UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DANIEL SANZIO GIMENES DA CRUZ

**Papel dos adrenoceptores β em células dendríticas derivadas de
monócitos humanos**

São Paulo

2017

DANIEL SANZIO GIMENES DA CRUZ

**Papel dos adrenocetores β em células dendríticas derivadas de
monócitos humanos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador: Prof.^a Dr.^a Cristina de
Oliveira Massoco Salles Gomes

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3482
FMVZ

Cruz, Daniel Sanzio Gimenes da
Papel dos adrenoceptores β em células dendríticas derivadas de monócitos humanos / Daniel Sanzio Gimenes da Cruz. -- 2017.
180 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Células dendríticas (DCs). 2. Neuroimunomodulação. 3. Sistema nervoso simpático (SNS). 4. Estresse. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 31 de outubro de 2016
CEUAx N 3617200916

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Cristina De Oliveira Massoco Salles Gomes

Área: 0

Equipe envolvida: Daniel Sanzio Gimenes Da Cruz - **executor** (faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia); Cristina De Oliveira Massoco Salles Gomes (orientador)

Título do projeto: "Papel dos receptores beta-adrenérgicos em células dendríticas derivadas de monócitos".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 27/10/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFIED

We certify that the Research "Role of beta-adrenergic receptors in monocyte-derived dendritic cells", protocol number CEUAX 3617200916, under the responsibility Cristina De Oliveira Massoco Salles Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day October 27, 2016.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Papel dos receptores beta-adrenérgicos em células dendríticas derivadas de monócitos", protocolado sob o CEUAX nº 3617200916, sob a responsabilidade de Cristina De Oliveira Massoco Salles Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 27 de outubro de 2016.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo 11 de agosto de 2016

AUTORIZAÇÃO

Em nome do Instituto HOC de Hemoterapia, autorizo o **Sr. Daniel Sanzio Gimenes da Cruz** a utilizar as câmaras LRS, peças integrantes dos kits descartáveis utilizados para coleta de plaquetas por aférese leucorreduzidas, em pesquisa denominada "Papel dos receptores beta-adrenérgicos em células dendríticas derivadas de monócitos". As referidas câmaras contêm sangue residual com elevada quantidade de leucócitos e são removidas do kit imediatamente após sua utilização, com o consentimento escrito do doador de plaquetas para utilização de seu conteúdo em pesquisas institucionais.

Atenciosamente

Joseito B. Brandão, diretor médico
Instituto HOC de Hemoterapia
Hospital Alemão Oswaldo Cruz

Instituto HOC de Hemoterapia
Rua João Julião, 331 • Sala 1 • Parahy
São Paulo • SP • CEP 01323-903
Fone: 11 3286 7372 • Fax: 11 3286 7370

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CRUZ, Daniel Sanzio Gimenes da

Título: Papel dos adrenocetores β em células dendríticas derivadas de monócitos humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha mãe, Vilma, por todos os ensinamentos, lições, dedicação e amor que você me forneceu intensamente por toda sua vida. Sou a pessoa mais grata do mundo por ter tido você como mãe. Sinto diariamente uma saudade imensurável de você.

À minha segunda mãe, a Per. Você sempre foi um modelo de humildade, generosidade e bondade para mim. Obrigado por cuidar de mim por tantos anos.

Também sinto muito sua falta.

Como não poderia faltar, à minha Gordinha! Já passamos por grandes “bocados”, alguns muito bons, e outros nem tanto, mas uma coisa é certa: você sempre esteve lá por mim. Obrigado por nunca me deixar desistir e por me sempre me apoiar! Você é uma grande fonte de inspiração e admiração para mim. Te amo demais!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e “mãe científica”, Cristina Massoco. A caminhada começou já tem um tempo e foi longa, mas sou extremamente grato por você ter sido a pessoa que me guiou até aqui.

Aos meus irmãos, Alexandre e Dalila, pelo carinho e todo o suporte. E o mais importante: por nossa união, apesar da distância durante todo esse tempo.

À toda a minha família, que esteve na minha mente e coração por todos estes anos.

Aos meus sogros, Jorge e Creusa, por me acolherem quando era apenas um menino do interior que tinha acabado de sair da casa da mãe para morar na maior cidade do país. Sem vocês nada disso seria possível, saibam que minha gratidão por vocês não tem limites.

Aos meus amigos de graduação! Já faz um tempo que passamos por todas as dificuldades do nosso curso, mas sempre com muito bom humor. A nossa união sempre foi e continua muito forte. Gostaria de cumprimentar especialmente meus “Brothers” do Clube da Luta®: Cauê, Juninho, Fernando, Kalil, Brancão e o tenente Mastine, parceiros de toda a vida.

Ao meu antigo orientador da graduação, Phileno Pinge-Filho. Você foi e segue sendo uma grande inspiração para mim, não somente de professor, mas também de pessoa. Não poderia ter escolhido um primeiro mentor científico melhor que você.

Ao Prof. Barbuto e seus alunos, que sempre me ajudaram quando eu precisava “daquele reagente” que estava faltando. Em especial a Bruna Zelante, que me auxiliou nas minhas tentativas iniciais de Western Blot e ao Thiago Patente, que além de ser a minha “ponte” também sempre esteve sempre disponível para “trocar ideias” comigo em relação aos nossos projetos.

Estendo estes agradecimentos também ao Prof. Jean Peron e seus alunos, especialmente a Nágela Zanluqui, minha parceira de alguns anos já.

Ao Prof. João Palermo-Neto por ter me dado o “sinal verde” para entrar no grupo de Neuroimunomodulação. Sem o seu acolhimento, eu nunca teria chegado até aqui.

À Prof. Maria Lúcia Daigli e ao Prof. Bruno Cogliati e seus alunos, que sempre me ajudaram quando precisei de algum reagente ou utilizar algum equipamento dos seus laboratórios.

Aos técnicos do laboratório de Farmacologia, Herculano e Vagner e à especialista Nicolle, pelo suporte imprescindível durante todos estes anos e também pela grande amizade que acabamos cultivando.

Ao Dr. Joselito Brandão, diretor do Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, por aceitar meu projeto e especialmente às enfermeiras e recepcionistas do Banco de Sangue que me “aturaram” por todos estes anos conseguindo câmaras LRS para mim sempre que eu precisava.

Aos meus amigos de pós-graduação no doutorado: Ana Paula Lima, Atílio Calefi, Eduardo Kenji, Everton Bertaglia, Jessica Garcia, Julia Zaccarelli, Lilian Namazu, Mariana Sayuri, Natalia Moreira, Rafael Margatho, Thaisa Sandini, Thiago Marinho e Wanderley Quinteiro por toda a discórdia e reconciliação nestes anos. Vocês certamente fizeram o lado ‘tenso’ da pós-graduação parecer bem menor.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia, por me acolher para realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de estudos, indispensável para que eu pudesse realizar o trabalho e sobreviver em São Paulo ao mesmo tempo.

“There is always a bigger fish”

Qui-Gon Jinn

RESUMO

CRUZ, D. S. G. **Papel dos adrenoreceptores β em células dendríticas derivadas de monócitos humanos.** [Role of β -adrenoceptors in human monocyte-derived dendritic cells]. 2017. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O sistema nervoso simpático (SNS) inerva a maioria dos órgãos linfoides e durante situações de estresse, por meio da liberação da noradrenalina de seus ramos eferentes, emitem sinais capazes de modular as repostas imunes. Nossa hipótese foi de que esta via poderia alterar a função de células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos humanos, uma vez que receptores adrenérgicos já foram demonstrados em DCs murinas e pelo fato de que as estas células são chave na iniciação de respostas imunes adaptativas, bem como indutoras de tolerância. Desta forma, DCs diferenciadas a partir de monócitos sanguíneos provenientes de doadores saudáveis tratadas com ligantes adrenérgicos foram analisadas quanto a expressão de marcadores de membrana, atividade fagocítica, apresentação antigênica em ensaio de reação mista de linfócitos, expressão gênica de marcadores de diferenciação e ativação, bem como produção de citocinas. Os resultados revelaram que as DCs apresentam transcritos apenas para o adrenoreceptor β_2 , e esta expressão é similar à de macrófagos, mas inferior a de linfócitos. A análise dos marcadores fenotípicos de membrana, atividade fagocítica, apresentação antigênica e produção de citocinas não mostraram alterações nas células tratadas com agonistas adrenérgicos. No entanto, o tratamento com ligantes adrenérgicos foi capaz de alterar a expressão dos genes *CD40*, *CD80*, *CD83*, *CXCL1*, *TGFB1*, *FCGR3A*, *CCR7* e *CCL5* em DCs e macrófagos estimulados com LPS ou TNF- α . Embora os efeitos dos ligantes adrenérgicos não tenham sido fortemente evidenciados nos testes realizados, os resultados sugerem que pequenas alterações podem ser provocadas pela ligação das catecolaminas em DCs, sugerindo que estas possam ser moduladas pelo SNS, modificando as respostas imunes

Palavras-chave: Células dendríticas (DCs). Neuroimunomodulação. Sistema nervoso simpático (SNS), Estresse.

ABSTRACT

CRUZ, D. S. G. **Role of β -adrenoceptors in human monocyte-derived dendritic cells.** [Papel dos adrenoceptores β em células dendríticas derivadas de monócitos humanos]. 2017. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The sympathetic nervous system (SNS) innervates most of the lymphoid organs and during stress situations, by releasing norepinephrine from its efferent branches, emit signals capable of modulating immune responses. Our hypothesis was that this pathway could alter the function of human monocyte-derived dendritic cells (DCs), since adrenergic receptors have already been demonstrated in murine DCs, and by the fact that these cells are key in initiating adaptive immune responses as well as tolerance inducers. Thus, differentiated DCs from blood monocytes from healthy donors treated with adrenergic ligands were analyzed for expression of membrane markers, phagocytic activity, antigenic presentation in a mixed lymphocyte reaction assay, gene expression of differentiation and activation markers and cytokine production. The results revealed that DCs present transcripts only for the β_2 adrenoceptor, and this expression is similar to that observed in macrophages, but lower than what it is found in lymphocytes. The analysis of phenotypic membrane markers, phagocytic activity, antigenic presentation and cytokine production did not revealed any changes in the cells treated with adrenergic agonists. However, treatment with the adrenergic ligands was able to alter the expression of *CD40*, *CD80*, *CD83*, *CXCL1*, *TGFB1*, *FCGR3A*, *CCR7* and *CCL5* genes in DCs and macrophages stimulated with LPS or TNF- α . Although the effects of adrenergic ligands have not been strongly demonstrated in the tests performed, the results suggest that small changes can be caused by the binding of catecholamines in DCs, suggesting that they can be modulated by the SNS, modifying immune responses.

Keywords: Dendritic cells (DCs). Neuroimmunomodulation. Sympathetic nervous system (SNS). Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Câmara de leucorredução de plaquetaferese do aparelho <i>Trima Accel</i> ®.	48
Figura 2 - Sangue sobre <i>Ficoll-Paque Plus</i> antes da centrifugação para formação das camadas celulares.	50
Figura 3 – Ilustração do procedimento de separação de PBMCs por <i>Ficoll-Paque PLUS</i>	51
Figura 4 - Ilustração da caracterização da diferenciação e maturação de DCs pelos marcadores CD14, CD209 e CD83.	58
Figura 5 - <i>Dot plot</i> e histograma ilustrativos da análise realizada para obtenção da % de células que proliferaram	60
Figura 6 - Histogramas ilustrativos do ensaio do CBA	64
Figura 7 - Dot plots ilustrativos da análise do ensaio de CBA.	64
Figura 8 - Histogramas da expressão gênica de adrenocetores $\beta 2$ nos diferentes perfis de DCs e células mononucleares	68
Figura 9 - Histogramas da viabilidade celular após 20 minutos de tratamento	69
Figura 10 - Histogramas da viabilidade celular após 48 horas de tratamento	70
Figura 11 - Avaliação da expressão proteica de pCREB em iDCs e mDCs LPS por citometria de fluxo	71
Figura 12 – Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 5 minutos de tratamento.....	73
Figura 13 - Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 15 minutos de tratamento.....	74
Figura 14 - Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 30 minutos de tratamento.....	75
Figura 15 - Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 5, 15 e 30 minutos de tratamento.....	76
Figura 16 - <i>Box plots</i> da expressão de CD14 e CD209 na membrana plasmática de Mo-DCs.	78

Figura 17 - <i>Box plots</i> da expressão de CD14 e CD209 na membrana plasmática de Mo-DCs	79
Figura 18 - <i>Box plots</i> da porcentagem do índice de fagocitose de iDCs após 30 minutos de tratamento com ligantes adrenérgicos.....	80
Figura 19 - <i>Box plots</i> da porcentagem da população de linfócitos que entrou em divisão celular após contato com mDCs tratadas por 30 minutos com agonistas adrenérgicos.	82
Figura 20 - Expressão gênica dos marcadores (A) <i>CD1c</i> , (B) <i>CD209</i> , (C) <i>CD14</i> (D) <i>ADRB2</i> em iDCs derivadas de monócitos após tratamento crônico com agonistas adrenérgicos.....	84
Figura 21 - Expressão gênica dos marcadores (A) <i>TGFB1</i> , (B) <i>CD37</i> , (C) <i>CXCL1</i> e (D) <i>CD163</i> em iDCs derivadas de monócitos após tratamento crônico com agonistas adrenérgicos.....	85
Figura 22 - Expressão gênica dos marcadores <i>CCL5</i> , <i>CD40</i> , <i>CD80</i> , <i>CXCL1</i> , <i>CCR7</i> , <i>CD83</i> , <i>CD86</i> e <i>CD163</i> em DCs após 6 dias de tratamento com agonistas adrenérgicos.	87
Figura 23 - Expressão gênica dos marcadores (A) <i>CD83</i> , (B) <i>CD86</i> , (C) <i>CXCL1</i> , (D) <i>CCL5</i> , (E) <i>CCR7</i> , (F) <i>TGFB1</i> , (G) <i>CD80</i> , (H) <i>CD40</i> , (I) <i>FCGR3A</i> e (J) <i>CD163</i> em tolDCs após 6 dias de tratamento com agonistas adrenérgicos.	91
Figura 24 - Expressão gênica dos marcadores (A) <i>CD14</i> , (B) <i>FCGR1A</i> , (C) <i>ITGAM</i> e (D) <i>ADRB2</i> em macrófagos tratados cronicamente com agonistas e antagonistas adrenérgicos.....	95
Figura 25 - Expressão gênica dos marcadores <i>TGFB1</i> , <i>CD37</i> , <i>PPARG</i> e <i>CD163</i> em macrófagos tratados cronicamente com agonistas e antagonistas adrenérgicos.	97
Figura 26 - Expressão gênica dos marcadores (A) <i>FCGR3A</i> , (B) <i>CXCL1</i> , (C) <i>CD80</i> , (D) <i>CD83</i> , (E) <i>CCR7</i> , (F) <i>CD40</i> , (G) <i>CCL5</i> , (H) <i>CD163</i> e (J) <i>CD86</i> em macrófagos após 6 dias de tratamento com agonistas e antagonistas adrenérgicos.	99
Figura 27 - Quantificação das citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-8, (D) IL-10, (E) IL-12p70 e (F) TNF- α em iDCs, mDCs, LPS, tolDCs, macrófagos e macrófagos LPS tratadas ou não com noradrenalina por 6 dias.	103

Figura 28 - <i>Dot plots</i> representativos da análise do <i>sorting</i> de monócitos por beads magnéticas a partir de PBMCs.....	161
Figura 29 - <i>Dot plots</i> e histogramas representativos da avaliação da diferenciação de monócitos em células dendríticas.	162
Figura 31 - Curvas de dissociação (<i>melt</i>) dos genes <i>CD14</i> , <i>FCGR1A</i> , <i>FCGR3A</i> , <i>ITGAM</i>	163
Figura 32 - Curvas de dissociação (<i>melt</i>) dos genes <i>CD163</i> , <i>CCR7</i> , <i>TGFB1</i> , <i>PPARG</i>	164
Figura 33 - Curvas de dissociação (<i>melt</i>) dos genes <i>CD1C</i> , <i>CD209</i> , <i>CD80</i> , <i>CCL5</i>	165
Figura 34 - Curvas de dissociação (<i>melt</i>) dos genes <i>CD37</i> , <i>CXCL1</i> , <i>CD83</i> , <i>CD86</i> .	166
Figura 35 - Curvas de dissociação (<i>melt</i>) dos genes <i>ADRB2</i> e <i>OAZ1</i>	167
Figura 30 - <i>Dot plots</i> representativos da avaliação de viabilidade celular com o corante iodeto de propídio.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados no trabalho.....	62
Tabela 2 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD14</i> e <i>FCGR1A</i>	169
Tabela 3 -Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>FCGR3A</i> e <i>ITGAM</i>	170
Tabela 4 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD163</i> e <i>CCR7</i> ..	171
Tabela 5 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>TGFB1</i> e <i>PPARG</i>	172
Tabela 6 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD1C</i> e <i>CD209</i> ..	173
Tabela 7 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD40</i> e <i>CCL5</i>	174
Tabela 8 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD37</i> e <i>CXCL1</i> ..	175
Tabela 9 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD80</i> e <i>ADRB2</i> ..	176
Tabela 10 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes <i>CD83</i> e <i>CD86</i> ..	177
Tabela 11 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão do gene <i>OAZ1</i>	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Tampão de lise amônio-cloreto-potássio
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico, do inglês <i>adrenocorticotropic hormone</i>
ANOVA	Análise de variância
APC	Do inglês <i>allophycocyanin</i>
BMDCs	Células dendríticas derivadas de medula óssea, do inglês <i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina, do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CBA	Do inglês, <i>cytometry bead array</i>
CCR7	Receptor de quimiocina 7 (motivo C-C), do inglês chemokine (C-C motif) receptor 7
CD	Do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CDPs	Progenitoras comprometidas de células dendríticas, do inglês <i>committed dendritic cell progenitors</i>
CFSE	Do inglês <i>5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CLEC9A	Lectina tipo C dominio familia 9, membro A, do inglês <i>C-type lectin domain family 9 member A</i>
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
CX3CR1	Receptor de quimiocina 1 (motivo C-X3-C) do inglês <i>chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i>
CXCL1	Ligante de quimiocina (motivo C-X-C), (C-X-C motif) chemokine ligand 1
DAMPs	Padrões associados a perigo, do inglês <i>danger associated molecular patterns</i>
DAPI	Do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DCs	Células dendríticas, do inglês <i>dendritic cells</i>
DEPC	Dicarbonato de dietila, do inglês <i>diethylpyrocarbonate</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido, do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol, do inglês <i>dithiothreitol</i>

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPAC	Proteínas trocadoras diretamente ativadas pelo cAMP, do inglês <i>exchange proteins directly activated by cAMP</i>
FITC	Do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FLT3L	Tirosino-quinase 3 FMS-relacionado, do inglês <i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
FSC	Do inglês <i>forward-scattered light</i>
FXIIIa	Fator xiiia
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HLA-DR	Do inglês <i>human leukocyte antigen –D related</i>
HPA	Eixo hipotálamo – hipófise – adrenal, do inglês <i>hypothalamic–pituitary–adrenal axis</i>
HSCs	Células tronco hematopoiéticas, do inglês <i>hematopoietic stem cells</i>
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
iDCs	Células dendríticas imaturas, do inglês <i>immature dendritic cells</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LCs	Células de Langerhans, do inglês <i>Langerhans cells</i>
LPS	Lipopolissacarídeos, do inglês <i>lipopolysaccharides</i>
MAPKs	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos, do inglês <i>mitogen activated protein kinases</i>
mDCs	Células dendríticas maduras, do inglês <i>mature dendritic cells</i>
MDP	Célula progenitora de macrófago e célula dendrítica, do inglês <i>macrophage and dendritic cell progenitor</i>
MDSCs	Células supressoras derivadas da linhagem mieloide, do inglês <i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência, do inglês <i>median fluorescence intensity</i>
MHC-I	Complexo de histocompatibilidade principal classe I, do inglês <i>major histocompatibility complex class I</i>
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal classe II, do inglês <i>major histocompatibility complex class II</i>

MLR	Reação mista de linfócitos, do inglês <i>mixed lymphocyte reaction</i>
Mo-DCs	Células dendríticas derivadas de monócitos, do inglês <i>monocyte-derived dendritic cells</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B, do inglês <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NKs	Células matadoras naturais, do inglês <i>natural killer</i>
OVA	Ovalbumina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
pCREB	Proteína ligadora do elemento responsivo do AMPc fosforilada, do inglês <i>phosphorylated cAMP response element-binding protein</i>
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides, do inglês <i>plasmacytoid dendritic cells</i>
PE	Do inglês phycoerythrin
PI	Iodeto de propídio, do inglês <i>propidium iodide</i>
PKA	Proteína quinase dependente de camp, do inglês <i>protein kinase A</i>
PMNs	Células polimorfonucleares, do inglês <i>polymorphonucleated cells</i>
Poli (I:C)	Ácido polinosínico-policitidílico), do inglês <i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão, do inglês <i>pattern recognition receptors</i>
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo, do inglês <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SAPI	<i>Staphylococcus aureus</i> inativados e corados com iodeto de propídio
SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i>
SFB	Soro fetal bovino
Siglec H	Lectina H semelhante à imunoglobulina ligadora de ácido siálico, do inglês <i>sialic acid binding Ig-like lectin H</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático

