de transcrição 5x, 2µl de DTT 0,1M e 1µl de inibidor de RNase (40U/µl) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram, então, colocadas em termociclador a 42°C por 2 minutos. Por último foi adicionado 1µl da enzima transcriptase reversa (200U/µl) e esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos.

4.11.4 Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn+ - Rn-$), onde $Rn+$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e $Rn-$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn , que seria uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de *primers*. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o *threshold* corresponde ao Ct (*cycle threshold*) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001), utilizando

como gene de referência a média geométrica de 3 genes de referência: o GAPDH (D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase), Ciclofilina A e HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase). Consideramos significativo todo o valor de $QR > 2$ ou $QR < 0,5$.

A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) é:

$$QR = 2^{\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ referência, e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$$

4.11.5 Desenho e padronização dos primers

Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, USA). O tamanho dos primers variou de 18 a 25 bases, o *melting point* de 59-61 °C e o conteúdo de GC de 40-60%. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 86 a 119pb e 75-85°C de T_m (*melting point*). A concentração de uso de cada par de seqüências de primers foi padronizada em reações de RT-PCR, foi utilizado um *pool* de cDNA de todas as amostras de linfócitos T, onde foram testadas as concentrações de 100nM, 200nM e 300nM, para cada par de *primers*. Após as reações de RT-PCR em tempo real foi observado o valor de Ct de cada par de primers em cada concentração e foi escolhida a concentração que apresentava o menor valor de Ct. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é quantidade de mRNA presente na amostra. Dessa forma, a concentração de uso de cada primer foi escolhida baseando-se no valor de Ct, de forma que a concentração de cada par de “primers” não fosse um fator limitante da reação.

4.11.6 Especificidade e adequação dos primers

A especificidade dos “primers” desenhados pelo *Primer Express* foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio, que mantêm as duplas fitas unidas, se rompem (devido ao aumento de temperatura), o *SYBR-Green* é liberado. A

fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou *melting point* (T_m) do produto de amplificação (*amplicon*).

4.11.7 Cálculo da Eficiência

O cálculo da eficiência foi realizado como sugerido em Pfaffl e colaboradores (2002). Para calcularmos o valor da eficiência de cada par de de seqüências primers, fizemos um pool de todas as amostras estudadas (pool cDNA). Em seguida, diluímos esse pool em diluições que variavam de 1:10, 1:50, 1:250 e 1:1250 ou 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, e realizamos ensaios de RT-PCR em tempo real, onde cada seqüência de primers, já padronizada quanto a sua concentração de uso, foi testada.

Após a reação de RT-PCR em tempo real, foi obtido o valor de C_t (das triplicata) de cada diluição para cada seqüência de *primers* testada. As médias dos valores de C_t foram utilizadas no cálculo da eficiência, onde a linha da regressão linear foi composta pelo valor logaritmo das diluições testadas (\log_{10} RNA; eixo X) e pelos valores da média de C_t (eixo Y). O valor de *slope*, obtido da reta do gráfico da eficiência, é utilizado para determinar a eficiência da seqüência de primers para o gene de interesse. A fórmula utilizada para a eficiência (E) é:

$$E = (10^{-1/\text{slope}})$$

4.11.8 Critérios de Validação

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: (i) presença de controles brancos adequados, sem amplificação, (ii) curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, e com o seu início de aumento antes de C_T de 30, (iii) curva de dissociação adequada com pico único, (iv) ocorrência de amplificação do gene de interesse com C_T de até 35, (v) triplicatas do ensaio com diferenças entre elas < 1 C_T , (vi) análise de eficiência da reação, com amostras com diluições seriadas, com razão entre 1,8 e 2,0.

5. RESULTADOS

5.1 Geração de células dendríticas

Para estudar o efeito da interação entre as DCs e a proteína de choque térmico Hsp60 humana sobre a resposta imune, nós inicialmente diferenciamos DCs a partir de monócitos humanos. Para tanto, separamos PBMC de voluntários saudáveis em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque. Em seguida, nós fizemos a seleção dos monócitos das PBMC por meio de contagens imunomagnéticas. Na Tabela 2 mostramos o rendimento e a pureza dos monócitos antes e após a purificação. O rendimento dos monócitos foi calculado como a porcentagem de células recuperadas das PBMC totais após a seleção com as contagens imunomagnéticas e contagem em câmara citométrica. A pureza dessas células foi determinada como a porcentagem de células positivas para CD14 e negativas para marcadores de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD19) e células dendríticas (CD1a), por meio de citometria de fluxo.

Cultivamos monócitos humanos com GM-CSF e IL-4 ou com GM-CSF por 7 dias. A eficiência de diferenciação de monócitos em células dendríticas foi maior do que 90%, conforme observada pela não detecção da molécula CD14 após a purificação (Tabela 2) na superfície das células diferenciadas. A maturação das células dendríticas foi feita utilizando-se LPS em cultura por 24 horas.

Tabela 2. Pureza das células dendríticas derivadas de monócitos humanos *in vitro*

Marcador	CD14	CD1a	CD3	CD19
Antes da purificação	95%	1%	3%	3%
Após a purificação	3%	92%	1%	0%

Foram adquiridos 10000 (a) eventos e as células analisadas com base no tamanho (FSC, do inglês, "Forward Scatter", dispersão frontal) e na granulidade (SSC, do inglês, "Side Scatter", dispersão lateral). As células apresentaram 92% de positividade para o marcador de DC (CD1a, 92%) e apenas quantidades mínimas de marcadores de monócitos/macrófagos (CD14, 3%) e de células T (CD3, 1%). Um experimento representativo de 16 indivíduos.

5.2 Caracterização morfológica e funcional das células dendríticas

5.2.1 Caracterização Morfológica

O tratamento de monócitos com GM-CSF e IL-4, resultou na geração de células com características morfológicas de DC (Figura 5).