SSC	Do inglês <i>side-scattered light</i>
TGF- β -	Fator de transformação do crescimento beta, do inglês <i>transforming growth factor beta</i>
Th	Células T auxiliares, do inglês <i>T helper</i>
TLR	Receptores do tipo toll, do inglês <i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
tolDCs	Células dendríticas tolerogênicas, do inglês <i>tolerogenic dendritic cells</i>
Tregs	Células T reguladoras
TRL3	Gene de resistência a tuberculose, do inglês <i>tuberculosis resistance 3</i>
XCR1	Receptor de quimiocina 1 (motivo X-C), do inglês <i>X-C motif chemokine receptor 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. PSICONEUROIMUNOLOGIA	24
1.1.1. Histórico	24
1.1.2. Estresse e comunicação neuroimune	27
1.2. CÉLULAS MIELOIDES MONONUCLEARES	29
1.2.1. Monócitos/macrófagos	29
1.2.2. Células dendríticas	31
1.3. SINALIZAÇÃO NORAGRENÉRGICA EM CÉLULAS IMUNES	42
2. OBJETIVOS	46
2.1. OBJETIVO GERAL	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1. CASUÍSTICA	48
3.2. ISOLAMENTO DE PBMCs POR GRADIENTE DE <i>FICOLL</i>	49
3.3. CRIOPRESERVAÇÃO DE PBMCs	52
3.4. ISOLAMENTO DE CÉLULAS CD14 ⁺ POR SORTING COM <i>BEADS</i> MAGNÉTICAS	52
3.5. CULTIVO CELULAR	54
3.6. FÁRMACOS	55
3.7. ENSAIO DE CITOXICIDADE CELULAR POR MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO	55
3.8. MARCAÇÃO INTRACELULAR DE pCREB	55
3.8.1. Marcação intracelular de pCREB por citometria de fluxo	55
3.8.2. Marcação intracelular de pCREB por imunofluorescência	56

3.9.	AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE MEMBRANA DE MONÓCITOS, iDCs E mDCs POR CITOMETRIA DE FLUXO	57
3.10.	ENSAIO DE FAGOCITOSE.....	59
3.11.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE LINFOESTIMULADORA DAS mDCs ...	59
3.12.	EXTRAÇÃO DE RNA	60
3.13.	SÍNTESE DE cDNA.....	60
3.14.	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO POR qRT-PCR	61
3.15.	DOSAGEM DE CITOCINAS DO SOBRENADANTE DOS CULTIVOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	63
3.16.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
4.	RESULTADOS.....	67
4.1.	EXPRESSÃO DE ADRENOCEPTORES β EM DCs, MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS	67
4.2.	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO.....	68
4.3.	AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DOS ADRENOCEPTORES β	70
4.4.	AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	77
4.4.1.	Tratamento prévio ao estímulo de diferenciação.....	77
4.4.2.	Tratamento prévio ao estímulo de maturação.....	78
4.5.	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE DCs TRATADAS COM LIGANTES ADRENÉRGICOS.....	80
4.5.1.	Ensaio de fagocitose	80
4.5.2.	Ensaio de reação mista de linfócitos	81
4.6.	EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS	82
4.6.1.	Avaliação da diferenciação de DCs a partir de monócitos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	83

4.6.2.	Avaliação do perfil de expressão gênica em iDCs tratadas com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	84
4.6.3.	Avaliação da maturação por meio de LPS e TNF- α de iDCs tratadas com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	86
4.6.4.	Avaliação do perfil de expressão gênica em toIDCs tratadas com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	89
4.6.5.	Avaliação da diferenciação de monócitos em macrófagos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	94
4.6.6.	Avaliação do perfil de expressão gênica em macrófagos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	96
4.6.7.	Avaliação da maturação por meio de LPS de macrófagos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias	98
4.7.	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS TRATADAS COM NORADRENALINA E FENOTEROL POR 6 DIAS	
	102	
5.	DISCUSSÃO	107
6.	CONCLUSÃO	122
6.1.	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	122
6.2.	CONCLUSÃO GERAL	123
	REFERÊNCIAS	125
	APÊNDICES	161
	ANEXOS	180

introdução

“Much to learn you still have”

Yoda

1. INTRODUÇÃO

1.1. PSICONEUROIMUNOLOGIA

1.1.1. Histórico

A psiconeuroimunologia é a área de estudo multidisciplinar que agrega as interações entre as disciplinas das ciências comportamentais, neurociência, endocrinologia e imunologia. Embora estes diferentes sistemas tenham ao longo da evolução adquirido funções especializadas, ainda sim são capazes de responderem a informações transmitidas entre eles, gerando respostas fisiológicas ou patológicas decorrentes desta integração.

Os primórdios dos estudos em psiconeuroimunologia datam dos anos 1920, na Rússia. Serguei Metalnikov e Victor Chorine, utilizando modelos baseados nos experimentos de Ivan Pavlov, realizavam injeções intraperitoneais de pequenas quantidades de tapioca, filtrados de *Staphylococcus aureus* ou *Baccillus anthracis* inativas (estímulos não-condicionados) pareados com arranhões ou calor aplicados em uma pequena área da pele (estímulos condicionados) em coelhos e porquinhos-da-índia. A aplicação dos estímulos não condicionados levavam a um aumento de células polimorfonucleares (PMNs, do inglês *polymorphonucleated cells*). Após um breve período de repouso, o estímulo condicionado — e somente este — era reaplicado nos animais. O que se observou, foi que mesmo sem a presença do estímulo imunogênico, o número de PMNs aumentava substancialmente (METALNIKOV; CHORINE, 1928). A este fenômeno se deu o nome de condicionamento comportamental das respostas imunes.

Subsequentemente, outros experimentos utilizando estes mesmos conceitos foram realizados por estes mesmos cientistas e replicados — mesmo que com uma aparente controvérsia na reprodutibilidade — por outros pesquisadores russos (NICOLAU; ANTINESCU-DIMITRIU, 1929a, 1929b; OSTRAVSKAYA, 1930). A partir da década de 50, paralelamente aos experimentos soviéticos, e menos conhecidos, estão também os trabalhos de pesquisadores romenos que demonstraram aumentos significativos na capacidade fagocítica de PMNs em cães submetidos aos protocolos de condicionamento comportamental (BENETATO et al.,

1952; BENETATO, 1955; BACIU et al., 1965). Todos estes trabalhos despertaram pouco interesse, ou um certo grau de ceticismo pela comunidade científica da época.

Ainda na década de 50, foram publicados artigos indicando as influências do sistema nervoso central (SNC) sobre o sistema imunológico. Andor Szentivanyi's e colaboradores, em seus estudos sobre a asma, utilizaram modelos de choque anafilático em animais imunizados, nos quais eles demonstraram que lesões no hipotálamo eram capazes de inibir o desenvolvimento desta resposta imunológica exacerbada (FILIPP; SZENTIVANYI; MESS, 1952; FILIPP; SZENTIVANYI, 1958; SZENTIVANYI; FILIPP, 1958). O virologista Fred Rasmussen, juntamente com Norman Brill — um psiquiatra — e James Marsh — um psicólogo — realizaram trabalhos envolvendo os efeitos de diferentes estressores sobre a resposta de camundongos a diversos vírus, aumentando ou diminuindo estas respostas, de acordo com a natureza do estressor (RASMUSSEN; MARSH; BRILL, 1957; JOHNSON et al., 1963; YAMADA; JENSEN; RASMUSSEN, 1964). No entanto, estes trabalhos também não foram muito bem sucedidos em atrair a atenção da comunidade científica, embora tenham servido de inspiração para outros cientistas.

Um pesquisador que se destacou nestes estudos foi o psiquiatra George Solomon, que em 1964 cunhou o nome “psicoimunologia” e publicou um artigo referência intitulado: “Emoções, Imunidade, e Doença: Uma Integração Teórica Especulativa” (tradução livre) (SOLOMON, G F, MOOS, 1964). Suas pesquisas iniciais mostraram que o desenvolvimento de determinadas doenças autoimunes com componentes de predisposição genética, como a artrite reumatoide, estava muitas vezes relacionadas a presença de distúrbios psicológicos e ausência de bem-estar mental (MOOS; SOLOMON, 1964a, 1964b, 1965, 1965; SOLOMON; MOOS, 1964). Ainda, Solomon também realizou uma série de experimentações animais, avaliando os efeitos da manipulação de aspectos comportamentais, sociais e endócrinos nas respostas imunes. Assim como em trabalhos anteriores, os resultados foram variados de acordo com o tipo de estressor utilizado (SOLOMON; MERIGAN; LEVINE, 1966; SOLOMON, 1969; AMKRAUT; SOLOMON; KRAEMER, 1971; AMKRAUT; SOLOMON, 1972).

Durante os anos 70, o brasileiro João Garcia Leme, começou a demonstrar que fatores produzidos no microambiente inflamatório eram capazes de ativar o eixo

hipotálamo – hipófise – adrenal (HPA, do inglês *hypothalamic – pituitary – adrenal axis*), que por sua vez, teria a capacidade de controlar a inflamação por meio da liberação de glicocorticoides (LEME; SCHAPOVAL, 1975; MORAES; GARCIA LEME, 1982). Na mesma linha, Hugo Besedovsky e colaboradores começaram uma série de pesquisas demonstrando que o sistema imunológico, quando exposto a um antígeno, gerava uma resposta imune que, por sua vez, era capaz de ativar funções neuroendócrinas. Este pesquisador propôs que o SNC então, por um mecanismo de *feedback*, poderia regular a magnitude das repostas imunes. Estes estudos contribuíram para a formação dos conceitos de integração das redes de atuação dos sistemas neuroendócrinos e imunes, que teriam comunicação bidirecionais (BESEDOVSKY, 1971; BESEDOVSKY et al., 1975, 1983; BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1981; DEL REY et al., 1981, 1987).

A colaboração interdisciplinar entre o virologista Ronald Glaser com a psicologista Janice Kiecolt-Glaser desenvolveu estudos mostrando a relação entre o estresse e o sistema imune na reativação de infecções virais latentes (GLASER et al., 1985). No campo comportamental, Roger Bartrop e também uma série de outros pesquisadores, relacionaram alterações imunes com experiências de vida estressantes e estados emocionais (BARTROP et al., 1977; DORIAN et al., 1982; KIECOLT-GLASER et al., 1984; LANDMANN et al., 1984; RADOJCIC et al., 1991). Edwin Blalock e colaboradores, por sua vez, propuseram que o sistema imune e o neuroendócrino compartilhavam receptores e mediadores, ou seja, que produtos de células imunes poderiam agir como neurotransmissores e que estas células possuiriam receptores para peptídeos provenientes do SNC (BLALOCK; SMITH, 1980; BLALOCK; HARP, 1981; SMITH; BLALOCK, 1981; TADA, 1997). Outros trabalhos demonstraram a inervação direta de órgãos imunes (WILLIAMS et al., 1981; WILLIAMS; FELTEN, 1981; LIVNAT et al., 1985; FELTEN et al., 1987). Em 1975, Robert Ader e Nicholas Cohen publicaram um artigo retomando os conceitos dos trabalhos soviéticos da década de 20 sobre imunossupressão condicionada (ADER; COHEN, 1975).

A convergência destes importantes trabalhos, assim como de muitos outros, mostrando de forma contundente a interação do cérebro com as respostas imunes, na mesma época, bem como a criação oficial do campo de estudos intitulado de psiconeuroimunologia, do lançamento de um livro de mesmo nome, uma revista e

uma sociedade, marcaram formalmente o início da psiconeuroimunologia com uma interdisciplina moderna. Desde então, houve um aumento vertiginoso de publicações na área e o crescente interesse dos pesquisadores de diferentes disciplinas continuam levando a descobertas importantes em diversos campos. Desde então, houve um aumento vertiginoso de publicações na área, e o crescente interesse dos pesquisadores de diferentes disciplinas continuam levando a descobertas importantes em diversos campos.

1.1.2. Estresse e comunicação neuroimune

Todos os organismos vivos possuem a propriedade de modulação de seu ambiente interno, mantendo uma condição estável a partir de ajustes de equilíbrio dinâmico controlados por mecanismos inter-regulados. Esta propriedade é conhecida como homeostasia (CHOVATIYA; MEDZHITOV, 2014). No entanto, estímulos externos podem comprometer este equilíbrio, desencadeando respostas envolvidas na restauração do mesmo.

Em 1936, um pesquisador húngaro chamado Hans Selye, foi pioneiro em mostrar uma série de evidências empíricas de que diferentes agentes estressores (inicialmente chamados de agentes nocivos) causavam uma série de sintomas em ratos, como hipertrofia das glândulas adrenais, além de diminuição do timo, baço e linfonodos. A este conjunto de respostas ele deu o nome de síndrome da adaptação geral. Esta síndrome, segundo Selye, consiste em três fases: inicialmente, existe a “reação de alarme”, na qual o corpo se prepara para a resposta de “luta ou fuga”. No entanto, este estado de excitação não pode ser mantido por muito tempo pelo organismo, então uma segunda fase de adaptação entra em ação, chamada de resistência. Finalmente, se o for suficientemente longo, a adaptação não consegue ser mantida indefinidamente, chegando a última fase, chamada de exaustão (apud SELYE, 1998).

Desde então, várias definições foram propostas para o conceito de estresse, focando em diversos aspectos de desafios internos ou externos, tipos de perturbação ou estímulo; percepção dos estímulos pelos organismos; ou uma resposta fisiológica ao estímulo (GOLDSTEIN; MCEWEN, 2002; SAPOLSKY, 2005). Uma definição mais integrada é que o estresse é um conjunto de eventos, consistindo

de um estímulo (estressor) que leva a uma reação do cérebro (percepção) e que por fim a ativação dos sistemas fisiológicos de luta ou fuga no organismo (resposta ao estresse) (DHABHAR; MCEWEN, 1997).

Embora a palavra estresse tenha sido contemporaneamente associada somente a conotações negativas, o estresse é um processo natural e presente no cotidiano de todos os seres vivos. De fato, o estresse, quando crônico ou duradouro pode causar danos aos organismos, contribuindo para o desenvolvimento de uma série de doenças, (IRWIN et al., 1990; GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005; CHROUSOS; KINO, 2007; MCEWEN, 2008). No entanto, deve-se considerar que a resposta estresse pode possuir efeitos adaptativos iniciais benéficos, como aumento da função imune e ganhos na performance física e cognitiva (DHABHAR; VISWANATHAN, 2005). Portanto, um aspecto importante do estresse a ser considerado é a duração dos efeitos biológicos do mesmo. O estresse agudo é definido como aquele que ocorre por minutos ou horas. Já o estresse crônico como aquele que persiste por várias horas durante o dia ou ainda por semanas e meses (DHABHAR; MCEWEN, 1997). A intensidade do estresse pode ser avaliada por picos de produção de hormônios e neurotransmissores, além de outras mudanças fisiológicas — como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial — e podem afetar o tempo pelo qual estas mudanças persistem durante o estresse e após o término deste. A magnitude e duração do aumento induzido pelo estresse de catecolaminas e glicocorticoides podem ter efeitos significantes na distribuição celular e função de células imunes (BENSCHOP; RODRIGUEZ-FEUERHAHN; SCHEDLOWSKI, 1996). Além disso, os efeitos do estresse nas respostas imunes e comportamento podem ser moldados por uma série de fatores, tais como a frequência, duração, intensidade, percepção e enfrentamento das situações estressoras (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

O conhecimento dos efeitos dos glicocorticoides sobre o sistema imunológico, fizeram com que este hormônio e seus análogos fossem utilizados em terapias de doenças inflamatórias desde meados da década de 1940. Neste âmbito, por seus estudos envolvendo o cortisol e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *adrenocorticotropic hormone*), que resultaram no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide, os pesquisadores Kendall,

Reichstein e Hench foram laureados com o prêmio Nobel de Medicina em 1950 (HENCH et al., 1950).

A regulação da liberação de glicocorticoides é feita pela interação entre regiões cerebrais (hipotálamo) e órgãos endócrinos (hipófise e córtex das glândulas adrenais), mais conhecido como eixo HPA. Diversos estímulos inflamatórios, tais como produtos bacterianos ou virais, assim como estressores físicos e psicológicos, são percebidos pelo SNC e resultam na secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês *corticotropin release hormone*) pelas células do núcleo paraventricular do hipotálamo, que atingem a adeno-hipófise. Esta então é estimulada a liberar o ACTH na corrente sanguínea que, por sua vez, estimula o córtex da adrenal a produzir e liberar glicocorticoides endógenos na circulação. Os próprios glicocorticoides inibem então a ativação do eixo HPA, mantendo a homeostase (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002).

Além dos efeitos imunossupressores sistêmicos decorrentes da ativação do eixo HPA que culmina na liberação de glicocorticoides, o estresse também pode ativar o sistema nervoso simpático (SNS). O SNS consiste de regiões cerebrais e fibras nervosas noradrenérgicas que liberam noradrenalina e conectam regiões do tronco encefálico cerebrais aos órgãos linfoides (STERNBERG, 2006). Estudos neuroanatômicos utilizando marcadores retrógrados e imunohistoquímica demonstraram uma forte inervação simpática no timo, baço, medula óssea, e linfonodos em contato íntimo com células imunes, sugerindo a comunicação entre os dois sistemas. (NANCE; SANDERS, 2007).

1.2. CÉLULAS MIELOIDES MONONUCLEARES

1.2.1. Monócitos/macrófagos

Os monócitos e os macrófagos, juntamente com as células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*), são células da imunidade inata que constituem o sistema fagocítico mononuclear (HANIFFA; BIGLEY; COLLIN, 2015). Os monócitos são células mieloides diferenciadas na medula óssea a partir das células tronco hematopoiéticas (HSCs, do inglês *hematopoietic stem cells*), de onde elas migram para popular o baço e circular na corrente sanguínea. Estas células

apresentam um transcriptoma bem diverso (WELLS et al., 2006), e desempenham múltiplas funções, atuando na manutenção da homeostase, respostas imunes e também na reparação tecidual.

Em humanos, os monócitos foram definidos inicialmente com base em estudos morfológicos e citoquímicos. Estes estudos posteriormente foram complementados pela citometria de fluxo, baseando-se nas propriedades de dispersão de luz, bem como de marcadores de membrana celular, sendo o mais clássico deles o CD (do inglês *cluster of differentiation*) 14. Esta tecnologia ainda permitiu a descoberta de uma subpopulação caracterizada pela presença de CD16 na membrana celular plasmática (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1989) que apresenta maior expressão de complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC-II, do inglês *major histocompatibility complex class II*), e por alta produção de fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) quando estimulada por ligantes de receptores do tipo toll (TLR, do inglês *toll-like receptor*) (BELGE et al., 2002; SZAFLARSKA et al., 2004; SERBINA et al., 2009). Os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ foram então denominados de monócitos “clássicos”, enquanto os CD14⁺CD16⁺⁺ de “não-clássicos”. Ainda, foram descritos monócitos com o fenótipo intermediário CD14⁺⁺CD16⁺. Estas células constituem uma pequena população entre todos os monócitos, no entanto, apresentam alguns atributos diferenciados e expandem rapidamente na presença de citocinas ou processo inflamatório (FINGERLE et al., 1993).

Os macrófagos foram primeiramente descritos pelo laureado com o prêmio Nobel de Medicina Élie Metchnikoff no final do século XIX. Metchnikoff descreveu “micrófagos” (que foram subsequentemente renomeados em neutrófilos) e células maiores, denominadas macrófagos, internalizando patógenos durante reações de inflamação, observações estas que o levaram a formular a teoria da imunidade pela fagocitose (METCHNIKOFF, 1892). Os macrófagos foram eventualmente incorporados no sistema retículo-endotelial de 1924, implicando que eles se originavam, residiam e se renovavam no tecido conectivo reticular. Mais adiante, em 1968, Ralf van Furth, Zanvil Cohn e colaboradores deram um novo nome a este sistema: fagocítico mononuclear. Em um trabalho que foi um marco no estudo destas células, eles demonstraram que as células fagocíticas presentes nos tecidos eram monócitos diferenciados recrutados da corrente sanguínea (VAN FURTH, 1976). No

entanto, a noção rígida existente de que os macrófagos teciduais são obrigatoriamente células derivadas de monócitos foi alvo de controvérsia por anos (GINHOUX; JUNG, 2014). Atualmente sabe-se que a persistência de uma população adulta de macrófagos teciduais não derivadas de monócitos se forma antes do nascimento e se mantém por auto renovação (GINHOUX; JUNG, 2014). Como as duas populações diferem em relação a contribuições funcionais na homeostase ou frente aos desafios ainda são objeto de estudo de grande importância.

Os macrófagos possuem papéis relacionados a quase todos os aspectos biológicos de um organismo, como desenvolvimento (NIIDA et al., 1999; GYORKI et al., 2009; POLLARD, 2009; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015) , manutenção da homeostase (SAVILL et al., 2002; GORDY et al., 2011), reparação tecidual (STEFATER et al., 2011) e respostas imunes direcionadas a eliminação de patógenos (GORDON, 2003; WYNN; BARRON, 2010; MURRAY; WYNN, 2011; MURRAY et al., 2014). Os macrófagos residentes agem regulando a homeostase tecidual agindo como sentinelas e respondendo a mudanças internas e externas.

O processo de diferenciação de monócitos em macrófagos é regulado por múltiplos fatores teciduais específicos, que inclui importantes alterações fenotípicas, funcionais e morfológicas guiadas pelo microambiente tecidual, gerando a grande gama de populações distintas de macrófagos que existem no organismo. Os macrófagos podem ainda serem caracterizados pelo seu estado de ativação: M1 - pró-inflamatórios (ativação clássica) e M2 - anti-inflamatórios (ativação alternativa). Embora estas denominações sejam usualmente utilizadas para definir o estado de ativação destas células, atualmente sabe-se que um grande espectro de diversidade funcional existe entre estes dois extremos, que podem representar uma célula em estados funcionais distintos, ou então dois tipos celulares diferentes. Novas abordagens de classificação que caracterize mais precisamente a função e plasticidade dos macrófagos sobre diferentes estímulos vêm sendo propostas (MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014).

1.2.2. Células dendríticas

Nos dias atuais, o papel central das DCs em reconhecer patógenos, ativar respostas de células T, iniciar e coordenar respostas imunes adaptativas é

inquestionável. No entanto, nos anos 1970, Ralph Steinman no laboratório de Zanvil Cohn, descobriu um “novo tipo celular” presente em órgãos linfoides secundários de camundongos que diferiam dos outros leucócitos até então conhecidos (STEINMAN; COHN, 1973, 1974; STEINMAN; LUSTIG; COHN, 1974; STEINMAN; ADAMS; COHN, 1975). Estas células foram nomeadas células dendríticas devido a observação em microscopia de contraste de fase que possuíam uma série de prolongamentos e ramificações. A carreira de Steinman foi, desde então, toda direcionada ao estudo do papel destas células nas respostas imunes. Em 2011, pelo conjunto de seus trabalhos envolvendo a descoberta das DCs e seu papel na imunidade inata, foi laureado com o prêmio Nobel de Medicina. Infelizmente, ele faleceu três dias antes do anúncio realizado pelo comitê da premiação. No entanto, seu legado científico forneceu uma descoberta que revolucionou os estudos em imunologia.

As células de Langerhans (LCs, do inglês *Langerhans cells*), presentes na epiderme, foram inicialmente identificadas em 1868 por Paul Langerhans o qual, na época, as descreveu equivocadamente como células pertencentes ao sistema nervoso (LANGERHANS, 1868). A descoberta de que as LCs compartilhavam muitas das características descritas das DCs aconteceu mais de 100 anos depois quando Schuler e Steinman demonstraram que as LCs apresentavam MHC-II e podiam induzir uma reação mista de linfócitos (MLR, do inglês *mixed lymphocyte reaction*) (SCHULER; STEINMAN, 1985). A importância deste achado em particular — além dos estudos decorrentes e subsequentes envolvendo as respostas imunológicas na pele — foi o estabelecimento do conceito da existência de subtipos de DCs, que embora compartilhassem características e funções semelhantes, existiam em tecidos distintos e apareciam em diferentes formas.

A partir de meados da década de 1990, o número de publicações envolvendo as DCs começaram a crescer vertiginosamente. Esse aumento veio então acompanhado de novos conhecimentos acerca da grande diversidade de DCs existentes, bem como de seus mecanismos de ação. Estas novas descobertas não deixaram de ser acompanhadas por parte da comunidade científica com certo ceticismo, pois embora as DCs apresentassem características fenotípicas e funcionais únicas dentre os leucócitos, a falta de marcadores específicos e de uma célula precursora na medula óssea geravam dúvidas quanto à existência de uma linhagem unificada de DCs. No entanto, foi demonstrado em camundongos que as linhagens de

monócitos e DCs são originadas de uma célula progenitora em comum, a célula progenitora de macrófago e célula dendrítica (MDP, do inglês *macrophage and dendritic cell progenitor*) (LIU; NUSSENZWEIG, 2010). As duas células, entretanto, divergem quando as MDPs dão origem aos monócitos e às progenitoras comprometidas de células dendríticas (CDPs, do inglês *committed dendritic cell progenitors*) na medula óssea. Por fim, as CDPs dão origem às pré-DCs, que deixam a medula óssea para popular os tecidos linfoides e não linfoides. Nos tecidos e durante o desenvolvimento, a divisão celular das DCs e a homeostase são reguladas pelo hormônio ligante de tirosino-quinase 3 FMS-relacionado (Flt3L, do inglês *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*) (LIU; NUSSENZWEIG, 2010). As células humanas equivalentes às MDPs, CDPs e as células precursoras imediatas das DCs — se de fato existirem — ainda estão sobre investigação. A expressão de MHC-II em HSCs CD34⁺ é um fator complicador na observação das células precursoras das DCs em humanos pois, em camundongos, a identificação das precursoras é realizada pela ausência deste marcador (HANIFFA; COLLIN; GINHOUX, 2013).

Estudos comparativos de fenótipos e funções delinearam subtipos distintos de DCs que estão amplamente distribuídos em todos os mamíferos. Em humanos, todas as DCs apresentam altos níveis de MHC-II (em humanos, HLA-DR, do inglês *human leukocyte antigen – D related*) e são totalmente, ou parcialmente negativas para os marcadores linhagem específicos CD3 (células T) CD19/20 (células B), CD16 e CD56 [células matadoras naturais (NKs, do inglês *natural killer*)]. Além de apresentarem estes marcadores gerais, as DCs humanas ainda podem ser divididas em mieloides, plasmocitoides (pDCs, do inglês *plasmacytoid dendritic cells*), CD14⁺ e LCs (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

As DCs mieloides expressam CD11c, CD13, CD33 e CD11b e correspondem às DCs ‘clássicas’ ou ‘convencionais’ de camundongos, que expressam CD11c. Tanto os monócitos, quanto as DCs mieloides expressam CD11c, no entanto, ao contrário daquelas, estas não expressam CD14 ou CD16. As DCs mieloides podem ainda ser divididas nas frações CD1c⁺ (correspondente às DCs CD11b⁺ de camundongos) e CD141⁺ (correspondentes às DCs CD8⁺/CD103⁺ de camundongos) (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013).

As células CD1c (reconhecidas pelo anticorpo BDCA-1) correspondem a aproximadamente 1% das células mononucleares e consistem na maior população de DCs mieloides humanas presentes no sangue, tecidos e órgãos linfoides. Estas células expressam uma série de lectinas, TLRs e outros receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) que reconhecem diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), tais como lipopolissacarídeos (LPS, do inglês *lipopolysaccharides*), flagelina, ácido polinosínico-policitidílico [poli(I:C), do inglês *polyinosinic-polycytidylic acid*] e R848 (VAN DER AAR et al., 2007). As células CD1c⁺ são potentes estimuladoras de células T CD4⁺ *naïve*, mas possuem uma capacidade de apresentação cruzada de antígenos às células CD8⁺ inferiores a das células CD141⁺ (BACHEM et al., 2010; JONGBLOED et al., 2010; HANIFFA et al., 2012). O repertório de citocinas produzidas por estas células inclui: TNF- α , interleucina (IL) - 8, IL-10 e IL-12 que são secretadas frente a diversos estímulos. Ademais, as DCs mieloides possuem a capacidade de induzir a polarização de células T auxiliares (Th, do inglês *T helper*) 1, Th17 e Th2 (MORET et al., 2013)

Por sua vez, o marcador trombomodulina, ou CD141 (identificado pelo anticorpo BDCA-3), é expresso em cerca de 10% das DCs mieloides presentes no sangue (0,1% das células mononucleares), caracterizando a menor população de DCs mieloides em humanos (MACDONALD et al., 2002). As células CD141⁺ são de difícil localização *in situ* devido ao seu baixo número e ao fato de outras células, como as presentes na pele e as endoteliais também expressarem este marcador (JONGBLOED et al., 2010). A diferenciação em relação as CD1c⁺ é auxiliada pelo fato de que as células CD141⁺ apresentam baixa expressão de CD11c e CD11b (HANIFFA et al., 2012). As DCs mieloides CD141⁺ são as equivalentes homólogas às DCs CD8⁺ presentes em linfonodos (BACHEM et al., 2010; JONGBLOED et al., 2010; POULIN et al., 2010) e às DCs teciduais CD103⁺ murinas. Assim como suas contrapartes em camundongos, as DCs CD141⁺ são consideradas as principais células responsáveis pela apresentação cruzada de antígenos (JOFFRE et al., 2012). Análises comparativas de expressão entre as duas espécies mostrou que as DCs 141⁺ expressam, assim como as murinas, lectina tipo C domínio família 9, membro A (CLEC9A, do inglês *C-type lectin domain family 9 member A*) (CAMINSCHI et al., 2008; HUYSAMEN et al., 2008; SANCHO et al., 2009), receptor de quimiocina 1

(motivo X-C) (XCR1, do inglês *X-C motif chemokine receptor 1*) (DORNER et al., 2009), molécula de adesão celular 1 (CADM1, do inglês *cell adhesion molecule 1*) (GALIBERT et al., 2005) e gene de resistência a tuberculose (TRL3, do inglês *tuberculosis resistance 3*) (SCHULZ et al., 2005). Já o DEC205, que é um marcador de DCs CD8⁺ é encontrado tanto nas DCs 141⁺, como também nas CD1c⁺ (DORNER et al., 2009; POULIN et al., 2010).

As DCs CD141⁺, por meio de CLEC9A, endocitam de maneira eficiente células necróticas (SANCHO et al., 2009; BACHEM et al., 2010), e reconhecem ácidos nucleicos virais por meio de TLR3 e TLR8, realizando apresentação cruzada dos antígenos virais para clones de células T CD8⁺ *in vitro* (BACHEM et al., 2010; JONGBLOED et al., 2010; POULIN et al., 2010; HANIFFA et al., 2012). Estas células secretam TNF- α , ligante de quimiocina (motivo C-X-C) [(CXCL1, do inglês (*C-X-C motif chemokine ligand 1*))] (JONGBLOED et al., 2010; HANIFFA et al., 2012), além de interferon (IFN) - γ quando estimuladas com poli(I:C) (LAUTERBACH et al., 2010). A citocina IL-12p70 pode ser produzida pelas células CD141⁺ sanguíneas (JONGBLOED et al., 2010; POULIN et al., 2010), embora não tenham sido detectadas em DCs da pele. No entanto, tanto as células sanguíneas quanto as presentes na pele são tão eficientes quanto as células CD1c⁺ em ativar respostas de células T CD4⁺ alogênicas (JONGBLOED et al., 2010).

Os tecidos linfoides e não linfoides ainda possuem uma terceira e pequena população de DCs linfoides que apresentam um fenótipo intermediário entre DCs e monócitos/macrófagos. Estas células são CD14⁺ HLA-DR⁺ CD11c mas não possuem os marcadores clássicos das outras DCs mieloides como o CD1c, CD141 e receptor de quimiocina 7 (motivo C-C) [(CCR7, do inglês *chemokine (C-C motif) receptor 7*)] (ANGEL et al., 2006; KLECHEVSKY et al., 2008; HANIFFA et al., 2009), mas possuem os marcadores de monócitos/macrófagos CD163, CD11b, receptor de quimiocina 1 (motivo C-X3-C) [(CX3CR1, do inglês *chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*)], fator XIIIa (FXIIIa) e CD209 (DC-SIGN) (DE GRUIJL et al., 2006; ANGEL et al., 2007; OCHOA et al., 2008; HANIFFA et al., 2009). As DCs CD14⁺ expressam TLR 1-9 (MATTHEWS et al., 2012), apresentam menor expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 quando comparadas às DCs CD1c⁺ e não expressam CD83 (DE GRUIJL et al., 2006; ANGEL et al., 2007). Foi demonstrado a capacidade destas células secretarem IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 (KLECHEVSKY et al., 2008), no

entanto, sua capacidade de estimulação de células T parece ser limitada em relação as células CD1c⁺ (ANGEL et al., 2006; DE GRUIJL et al., 2006; PENEL-SOTIRAKIS et al., 2012). Quando não estimuladas, estas células apresentam funções tolerogênicas similares a de DCs derivadas de monócitos tratadas com vitamina D (CHU et al., 2012). Como estas células não expressam CCR7, a sua capacidade de migrar aos linfonodos ainda é um mistério (ANGEL et al., 2007; HANIFFA et al., 2009). Em contrapartida, estas células parecem ser importantes na formação de células T foliculares (KLECHEVSKY et al., 2008), bem como na estimulação de células B (MATTHEWS et al., 2012). O equivalente destas células em camundongos ainda é objeto de estudo e aguarda confirmação, no entanto, as DCs CD14⁺ apresentam características em comum com as células CD11b⁺CD64⁺ murinas (LANGLET et al., 2012; PLANTINGA et al., 2013).

As pDCs são diferenciadas das células mieloides e outras células pela expressão de CD123 (IL-3R), CD303 (determinado pelo anticorpo CLEC4C/BDCA-2) e CD304 (neuropilina/BDC-4) (DZIOONEK et al., 2000) bem como pela ausência dos antígenos presentes nas DCs mieloides CD11b, CD11c, CD13, CD33. Os principais marcadores murinos das pDCs são o B220 e a Lectina H semelhante à imunoglobulina ligadora de ácido siálico (Siglec H, do inglês *sialic acid binding Ig-like lectin H*) (ROBBINS et al., 2008). As pDCs são as DCs mais abundantes e constituem aproximadamente 1% das células mononucleares sanguíneas (cerca de 50% das DCs sanguíneas) (MACDONALD et al., 2002). As pDCs são encontradas em linfonodos, constituindo cerca de 20% da população positiva para MHC-II encontrada nestes tecidos (COX et al., 2005). Embora não sejam encontradas normalmente em tecidos periféricos, são rapidamente recrutadas frente a desafios inflamatórios (ZABA et al., 2007; HANIFFA et al., 2012). As pDCs foram descritas como células envolvidas tanto em respostas inflamatórias, bem como tolerogênicas. A primeira função especializada descrita destas células foi a ação destas células contra infecções virais, uma vez que elas possuem capacidade de secretar grandes quantidades de IFN-1 frente a contato com vírus (PERUSSIA; FANNING; TRINCHIERI, 1985; SIEGAL et al., 1999). Além disso, elas expressam altos níveis de TLR7 e TLR9 que transduzem sinais após reconhecerem ácidos nucleicos virais. Dependendo do contexto, estas células podem polarizar respostas Th1 ou Th2 em células T CD4⁺ (RISSOAN et al., 1999), além de participar de respostas anti-inflamatórias induzindo células T reguladoras (Tregs)

Foxp3⁺ e células T produtoras de IL-10 (MOSEMAN et al., 2004; ITO et al., 2007). Por fim, a apresentação cruzada por estas células já foi demonstrada *in vitro*, e pelo fato de possuírem mecanismos eficientes para reconhecimento de ácidos nucleicos, quando ocorre a quebra da tolerância aos ácidos nucleicos próprios, estas células participam no desenvolvimento de doenças autoimunes como a psoríase e o lúpus eritematoso sistêmico (GILLIET; CAO; LIU, 2008).

As LCs são células encontradas na camada suprabasal da epiderme onde elas formam redes no interstício dos queratinócitos e em outros epitélios escamosos estratificados. Existem fortes evidências da persistência e capacidade de auto renovação destas células (CZERNIELEWSKI; DEMARCHEZ, 1987; KANITAKIS; PETRUZZO; DUBERNARD, 2004; KANITAKIS et al., 2011). As LCs apresentam grande capacidade de migração e são facilmente encontradas nos linfonodos drenantes da pele, especialmente em casos de doenças inflamatórias na pele (RAUSCH; KAISERLING; GOOS, 1977). As LCs humanas expressam altos níveis de Langerina e CD1a, além de outros marcadores que incluem o CD36, ATPase e FcεR1 (ROMANI et al., 1989). A função das LCs na imunidade aparenta ser um pouco difusa. Elas não expressam os TLRs 2, 4 e 5 (VAN DER AAR et al., 2007) e, conseqüentemente, são pouco responsivas a bactérias Gram-negativas. Além disso, sua capacidade de apresentação cruzada ainda é controversa na literatura, uma vez que LCs primárias aparentam ser muito menos efetivas na execução desta função em relação às geradas *in vitro* (KLECHEVSKY et al., 2008; VAN DER VLIST et al., 2011). Aparentemente, as funções das LCs estão relacionadas a manutenção da homeostase na epiderme, enquanto possuem a habilidade de responder a estímulos ambientais, como certos tipos de patógenos durante condições inflamatórias (ROMANI; BRUNNER; STINGL, 2012).

As células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs, do inglês *monocyte-derived dendritic cells*) são células geradas *in vitro* a partir monócitos CD14⁺ na presença do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e IL-4 (ROMANI et al., 1994; SALLUSTO, 1994). Estas células possuem um repertório funcional amplo: são capazes de induzir respostas de células T CD4⁺, de realizar apresentação cruzada de antígenos às células T CD8⁺ e secretar as citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-23 (EBNER et al., 2001). As Mo-DCs se tornaram o modelo de escolha da grande maioria

dos pesquisadores que trabalham com DCs, pois são facilmente obtidas em grandes quantidades, ao contrário das células primárias, que constituem uma população muito pequena das células sanguíneas totais. O fato de estas células apresentarem uma grande plasticidade, podendo se tornar imunogênicas quando ativadas/maduras ou ainda imunossupressoras quando induzidas com fatores tolerogênicos as tornaram uma ferramenta importante tanto no estudo da imunobiologia das DCs, bem como o seu uso em terapias buscando a indução de respostas imunes específicas para o desejado (BANCHEREAU; PALUCKA, 2005; KALINSKI et al., 2010; HILKENS; ISAACS, 2013; THOMAS, 2014; PINHO et al., 2016).

A observação de que a grande maioria das DCs primárias não são derivadas de monócitos e sim de outras células precursoras da medula óssea, levou os pesquisadores a questionar o papel e a existência do recrutamento dos monócitos em locais de inflamação dando origem às DCs *in vivo*. De fato, alguns autores ao testar a hipótese não obtiveram sucesso (FOGG et al., 2006; NAIK et al., 2006; VAROL et al., 2007; BOGUNOVIC et al., 2009). Por exemplo, Jakubzick et al. (2008) utilizaram camundongos geneticamente modificados a partir do cruzamento entre animais *Rosa26-Stop^{flox}EGFP* com animais *LysM-Cre* de forma que a expressão da *Cre* dependia da expressão concomitante de lisina e, assim, clivasse a porção '*Stop*' do EGFP. Tal abordagem metodológica seria capaz de identificar por meio da detecção de fluorescência verde, as células que foram derivadas de monócitos (*LysM⁺EGFP⁺*). O que se observou foi que todas as DCs teciduais não apresentavam fluorescência positiva, indicando que estas células possuíam progenitores que não eram monócitos. Por outro lado, outros trabalhos apontaram a ocorrência desta diferenciação *in vivo* (PETERS et al., 1991; ROMANI et al., 1994). Randolph et al. (1999) demonstraram a diferenciação e migração de monócitos que fagocitaram microsféricas injetadas subcutaneamente em camundongos. Parte destas células migrou para linfonodos, onde apresentaram fenótipo semelhantes às de DCs e aumento de moléculas co-estimuladoras.

Embora a comprovação de que as DCs teciduais possam derivar diretamente de monócitos *in vivo* ainda não tenha sido aceita por toda a comunidade científica, é fato que estas células podem adquirir propriedades e executar propriedades muito similares às células primárias. Outros questionamentos relacionados perduram, tais como se as DCs sanguíneas também se tornam células

inflamatórias diretamente e se estas células migram aos linfonodos, ou se diferenciam em células residentes não ativadas após o término dos estímulos inflamatórios (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013).