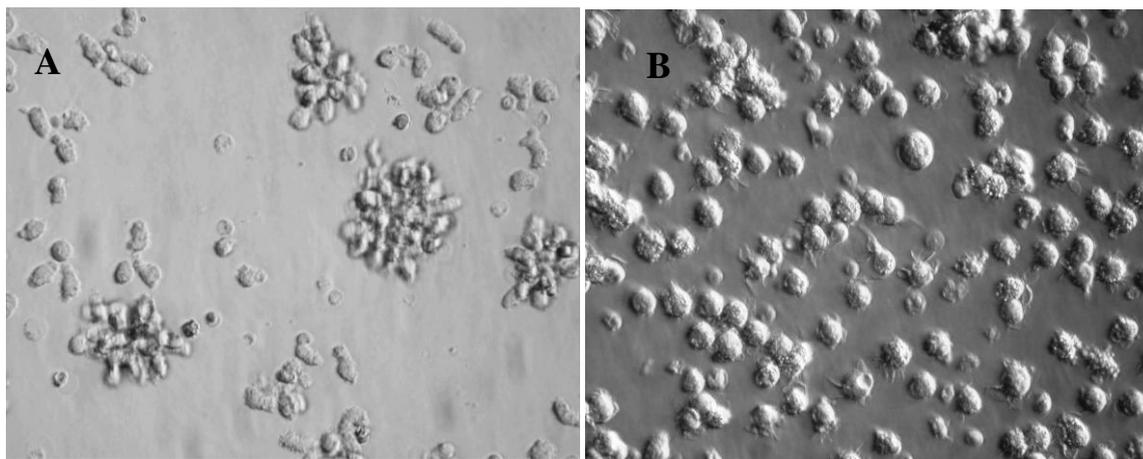


Figura 5. Características morfológicas das células dendríticas humanas geradas *in vitro* a partir de monócitos. (a) Grupo de Células dendríticas imaturas, ainda em uma fase precoce de diferenciação, apresentam formato arredondado. (b) Células dendríticas maduras em grumos e não grumadas apresentam formato arredondado e dendritos proeminentes. Microscopia óptica comum com aumento 400X

As análises da morfologia feitas por *citospin* e coloração com GIEMSA revelaram que ambos os tipos celulares apresentam semelhanças morfológicas: são multiformes e sem vacúolos. No entanto, essas mesmas células apresentaram também algumas diferenças quanto à posição do núcleo e quanto às projeções membranas. As células cultivadas apenas na presença de GM-CSF e IL-4, células dendríticas imaturas (iDC), apresentaram núcleo central e superfície celular relativamente lisa, com poucas e curtas projeções membranas. Ao contrário, as iDC tratadas com LPS amadureceram (mDC) e passaram por modificações morfológicas notáveis. Essas células, que tiveram um aumento substancial do seu volume, passaram a ter um núcleo totalmente periférico, um citoplasma com numerosos vacúolos e superfície celular com muitas projeções membranas pequenas e curtas.

5.2.2. Caracterização imunofenotípica das diferentes células dendríticas

Os dois tipos celulares diferiram imunofenotipicamente, as mDC expressaram altos níveis de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), moléculas HLA-DR e o marcador de maturação celular CD83 ao contrário das iDC (Tabela 3).

Tabela 3 - Imunofenotipagem de células dendríticas: medianas de intensidade de fluorescência e porcentagem (%) de positividade de marcadores de superfície celular em células dendríticas humanas geradas, *in vitro*, a partir de monócitos.

Marcador	Positividade (%)		MIF	
	iDC	mDC	iDC	mDC
CD1a	78 ± 27	79 ± 19	146	56
CD14	3 ± 3	1 ± 1	2	3
CD83	8 ± 4	75 ± 26	3	63
CD80	68 ± 19	89 ± 5	30	114
CD86	26 ± 31	87 ± 16	7	149
HLA-DR	31 ± 36	56 ± 34	7	21

Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC) e maduras (mDC). O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados como porcentagem média mais desvio padrão de células marcadas com os diferentes anticorpos monoclonais fluorescentes (%) e como medianas das intensidades de fluorescência (MIF). Em negrito estão as moléculas com maior expressão nas mDC. Foram realizados 16 experimentos com células de diferentes indivíduos.

5.3 Regulação x inflamação: expressão de mRNA de fatores imunorreguladores (REG) e pró-inflamatórios (INFLAMA) em linfócitos T cocultivados com DC imaturas pulsadas com antígenos da Hsp60

O objetivo deste bloco experimental foi identificar a expressão gênica de moléculas imunoreguladoras e inflamatória em linfócitos T, em resposta a peptídeos da Hsp60. Realizamos experimentos com os dois grupos de DC. A nossa estratégia consistiu na cocultura dos linfócitos T purificados ($\geq 98\%$ de pureza) com células dendríticas previamente estimuladas com antígenos da

Hsp60 por 24 h. Após 5 dias de cultura os linfócitos foram purificados ($\geq 98\%$ de pureza) e analisados quanto à expressão de genes predominantemente relacionados à imunorregulação (TGF β , receptor de TGF β , IL-10, Foxp3 e GATA3) ou predominantemente relacionados à inflamação (IFN- γ , TNF- α e T-bet). A expressão desses genes foi avaliada por PCR em tempo real. Vale destacar que, em função de problemas técnicos não pudemos realizar experimentos com células dendríticas maduras, razão pela qual os dados apresentados abaixo são referentes apenas a linfócitos cultivados com células dendríticas imaturas. Realizamos experimentos com células de 3 indivíduos diferentes (DC03, DC05 e DC09) (Quadro 1).