De modo a executar suas funções de maneira eficiente, as DCs respondem ao microambiente alterando as suas propriedades morfológicas e funcionais. Classicamente, quanto a seus atributos imunes, as DCs podem ser divididas em células dendríticas imaturas (iDCs, do inglês *imature dendritic cells*) e maduras (mDCs, do inglês *mature dendritic cells*). As iDCs populam diversos tecidos monitorando, capturando e reconhecendo antígenos. Entretanto, estas células possuem uma capacidade de apresentar estes antígenos capturados e iniciar respostas imunes muito limitada (PULENDRAN; TANG; MANICASSAMY, 2010). Após realizado o reconhecimento dos patógenos, ou padrões associados a perigo (DAMPs, do inglês *danger associated molecular patterns*), associado a integração dos fatores presentes no microambiente, as iDCs passam por uma série de alterações fenotípicas e funcionais que as possibilitam migrar para órgãos linfoides secundários, onde elas se encontram e ativam células T antígeno-específicas (KAPSENBERG, 2003; HAAKE; ZUCKERT, 2014). Esta ativação é mediada pela apresentação dos antígenos capturados e processados por meio da molécula de MHC-II, moléculas co-estimuladoras e secreção de quimiocinas e citocinas que promovem a atração, expansão e diferenciação de células T, que se polarizam em células efetoras de acordo com a natureza da ativação promovida pelas DCs (KALIŃSKI et al., 1999).

Como descrito, as DCs possuem uma maquinaria voltada para a captura e reconhecimento antigênico, responsável pela característica primordial e única destas células que é de iniciar respostas imunes direcionadas a agentes nocivos. No entanto, estas características apresentadas pelas DCs fazem com que elas também sejam ótimas indutoras de tolerância aos antígenos inofensivos e aos antígenos próprios (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003). Alguns dos mecanismos propostos para esta indução de tolerância incluem a deleção de células T auto-reativas, indução de anergia (ausência de resposta imunes contra antígenos estranhos), expressão de moléculas moduladoras de respostas, produção e secreção de citocinas anti-inflamatórias e indução de células Tregs (STEINBRINK et al., 2002; ANDERSON et al., 2008; BRENK et al., 2009; BAKDASH et al., 2014).

A descoberta das células dendríticas tolerogênicas (tolDCs, do inglês *tolerogenic dendritic cells*) consequentemente levou a extensivas buscas acerca do uso de suas propriedades tolerogênicas como terapia para diversas desordens. Neste âmbito, vários protocolos foram desenvolvidos com o intuito de gerar Mo-DCs com propriedades indutoras de tolerância imune, capazes de reprogramar ou silenciar células T auto reativas, ou ainda de induzir a diferenciação de células Tregs (BOSMA et al., 2008; TORRES-AGUILAR et al., 2010; BOKS et al., 2012). Estas células parecem modular as respostas de células T por meio do contato das moléculas co-estimuladoras (ou ausência delas) ou co-inibidoras, além da liberação de IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*) (GÁRATE et al., 2013). Abordagens utilizando estas células já foram realizadas com o intuito de diminuir as respostas imunes desfavoráveis em transplantes, reduzindo o uso de imunossupressores (EZZELARAB; THOMSON, 2011). Ainda, estas células têm sido utilizadas como terapia em doenças autoimunes, na qual as células precursoras de DCs são coletadas dos pacientes, diferenciadas *ex vivo* em células tolerogênicas, pulsadas com auto-antígenos e re-inoculadas, contribuindo para a redução das respostas inflamatórias (HILKENS; ISAACS, 2013).

Por outro lado, uma outra vertente tem buscado o oposto, ou seja eliminar as tolDCs em situações nas quais elas são indesejáveis, como o câncer. A deficiência funcional de DCs induzida por tumores foi primeiramente descrita a mais de duas décadas e desde então, outros estudos vêm buscando compreender as razões que levam a uma resposta imune anti tumoral deficiente em pacientes com câncer. Uma apresentação antigênica anormal em linfonodos durante a tumorigênese e a inibição da função de DCs isoladas de animais portadores de tumores e pacientes com câncer já foi observada e descrita por diversos grupos (ALCALAY; KRIPKE, 1991; HALLIDAY; REEVE; BARNETSON, 1991; HALLIDAY; LUCAS; BARNETSON, 1992; GABRILOVICH et al., 1996). Foi demonstrado que DCs associadas a tumores expressam menos moléculas co-estimulatórias (CHAUX et al., 1996). Estudos adicionais revelaram que estas células apresentavam outros tipos de anormalidades, tais como baixa produção de IL-12, redução da capacidade endocítica, inibição da maquinaria de processamento antigênico, motilidade anormal, dentre outros (SHURIN et al., 2002, 2006; MAKARENKOVA et al., 2003; TOURKOVA et al., 2005, 2007; BENNACEUR et al., 2009). Estes e outros resultados sugerem que os efeitos de

bloqueio das funcionalidades das DCs mediados pelos tumores representam um mecanismo único de escape tumoral, em adição a supressão da geração de DCs (dendropoiesis) e diminuição da sobrevivência destas células. Estas características anormais das DCs provocadas pelos tumores levam a um bloqueio ativo da imunidade anti-tumoral, com aumento de Tregs e células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*), dando suporte a progressão tumoral, contribuindo para a neoangiogênese e surgimento de metástases.

Nesta mesma linha, a exploração das características das células imunes que permitem reconhecer e destruir as células tumorais tem levado ao desenvolvimento de novas terapias (imunoterapias) contra o câncer. Nos últimos anos, uma grande quantidade de trabalhos vem sendo desenvolvidos com o intuito de encontrar maneiras de diminuir/eliminar as células imunes reguladoras, uma vez que elas dificultam e impossibilitam diversas imunoterapias voltadas contra os tumores. Uma destas imunoterapias, são as vacinas de DCs antitumorais (BARBUTO et al., 2004). O princípio envolve fornecer peptídeos antigênicos tumorais às DCs, que por sua vez ativariam linfócitos T citotóxicos (CTLs, do inglês *cytotoxic T lymphocytes*) direcionados às células tumorais. Nos últimos anos várias estratégias têm sido empregadas para gerar vacinas antitumorais envolvendo as DCs, como pulsar estas células com peptídeos ou proteínas; transfectar as DCs com ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) e ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*); carregar as DCs com as células tumorais e com lisados destas; infectar as DCs com vetores bacterianos, fúngicos ou virais. Somadas as técnicas de carregamento de antígeno pelas DCs, drogas específicas têm sido utilizadas para facilitar a captura dos antígenos tumorais pelas DCs e para aumentar a expressão das moléculas co-estimuladoras destas *in vivo*. Ainda, o uso de adjuvantes induz a maturação das DCs, consequentemente levando a um aumento da ativação de CTLs direcionadas ao tumor (YONG et al., 2012).

Embora a imunoterapia, através de técnicas como o uso de anticorpos monoclonais, citocinas recombinantes e vacinas de DCs tenham ao longo dos anos obtido resultados positivos e promissores, algumas propriedades reguladoras desenvolvidas pelas células tumorais causam disfunções nas repostas imunes, inibindo a geração de respostas duradouras e efetivas para erradicação completa dos

tumores, limitando a eficácia destas terapias (BARBUTO, 2013; ESCORS, 2014; ROLINSKI; HUS, 2014). Portanto, novos estudos envolvendo receptores e moléculas reguladoras de DCs podem levar a uma maior compreensão da atividade das DCs no microambiente tumoral, bem como contribuir para a geração de imunoterapias mais eficientes.

1.3. SINALIZAÇÃO NORAGRENÉRGICA EM CÉLULAS IMUNES

As catecolaminas noradrenalina e adrenalina exercem seus efeitos em células alvo via estimulação de dois subtipos principais de receptores alfa (α) e beta (β) adrenérgicos acoplados à proteína G expressos na superfície de diversas células, incluindo células imunes (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995; SANDERS, 1995). Após a interação ligante-receptor, os adrenoceptores β ativam a adenilato ciclase, gerando o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*). O cAMP é um segundo mensageiro que após ativado e em alta concentração intracelular leva à ativação de outras proteínas efetoras, como a proteína quinase dependente de cAMP (PKA, do inglês *protein kinase A*). Esta por sua vez ativa vias de transdução de sinais, mediando a resposta celular aos neurotransmissores do estresse (TOMOZAWA et al., 1995).

A grande maioria dos estudos presentes na literatura que investigaram os efeitos diretos de catecolaminas, — tais como a noradrenalina — e do SNS de uma maneira geral no sistema imune, foram realizados sobre respostas imunes adaptativas e produção de anticorpos (SANDERS, 2006), enquanto menos informação existe sobre os efeitos em células da imunidade inata, como monócitos, macrófagos e células dendríticas.

A expressão de adrenoceptores em monócitos foi descrita em ensaios de ligantes-receptores e citometria de fluxo. A densidade dos receptores $\beta 2$ nos ensaios de ligação foi de 2400 sítios de ligação/célula, sendo demonstrada uma modulação no número destes receptores após a realização de atividades físicas (RATGE et al., 1988; MAISEL et al., 1990; FRAGALA et al., 2011). Ainda, os estágios de diferenciação e maturação dos monócitos/macrófagos influem na expressão destes receptores, sendo geralmente a expressão maior em monócitos do que macrófagos (RADOJCIC et al., 1991; EZEAMUZIE; SHIHAB; AL-RADWAN, 2011). A ativação

destes receptores no estresse já foi demonstrada em alguns experimentos *in vivo* e *ex vivo*. Por exemplo, em camundongos, protocolos de estresse maternal foram capazes de provocar alterações importantes nas funções dos macrófagos das proles (PALERMO NETO; MASSOCO; FÁVARE, 2001; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003). Em macrófagos derivados de monócitos de doadores saudáveis, a aplicação de um estressor agudo aos participantes reduziu o potencial microbicida relacionado a reparo tecidual destes quando comparados ao grupo controle, e este efeito foi provavelmente mediado pela noradrenalina (KUEBLER et al., 2013).

Ademais, foi demonstrado que DCs de camundongos expressam mRNA para os receptores adrenérgicos do tipo $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 2A$, $\alpha 2C$, $\beta 2$ e $\beta 1$, (SEIFFERT et al., 2002; MAESTRONI; MAZZOLA, 2003; BOTTA; MAESTRONI, 2008; HERVÉ et al., 2013; NIJHUIS et al., 2014; TAKENAKA et al., 2016) e que, de maneira geral, o papel destes receptores seria o de limitar as respostas inflamatórias a um determinado patógeno, bem como modular o tipo e a intensidade da resposta adaptativa (NIJHUIS et al., 2014; TAKENAKA; GUERESCHI; BASSO, 2017). Em um estudo realizado em camundongos, utilizando um modelo de coabitação com um companheiro doente (portador de melanoma) foi possível observar alterações nas DCs do camundongo que compartilhava a mesma gaiola do animal doente. Os companheiros saudáveis apresentavam DCs esplênicas com maior expressão de moléculas co-estimuladoras CD80, menores porcentagens de DCs derivadas da medula óssea positivas para MHC-II e CD80, além de déficits no estabelecimento de respostas de hipersensibilidade tardia a ovalbumina (OVA) que foi associada a proliferação de uma subpopulação de células T secretoras de IL-10 (TOMYOSHI et al., 2009). De maneira interessante, os níveis de corticosterona de ambos os grupos foi semelhante, sugerindo que outras vias ativadas pelo estresse, como a via simpática, poderiam estar mediando estes efeitos. Em humanos, os estudos envolvendo o papel dos receptores adrenérgicos em DCs são ainda mais escassos. No entanto, eles também sugerem uma provável modulação mediada por estes receptores. Goyarts et al. (2008) por exemplo, demonstraram que a noradrenalina foi capaz de inibir a produção de IL-23, IL-12p40, fator de necrose tumoral TNF- α e IL-6 em DCs derivadas de células de cordão umbilical CD34⁺. Estes efeitos foram abolidos quando foram utilizados antagonistas de receptores adrenérgicos, sugerindo que

estes efeitos da noradrenalina são mediados pelos receptores adrenérgicos e não por outros receptores.

Sendo assim, é possível especular que as DC humanas de fato, expressem receptores adrenérgicos funcionais e que estes receptores possam ser modulados tanto nas situações fisiológicas, mas também possam apresentar desdobramentos importantes em situações patológicas.

objetivos

"Your focus determines your reality"

Qui-Gon Jinn

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de ligantes adrenérgicos na modulação de diferentes perfis de Mo-DCs humanos

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica dos
- Verificar a funcionalidade dos adrenocetores β em DCs;
- Avaliar o fenótipo de membrana, função fagocítica e apresentação de antígeno de DCs tratadas com ligantes adrenérgicos;
- Determinar a expressão de genes relacionados às DCs, tolDCs e macrófagos, estimulados ou não com LPS e TNF- α e tratados com ligantes adrenérgicos.
- Quantificar a secreção de citocinas nas culturas de DCs, tolDCs e macrófagos tratados com ligantes adrenérgicos.

material e métodos

“Do, or do not. There is no try”

Yoda

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

As amostras de sangue necessárias para a diferenciação de DCs e macrófagos neste estudo foram obtidas junto ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo - SP, a partir de câmaras de leucorredução de plaquetaferese (Figura 1), de cinco doadores saudáveis, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Figura 1 - Câmara de leucorredução de plaquetaferese do aparelho *Trima Accel*®.

Fonte: Cruz (2017)

3.2. ISOLAMENTO DE PBMCs POR GRADIENTE DE *FICOLL*

Para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*), foram utilizados cerca de 10 mL de produto de câmara de leucorredução de doadores de plaquetas de acordo com o descrito por Néron et al. (2007). Estas câmaras contêm entre $2-10 \times 10^8$ células mononucleares. Com o auxílio de uma tesoura, as extremidades da câmara foram cortadas e as amostras foram despejadas individualmente em tubos cônicos de 50 mL e diluídas na proporção de 1:3 em meio de cultura RPMI 1640 (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA).

Em novos tubos cônicos de 50 mL, foram aplicados 10 mL de *Ficoll-Paque Plus* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Reino Unido) — a temperatura ambiente — e na sequência, 20 mL da suspensão celular foi aplicada lentamente sobre o *de Ficoll-Paque Plus*, de modo a formar duas camadas não miscíveis (Figura 2). Os tubos foram centrifugados a $900 \times g$ por 30 minutos, sem o freio da centrífuga, a 20°C . A camada de PBMCs formada na interface entre o *de Ficoll-Paque Plus* e a camada de plasma (Figura 3) foi retirada com o auxílio de pipetas *Pasteur*, colocadas em novos tubos juntamente com 30 mL de meio RPMI 1640 e centrifugadas a $350 \times g$ por 7 min, com o freio da centrífuga ativado, a 4°C .

Figura 2 - Sangue sobre *Ficoll-Paque Plus* antes da centrifugação para formação das camadas celulares.

Fonte: Cruz (2017)

Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas e procedeu-se a lise de hemácias residuais aplicando-se sobre as células 2 mL de tampão de lise ACK (amônio-cloreto-potássio) estéril. Após uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, as células foram lavadas por mais duas vezes, nas mesmas condições descritas anteriormente. As células resultantes foram quantificadas em câmara de *Neubauer* e ressuspensas em meio RPMI no volume adequado para se obter a concentração aproximada de 1×10^6 células/mL para serem utilizadas no caso das culturas por adesão, 6×10^7 para congelamento ou foram ajustadas para a concentração aproximada de 5×10^8 células/mL para o procedimento de *sorting* magnético.

Figura 3 – Ilustração do procedimento de separação de PBMCs por *Ficoll-Paque PLUS*

Legenda: Inicialmente a tampa azul foi retirada do frasco (1). Após inverter várias vezes o frasco, foram retirados 3 mL de *Ficoll-Paque PLUS* com uma seringa (2). O *Ficoll-Paque PLUS* foi então despejado em um tubo, e a suspensão celular foi lentamente adicionada sobre a camada de *Ficoll-Paque PLUS* (3). As células foram então centrifugadas, resultando na separação ilustrada em 4. A camada superior foi removida e as PBMCs foram então coletadas (5, seta azul). Para mais detalhes, ver texto.

Fonte: Modificado do manual do usuário *Ficoll-Paque PLUS – For in vitro isolation of lymphocytes* – Amersham Biosciences.

(<http://pro.unibz.it/staff2/sbenini/documents/Protein%20purification%20handbooks/Don't%20move/18115269AB.pdf>).

3.3. CRIOPRESERVAÇÃO DE PBMCs

Cerca de 6×10^7 PBMCs foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI 1640 e acondicionadas em um isopor contendo 50% água e 50% gelo. Sobre esta suspensão celular foi aplicado vagarosamente e com agitação do tubo de células, 1 mL de meio de congelamento (os volumes foram ajustados de acordo com a quantidade de células, mas as proporções se mantiveram) consistindo de 80% de soro fetal bovino (SBF) e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, do inglês *dimethyl sulfoxide*). Imediatamente, a suspensão celular foi transferida para tubos de criopreservação previamente identificados e estes foram acondicionados no recipiente para congelamento lento, *Mr. Frosty* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA), no qual as células são resfriadas a aproximadamente a $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ no freezer -80°C . No dia seguinte, as células foram removidas do *Mr. Frosty* e acondicionadas em nitrogênio líquido até a realização dos experimentos.

No processo de descongelamento, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e imersas imediatamente em banho aquecido a 37°C por cerca de 1 min. Em seguida a suspensão celular foi vagarosamente diluída em 5 mL de meio de cultura RPMI a 4°C e centrifugada a $350 \times g$ por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

3.4. ISOLAMENTO DE CÉLULAS CD14⁺ POR SORTING COM BEADS MAGNÉTICAS

Aproximadamente 5×10^8 células foram incubadas em 150 μL de Tampão de Sorting – Tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) com 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*) e 0,1% de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) com 50 μL de bloqueador de receptores FC (*Miltenyi*, *Bergisch Gladbach*, Alemanha) por 10 minutos a 4°C . Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD14 FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) (*Biolegend*, San Diego, CA, EUA) ou CD14 FITC (*Miltenyi*) na diluição de 1:100 (no caso do *sorting*

positivo), ou alternativamente, com coquetel de anticorpos (no caso do *sorting* negativo) por 30 minutos a 4°C. As células foram então lavadas por duas vezes com 10 mL de tampão de *sorting* para remoção dos anticorpos que não realizaram ligação (apenas no caso do *sorting* positivo). Em seguida, foram incubadas com 100 µL de *beads* magnéticas anti-FITC (*Miltenyi*) (*sorting* positivo), ou *beads* anti-biotina (*Miltenyi*) (*sorting negativo*) por 15 minutos a 4°C. Após uma lavagem com 10 mL de tampão de *sorting*, as células foram finalmente separadas em colunas *LS* através de um campo magnético gerado por um ímã (*Miltenyi*), de acordo com as instruções do fabricante.

De forma sucinta, foram adicionados 3 mL de tampão de *sorting* na coluna, com o intuito de prepará-la para as células. Estas foram ressuspensas em 2,5 mL e adicionadas à coluna. Na sequência, três lavagens subsequentes foram realizadas com 3 mL de tampão de *sorting*. No caso do *sorting* positivo, as células CD14⁺ ficavam presas na coluna, enquanto as células CD14⁻ passavam direto para o tubo coletor. Ao término da separação, a coluna foi retirada do ímã, e em um novo tubo coletor, foram realizados dois *flushs* com tampão de *sorting*, 5 mL cada, transferindo as células CD14⁺ da coluna para o tubo coletor. Já no caso do *sorting* negativo, as células CD14⁺ passavam direto para a coluna e a população das outras células (CD14⁻), por sua vez, ficavam retidas na mesma. Ao término da separação as células foram coletadas de maneira similar à do *sorting* positivo. As células foram então novamente contadas em câmara de *Neubauer*, e a viabilidade avaliada com azul de trypan 0,4%. As células só foram subsequentemente utilizadas quando a viabilidade foi superior a 90%.

A avaliação da pureza de monócitos na população celular obtida foi realizada por citometria de fluxo no citômetro *FACS Calibur* (*BD Biosciences*, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após a eliminação das células marcadas com iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*), e ajuste de FSC (do inglês *forward-scattered light*) x SSC (do inglês *side-scattered light*) na população de monócitos, foram adquiridos 10.000 eventos no canal FL-1 (correspondente à marcação CD14⁺- FITC) (Apêndice A). Em todas as separações a pureza obtida foi superior a 90%.

3.5. CULTIVO CELULAR

As células ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços (1 mL/poço). Após a incubação *overnight* das células, o sobrenadante foi removido para remoção das células não aderentes. Alternativamente, células CD14⁺ provenientes do *sorting* foram também ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e foram semeadas em placas de 24 poços (1 mL/poço). Nos poços destinados a geração de iDCs, foram adicionados 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4. Para a geração de tolDCs, além de 50 ng/mL de GM-CSF e 50 ng/mL de IL-4, foram adicionados 2,5 ng/mL de IL-10 e 10 ng/mL de TGF- β . Para a geração de macrófagos, somente 50 ng/mL de GM-CSF foram adicionados. As células foram então mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 5 dias. No 5º dia de cultura, para induzir a maturação das iDCs e de tolDCs, nos poços correspondentes a maturação por LPS foi adicionado 1 µg/mL de LPS, e em outros poços determinados para maturação por TNF- α , foram adicionados 50 ng/mL de TNF- α . Para induzir a maturação dos macrófagos, 50 ng/mL de LPS foram adicionados aos poços pré-determinados. As células foram avaliadas quanto a sua diferenciação no último dia de cultura por citometria de fluxo para os marcadores CD14, CD209 e em alguns casos, CD83 (ver Seção 3.9 e Apêndice B).

No dia 0, os linfócitos (obtidos a partir do *sorting* positivo de monócitos) foram lisados com 350 µL de tampão de lise RLT (*Qiagen*, Venlo, Holanda) contendo 10% de β -mercaptoetanol (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). Os monócitos foram lisados no 3º dia de cultura e o restante das células, no 7º dia. Sucintamente, as células foram ressuspensas com o próprio meio de cultura presente nos poços (o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer - 80° C para posterior dosagem de citocinas), lavadas com PBS, ressuspensas em tampão RLT e lisadas com auxílio das forças geradas pela passagem repetida das células em seringa com agulha 21G. Os lisados foram então armazenados no freezer - 80° C para posterior extração de RNA.

3.6. FÁRMACOS

Como ligantes adrenérgicos, foram utilizados o agonista de receptores adrenérgicos hidrocloreto de L-norepinefrina (*Sigma Aldrich*) e o agonista seletivo de adrenoreceptores β_2 , hidrobrometo de fenoterol (*Sigma Aldrich*). Como antagonista não seletivo de receptores β foi utilizado o cloridrato de propranolol (*Sigma Aldrich*) e como antagonista específico de receptores β_2 , o ICI-118,551 (*Tocris Bioscience*, Avonmouth, Bristol, Reino Unido). Todos os ligantes foram diluídos em DMSO, que foi utilizado também como controle nos grupos veículo.

3.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR POR MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO

Com o intuito de encontrar as doses adequadas de fármacos adrenérgicos que proporcionassem efeitos biológicos mas que não fossem tóxicos às células; foi realizado um ensaio de dose-resposta, no qual doses crescentes de agonistas foram testadas. A viabilidade celular foi avaliada por meio da detecção de células positivas para PI, visto que apenas células em processo de morte celular (necrose e apoptose tardia) apresentam marcação intracelular devido à perda da permeabilidade de membrana. Para isto, as células foram lavadas em PBS, ressuspendidas em tampão de ligação, e então incubadas com PI por 10 minutos em temperatura ambiente no escuro. A detecção da fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo *FACS Calibur* (*BD Biosciences*) e as intensidades detectadas em células não marcadas foram utilizadas para o ajuste do *threshold* em cada canal.

3.8. MARCAÇÃO INTRACELULAR DE pCREB

3.8.1. Marcação intracelular de pCREB por citometria de fluxo

Após o tratamento com os ligantes adrenérgicos, as células foram marcadas de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo primário *rabbit anti-proteína ligadora do elemento responsivo do AMPc fosforilada* (*pCREB*, do inglês

phosphorylated cAMP response element-binding protein) (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, EUA). Sucintamente, as células (1×10^6 por tubo) foram lavadas com PBS, ressuspensas e fixadas em solução de formaldeído 4% em PBS por 10 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram resfriadas em gelo por 1 minuto e permeabilizadas com metanol resfriado no freezer, com uma incubação em gelo de 30 minutos. As células foram então lavadas 2 vezes com solução tampão de incubação (PBS contendo 0,5% de BSA), ressuspensas em 100 µL da mesma solução contendo anticorpo diluído 1:800 e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Na sequência as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 100 µL do tampão de incubação contendo 0,5 µL do anticorpo secundário PE (do inglês phycoerythrin) *Goat anti-Rabbit IgG* (Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então novamente lavadas para remoção dos anticorpos não ligados, finalmente ressuspensas em 200 µL de tampão e os eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo *FACSCalibur* com o *software CellQuest Pro* (BD Biosciences). Após aquisição das amostras, os resultados foram analisados no *software* FlowJo vX (*FLOWJO*, Ashland, OR, EUA).

3.8.2. Marcação intracelular de pCREB por imunofluorescência

Após 5 dias de cultura, as iDCs e monócitos foram divididas em 4 grupos para tratamento: controle do tratamento (veículo), forskolina (controle positivo), noradrenalina e propranolol + noradrenalina. Todos os grupos foram tratados com 5 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (*Sigma Aldrich*) por 15 minutos em estufa de CO₂ 5% a 37°C; o grupo propranolol + noradrenalina foi tratado previamente com 2 µM de cloridrato de propranolol (*Sigma Aldrich*) por 15 minutos em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após o término desta última incubação, as células destinadas aos tratamentos com forskolina (1 µM) e noradrenalina (1 µM) foram tratados por 5, 15 ou 30 minutos em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

Após o término do tempo de incubação dos últimos tratamentos, o meio de cultura foi removido dos poços e as células foram imediatamente fixadas com solução de formaldeído 4% em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o fixador foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS. As

células foram então bloqueadas e permeabilizadas com 500 µL de tampão de bloqueio (1X PBS / 1% BSA / 0.3% Triton™ X-100) por 60 minutos a temperatura ambiente. Na sequência, foi aplicado sobre as lamínulas 100 µL do anticorpo primário *rabbit anti-pCREB* (*Cell Signaling Technology*), diluído 1:500 em tampão de bloqueio. As placas foram então incubadas sobre agitação por 18 horas a 4°C.

Após o término da incubação as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS. Enquanto isso, o anticorpo secundário *anti-rabbit* FITC foi diluído no tampão de bloqueio na proporção 1:400 e 200 µL foi aplicado sobre as lamínulas. As placas foram então incubadas por 1 hora sobre agitação a temperatura ambiente, no escuro. Nos últimos 10 minutos de incubação, 2 µL de solução de DAPI (do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*) diluído 1:200 foi adicionado sobre as lamínulas.

Após o término da incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, aguardando ao menos 5 minutos entre cada uma das lavagens. Por fim, as lamínulas foram retiradas das placas, lavadas brevemente em água destilada, secas em papel filtro e posicionadas sobre uma gota de 7 µL de meio de montagem *Vectashield* (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA) em lâminas histológicas. As lamínulas foram então seladas com esmalte comercial e as lâminas foram deixadas em repouso *overnight* a temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, as lâminas foram armazenadas a -20°C até a aquisição das imagens. Estas foram realizadas em microscópio confocal invertido LSM 700 com o uso do software *Zen Blue Edition* v. 2.3 (*Zeiss*, Oberkochen, Alemanha), obtendo-se imagens de 10 a 25 camadas em cada lamínula. As análises e diagramação foram realizadas através dos programas *ImageJ* e *Adobe Photoshop CC* (*Adobe*, San José, CA, EUA), respectivamente.

3.9. AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE MEMBRANA DE MONÓCITOS, iDCs E mDCs POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para determinação do fenótipo de membrana de monócitos e iDCs, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais para as seguintes moléculas de membrana: CD14 FITC (*Biolegend*) e CD209 PE (*Biolegend*) e CD83

APC (do inglês *allophycocyanin*) (*Biolegend*). Após a contagem em câmara de *Neubauer*, as células ($\sim 5 \times 10^5$) foram colocadas em tubos cônicos de citometria e centrifugados por 350 x g por 7 minutos a 4° C. Foram então, adicionados os anticorpos específicos em concentração apropriada para os marcadores de interesse e os tubos foram incubados por 30 minutos a 4° C no escuro. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados e as células lavadas com 500 µL/tubo de tampão para citometria (PBS, contendo 0,5% de BSA) para remoção dos anticorpos que não realizaram ligação. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão para citometria e os eventos foram adquiridos nos citômetros de fluxo *FACSCalibur* com o software *CellQuest Pro* ou *Accuri C6 Plus* (*BD Biosciences*). Após aquisição das amostras, os resultados foram analisados no software *FlowJo v10*. (*FLOWJO* Ashland, OR, EUA) A Figura 4 ilustra os fenótipos analisados.

Figura 4 - Ilustração da caracterização da diferenciação e maturação de DCs pelos marcadores CD14, CD209 e CD83.

Fonte: Cruz (2017).

3.10. ENSAIO DE FAGOCITOSE

Para avaliar a capacidade fagocítica das iDCs, 2×10^5 células foram incubadas com *Staphylococcus aureus* inativados e corados com iodeto de propídio (SAPI) por 1 hora em estufa a 37°C. A reação foi inativada com adição de solução de EDTA 3 mM a 4°C e lavagem das células em PBS. Estas foram então submetidas à leitura em citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD Biosciences), com aquisição de pelo menos 10.000 eventos. Foram consideradas a porcentagem de células que realizaram a fagocitose, bem como a mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*) do SAPI nas células positivas. Para a obtenção do índice de fagocitose, a MFI foi dividida pela porcentagem de células positivas para SAPI. A análise dos resultados foi realizada no *software* FlowJo v10. (FLOWJO Ashland, OR, EUA)

3.11. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE LINFOESTIMULADORA DAS mDCs

Os linfócitos alogênicos, obtidos conforme descrito na Seção 3.2, foram co-cultivados durante 120 horas na presença de mDCs previamente tratadas por 30 minutos com agonistas adrenérgicos na proporção de 1 DCs/10 linfócitos em placas de 96 poços de fundo em “U” num volume final de 200 µL de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Um grupo de linfócitos autólogos foi utilizado como controle negativo de proliferação. Antes de serem co-cultivados, os linfócitos foram marcados com 5 mM de CFSE (do inglês *5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) por 30 minutos a 37°C, seguidos de duas lavagens com PBS. Após as 120 horas, a aquisição dos resultados foi realizada no citômetro de fluxo *FACSCalibur* e utilizando o *software* *Cellquest Pro* (BD Biosciences). A análise dos resultados foi realizada no *software* FlowJo v10. (FLOWJO Ashland, OR, EUA). A Figura 5 ilustra a análise realizada.

Figura 5 - *Dot plot* e histograma ilustrativos da análise realizada para obtenção da % de células que proliferaram

Legenda: A seta mostra o fluxo de análise realizado.

Fonte: Cruz (2017).

3.12. EXTRAÇÃO DE RNA

Para a análise de expressão gênica, os mRNAs foram obtidos como se segue. Os lisados previamente coletados (Seção 3.5) foram congregados em solução única (*pool*) e submetidos a extração de RNA total pelo kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Para a eliminação de DNA genômico, foi adicionado ao processo DNase I do kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) também conforme indicações do fabricante. A concentração de RNA total foi quantificada por meio da leitura espectrofotométrica em *Nanodrop* a 260 nm. A qualidade do RNA foi verificada pela razão de DO 260 nm/280 nm.

3.13. SÍNTESE DE cDNA

Para síntese de cDNA com a enzima *Superscript II* (Life Technologies) foi utilizado 500 ng de RNA total de cada amostra. Foi adicionado 1 µL de Oligo dT a 50 µM (Life Technologies), 1 µL de dNTP Mix a 10 mM (Life Technologies) e

completado para 13 µL com água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC, do inglês *diethylpyrocarbonate*). A solução foi incubada em termociclador por 5 minutos a 65°C e 1 minuto a 4°C. Após a incubação, foram adicionadas 40 unidades de *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Life Technologies), 200 unidades de *Superscript® II Reverse Transcriptase* (Life Technologies), 1 µL de ditioneitol (DTT, do inglês *dithiothreitol*) a 0,1 M (Life Technologies) e 4 µL de 5X *first-strand buffer* (Life Technologies). A amostra foi amplificada seguindo o seguinte ciclo: 60 minutos a 50°C, 15 minutos a 70°C e 1 minuto a 4°C. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos.

3.14. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO POR qRT-PCR

A quantificação dos níveis de expressão dos adrenoceptores e outros genes relevantes para as populações celulares em estudo foram realizadas através de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR, do inglês *quantitative real time polymerase chain reaction*) e monitoradas pelo método de incorporação de *SYBR Green* (*SYBR Select Master Mix*, Applied Biosystems, Foster City, EUA) com *primers* específicos (Tabela 1). Os cDNAs foram diluídos 10 vezes ou não (no caso dos genes: *IL-12p35*, *ADRB1*, *ADRB3*) para a amplificação dos produtos dos genes descritos na Tabela 1. Os cDNAs foram utilizados em duplicata. A quantificação foi realizada em sistema de PCR em tempo real Step One Plus® (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A confirmação dos produtos de amplificação foi realizada por meio da análise da curva de dissociação (Apêndice C) e por meio da análise dos tamanhos do *amplicons* em eletroforese de gel de agarose 2%.

O método utilizado para análise da expressão gênica através do ensaio de qRT-PCR foi o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para tal, foi calculado inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene endógeno (*OAZ1*) dos valores de CT do gene alvo pela seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gene Alvo}) - Ct (\text{Gene Endógeno OAZ1})$$

Após determinação do ΔCT da amostra, foi escolhido como amostra normalizadora para todas as análises o cDNA de iDCs do grupo veículo. Para o cálculo do $\Delta\Delta CT$ utilizou-se a fórmula seguinte:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Amostra}) - \Delta CT (\text{Amostra Normalizadora iDC})$$

Uma vez determinado o $\Delta\Delta CT$, a expressão relativa da amostra alvo em relação a amostra iDC veículo foi obtida por meio do uso da seguinte fórmula:

$$\text{Expressão Relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Tabela 1 - Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados no trabalho.

Gene	Primer	
	Forward	Reverse
<i>CD14</i>	CTGGAACAGGTGCCTAAAGGAC	GTCCAGTGTCTCAGGTTATCCACC
<i>ITGAM</i>	GGAACGCCATTGTCTGCTTTTCG	ATGCTGAGGTCATCCTGGCAGA
<i>FCGR1A</i>	ATACAGGTGCCAGAGAGGTCTC	CCAGCTTATCCTTCCACGCATG
<i>CD163</i>	CCAGAAGGAACTTGTAGCCACAG	CAGGCACCAAGCGTTTTGAGCT
<i>CD80</i>	CTCTTGCTGCTGGCTGGTCTTT	GCCAGTAGATGCGAGTTTGTGC
<i>IL-12p35</i>	GATGGCCCTGTGCCTTAGTA	TCAAGGGAGGATTTTTGTGG
<i>CCR7</i>	CAACATCACCAGTAGCACCTGTG	TGCGGAACTTGACGCCGATGAA
<i>TGFB1</i>	TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC	GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA
<i>CD200R</i>	CGTCTCCCATTGACTGGCAAC	CCAAATGAATCCCACGATGGTCA
<i>PPARG</i>	AGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG	GGCTTCACATTGAGCAAACCTGG
<i>CD1C</i>	TCTCTTGGGTCTCCTGGATGCA	GAGGCATGACAAACCAGCAACAG
<i>CD209</i>	GCAGTCTTCCAGAAGTAACCGC	GCTCTCCTCTGTTCCAATACTGC
<i>CD83</i>	TACAGAGCGGAGATTGTCCTGC	GCTCGTTCCATGCCAGCTTTAG
<i>CD86</i>	CCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCC	GCTGTAATCCAAGGAATGTGGTC
<i>CD40</i>	CCTGTTTGCCATCCTCTTGGTG	AGCAGTGTTGGAGCCAGGAAGA
<i>CCL5</i>	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC	ACACACTTGGCGGTTCTTTTCGG
<i>CD37</i>	AGCTGGGACTATGTGCAGTTCC	CCGACAAGTTGTAGCAGGAGCA
<i>CXCL1</i>	AGCTTGCCCTCAATCCTGCATCC	TCCTTCAGGAACAGCCACCAGT
<i>FCGR3A</i>	GGTGAATTGTCCACTCCAGTGT	ACCATTGAGGCTCCAGGAACAC
<i>OAZ1</i>	ATAAACCCAGCGCCACCATCCA	GGCATCAGGAGCACCACCGAG

Fonte: Cruz (2017)

3.15. DOSAGEM DE CITOCINAS DO SOBRENADANTE DOS CULTIVOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

A dosagem de citocinas foi realizada pelo teste de *Cytometry Bead Array* (CBA) *Human Inflammatory Cytokine Kit* (BD Biosciences) que é utilizado para medir quantitativamente IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 em uma única amostra de sobrenadante. O CBA pode ser comparado ao método de ELISA sanduíche e o protocolo de análise foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, os *nanobeads* de captura e detecção, e as citocinas recombinantes da curva padrão específicos para cada citocina analisada foram diluídas nas concentrações recomendadas. Cada *nanobead* está ligada a anticorpos específicos para a citocina/quimiocina a ser quantificada e apresenta fluorescência diferente entre si, o que permite a diferenciação de cada citocina, em diferentes picos de média da intensidade de fluorescência, como demonstrado na Figura 6. A aquisição dos resultados foi realizada utilizando o citômetro de fluxo FACS *Calibur* (BD Biosciences) e o software *Cellquest Pro* (BD Biosciences). A análise dos resultados foi realizada no software *FlowJo* v10. (FLOWJO). A Figura 7 ilustra a análise realizada. Sucintamente, um *gate* foi realizado selecionando as *beads* em FSC x SSC. Em seguida, *gates* separados foram feitos sobre cada uma das populações de *beads*, cada uma correspondendo à citocina descrita ao lado direito do *dot plot*. Na sequência, a mediana geométrica de fluorescência foi calculada para o canal FL-2-H de cada uma das citocinas. Por fim, estes valores foram convertidos em concentração no software *Myassays* após comparação com curva padrão logística de 4 parâmetros.

Figura 6 - Histogramas ilustrativos do ensaio do CBA

Legenda: Histograma que ilustra os picos de média da intensidade de fluorescência para as diferentes populações de *nanobeads*.

Fonte: Modificado do manual do usuário do CBA *Human Inflammatory Cytokine* – BD Biosciences
<http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/others/23-11112.pdf>

Figura 7 - Dot plots ilustrativos da análise do ensaio de CBA.

Legenda: A seta indica o fluxo de análise.

Fonte: Cruz (2017).

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados pela média $\pm$ desvio padrão (SD, do inglês *standard deviation*) em cada experimento. Para análises de comparação entre dois grupos, o teste *t* de *Student* foi utilizado. Quando comparadas as diferenças entre três ou mais tipos celulares, os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Para análise dos efeitos dos tratamentos nas diferentes células foi utilizado o teste de análise de variância em duas vias (do inglês, *Two-Way ANOVA*), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software *Graphpad Prism 6*.

resultados

"Always pass on what you have learned"

Yoda

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESSÃO DE ADRENOCEPTORES β EM DCs, MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS

A expressão gênica dos adrenoceptores β 1, 2 e 3 foram avaliadas pela técnica de qRT-PCR em iDCs, tolDCs, macrófagos (diferenciados a partir de monócitos provenientes de *sorting*) e linfócitos. Dentre estas, os linfócitos foram as células que apresentaram a maior expressão gênica do adrenoceptor β 2, seguido pelas iDCs, macrófagos e por fim, tolDCs. Macrófagos e iDCs não apresentaram diferença significativa de expressão quando comparadas entre si (Figura 8A).

Quando avaliada a expressão das células diferenciadas com estímulos de maturação, as mDCs LPS e mDCs TNF apresentaram uma redução nos níveis de expressão de adrenoceptor β 2 quando comparadas às iDCs (Figura 8B). Perfis similares de expressão foram observados nas tolDCs e macrófagos ativados (Figura 8C e Figura 8D, respectivamente). A expressão gênica de adrenoceptores β 1 e 3 também foram avaliadas, mas os níveis de expressão foram muito baixos e não foram detectados nas condições testadas (dados não apresentados).

Figura 8 - Histogramas da expressão gênica de adrenoceptores $\beta 2$ nos diferentes perfis de DCs e células mononucleares

Legenda: **A** – Expressão gênica relativa de *ADRB2* entre iDCs, tolDCs, macrófagos e linfócitos. * $P < 0,05$ vs tolDCs; $\varphi P < 0,05$ vs iDCs; $\psi P < 0,05$ vs macrófagos, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. **B** – Expressão gênica relativa de *ADRB2* entre iDCs, mDCs LPS e mDCs TNF. * $P < 0,05$ vs iDCs, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. **C** – Expressão gênica relativa de *ADRB2* entre tolDCs, tolDCs LPS e tolDCs TNF, * $P < 0,05$ vs tolDCs, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. **D** – Expressão gênica relativa de *ADRB2* entre macrófagos e macrófagos LPS. * $P < 0,05$ vs macrófagos. Os valores representam a média $\pm$ SD, teste *t* de Student. $n = 5$.

Fonte: Cruz (2017).