DC #	Estímulo	TGFβ	TGFβ R	IL-10	Foxp3	GATA3	IFNγ	TNFα	T-bet	Tipo DC	Predomínio REG/ INFLAMA
DC03	N3	2,4	4,5	0,2	0,9	1,0	0,8	0,3	1,2	iDC	
	N7	2,2	5,4	0,1	0,6	0,9	0,5	0,2	1,0		
	p277	3,2	5,9	0,2	0,5	1,0	0,4	0,1	1,3		
	C-Hsp60	1,7	nd	0,2	0,5	1,2	1,0	0,3	0,8		
DC05	N3	2,2	3,0	0,1	292,0	340,4	248,8	2,5	6807,9	iDC	equilíbrio
	N7	2,7	2,7	0,2	229,9	211,4	163,1	1,9	4028,4		
	p277	0,4	0,6	5,2	1,4	1,6	9,4	1,1	1,0		
	C-Hsp60	0,2	1,0	0,5	1,4	2,4	11,4	0,5	4,4		
DC09	N3	1,4	1,5	0,1	1,5	1,2	3,2	0,9	0,5	iDC	
	N7	2,0	0,8	undet	0,4	0,6	1,1	0,5	0,2		
	p277	2,1	1,5	0,1	1,2	1,3	4,6	1,0	0,6		
	C-Hsp60	1,5	1,7	0,4	1,4	1,0	5,1	1,0	0,5		

Quadro 1. Razão da expressão relativa de mRNA de fatores imunorreguladores e pró-inflamatórios em linfócitos T purificados após terem sido cocultivados com DC imaturas previamente incubadas com antígenos da Hsp60. As moléculas TGFβ, IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas imunorreguladoras. IFN-γ, TNF-α e T-bet foram consideradas pró-inflamatórias. Os resultados estão expressos como a razão entre a média dos resultados de amplificação na condição experimental com o antígeno da Hsp60 e a condição sem o antígeno, ambos relativos à expressão do gene endógeno de GAPDH. Os números em verde correspondem a resultados com aumento da expressão gênica e, em vermelho, diminuição. REG: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias. INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró -inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras. Equilíbrio: quanto o número de modificações REG foi igual ao número de modificações INFLAMA. Os quadrantes em cinza correspondem a condições onde houve predomínio ou uma modificação REG e os em **amarelo** quando houve predomínio ou uma modificação INFLAMA.

Afim de avaliar se o pulso das células dendríticas com antígenos da Hsp60 era capaz de modular a expressão de cada um dos genes estudados, em linfócitos T, nós estabelecemos a razão da expressão de mRNA dos linfócitos T da condição de cultura com o antígeno, em relação à condição sem o antígeno, ambos em relação à expressão do gene controle endógeno, a enzima GAPDH. Os resultados, mostrados como índices de expressão relativa (IR) (números adimensionais) foram assim interpretados: $IR \geq 2$, aumento da expressão do gene em questão; $IR \leq 0,5$ diminuição da expressão do mRNA deste gene. As modificações na expressão gênica foram consideradas imunorreguladoras (REG) ou pró-inflamatórias (INFLAMA). Consideramos uma modificação como REG, quando detectamos IR da expressão de mRNA das moléculas imunorreguladoras ≥ 2 e / ou quando o IR das moléculas pró-inflamatórias foram $\leq 0,5$. Por outro lado, consideramos uma modificação como INFLAMA quando detectamos IR da expressão de mRNA de moléculas pró- inflamatórias ≥ 2 , e / ou quando o IR da expressão de mRNA das moléculas imunorreguladoras foram $\leq 0,5$.

Todos resultados apresentados aqui são oriundos de experimentos que preencheram os critérios de validação para PCR em tempo real (ver Material e Métodos) que incluem entre outros, (i) a eficiência dos *primers* para cada um dos genes estudados e (ii) a análise da curva de dissociação do produto amplificado. A curva de eficiência informa quão adequados são os *primers* utilizados para amplificar determinada seqüência de nucleotídeos e se são capazes de amplificar amostras com baixa concentração de mRNA para aquele gene. A curva de dissociação informa sobre a especificidade do par de *primers* para a amostra a ser amplificada. *Primers* específicos para uma única seqüência de nucleotídeos devem apresentar uma curva de dissociação do produto amplificado com pico único. Na Figura 6 mostramos a curva de dissociação para o gene do TGF- β . Todos os outros genes apresentaram curvas de dissociação semelhantes. A análise da eficiência dos *primers* usados para amplificação de cada gene específico mostrou-se adequada, com valores variando de 1,8 a 2,0: TGF- β (1,8), TGF- β R (1,8), IL-10 (1,8), Foxp3 (2,0), GATA3 (1,8), IFN- γ (1,8), TNF α (1,8) e T-bet(1,9). Na Figura 7 mostramos a curva de eficiência dos *primers* para TGF- β , construída a partir dos dados constantes no

Quadro 2.

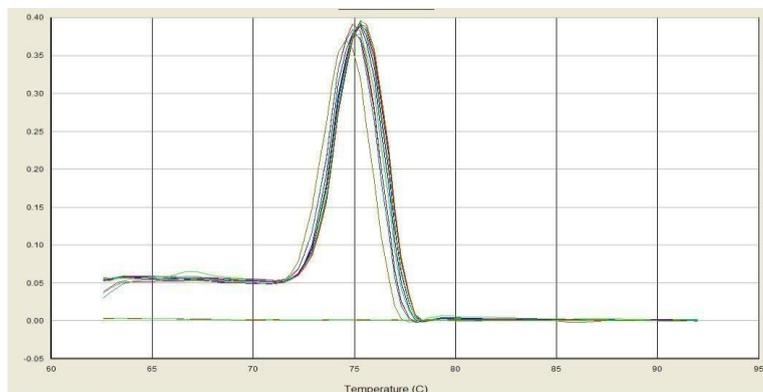


Figura 6. Curva de dissociação para primers TGFβ.
Dissociação do amplicon do TGFβ com um pico único e com Tm de 75 °C.