4.2. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO

Antes de iniciar os experimentos subsequentes, nos quais as células seriam tratadas com agonistas e antagonistas adrenérgicos, foi verificado se algum

dos tratamentos ou doses pretendidas poderia ser tóxico às células, visto que tal efeito implicaria em alterações nos resultados de ensaios fenotípicos e funcionais das DCs (Figura 9 e Figura 10). O único tratamento que reduziu significativamente a viabilidade celular foi o do propranolol, na dose de 200 μ M no período de 48 horas (Figura 10). Nos experimentos subsequentes, nenhuma dose utilizada foi superior a 2 μ M.

Figura 9 - Histogramas da viabilidade celular após 20 minutos de tratamento

Legenda: As células foram tratadas com agonistas ou antagonistas adrenérgicos por 20 minutos, Após o término deste período, as células foram incubadas com PI e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores representam a média $\pm$ SD. ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey $n=5$.

Fonte: Cruz (2017).

Figura 10 - Histogramas da viabilidade celular após 48 horas de tratamento

Legenda: As células foram tratadas com agonistas ou antagonistas adrenérgicos por 48 horas. Após o término deste período, as células foram incubadas com PI e avaliadas por citometria de fluxo *P < 0,05 vs grupo veículo. Os valores representam a média ± SD. ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey n=5.

Fonte: Cruz (2017).

4.3. AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DOS ADRENOCEPTORES β

Uma vez que as células avaliadas mostraram expressão gênica para o adrenoceptor β_2 , a próxima etapa foi demonstrar que a ativação destes receptores levava a ativação da cascata intracelular, culminando na fosforilação do CREB. Portanto, Mo-DCs imaturas e maduras (LPS) foram tratadas com noradrenalina. Como controle positivo, algumas células foram estimuladas com forskolina (ativador de cAMP) e IBMX (inibidor de fosfodiesterase). Com o intuito de bloquear a ação da

noradrenalina, alguns grupos de células receberam tratamento prévio com propranolol. Inicialmente, as células foram avaliadas por citometria de fluxo para marcação de pCREB. A Figura 11 mostra que a expressão de pCREB em todos os grupos analisados foi muito similar, não sendo possível discriminar se os tratamentos realmente provocaram alguma alteração da expressão de pCREB nas células.

Figura 11 - Avaliação da expressão proteica de pCREB em iDCs e mDCs LPS por citometria de fluxo

Legenda: As células foram tratadas com IBMX por 15 minutos, seguido do bloqueio ou não dos adrenocetores β por propranolol (2 μ M) por 15 minutos, e finalmente com noradrenalina ou forskolina por mais 15 minutos. Após o término deste período, as células foram fixadas, marcadas com anticorpo *anti-pCREB* e avaliadas por citometria de fluxo.

Fonte: Cruz (2017).

Uma vez que o teste da ativação da via que leva a pCREB não foi satisfatório, foi realizada uma nova abordagem metodológica, utilizando desta vez a técnica de imunofluorescência. Ainda, os tratamentos foram realizados em três tempos distintos, de maneira a encontrar o melhor tempo para observação dos efeitos. Com esta estratégia de tratamentos, esperava-se que o grupo forskolina apresentasse

a maior marcação nuclear de todos, seguido do grupo noradrenalina, e que o grupo tratado previamente com propranolol tivesse uma marcação similar ao grupo controle. Como pode ser observado nas Figuras 12-15, os resultados esperados não foram observados. Com exceção da informação de que em 15 minutos (Figura 13 e Figura 15) se encontra o pico da marcação de pCREB nas células, a variação grande de marcações em todos os grupos e em tempos distintos não gerou respostas definitivas. Assim como na citometria de fluxo, a imunofluorescência não teve sensibilidade suficiente para o objetivo proposto.

Figura 12 – Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 5 minutos de tratamento.

Legenda: As células foram tratadas com IBMX por 15 minutos, seguido do bloqueio ou não dos adrenoceptores β por propranolol (2 μ M) por 15 minutos, e finalmente com noradrenalina (1 μ M) ou forskolína (1 μ M) por mais 5 minutos. Após o término deste período, as células foram fixadas, marcadas com anticorpo *anti-pCREB* e avaliadas em microscópio confocal.

Fonte: Cruz (2017).

Figura 13 - Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 15 minutos de tratamento.

Legenda: As células foram tratadas com IBMX por 15 minutos, seguido do bloqueio ou não dos adrenoceptores β por propranolol (2 μ M) por 15 minutos, e finalmente com noradrenalina (1 μ M) ou forskolina (1 μ M) por mais 15 minutos. Após o término deste período, as células foram fixadas, marcadas com anticorpo *anti-pCREB* e avaliadas em microscópio confocal.

Fonte: Cruz (2017).

Figura 14 - Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 30 minutos de tratamento.

Legenda: As células foram tratadas com IBMX por 15 minutos, seguido do bloqueio ou não dos adrenoreceptores β por propranolol (2 μ M) por 15 minutos, e finalmente com noradrenalina ou (1 μ M) ou forskolina (1 μ M) por mais 30 minutos. Após o término deste período, as células foram fixadas, marcadas com anticorpo *anti-pCREB* e avaliadas em microscópio confocal.

Fonte: Cruz (2017).

Figura 15 - Detecção da expressão de pCREB em iDCs por imunofluorescência após 5, 15 e 30 minutos de tratamento.

Legenda: As células foram tratadas com IBMX por 15 minutos, seguido do bloqueio ou não dos adrenoceptores β por propranolol (2 μ M) por 15 minutos, e finalmente com noradrenalina (1 μ M) ou forskolina (1 μ M) por mais 5, 15 ou 30 minutos. Após o término destes períodos, as células foram fixadas, marcadas com anticorpo *anti-pCREB* e avaliadas em microscópio confocal. Azul: DAPI (DNA); Verde: *anti-pCREB*.

Fonte: Cruz (2017).

4.4. AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

4.4.1. Tratamento prévio ao estímulo de diferenciação

Apesar de não conseguirmos comprovar que a expressão gênica de adrenoceptores $\beta 2$ se confirma na expressão proteica de receptores funcionais, resolvemos testar nossas hipóteses por meio do tratamento das células com agonistas e antagonistas adrenérgicos, com o intuito de observar alguma alteração decorrente.

Inicialmente, os monócitos aderentes foram tratados por 30 minutos com noradrenalina antes de serem estimulados com GM-CSF e IL-4 para a geração de iDCs. O propósito foi avaliar se a ligação do agonista ao receptor poderia sinalizar para a célula alguma alteração no microambiente que alterasse o seu processo de diferenciação. Como pode ser observado na Figura 16A e Figura 16C, a porcentagem de células e o MFI de CD14 foram baixos. Em contraste, a expressão de CD209 se apresentou elevada (Figura 16B e Figura 16D), indicando que as células ao término da cultura apresentavam características próprias de iDCs. O tratamento com noradrenalina e fenoterol não se mostrou capaz de alterar esta diferenciação.

Figura 16 - *Box plots* da expressão de CD14 e CD209 na membrana plasmática de Mo-DCs.

Legenda: Os monócitos foram tratados com noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 30 minutos antes do estímulo de GM-CSF e IL-4 para diferenciação das células em iDCs. Após o término deste período, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD14 e anti-CD209 e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores estão representados pelo mínimo e máximo. ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey $n=5$.

Fonte: Cruz (2017).

4.4.2. Tratamento prévio ao estímulo de maturação

Dado que o tratamento dos monócitos com os ligantes adrenérgicos não foi capaz de alterar a diferenciação destas em iDCs, nosso próximo questionamento foi se o tratamento das iDCs com noradrenalina por 30 minutos antes do estímulo de maturação (LPS) poderia afetar de alguma forma a maturação das mesmas. Para tal, a porcentagem e MFI dos marcadores HLA-DR e CD83 foram avaliados.

Embora o estímulo com LPS tenha elevado a expressão dos marcadores observados quando comparados a células sem estímulo, a noradrenalina não foi capaz de modificar esta expressão, indicando que o agonista adrenérgico teve pouco ou nenhum efeito sobre a maturação das iDCs (Figura 17).

Figura 17 - Box plots da expressão de CD14 e CD209 na membrana plasmática de Mo-DCs

Legenda: As iDCs foram tratadas com noradrenalina (1 μ M) por 30 minutos antes do estímulo com LPS para maturação das células em mDCs. Após o término deste período, as células foram incubadas com anticorpos anti-HLA-DR e anti-CD83 e avaliadas por citometria de fluxo. Os valores estão representados pelo mínimo e máximo. *P < 0,05 vs grupo sem estímulo, ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey n=4.

Fonte: Cruz (2017).

4.5. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE DCs TRATADAS COM LIGANTES ADRENÉRGICOS

4.5.1. Ensaio de fagocitose

Apesar de não terem sido encontradas alterações fenotípicas nas células após os tratamentos com os ligantes adrenérgicos, buscou-se verificar se estes tratamentos poderiam afetar, de alguma forma, a funcionalidade das células. O primeiro ensaio realizado foi o de fagocitose, no qual as iDCs tratadas ou não foram incubadas com SAPI. Após o término de incubação, as células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto a fluorescência para PI.

Figura 18 - *Box plots* da porcentagem do índice de fagocitose de iDCs após 30 minutos de tratamento com ligantes adrenérgicos.

Legenda: As iDCs foram tratadas com noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 30 minutos antes da incubação com SAPI, que também teve duração de 30 minutos. Após o término deste período, as células foram avaliadas por citometria de fluxo. Os valores estão representados pelo mínimo e máximo. ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey n=5, dois experimentos independentes.

Fonte: Cruz (2017).

Como pode ser observado na Figura 18, embora os níveis gerais de fagocitose obtidos tenham sido mais baixos do que o esperado, a fagocitose das iDCs não foi alterada em nenhum dos tratamentos utilizados, indicando que os agonistas adrenérgicos não afetam a capacidade das iDCs de realizar fagocitose.

4.5.2. Ensaio de reação mista de linfócitos

Ainda com o intuito de se verificar o papel de agonistas adrenérgicos na função das DCs, foi realizado o experimento de MLR, no qual as DCs foram tratadas com os agonistas adrenérgicos e depois incubadas em co-cultivo com linfócitos alogênicos. Tal abordagem teve como objetivo verificar a eficiência da apresentação antigênica. Previamente ao co-cultivo, os linfócitos foram incubados com CFSE, um marcador fluorescente que se dilui no citoplasma das células à medida que estas entram em divisão celular. Desta forma, é possível avaliar a proliferação dos linfócitos por citometria de fluxo.

Foi observado que a porcentagem da população que entrou em divisão celular foi superior em todos os grupos quando comparados ao grupo de linfócitos autólogos, resultado condizente com o esperado. No entanto, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos tratados com agonistas adrenérgicos e o grupo veículo (Figura 19), sinalizando que, independentemente dos tratamentos, todas os linfócitos tiveram taxas proliferativas semelhantes.

Figura 19 - *Box plots* da porcentagem da população de linfócitos que entrou em divisão celular após contato com mDCs tratadas por 30 minutos com agonistas adrenérgicos.

Legenda: As mDCs foram tratadas com noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 30 minutos antes da incubação com os linfócitos marcados com CFSE. O co-cultivo foi incubado por 120 horas. Após o término deste período, os linfócitos foram avaliados por citometria de fluxo. Os valores estão representados pelo mínimo e máximo. ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey $n=5$.

Fonte: Cruz (2017).

4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS

Os dados até aqui apresentados indicam que o tratamento agudo de PBMCs em diferentes estágios de maturação com agonistas adrenérgicos não afetou significativamente tanto o fenótipo quanto a funcionalidade destas células. Sendo

assim, resolvemos aumentar o escopo do presente trabalho e avaliar se o tratamento crônico com agonistas adrenérgicos altera a capacidade de diferenciação e maturação de DCs. Para isso, o tempo de tratamento foi estendido para 6 dias, ou seja, as células começaram a ser tratadas desde o dia 1 até o dia 6 de cultivo celular, com os ligantes adrenérgicos sendo adicionados aos poços a cada 24 horas. De forma a avaliar a toxicidade deste tratamento em específico para as células, foi realizado um teste de viabilidade celular por incorporação de PI e avaliado por citometria de fluxo (Apêndice D). Todas as avaliações subsequentes foram realizadas utilizando a técnica de qRT-PCR para avaliação de expressão gênica. Ainda, nestas análises, além das iDCs, as tolDCs (células geradas na presença de IL-10 e TGF- β) e macrófagos (gerados com GM-CSF) tiveram sua expressão gênica avaliada frente aos tratamentos. Infelizmente, não foi possível obter mRNA de monócitos suficiente para realização dos qRT-PCRs, o que impediu a comparação da expressão de marcadores destas células com o restante dos grupos avaliados. De qualquer forma, marcadores relevantes para as populações estudadas foram comparados com as suas contrapartes tratadas com os ligantes adrenérgicos.

4.6.1. Avaliação da diferenciação de DCs a partir de monócitos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

De forma a avaliar se a ligação de noradrenalina e o agonista seletivo de adrenoreceptores β_2 , fenoterol, poderia alterar o processo de diferenciação dos monócitos em iDCs, a expressão de genes relacionados ao fenótipo destas células foi avaliada. Monócitos estimulados com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em iDCs, quando tratados com noradrenalina e fenoterol, não sofreram alterações na expressão gênica dos marcadores clássicos de iDCs (*CD1c* e *CD209*) ao término do período de cultivo celular (Figura 20A-B). Os níveis do transcrito de *CD14*, típico de monócitos, também não sofreu nenhuma alteração significativa com os tratamentos (Figura 20C). Por fim, a expressão gênica dos adrenoreceptores β_2 nos grupos tratados também se mostrou similar ao do grupo veículo no término do experimento, mesmo com a exposição repetida aos ligantes por quase uma semana (Figura 20D).

Figura 20 - Expressão gênica dos marcadores (A) *CD1c*, (B) *CD209*, (C) *CD14* (D) *ADRB2* em iDCs derivadas de monócitos após tratamento crônico com agonistas adrenérgicos.

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias. Os valores representam a média $\pm$ SD. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. n = 5.
Fonte: Cruz (2017).

4.6.2. Avaliação do perfil de expressão gênica em iDCs tratadas com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

Em uma segunda etapa, avaliamos se os ligantes adrenérgicos poderiam alterar a diferenciação de DCs, conferindo a estas células um perfil mais tolerogênico (ou anti-inflamatório). Para isso, foi realizada a análise da expressão dos

genes *TGFB1*, *CD37*, *CXCL1* e *CD163*. Como é possível observar na Figura 21, o tratamento crônico com agonistas adrenérgicos não conferiu um perfil tolerôgênico às DCs, uma vez que a expressão destes genes não foi alterada.

Figura 21 - Expressão gênica dos marcadores (A) *TGFB1*, (B) *CD37*, (C) *CXCL1* e (D) *CD163* em iDCs derivadas de monócitos após tratamento crônico com agonistas adrenérgicos.

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias. Os valores representam a média $\pm$ SD. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. $n = 5$.
Fonte: Cruz (2017).

4.6.3. Avaliação da maturação por meio de LPS e TNF- α de iDCs tratadas com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

Dado que as iDCs foram geradas normalmente a partir da diferenciação de monócitos, foi também investigado se a maturação destas células com LPS e TNF- α frente ao tratamento com os ligantes adrenérgicos poderia alterar alguma propriedade neste processo. O estímulo de iDCs com LPS aumentou de maneira significativa a expressão gênica dos marcadores *CCL5*, *CD40*, *CD80*, *CXCL1*, *CCR7*, *CD83* e *CD86* (Figura 22A-G) e reduziu os níveis de CD163 quando comparados ao grupo veículo iDCs (Figura 22H). Já o estímulo destas células com TNF- α aumentou de maneira significativa os marcadores *CD40*, *CXCL1* e *CD83* (Figura 22B, Figura 22D e Figura 22F, respectivamente), enquanto também reduziu os níveis de CD163 (Figura 22H). A expressão de IL-12p35 não foi detectada nas condições utilizadas (dados não mostrados).

Quando as células estimuladas com LPS foram tratadas com noradrenalina, foi observada uma redução da expressão de *CD40*, *CD80* e *CXCL1*, quando comparadas ao grupo veículo mDCs LPS (Figura 22B-D). O uso do inibidor de adrenoreceptores β_2 , ICI-118,551 previamente ao tratamento com o agonista, não foi capaz de reverter esta diminuição. Quando estas células foram tratadas com o agonista seletivo de receptores β_2 , fenoterol, foram observadas reduções novamente nos marcadores *CD40* e *CD80* e também no gene *CCL5* (Figura 22A-C). O uso do bloqueador seletivo só reverteu este efeito no caso do *CCL5*. No caso das iDCs estimuladas com TNF- α , estas apresentaram apenas redução nos níveis de *CXCL1* quando tratadas com fenoterol e o bloqueio dos adrenoreceptores β não foi capaz de reverter este efeito (Figura 22D).

Figura 22 - Expressão gênica dos marcadores *CCL5*, *CD40*, *CD80*, *CXCL1*, *CCR7*, *CD83*, *CD86* e *CD163* em DCs após 6 dias de tratamento com agonistas adrenérgicos.

(Continua)

(Continuação)

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias. Expressão gênica relativa de *CCL5* (A), *CD40* (B), *CD80* (C), *CXCL1* (D), *CCR7* (E), *CD83* (F), *CD86* (G) e *CD163* (H) entre iDCs, mDCs LPS e mDCs TNF. Os valores representam a média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ células mDCs (LPS ou TNF) vs seus respectivos tratamentos em iDCs; $^{\circ}P < 0,05$ células tratadas vs células veículo no mesmo grupo de células. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. $n=5$. Fonte: Cruz (2017).

4.6.4. Avaliação do perfil de expressão gênica em toIDCs tratadas com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

Monócitos estimulados com IL-10 e TGF- β durante a diferenciação em DCs também foram tratados com os agonistas adrenérgicos noradrenalina e fenoterol, e ativados com LPS e TNF- α . Possíveis alterações nos marcadores destas células foram então avaliadas. Assim como nas iDCs, alguns marcadores de ativação de DCs

aumentaram a sua expressão de maneira geral também nas tolDCs, como o *CD83*, *CD86*, *CXCL1*, *CCL5* e *CCR7* (Figura 23 A- E). De maneira interessante, foi observado um aumento de expressão do *TGFB1* em células do grupo veículo quando comparadas ao grupo tratado com noradrenalina somente após estimulação com TNF- α (Figura 23F). Em contraste, os estímulos de maturação falharam, de maneira geral, em aumentar os níveis de expressão dos genes *CD80* e *CD40* (Figura 23G-H). Por fim, houve uma redução na expressão de *FCGR3A* e *CD163*, tanto com a estimulação por LPS, quanto por TNF- α (Figura 23I-J).

Já a análise dos efeitos provocados pelos tratamentos revelou alterações na expressão do *TGFB1*, no qual o tratamento com noradrenalina e fenoterol diminuiu, no grupo estimulado com TNF- α , a expressão deste gene quando comparado ao veículo (Figura 23F). No entanto, o tratamento prévio com antagonista não reverteu estes efeitos. Similarmente, a expressão de *CD40* sofreu redução no grupo estimulado com TNF- α após o tratamento com noradrenalina e fenoterol, mas neste caso, o bloqueio com o ICI-118,551 reverteu apenas os efeitos da noradrenalina (Figura 23H). Ainda, no caso do *CXCL1*, a noradrenalina e o fenoterol diminuíram a expressão tanto nas células estimuladas com LPS como nas estimuladas com TNF- α (Figura 23C). No entanto, o bloqueio dos receptores com o antagonista só reverteu os efeitos observados nas células tratadas com noradrenalina e estimuladas com LPS. Em contrapartida, o tratamento com noradrenalina aumentou a expressão de *CCR7* no grupo estimulado com LPS, sendo que o antagonista foi capaz de reverter este efeito (Figura 23E)

Figura 23 - Expressão gênica dos marcadores (A) *CD83*, (B) *CD86*, (C) *CXCL1*, (D) *CCL5*, (E) *CCR7*, (F) *TGFB1*, (G) *CD80*, (H) *CD40*, (I) *FCGR3A* e (J) *CD163* em tolDCs após 6 dias de tratamento com agonistas adrenérgicos.

(Continua)

(Continuação)

(Continuação)

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias. Expressão gênica relativa de *CD83* (A), *CD86* (B), *CXCL1* (C), *CCL5* (D), *CCR7* (E), *TGFB1* (F), *CD80* (G), *CD40* (H), *FCGR3A* (I) e *CD163* (J) entre tolDCs, tolDCs LPS e tolDCs TNF. Os valores representam a média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ células tolDCs estimuladas (LPS ou TNF- α) vs seus respectivos tratamentos em tolDCs sem estímulo; $^{\circ}P < 0,05$ células tratadas vs células veículo no mesmo grupo de células. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. $n=5$.

Fonte: Cruz (2017).

4.6.5. Avaliação da diferenciação de monócitos em macrófagos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

Visto que os macrófagos apresentaram expressão gênica similar de *ADRB2* ao de iDCs, foi avaliado se o tratamento dos monócitos com os ligantes adrenérgicos seria capaz de alterar o desenvolvimento destas células em macrófagos.

A análise dos marcadores *CD14*, *FCGR1A* e *ITGAM* não apresentou nenhuma alteração quando as células foram tratadas com os ligantes adrenérgicos ao término do período de cultivo células (Figura 24A-C). Por sua vez, o tratamento com fenoterol reduziu a expressão de *ADRB2* (Figura 24D). No entanto, o uso de ICI-118,551 não foi capaz de restaurar o nível de expressão para os níveis semelhantes aos observados no respectivo grupo veículo (Figura 24D).

Figura 24 - Expressão gênica dos marcadores (A) *CD14*, (B) *FCGR1A*, (C) *ITGAM* e (D) *ADRB2* em macrófagos tratados cronicamente com agonistas e antagonistas adrenérgicos.

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias.

* $P < 0,05$ vs grupo veículo, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. $n = 5$.

Fonte: Cruz (2017).

4.6.6. Avaliação do perfil de expressão gênica em macrófagos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

Similarmente à análise realizada em iDCs, buscou-se verificar se o tratamento de macrófagos com ligantes adrenérgicos teria a capacidade de reduzir o potencial inflamatório destas células (ou seja, a um fenótipo mais similar a um perfil de macrófagos do tipo M2). Para tal, foram avaliados os marcadores *TGFB1*, *CD37*, *PPARG*, *CD163* e *CD200R*. Destes, foram observadas redução na expressão de *PPARG* e *CD163* quando os macrófagos foram tratados com fenoterol (Figura 25C-D). Todavia, novamente o uso do antagonista ICI-118,551 não foi capaz de reverter estes efeitos. Nas condições utilizadas no presente trabalho, não foi possível detectar de forma específica os níveis de expressão de *CD200R* (dados não mostrados).

Figura 25 - Expressão gênica dos marcadores *TGFB1*, *CD37*, *PPARG* e *CD163* em macrófagos tratados cronicamente com agonistas e antagonistas adrenérgicos.

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias. Os valores representam a média $\pm$ SD. * $P < 0,05$ vs grupo veículo, ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. $n = 5$.

Fonte: Cruz (2017).

4.6.7. Avaliação da maturação por meio de LPS de macrófagos tratados com os ligantes noradrenalina e fenoterol por 6 dias

De forma a avaliar se o tratamento com ligantes adrenérgicos poderia influenciar na ativação de macrófagos estimulados com LPS, a expressão de vários genes relacionados à ativação destas células foi avaliada. O tratamento com LPS levou a um aumento da expressão dos marcadores *FCGR3A*, *CXCL1*, *CD80*, *CD83* (Figura 26A-D) e parcialmente de *CCR7*, *CD40*, *CCL5* (alguns grupos tratados não tiveram aumento significativamente estatístico) (Figura 26E-G) enquanto — assim como em mDCs — reduziu os níveis de *CD163* (Figura 26H) e não alterou a expressão de *CD86* (Figura 26I). Novamente, a expressão de *IL-12p35* não foi detectada nas condições testadas (dados não apresentados).

Além disso, também foi avaliado se o tratamento com agonistas adrenérgicos seria capaz de afetar a expressão de algum dos marcadores de ativação. A expressão do gene *FCGR3A* foi reduzida tanto pela noradrenalina, quanto pelo fenoterol (Figura 26A), sendo que o uso do antagonista de adrenoceptor β conseguiu reverter a níveis de expressão comparáveis aos observados no grupo veículo em ambos os tratamentos. Já a expressão do gene *CCR7* foi reduzida nos grupos tratados com noradrenalina e fenoterol (Figura 26E), no entanto o antagonista adrenérgico não foi capaz de reverter estas alterações. Padrão de resposta semelhante foi observado para a expressão do *CD83* (Figura 26D). No caso do *CD80* o tratamento com fenoterol diminuiu a expressão deste marcador (Figura 26C), sendo que o uso do antagonista reverteu este efeito. Em contraste, o fenoterol também foi capaz de diminuir a expressão gênica de *CCL5* (Figura 26H), no entanto o antagonista não reverteu completamente este efeito. O único marcador que apresentou aumento de expressão foi o *CXCL1*, no grupo noradrenalina (Figura 26B) efeito este que foi revertido pelo ICI-118,551.

Todos os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ calculados neste trabalho encontram-se resumidos no Apêndice E.

Figura 26 - Expressão gênica dos marcadores (A) *FCGR3A*, (B) *CXCL1*, (C) *CD80*, (D) *CD83*, (E) *CCR7*, (F) *CD40*, (G) *CCL5*, (H) *CD163* e (J) *CD86* em macrófagos após 6 dias de tratamento com agonistas e antagonistas adrenérgicos.

(Continua)

(Continuação)

(Continuação)

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) e fenoterol (1 μ M) por 6 dias. Expressão gênica relativa de *FCGR3A* (A), *CXCL1* (B), *CD80* (C), *CD83* (D), *CCR7* (E), *CD40* (F), *CCL5* (G), *CD163* (H) e *CD86* (I) entre macrófagos e macrófagos LPS. Os valores representam a média

(Conclusão)

± SD. *P<0,05 células macrófagos LPS vs seus respectivos tratamentos em macrófagos sem estímulo; ^φP<0,05 células tratadas vs células veículo no mesmo grupo de células. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. n=5.

Fonte: Cruz (2017).

4.7. AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS TRATADAS COM NORADRENALINA E FENOTEROL POR 6 DIAS

De maneira a complementar os dados obtidos e de avaliar se os tratamentos com agonistas adrenérgicos estariam modificando a produção e liberação de citocinas (fatores importantes na ativação de outras células nas respostas imunes), examinamos o sobrenadante coletado no último dia de cultivo celular das células geradas na presença de noradrenalina.

A análise mostrou que não houve diferença significativa na produção das citocinas avaliadas (Figura 27), com exceção da IL-6, na qual as mDCs estimuladas com LPS produziram uma quantidade maior desta citocina quando comparadas às iDCs não estimuladas (Figura 27B). Além disso, a produção de IL-10 pelas células, que embora não tenha dado nenhuma diferença estatística, demonstrou uma tendência de maior produção pelas tolDCs em relação as iDCs e macrófagos não estimulados, sendo este um resultado esperado devido ao seu perfil anti-inflamatório. No entanto, de maneira intrigante, a produção desta citocina foi ainda maior em células estimuladas com LPS (Figura 27D).

Figura 27 - Quantificação das citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-8, (D) IL-10, (E) IL-12p70 e (F) TNF- α em iDCs, mDCs, LPS, tolDCs, macrófagos e macrófagos LPS tratadas ou não com noradrenalina por 6 dias.

(Continua)

(Continuação)

Legenda: As células foram tratadas com os ligantes noradrenalina (1 μ M) por 6 dias. Quantificação de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F). Os valores representam a média $\pm$ SD.

*P<0,05 células tratadas vs células veículo. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. n = 5.

Fonte: Cruz (2017).

discussão

"Many of the truths we cling to depend greatly on our own point of view"

Obi-Wan Kenobi

5. DISCUSSÃO

Visto que evidências crescentes vêm demonstrando as nuances das sinalizações entre o SNC e o sistema imune e dado que as DCs são peças chave na comunicação da resposta imune inata com a adaptativa, nos pareceu uma proposta interessante investigar os efeitos que uma resposta de estresse teria sobre estas células.

Portanto, buscou-se verificar se a ação de catecolaminas — mais especificamente, a noradrenalina —, um hormônio liberado durante respostas de estresse, poderia alterar a diferenciação e função de Mo-DCs *in vitro*.

Obviamente, a primeira pergunta realizada foi se as DCs possuiriam meios de responder diretamente a ação das catecolaminas, ou seja, se expressariam adrenoceptores β próprios em suas membranas celulares. Foi demonstrado então em nossos experimentos que as iDCs expressam mRNA para o adrenoceptor $\beta 2$. Outros dois trabalhos demonstraram a expressão gênica e proteica de adrenoceptores β em DCs humanas: YANG et al. (2013) mostraram a expressão proteica de receptores $\beta 1$, enquanto GIORDANI et al. (2015) demonstraram que as iDCs apresentam uma expressão gênica muito mais baixa de receptores $\beta 1$, quando comparada a expressão de receptores $\beta 2$, resultado similar com os dados obtidos neste trabalho. Ainda, estes autores mostraram que a expressão de ambos os adrenoceptores foi bem inferior quando comparada a de monócitos, indicando que estas células diminuem a expressão destes receptores conforme se diferenciam em DCs.

Em camundongos, já foram demonstrados em células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs, do inglês *bone marrow-derived dendritic cells*) e LCs a expressão de transcritos dos adrenoceptores $\alpha 1B$ (MAESTRONI, 2000), $\alpha 1A$ (SEIFFERT et al., 2002), $\alpha 2A$ (MAESTRONI; MAZZOLA, 2003; TAKENAKA et al., 2016) e $\alpha 2C$ (MAESTRONI; MAZZOLA, 2003), além de $\beta 1$ e $\beta 2$ (SEIFFERT et al., 2002; MAESTRONI; MAZZOLA, 2003; NIJHUIS et al., 2014; TAKENAKA et al., 2016). Os trabalhos que avaliaram a expressão dos adrenoceptores $\alpha 1B$, $\alpha 2B$, $\alpha 1D$ e $\beta 3$, não detectaram a expressão destes (SEIFFERT et al., 2002; MAESTRONI; MAZZOLA,

2003; NIJHUIS et al., 2014), sendo que o adrenoceptor $\beta 3$ também não foi detectado nos nossos experimentos.

O presente trabalho ainda avaliou a expressão dos adrenoceptores β em mDCs maturadas com LPS e TNF- α , tolDCs imaturas e maduras, macrófagos com ou sem ativação por LPS e linfócitos. Dentre todas as células avaliadas, os linfócitos foram os que apresentaram a maior expressão do receptor $\beta 2$. Tanto iDCs quanto tolDCs, e macrófagos estimulados com LPS apresentaram uma modificação na expressão dos receptores, que foi reduzida. Embora Nijhuis et al. (2014) não tenham relatado este fenômeno, resultados parecidos aos nossos já foram descritos em BMDCs de camundongos (TAKENAKA et al., 2016) e na linhagem estabelecida de macrófagos de camundongos RAW264 (KIZAKI et al., 2008). Neste último trabalho, os autores demonstraram que a supressão da expressão dos receptores $\beta 2$ nos macrófagos por LPS está relacionada a produção de NO por estas células, que é reduzida quando o receptor tem a sua expressão restaurada. Este possivelmente é um mecanismo fisiológico das células para que elas possam produzir rapidamente quantidades suficientes de NO frente a infecções bacterianas. Muito provavelmente, a redução da expressão de adrenoceptores $\beta 2$ nas DCs e macrófagos estimulados com LPS é resultado de mecanismos existentes nas células para tentar ignorar sinais anti-inflamatórios quando precisam responder aos antígenos e gerar respostas imunes eficazes. Nossos resultados ainda mostraram que a estimulação com TNF- α gera perfis de redução de expressão similares aos do LPS, indicando que mesmo sinais inflamatórios de naturezas distintas podem desencadear mecanismos muito parecidos de respostas celulares.

Um dos resultados mais interessantes que obtivemos neste trabalho foi o de que tolDCs apresentaram níveis baixos de expressão dos adrenoceptores $\beta 2$. Embora dados mais aprofundados que expliquem esta baixa expressão sejam inexistentes até o momento na literatura, é possível especular que, pelo fato das tolDCs já possuírem forte atividade supressora, sinais anti-inflamatórios adicionais não sejam desejáveis, ou mesmo necessários para o correto funcionamento destas células. De qualquer forma, mais estudos são necessários para explicar os mecanismos envolvidos na modificação da expressão destes receptores e as alterações funcionais decorrentes destas modificações.

Dado que as DCs apresentaram transcritos para os adrenoreceptores β_2 , o próximo passo foi tentar investigar se estes receptores eram funcionais. Na via canônica de sinalização por meio da estimulação dos receptores adrenérgicos β , a ativação destes leva a um aumento dos níveis intracelulares de cAMP e a consequente ativação da PKA leva a fosforilação de CREB (LORTON; BELLINGER, 2015). Portanto, buscou-se avaliar a presença desta proteína fosforilada em células tratadas com agonistas adrenérgicos. Infelizmente, as metodologias utilizadas não foram sensíveis o suficiente para tal propósito. Vale destacar que apesar dessa sinalização ser a principal via de ativação dos adrenoreceptores β_2 , já foram demonstradas outras vias ativadas independentes de PKA. Por exemplo, a estimulação dos receptores pode ativar as proteínas trocadoras diretamente ativadas pelo cAMP (EPAC, do inglês *exchange proteins directly activated by cAMP*). As EPACs 1 e 2 ativam o trifosfato de guanina Rap1A que, por sua vez, estimula os efetores B-raf, MAP/ERK1/2 e ERK1/2 (DE ROOIJ et al., 1998; KAWASAKI et al., 1998). Uma segunda via, esta independente de cAMP, é a das beta-arrestinas. Estas proteínas atuam como transdutoras de sinais e moduladoras de outras proteínas que podem levar a ativação ou regulação de diversas vias, tais como do fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e cascatas de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *mitogen activated protein kinases*) (MA; PEI, 2007). Experimentos futuros que envolvam as vias de ativação dos adrenoreceptores β em DCs humanas devem levar em consideração a sinalização por estas vias descritas.

Visto que, com as técnicas empregadas, não conseguimos observar a ativação direta dos receptores, resolvemos então investigar de forma indireta se as DCs tratadas de forma aguda apresentariam alterações fenotípicas e funcionais decorrentes da ligação dos agonistas adrenérgicos nos adrenoreceptores. Dado que uma das funções essenciais para as respostas imunes desempenhadas pelas DCs é a fagocitose de organismos estranhos, resolvemos observar a fagocitose de *Staphylococcus aureus* em células tratadas. Após 30 minutos de incubação com as bactérias, não observamos diferenças significantes na fagocitose realizada pelas células tratadas quando comparadas às sem presença dos ligantes. De maneira similar, o tratamento de Mo-DCs com adrenalina e clenbuterol, um agonista seletivo

de adrenoreceptores β_2 , não alterou a fagocitose de *beads* por estas células (GIORDANI et al., 2015).

Em contraste com nossos achados, Nijhuis et al. (2014) demonstraram que o tratamento de BMDCs de camundongos com adrenalina foi capaz de provocar um aumento da captura de partículas de dextran, embora o uso do agonista seletivo de receptores salbutamol não tenha repetido este efeito, indicando que os efeitos da endocitose tenham sido mediados por receptores α -adrenérgicos. De fato, Yoshiki Yanagawa et al. (2010) investigaram a endocitose de dextran e OVA em BMDCs murinas e também observaram um aumento da endocitose utilizando noradrenalina como agonista adrenérgico. Mais especificamente, este efeito foi mediado por receptores α_2 , uma vez que o uso do antagonista de receptores α_1 , prazosina e o antagonista de receptores β , propranolol, não reverteram estes efeitos, ao contrário do antagonista de receptores α_2 , ioimbina.

Curiosamente, tanto a nossa abordagem quanto a dos trabalhos descritos foi realizada com exposições agudas a ligantes adrenérgicos, mimetizando situações breves de estresse. O aumento da endocitose faz sentido neste contexto, no qual o sistema imunológico, frente a estímulos estressores tais como uma infecção, deve prontamente responder aos antígenos de forma a resguardar o organismo. Por outro lado, estudos que envolvam também os efeitos da exposição mais prolongada das células aos neurotransmissores do estresse devem ser realizados futuramente, visto que o estresse crônico tem sido relacionado em estudos anteriores ao inverso do que foi observado, ou seja, a respostas imunossupressoras (ELFTMAN et al., 2007). O fato de nossos resultados não terem sido similares aos destes últimos trabalhos citados podem também ser explicados por diferenças no objeto de endocitose (dextran e OVA vs bactérias; processos bem distintos e mediados por receptores diversos) e da espécie em estudo (BMDCs murinas vs Mo-DCs humanas).

Após a internalização dos antígenos capturados, as DCs os processam e os apresentam às células T. De forma geral, os antígenos intracelulares são apresentados por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I, do inglês *major histocompatibility complex class I*) para células T CD8⁺, enquanto moléculas provenientes de antígenos extracelulares são apresentadas por moléculas de MHC-II às células T CD4⁺. Ainda, existem casos nos quais as DCs

adquirem antígenos extracelulares e, após processá-los, os apresentam via MHC-I para células T CD8⁺, processo denominado de apresentação cruzada. Este processo é importante na apresentação de peptídeos bacterianos e virais, bem como de antígenos tumorais. De fato, Hervé et al. (2013) demonstraram que o tratamento de BMDCs com o agonista seletivo de receptores β_2 , salbutamol, não foi capaz de alterar a captura e apresentação de antígenos exógenos, no entanto, inibiu a apresentação cruzada destas células para os CTLs, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em concordância com estes dados, a simpatectomia química de camundongos com o uso de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) aumentou as respostas primárias de células T CD8⁺ a antígenos virais e celulares. Ademais, a transferência adotiva das células T CD8⁺ dos animais simpatectomizados indicou que o aumento das respostas observadas não resultaram de alterações ocorridas nesta população, mas sim estão relacionadas ao aumento crescente da habilidade das DCs em ativar células T *naïve* (GREBE et al., 2009).

Os protocolos para estudar a apresentação antigênica das DCs para os linfócitos foram obviamente bem mais simplificados no presente trabalho do que nesses previamente discutidos. DCs tratadas com ligantes adrenérgicos ou não foram incubadas com uma população mista de linfócitos alogênicos e a proliferação destes foi observada por meio da diluição do corante intracelular CFSE. Em nossas análises, não foram encontradas diferenças significativas neste ensaio, indicando que a apresentação antigênica das DCs não foi modificada pela ligação dos agonistas adrenérgicos. Similarmente, Mo-DCs estimuladas ou não com LPS e tratadas por 24 horas com clenbuterol ou adrenalina e co-cultivadas com células T CD4⁺, não apresentaram alterações na sua capacidade estimuladora (GIORDANI et al., 2015). Todavia, há de se considerar nos experimentos de linfoproliferação que mesmo que o número de linfócitos totais não tenha sido alterado, é possível que estes tenham polarizado para algum tipo de resposta. Infelizmente, esta foi uma das limitações deste trabalho que deve ser avaliada futuramente.

De fato, já foi demonstrado que o tratamento de BMDCs incubadas com ovalbumina (OVA), tratadas com adrenalina e salbutamol, e estimuladas com LPS, não foi capaz de alterar o número de células em proliferação e nem a razão de divisão das células T de camundongos transgênicos com TCRs específicos para OVA.

Entretanto, quando os autores investigaram a polarização destas células, eles verificaram que não houve indução das células para perfil Th1, uma vez que não houve um aumento de células produtoras de IFN- γ ou de IL-17A. Em vez disso, eles verificaram um aumento de células que produziam IL-4, correspondendo a um perfil Th2. Ademais, foi observado um aumento do número de células T reguladoras (Tregs) expressando Foxp3 (NIJHUIS et al., 2014). Em contrapartida, outros autores que utilizaram tratamentos similares encontraram resultados um pouco diferentes: a sinalização via adrenoceptor $\beta 2$ em BMDCs estimuladas com LPS alterou a diferenciação das células T CD4⁺ *naïve*, também inibindo a produção de IFN- γ , mas diferentemente do trabalho anterior, a produção de IL-17 foi favorecida (KIM; JONES, 2010; TAKENAKA et al., 2016).

Seguindo a mesma linha, já há 20 anos, Panina-Bordignon et al. (1997) mostraram que o tratamento com salbutamol de monócitos e DCs humanas estimuladas com CD40 inibiu a produção de IL-12 por estas células e também favoreceu o desenvolvimento de células com perfil Th2. Em adição, a administração *in vivo* de uma dose terapêutica do mesmo agonista resultou em uma inibição seletiva da produção de IL-12 por linfócitos sanguíneos totais, quando estes foram estimulados *ex vivo* com LPS.