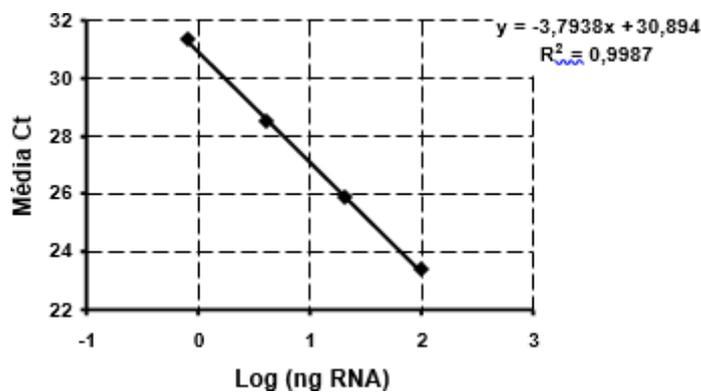


Figura 7. Curva de eficiência para TGFβ.
Relação diretamente proporcional entre o logaritmo da concentração do mRNA e o ciclo médio de amplificação para essa amostra (Ct), nessa concentração. Y= equação da reta.

Diluições	ng RNA	log ng RNA	média Ct	
1:1250	0,8	-0,09691	31,373	
1:250	4	0,60206	28,486	
1:50	20	1,30103	25,872	
1:10	100	2,00000	23,405	
			Eficiência	1,8
			Slope	-3,7938

Quadro 2. Resultado da análise de eficiência para TGFβ em ensaio por PCR em tempo real. Diluições seriadas de mRNA das amostras de linfócitos T e as ampliações médias para

cada diluição. Eficiência foi calculada conforme descrito na seção material e métodos.

A análise dos diferentes antígenos da Hsp60 em relação a cada experimento mostrou um predomínio de modificação REG em 5 das 12 análises (41,6%), modificação equilibrada (REG=INFLAMA) em 1 das 12 análises (8,4%), e predomínio de modificação INFLAMA em 6 das 12 condições (50%). O peptídeo N7 induziu mais modificações do tipo REG (em 11 das 24 condições em que foi testado: 45,8%) do que modificações do tipo INFLAMA (em 6 das 24 condições: 25%). Considerando agora o seu predomínio de modificação (REG ou INFLAMA) em relação a todas as moléculas estudadas, em todas as 3 células (DC03, DC05, DC09: iDC) o predomínio foi de modificação do tipo REGULA em quase todos os experimentos (2 das 3 células) (Quadro 1). Analisando as modificações REG e INFLAMA para todas as moléculas estudadas (8 moléculas), para o peptídeo p277 o predomínio foi INFLAMA em 3 das 8, em comparação a modificação REG em 1 das 8 (Figura 8c). Essas modificações REG ocorreram tanto por aumento da expressão dos genes mais imunorreguladores, como pela diminuição daqueles mais inflamatórios. Para o peptídeo N3 houve equilíbrio, 2 das 8 moléculas tanto para REG quanto para INFLAMA (Figura 8b). Para a proteína C-Hsp60 o predomínio foi de modificação INFLAMA 2 das 8 moléculas, em comparação a modificação REG em 1 das 8 (Figura 8d). Mais uma vez, o predomínio INFLAMA foi decorrente tanto do aumento quanto da diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios e imunorreguladores, respectivamente.

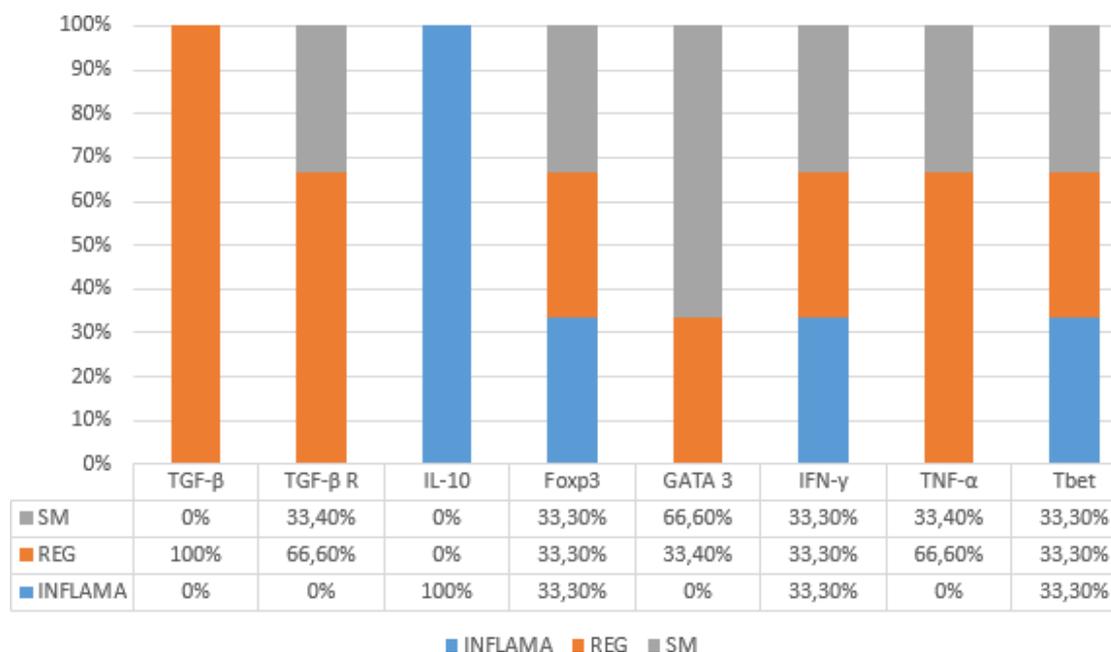


Figura 8a - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N7 da Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o gene estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFN_γ, TNF_α e T- bet) frente ao peptídeo N7 da Hsp60 e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal gene na presença do N7. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação.

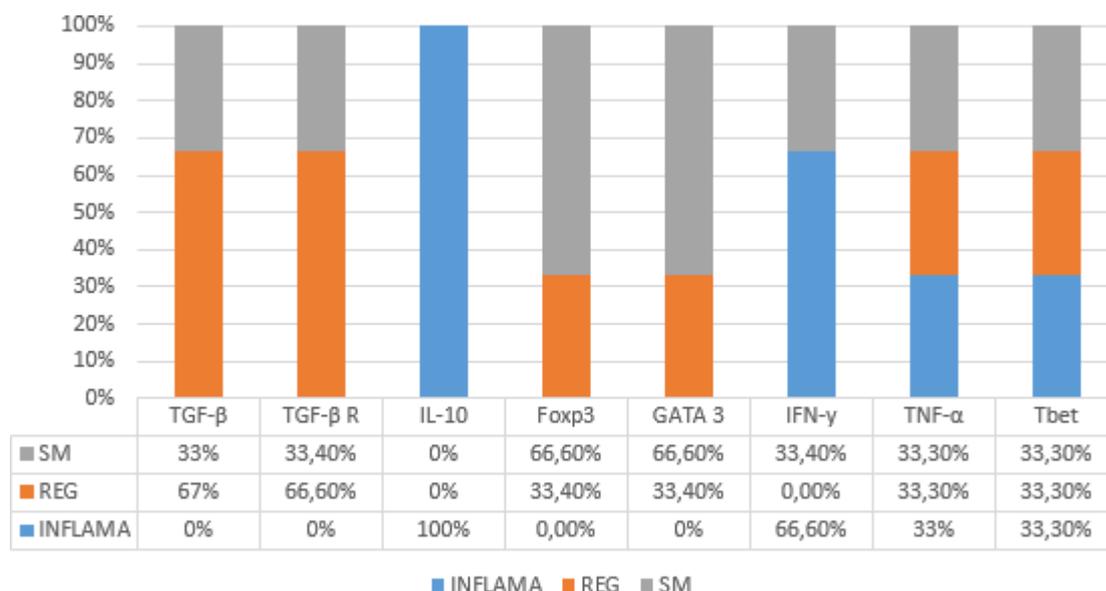


Figura 8b - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N3 da Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o gene estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFN_γ, TNF_α e T- bet) frente ao peptídeo N3 da Hsp60 e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal gene na presença do N3. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação.

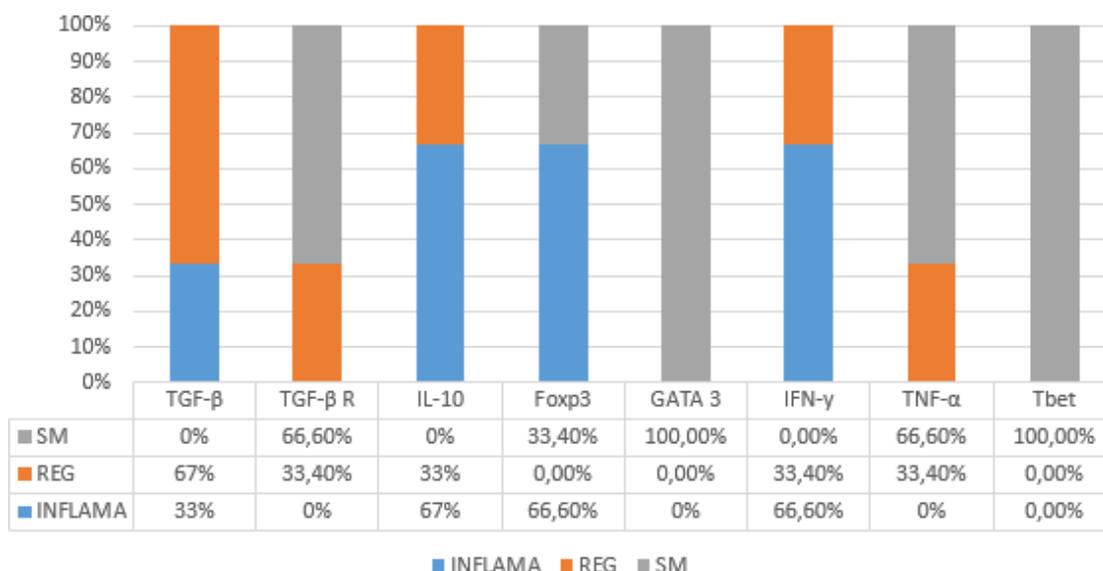


Figura 8c - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo p277 da Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o gene estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFNγ, TNFα e T- bet) frente ao peptídeo p277 da Hsp60 e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal gene na presença do p277. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação

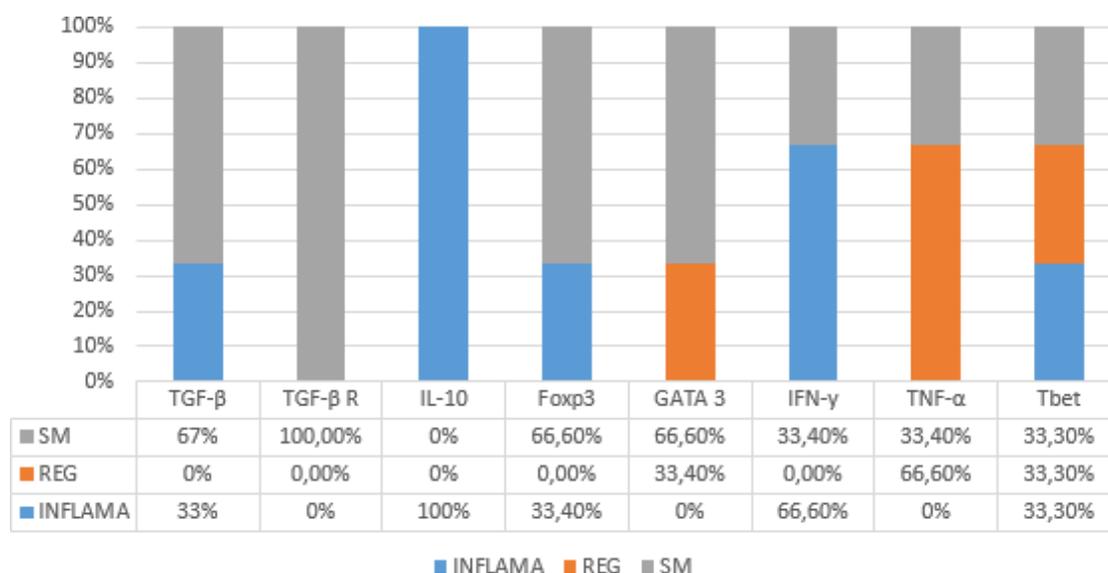


Figura 8d - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pela fração C-Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o fator estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFN-γ, TNFα e T-bet) frente à fração C-Hsp60, em real time-PCR, e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal fator na presença da C-Hsp60. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, tivemos como objetivo principal determinar o perfil molecular de mRNA em linfócitos T de moléculas envolvidas em imunorregulação (FOXP3, GATA3, TGF β , IL-10,) e de outras envolvidas em resposta imune pró-inflamatória (T-bet, IFN-g, TNF-a) induzidas na auto-reatividade a antígenos da Hsp60 em cocultura de LT com DC maduras e imaturas. Trabalhamos com a hipótese de que as DCs imaturas tratadas com peptídeos da Hsp60 humana pudessem direcionar respostas de Linfócito T para perfis reguladores ou inflamatórios dependendo da região da proteína.

Primeiramente nosso primeiro desafio foi gerar eficientemente células dendríticas maduras e imatura, para isso deve ser considerado que quando se trabalha com células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos para que os resultados obtidos com testes funcionais possam ser verdadeiramente atribuídos a DCs e não a monócitos não totalmente diferenciados. A fim de avaliar esta questão nós realizamos a imunofenotipagem das células dendríticas por nós geradas no 7º dia de diferenciação. Fomos eficientes em gerar células dendríticas conforme mostrado pela perda do marcador de monócito CD14 e pela aquisição simultânea do marcador de DC, CD1a (expressos em 3% e 92% da população celular, respectivamente) (Tabela 2). Com base nesses resultados assumimos que trabalhamos com células totalmente diferenciadas.

Analisamos o perfil de expressão gênica de um painel de moléculas reguladoras (TGF- β , receptor de TGF- β Foxp3, IL-10) e inflamatórias (INF-gama, TNF- α e T-bet), em linfócitos T cultivados com células dendríticas previamente pulsadas com antígenos da Hsp60. Observamos o envolvimento da Hsp60 tanto na indução quanto na inibição da expressão dessas moléculas. Esta análise nos permitiu identificar o peptídeo N7 como um antígeno potencialmente imunoregulador, uma vez que mostrou um predomínio de modificações do tipo REGULA em 100% das vezes em que foi testado.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos funcionalmente nos experimentos de auto-reatividade e se somam a eles no sentido de indicar o peptídeo N7 como um potencial antígeno regulador. Nossos resultados sobre o

efeito dos antígenos da Hsp60 na auto-reatividade e na expressão gênica em linfócitos T cultivados com diferentes DCs, previamente pulsadas com esses antígenos, indicam que existe a diversidade resposta dirigida a essa proteína.

Os nossos resultados mostraram a capacidade de antígenos Hsp60 de induzir tanto atividade imunoreguladora quanto inflamatória encontra subsídios na literatura. As bases moleculares que apoiam essa diversidade da indução de resposta começaram a ser elucidadas. Sabe-se, por exemplo, que a Hsp60 pode ligar-se diretamente em TLR, tanto em DCs (ROSENBERGER et al, 2015) quanto em linfócitos T reguladores (BERTON et al, 2017). Foi mostrado pelo grupo de Iru Cohen (1991) que em linfócitos T reguladores a ligação da Hsp60 ao receptor TLR2 induziu a expressão de GATA3 e IL-10 e diminuição de IFN- γ e T-bet, sugerindo o direcionamento da resposta T para um perfil Th2 (ZANIN-ZHOROV et al, 2005). No nosso trabalho, nós também detectamos um aumento na expressão de GATA3, principalmente em resposta a antígenos da região amino terminal da Hsp60. Porém, diferentemente dos trabalhos citados acima, esse aumento na expressão de GATA3 nos linfócitos T, provavelmente não pode ser atribuída à interação direta da Hsp60 ao TLR2, uma vez que não houve contato direto dos antígenos com os linfócitos. Assim, o aumento da expressão dessa molécula pode ter sido decorrente da interação do TCR dos linfócitos com moléculas de HLA complexadas a esses antígenos, ou de um efeito modulador das células dendríticas induzido pelos antígenos.

O fato de que a apresentação de peptídeos da Hsp60 no contexto de células dendríticas imaturas induziu a expressão de GATA3, principalmente por antígenos da região amino terminal, é sugestivo de que esses antígenos tenham o potencial de direcionar a resposta imune para um perfil mais imunoregulador. Esta idéia aumenta em dimensão à medida que constatamos que o peptídeo N7 é capaz de induzir a expressão de TGF- β , IL-10 e até mesmo do fator de transcrição associados a células reguladoras Foxp3 (Quadro 1). O aumento da expressão do nível de mRNA das citocinas TGF- β e IL-10 induzido pela Hsp60 já foi relatado em um modelo de uveíte (PHIPPS et al, 2003). No seu trabalho no entanto, o antígeno responsável pela indução da expressão de mRNA para TGF- β e IL-10 foi o peptídeo p336-351, derivado da região intermediária da Hsp60.

Foi interessante observar, no nosso trabalho, que o aumento na expressão de mRNA para o TGF- β foi acompanhado de um aumento concomitante da expressão para mRNA do seu receptor. Isso sugere que a auto-reatividade à Hsp60 foi capaz de sincronizar a expressão dessas moléculas.

Devemos destacar que em alguns casos o aumento dos mRNAs para TGF- β e para IL-10 foram acompanhados do aumento simultâneo de mRNAs de TNF- α e IFN- γ . A interpretação desses dados deve ser feita com cautela e ponderando-se que nenhuma citocina é produzida isoladamente e que o desfecho da resposta imune pode depender do equilíbrio entre os vários tipos de citocinas presentes em um determinado microambiente. Em linha com estes resultados, foi mostrado a produção de IL-10 e IFN- γ induzida pelos diferentes antígenos da Hsp60, no sistema murino (CALDAS et al, 2005). Da mesma forma, outros autores mostraram que, em doses repetidas, a Hsp60 humana pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, bem como diminuir a expressão das moléculas TLR4, CD80, CD86 e HLA-DR, em macrófagos de indivíduos saudáveis, *in vitro* (KILMARTIN; REEN, 2004). Esses dados reforçam o papel da Hsp60 na indução da resposta imune e põe em evidência a sua plasticidade funcional.

Consideramos importante a análise de um painel de genes envolvidos nas atividades funcionais dos linfócitos em resposta a Hsp60, pois acreditamos que um balanço da expressão de genes reguladores e imunorreguladores pode determinar o resultado da resposta imune induzida. A análise do nosso painel nos permitiu apreciar a expressão de genes inflamatórios e reguladores e nos deixou otimistas quanto ao papel imunorregulador do peptídeo N7, incitando-nos a explorar esse peptídeo em protocolos de tolerância.

7. CONCLUSÕES

- A obtenção de células dendríticas fenotipicamente imaturas e maduras (iDC e mDC) derivadas de monócitos CD14⁺ purificados é seguramente alcançada a partir do tratamento com GM-CSF, IL-4 e LPS, respectivamente. Essa diferenciação estável das DCs pode ser confirmada por imunofenotipagem.
- Na análise molecular de genes pró-inflamatórios e reguladores, observamos que os antígenos da Hsp60 induziram tanto modificações inflamatórias como reguladoras. Esses resultados indicam que a Hsp60 tem a capacidade de ativar, simultaneamente, genes funcionalmente antagônicos, reafirmando a diversidade funcional da Hsp60.
- Na análise da expressão de mRNA do painel de genes pró- inflamatórios e reguladores, em linfócitos T, identificamos o peptídeo N7 como indutor de modificações predominantemente reguladoras, em todas as condições em que ele foi testado. Com esses resultados, reafirmamos o potencial imunorregulador do peptídeo N7 da Hsp60.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2015.

APPEL, S.; YI, D.H. Current Status and Future Perspectives of Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2013, doi: 10.1111/sji.12060.

BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 20018:767-811.

BERTON, M.P. *et al.* Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8:73

BLACHERE, N. E. *et al.* Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med*. 1997;186(8):1315-22.

BLEOTU, C. *et al.* Significance of serum antibodies against HSP 60 and HSP 70 for the diagnostic of infectious diseases. *Virulence*, 5:8, 828-831; 2014.

BOL, K.F. *et al.* Dendritic Cell-Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clinical Cancer Research*, 2017, 22(8).

BOONSTRA, A. *et al.* Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*. 2003;197(1):101-9.

BOROWSKI, C. *et al.* On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(2):200-6.

CALDAS, C. *et al.* Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. *Clinical and Experimental Immunology* 146(1):66, 2006.

CANQUE, B. *et al.* IL-4 and CD40 ligation affect differently the differentiation, maturation, and function of human CD34+ cell-derived CD1a+CD14- and CD1a-CD14+ dendritic cell precursors in vitro. *J Leukoc Biol*. 1998;64(2):235-44.

CAUX, C. *et al.* Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+

hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;87(6):2376-85.

CLAYTON, K. *et al.* Langerhans Cells—Programmed by the epidermis. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1676.

CHEBOTAREVA, N.; BOBKOVA, I.; SHILOV, E. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress and Chaperones*, 2017, 22:319–343.

COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today*.1991;12(4):105-10.

DE HEUSCH. *et al.* Depending on their maturation state, splenic dendritic cells induce the differentiation of CD4(+) T lymphocytes into memory and/or effector cells in vivo. *Eur J Immunol*.2004;34(7):1861-9.

DE KLEER, I. *et al.* Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood*. 2006;107(4):1696-702.

DOMOGALLA, M.P. *et al.* Tolerance through education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape immunity. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1764.

DIRESKENELI, H. Innate and Adaptive Responses to Heat Shock Proteins in Behcet's Disease. *Genetics Research International*, 2013, Article ID 249157.

EDEN, W.V. *et al.* The enigma of Heat Shock Proteins in immune Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1599.

ELLMIEIER, W.; HAUST, L.; TSCHISMAROV, R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression. during T cell development. *Cell. Mol. Life Sci.* (2013) 70:4537–4553.

ENRIQUEZ, A.S. *et al.* The human mitochondrial Hsp60 in the APO conformation forms a stable tetradecameric complex. *Cell cycle*, 2017, vol. 16, N°. 13, 1309–1319.

ENK, A. H.*et al.* Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol*. 1993;151(5):2390-8.

FLORES-ROMO, L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology*. 2001;102(3):255-62.

FRIZZELL, H. *et al.* Role of heterogeneous cell population on modulation of dendritic cell phenotype and activation of CD8 T cells for use in cell-based immunotherapies.

Cell Immunol. 2017, 311: 54–62.

EGINAT, J. *et al.* Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. *Frontiers in Immunology*. 2015, Volume 6, Article 527.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723-37.

HARAKAL, J. *et al.* Regulatory T Cells Control Th2-Dominant Murine Autoimmune Gastritis. *J Immunol.* 2016 July 1; 197(1): 27–41.

HÖLZEMER, A.; GARCIA-BELTRAN, W.F.; ALTFELD, M. Natural Killer Cell Interactions with Classical and Non-Classical Human Leukocyte Antigen Class I in HIV-1 Infection. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1496.

JAKIC, B. *et al.* Elevated sodium leads to the increased expression of HSP60 and induces apoptosis in HUVECs. *Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179383> June 12, 2017.

JONULEIT, H. *et al.* Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1213-22.

KARIMI, M.H.; GERAMIZADEH, B.; MALEK-HOSSEINI, S.A. Tolerance Induction in Liver. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 2015; Vol. 6 (2).

Moudgil KD, Chang TT, Eradat H, Chen AM, Gupta RS, Brahn E, et al. Diversification of T cell responses to carboxy-terminal determinants within the 65-kD heat-shock protein is involved in regulation of autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 1997;185(7):1307-16.

MURPHY, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KILMARTIN, B.; REEN, D. J. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol.* 2004;34(7):2041-51.

KIM, E.Y. *et al.* Modulation of Adjuvant Arthritis by Cellular and Humoral immunity to Hsp65. *Frontiers in Immunology*, 2016, Volume 7, Article 203.

KUNDU, S. K. *et al.* A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum*

Retroviruses. 1998;14(7):551-60.

LEWIS, M.; TARLTON, J. F.; COSE, S. Memory versus naive T-cell migration. *Immunol Cell Biol*. 2008. Mar-Apr;86(3):226-31.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$. *Methods*, Volume 25, Issue 4, December 2001, Pages 402-408.

LUNA, E. *et al.* Treatment with encapsulated Hsp60 peptide (p277) prolongs skin graft survival in a murine model of minor antigen disparity. *Scandinavian journal of immunology* 66(1):62, 2007.

LUTZ, M.B. *et al.* GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1388.

LUTZ, M.B. Induction of CD4+ Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells. *Immune network* Vol. 16, No. 1: 13-25, February, 2016.

LIU, Y. *et al.* miRNA regulation of Tip110 expression and self-renewal and differentiation of human CD34+ hematopoietic cells. ***Oncotarget*, 2018, Vol. 9, No. 4.**

MENDOZA, J.A; WEINBERGER, K.K; SWAN, M.J. The Hsp60 protein of helicobacter pylori displays chaperone activity under acidic conditions. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2017, 95–99.

MOUDGIL K. D. *et al.* Diversification of T cell responses to carboxy-terminal determinants within the 65-kD heat-shock protein is involved in regulation of autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 1997;185(7):1307-16.

NATAF, F. *et al.* Autoimmunity as a Driving Force of Cognitive Evolution. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, Volume 11, Article 582.

NISHIZUKA, Y; SAKAKURA, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 1969;166(906):753-5.

NORDSKOG, B. K; FIELDS, W. R; HELLMANN, G. M. Kinetic analysis of cytokine response to cigarette smoke condensate by human endothelial and monocytic cells. *Toxicology*. 2005;212(2-3):87-97.

OBREGON, C. *et al.* Update on Dendritic Cell-induced immunological and Clinical Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1514.

PEAKMAN, Mark; VERGANI, Diego. *Imunologia básica e clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2011.

PEREIRA, L. M.S. *et al.* Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of immune Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 605.

PFAFFL, M. W. *et al.* Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids*, 2002 Res. 30:e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36

PHIPPS, P. A. *et al.* Prevention of mucosally induced uveitis with a HSP60-derived peptide linked to cholera toxin B subunit. *Eur J Immunol*. 2003;33(1):224-32.

REA, D. *et al.* Recombinant adenovirus-transduced human dendritic cells engineered to secrete interleukin-10 (IL-10) suppress Th1-type responses while selectively activating IL-10-producing CD4+ T cells. *Hum Immunol*. 2004;65(11):1344-55.

ROMAN, E.; MORENO, C. Delayed-type hypersensitivity elicited by synthetic peptides complexed with Mycobacterium tuberculosis hsp 70. *Immunology*. 1997;90(1):52-6.

ROSENBERGER, K. *et al.* Intrathecal heat shock protein 60 mediates neurodegeneration and demyelination in the CNS through a TLR4- and MyD88-dependent pathway. *Molecular Neurodegeneration*, 2015, 10:5.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*.1994;179(4):1109-18.

SITTIG, S.P. *et al.* Primary Human Blood Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy—Tailoring the Immune Response by Dendritic Cell Maturation. *Biomedicines*, 2015, 3, 282-303.

SPORRI, R.; SOUSA, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005;6(2):163-70.

SRIVASTAVA, P. K; DAS, M.R. The serologically unique cell surface antigen of Zajdela ascitic hepatoma is also its tumor-associated transplantation antigen. *Int J*

Cancer. 1984;33(3):417-22.

SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):185-94.

STEINBRINK, K. *et al*. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen- specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*. 1999;93(5):1634-42.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.

STRUNK, D. *et al*. A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185(6):1131-6.

SCHUCH. R.A. *et al*. The Use of Xanthan Gum as Vaccine Adjuvant: An Evaluation of Immunostimulatory Potential in BALB/c Mice and Cytotoxicity In Vitro. *BioMed Research International*. Volume 2017, Article ID 3925024, 9 pages.

SUSS, G.; SHORTMAN, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996;183(4):1789-96.

SUWANDI, J.S.; NIKOLIC, T.; ROEP, B.O. Translating Mechanism of Regulatory Action of Tolerogenic Dendritic Cells to Monitoring endpoints in Clinical Trials. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1598.

TAGUCHI, O.; NISHIZUKA, Y. Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance. *J Exp Med*. 1987;165(1):146-56.

TODRYK, S.M.; GOUGH, M.J.; POCKLEY, A.G. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology*, 2003 110 1–9.

TUNG, K. S. *et al*. Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. Immunopathology. *Am J Pathol*. 1987;126(2):293-302.

VOLK. V. *et al*. Multidimensional Analysis Integrating human t-Cell signatures in Lymphatic tissues with sex of humanized Mice for Prediction of Responses after dendritic Cell Immunization. *Frontiers in Immunology*, 2017, Volume 8, Article 1709.

VINEY, J. L. Immune fate decided by dendritic cell provocateurs. *Trends Immunol*.

2001;22(1):8-10.

ZANIN-ZHOROV, A. *et al.* Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol.* 2005;174(6):3227-36.

YU, H. *et al.* Comparative antigen-induced gene expression profiles unveil novel aspects of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. *Mol Immunol*, 2013, 56(4): 531–539.