Embora diferenças funcionais nas DCs não tenham sido encontradas nas condições testadas, um dos questionamentos realizados foi se os ligantes adrenérgicos poderiam de algum modo modificar a diferenciação dos monócitos em iDCs, ou então, modificar o processo de maturação normal destas células. Para isso, foi avaliada a expressão dos marcadores CD14, CD209, CD83 e HLA-DR na membrana das células após diferentes estratégias temporais de tratamentos. Inicialmente, foi verificado se monócitos tratados com os ligantes adrenérgicos antes da adição dos fatores GM-CSF e IL-4 para diferenciação em iDCs poderia comprometer esta diferenciação. De fato, Giordani et al. (2015) mostrou que monócitos gerados na presença de adrenalina ou clenbuterol apresentaram uma grande redução nos marcadores CD1a e retenção do marcador CD14 ao término do período de cultivo celular, indicando uma inibição do processo de diferenciação. Todavia, no presente trabalho, o tratamento pontual com noradrenalina e fenoterol antes da diferenciação, não provocou alterações nas células tratadas comparadas às

células controle, ou seja, o nível de expressão de CD14 das células diferenciadas diminuiu e o nível de CD209 aumentou de modo padrão para esta célula. Neste caso, poderia ser argumentado que naquele, o tratamento persistiu durante todo o período de diferenciação, enquanto neste não, justificando as diferenças observadas. No entanto, nos experimentos de expressão gênica, as células foram tratadas durante todos os dias da diferenciação, e a expressão dos marcadores típicos de DCs, CD209 e CD1c, ocorreu de acordo com o esperado esta população de células. Além do fato de que os marcadores de DCs avaliados foram distintos, é possível que diferenças nas condições de cultivo das células tenham levado às discrepâncias que foram encontradas na comparação entre os estudos.

Ademais, foi investigado se o tratamento das iDCs antes de receberem o estímulo com LPS para maturação poderia modificar as características típicas de células maduras, mais especificamente, algumas moléculas envolvidas na apresentação antigênica. A análise da expressão proteica não revelou alterações nos marcadores HLA-DR e CD83 de células tratadas com noradrenalina e fenoterol. Resultados semelhantes foram encontrados quando as células só foram tratadas após já terem sido estimuladas e incubadas por 48 horas. Nos experimentos de expressão gênica, nos quais as células foram tratadas por 6 dias, a estimulação com LPS aumentou a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 e CD83, o receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, CCR7 e as citocinas CCL5 e CXCL1. Destes, o CD40 e o CD80 tiveram a expressão inibida tanto pela noradrenalina, quanto pelo fenoterol. Entretanto, o fato de os antagonistas não terem restaurado a expressão normal sugere que outros receptores adrenérgicos, e não somente o $\beta 2$ possivelmente estejam mediando estes efeitos. A citocina CCL5 apresentou inibição no grupo fenoterol, possivelmente mediada por receptores $\beta 2$, enquanto a CXCL1 apresentou inibição no tratamento com noradrenalina, um efeito aparentemente mediado por receptores adrenérgicos distintos ao $\beta 2$. Já as células estimuladas com TNF- α aumentaram a expressão apenas de CD40, CD83 e CXCL1. Estas diferenças se deram muito provavelmente pelo fato de o estímulo com TNF- α ter sido utilizado em doses mais baixas do que o LPS, não sendo o aumento da expressão de grande parte dos marcadores suficientemente alto para observação de resultados estatisticamente significativos.

Outros trabalhos também investigaram a ação de agentes adrenérgicos em marcadores de maturação em DCs. Os resultados na literatura acerca destes marcadores são controversos. Enquanto alguns autores não encontraram alterações em moléculas co-estimuladoras, — após o tratamento com noradrenalina, adrenalina, salbutamol, fenoterol e clenbuterol — tais como MHC-II, CD86, CD80, CD40 (NIJHUIS et al., 2014; TAKENAKA et al., 2016) em camundongos e CD86, CD80, HLA-DR e CD83 em humanos, outros autores encontraram redução nos marcadores CD86 e CD40 no tratamento com salbutamol (HERVÉ et al., 2013). Ainda, em oposição, um trabalho demonstrou um aumento no MHC-II, CD80 e CD86 de BMDCs tratadas com adrenalina (KIM; JONES, 2010).

Tendo em vista os resultados obtidos, não é possível afirmar que o tratamento com noradrenalina e fenoterol inibiu a maturação das células dendríticas, pois todos os marcadores observados apresentaram um aumento em sua expressão após a estimulação. Entretanto, visto que CD40 e CD80 apresentaram alterações em seus níveis transcricionais indica que as células em constante contato com os ligantes possam apresentar algum comprometimento na estimulação de células T. As diferenças encontradas nas citocinas CXCL1 e CCL5 podem também indicar algum comprometimento no recrutamento de outras células. Mais dados são necessários para compreender a real relevância das alterações em moléculas co-estimuladoras de DCs tratadas com agonistas adrenérgicos.

Dado que uma das hipóteses era a de que o tratamento pudesse modificar o perfil das DCs geradas a partir dos monócitos tratados, foi avaliado se as DCs geradas a partir de monócitos na presença de ligantes adrenérgicos poderiam apresentar um perfil similar ao de tolDCs (DCs geradas na presença das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β). Os marcadores escolhidos para confirmar a diferenciação das tolDCs foram baseados em trabalhos prévios de expressão gênica em microarranjos (SCHINNERLING; GARCÍA-GONZÁLEZ; AGUILLÓN, 2015), no entanto, eles não se mostraram bons o suficiente para fazer a distinção em relação às iDCs. De qualquer forma, foi possível observar pela expressão de todos os genes analisados que claramente o perfil entre elas diferiu. Além disso, quando as tolDCs foram estimuladas com LPS e TNF- α , os aumentos de expressão das moléculas co-estimuladoras CD83, CD86 e da citocina CCL5, embora presentes, foram menos

expressivos quando comparados às variações observadas em iDCs. Ademais, ao contrário destas, as tolDCs falharam em aumentar de maneira geral, os níveis de CD80 e CD40.

Como os marcadores de tolDCs escolhidos não foram diferencialmente expressos entre as células estudadas, foram avaliados os efeitos dos ligantes diretamente nas células tolerogênicas. Assim como nas iDCs, apenas alterações pontuais foram observadas. Reduções na expressão de CD40, TGFB1 e CXCL1 em células estimuladas com TNF- α e um aumento de CCR7 em com LPS. Somente neste último caso o efeito observado parece ter sido mediado inteiramente pelos receptores β 2, enquanto nos outros, os experimentos com os antagonistas foram inconclusivos.

As tolDCs têm sido estudadas tanto por sua contribuição em patologias como o câncer (DUDEK et al., 2013), mas também pelo seu potencial terapêutico em doenças autoimunes (VAN BRUSSEL et al., 2014). Enquanto vários trabalhos mostraram os efeitos de glicocorticoides em DCs, em especial a dexametasona (DE JONG et al., 1999; XIA et al., 2005; ADLER; STEINBRINK, 2007; VAN KOOTEN et al., 2009; VAN KOOTEN; GELDERMAN, 2011; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2013; CALMETTE et al., 2014; SPALLANZANI et al., 2015; BARCALA TABARROZZI et al., 2016), a qual é utilizada inclusive em vários protocolos para a geração de tolDCs, muito pouco se sabe sobre os efeitos das catecolaminas (outros hormônios produzidos em situações de estresse) sobre as características das DCs. No presente trabalho, não foram encontrados efeitos robustos similares aos encontrados nos tratamentos com glicocorticoides, embora este resultado já fosse esperado, uma vez que os glicocorticoides estão entre os mais potentes imunossupressores conhecidos (FRANCHIMONT, 2004). Além disso, deve-se considerar que as tolDCs, embora apresentem características únicas, nada mais refletem DCs em estados funcionais distintos. Portanto, é possível considerar que pequenas alterações por catecolaminas, ou ainda, a interação destas com outros estímulos podem levar a uma gama de diferenças no padrão de respostas destas células. Por outro lado, também é possível que os efeitos dos ligantes adrenérgicos sejam mínimos nestas células pois, como já foi discutido, estas apresentaram inibição da expressão dos receptores β 2 adrenérgicos. Esta diminuição talvez seja uma

estratégia da célula para não se tornar ainda mais imunossupressora e acabar comprometendo todas as respostas imunes.

Neste trabalho, foi também investigado os efeitos do tratamento contínuo com noradrenalina e fenoterol sobre a expressão gênica de macrófagos. O racional do tratamento sobre estas células foi o mesmo aplicado às DCs, ou seja, foi observada a diferenciação dos monócitos em macrófagos e se estas células se tornavam mais inflamatórias ou anti-inflamatórias, a partir da investigação de alguns marcadores. Embora não tenha sido possível comparar a expressão dos marcadores dos monócitos com macrófagos, estes apresentaram transcritos de CD14, FCGR1A e ITGAM, alguns marcadores clássicos de macrófagos, — sendo tratados ou não — indicando uma diferenciação normal das células tratadas de acordo com o padrão esperado em macrófagos.

Além disso, os marcadores TGFB1, PPARG, CD163 e CD200R, relacionados a um fenótipo mais próximo ao espectro de células M2 (BOUHLEL et al., 2007; METCHNIKOFF; PRIZE, 2015) foram analisados. Destes, o fenoterol provocou uma inibição na expressão de CD163 e PPARG, resultado contrário ao esperado. Todavia, deve-se considerar que os macrófagos foram gerados apenas na presença de GM-CSF que, ao contrário da diferenciação com M-CSF, mesmo sem outros estímulos inflamatórios, conduz os macrófagos a uma polarização mais próxima do espectro M1 (JAGUIN et al., 2013). Um indício que corrobora com este raciocínio foi a inibição da expressão de CD200R, um receptor relacionado a vias anti-inflamatórias em macrófagos (WRIGHT et al., 2003; GORCZYNSKI et al., 2004). Neste contexto, o fenoterol pode ter contribuído ainda mais para esta polarização. No entanto, pelo fato de o bloqueador de receptores $\beta 2$ não ter revertido este efeito, e poucos trabalhos terem sido realizados sobre o efeito de catecolaminas sobre a diferenciação de macrófagos, novas investigações acerca deste resultado devem ser realizadas

Os macrófagos estimulados com LPS, por sua vez, apresentaram, como esperado, um aumento em marcadores relacionados à ativação, tais como CD80, CD83, CCR7, CXCL1, CCL5 e CD40, como já demonstrado em outros trabalhos (CAO; LEE; LU, 2005; MORENO-FIERROS et al., 2013; HIGUCHI et al., 2016). Além disso, a expressão do marcador CD86, que também é um marcador de ativação em macrófagos (MORENO-FIERROS et al., 2013) apresentou uma

tendência de aumento que, no entanto, não foi significativa. Ainda, a expressão do marcador FCGR3A (CD16) também foi estimulada pelo LPS. No caso deste, o tratamento com os agonistas adrenérgicos, levou a uma redução na expressão gênica que foi mediada pelos adrenoceptores $\beta 2$. O CD16 é um marcador de certas populações não clássicas e intermediárias de monócitos/macrófagos (ZIEGLER-HEITBROCK, 2007) e está relacionado a ativação de células NK, fagócitos e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpos (WIRTHMUELLER et al., 1992). Já a expressão de CCR7 e CD83 foi inibida em células tratadas com ambos os agentes adrenérgicos, mas os efeitos não foram necessariamente mediados por receptores $\beta 2$. Outro marcador de ativação, o CD80, apresentou inibição causada apenas pelo fenoterol, confirmada como sendo $\beta 2$ específica pelo funcionamento do antagonista deste receptor. Já o CCL5 apresentou inibição com fenoterol, mas não com noradrenalina, enquanto o CXCL1 tratado com noradrenalina foi o único que apresentou estimulação.

Tomados em conjunto, os resultados observados nos macrófagos ativados tendem a demonstrar uma certa atividade anti-inflamatória dos ligantes adrenérgicos nestas células. No entanto, estes resultados foram similares aos obtidos nos outros tipos celulares observados, ou seja, foram encontradas algumas alterações pontuais entre os marcadores, mas devido a heterogeneidade de funções destes marcadores bem como a aparente contribuição de outros receptores adrenérgicos que não os $\beta 2$, dificulta a interpretação exata dos resultados obtidos. Sendo assim, os nossos resultados mostraram que macrófagos podem ter sua expressão gênica modulada por ligantes adrenérgicos, entretanto, os consequentes efeitos funcionais destas alterações requerem estudos que possivelmente isolem estes marcadores e sejam consequentemente mais aprofundados.

De acordo, um grupo de pesquisadores recentemente concluiu, por meio da análise dos transcriptomas de macrófagos murinos estimulados com ligantes adrenérgicos, que as células não se encaixaram inteiramente em uma categoria pré-definida do espectro M1-M2, mas expressaram genes que são representativos de algumas categorias mais próximas aos M2 (LAMKIN et al., 2016). Por outro lado, um outro trabalho mostrou um efeito bem robusto da adrenalina e noradrenalina em macrófagos murinos, as quais mediam a polarização destas células para fenótipo

M2 via adrenoreceptores $\beta 2$ mesmo na presença de LPS, resultando em proteção durante endotoxemia e danos pulmonares agudos (GRAILER et al., 2014). Enquanto poucos trabalhos investigaram o efeito das catecolaminas sobre o fenótipo dos macrófagos, vários investigaram as ações destes ligantes sobre a produção de citocinas destas células.

Por exemplo, o tratamento com salmeterol e formoterol, dois agonistas $\beta 2$ adrenérgicos, foram capazes de inibir a liberação de TNF- α em macrófagos derivados de monócitos estimulados com LPS (DONNELLY et al., 2010). Em um outro trabalho, o uso de clenbuterol na linhagem U937 ativada também inibiu a liberação de TNF- α , além de IL-6, e aumentou a produção de IL-10 (IZEBOUD et al., 1999). No entanto, os efeitos descritos na literatura são controversos. Em outro trabalho utilizando a linhagem U937, a noradrenalina aumentou os níveis de mRNA e proteicos de IL-6 (LI et al., 2015). Na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, a ativação de receptores $\beta 2$ adrenérgicos também levou a um aumento da IL-6, além da IL-1 β (TAN et al., 2007). No presente trabalho, em contraste com os trabalhos citados, não foram observadas diferenças significantes nos macrófagos tratados com noradrenalina em relação ao veículo em nenhuma das citocinas analisadas.

Em relação a produção de citocinas por DCs, alguns trabalhos vêm demonstrando na literatura, a partir de modelos murinos, que a noradrenalina, via estimulação de receptores $\beta 2$, pode modular a produção de citocinas em DCs ativadas, inibindo a secreção de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-12 e IL-6, e aumentando a liberação de IL-33 e IL-10 (HASKÓ et al., 1998; MANNI; GRANSTEIN; MAESTRONI, 2011; YANAGAWA; MATSUMOTO; TOGASHI, 2011; HERVÉ et al., 2013; TAKENAKA et al., 2016). Em Mo-DCs humanas ativadas com CD40, a noradrenalina inibiu a produção de IL-12 (PANINA-BORDIGNON et al., 1997). Já em DCs derivadas de células precursoras de cordão CD34⁺, a ativação dos adrenoreceptores por noradrenalina inibiu a produção de IL-23, IL-12p40, TNF- α e IL-6, enquanto a expressão de IL-10 não foi significantemente alterada (GOYARTS et al., 2008). Um outro trabalho não encontrou diferenças na produção das citocinas IL-12, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α e IL-10 em Mo-DCs tratadas com adrenalina ou clenbuterol (GIORDANI et al., 2015). Similarmente a este, neste estudo também não foram encontradas diferenças significantes em DCs tratadas para nenhuma destas citocinas.

É possível que as discrepâncias observadas nos diferentes trabalhos se devam a diferentes protocolos de diferenciação, estado e estímulo de ativação, bem como o tempo realizado para coleta e análise das citocinas.

O fato de não ter sido observado no presente trabalho alterações fenotípicas e funcionais em grande escala nas células tratadas com ligantes adrenérgicos pode ser explicado por possíveis alterações na expressão dos adrenoceptores. Como já descrito, as DCs e macrófagos apresentaram níveis de expressão do receptor $\beta 2$ bem inferiores à de linfócitos. Além disso, já foi demonstrado que a expressão de adrenoceptores em monócitos é fortemente inibida quando estes são diferenciados em DCs (GIORDANI et al., 2015). O mesmo foi demonstrado em macrófagos, que após a diferenciação a partir de monócitos perdem a responsividade nos receptores adrenérgicos (BAKER; FULLER, 1995). Esta ausência de responsividade, por sua vez, leva a uma insensibilidade das células aos efeitos causados pelos agonistas $\beta 2$ adrenérgicos. De fato, mudanças no número de receptores estão relacionadas a estímulos, estágios de maturação e tempo de ativação das células nas respostas imunes (RADOJCIC et al., 1991; EZEAMUZIE; SHIHAB; AL-RADWAN, 2011). Na mesma linha, as células podem usar vários mecanismos para regular a duração e potência das cascatas de sinalização de maneira a assegurar respostas de magnitudes apropriadas de estímulos extracelulares a sinais intracelulares. Um fenômeno bem conhecido na regulação da sinalização em receptores acoplados a proteína G que ocorre em receptores adrenérgicos de células nervosas, mas também de células imunes é a diminuição desta sinalização, mesmo na presença constante de ligantes, fenômeno conhecido como dessensibilização dos receptores (LOMBARDI; KAVELAARS; HEIJNEN, 2002). Portanto, a ausência de mudanças drásticas em DCs e macrófagos em nosso estudo pode ser devida a esta perda de resposta dos receptores aos ligantes adrenérgicos.

Os efeitos *in vivo* do estresse em DCs ainda não são muito claros, mas já foram demonstradas alterações nestas células em modelos de estresse físico (LIMA, 2014), e psicológico (SAINT-MEZARD et al., 2003; CURTIN; MILLS; CONNOR, 2009; POWELL et al., 2009, 2011; TOMIYOSHI et al., 2009; ELFTMAN et al., 2010), tanto mediados por glicocorticoides, como também pelo sistema nervoso simpático e seus neurotransmissores. De forma importante, estes efeitos

apresentaram-se tanto deletérios, mas também como adjuvantes de respostas imunes. Estes fatos devem ser levados em consideração também no planejamento e execução dos experimentos *in vitro*, uma vez que estímulos curtos ou duradouros dos hormônios do estresse podem levar a respostas completamente opostas nas células imunes. Estudos em células imunes obtidas de pacientes que fazem uso constante de agonistas e antagonistas de receptores adrenérgicos também podem fornecer dados para uma melhor compreensão dos efeitos do uso crônico dos agentes adrenérgicos sobre o funcionamento das células imunes.

conclusão

“Mind what you have learned. Save you it can”

Yoda

6. CONCLUSÃO

6.1. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

No presente trabalho, foram realizadas as seguintes observações:

- A ordem decrescente de expressão gênica de adrenocetores $\beta 2$ encontrada nas células avaliadas foi: linfócitos, iDCs, macrófagos, tolDCs;
- A estimulação de DCs e macrófagos com LPS e TNF- α provocou uma inibição na expressão gênica dos adrenocetores $\beta 2$.

O tratamento das células com ligantes adrenérgicos:

- Não modificou o fenótipo de membrana de iDCs e mDCs;
- Não alterou a capacidade fagocítica e a apresentação antigênica de iDCs e mDCs;
- Não modificou a diferenciação das iDCs, tolDCs e macrófagos.

O tratamento das células com noradrenalina:

- Inibiu a expressão gênica de CD40, CD80 e CXCL1 em mDCs LPS;
- Inibiu a expressão gênica de CXCL1 e aumentou a expressão gênica de CCR7 em tolDCs LPS;
- Inibiu a expressão gênica de CXCL1, TGFB1 e CD40 em tolDCs TNF;
- Inibiu a expressão gênica de FCGR3A, CCR7 e CD83, e aumentou a expressão de CXCL1 em macrófagos LPS;
- Não alterou a produção de citocinas.

O tratamento das células com fenoterol:

- Inibiu a expressão gênica de CCL5, CD40 e CD80 em mDCs LPS;
- Inibiu a expressão gênica de CXCL1 em mDCs TNF;
- Inibiu a expressão gênica de CXCL1 em tolDCs LPS;
- Inibiu a expressão gênica de CXCL1, TGFB1 e CD40 em mDCs TNF;
- Inibiu a expressão gênica de FCGR3A, CCR7, CCL5, CD80, CD83 em macrófagos LPS;
- Não alterou a produção de citocinas.

6.2. CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos neste trabalho, em conjunto, sinalizam para uma possível ação anti-inflamatória dos ligantes adrenérgicos sobre DCs e macrófagos humanos. No entanto, a observação dos efeitos provocados pelos ligantes foi variável de acordo com o tempo dos tratamentos, do tipo de agonista, do estímulo inflamatório e do estágio de maturação/ativação das células. Devido à esta variação na expressão dos marcadores modificados pelos tratamentos, não foi possível concluir se os efeitos observados foram mediados pelos adrenocetores $\beta 2$. Os resultados indicam que além destes, outros adrenocetores podem estar envolvidos. Embora os resultados não permitam concluir que os ligantes adrenérgicos alterem consideravelmente as propriedades funcionais e fenotípicas de DCs, a inibição da expressão de determinados genes pode estar relacionada a processos específicos dentro das respostas imunes.

referências

“Only different in your mind. You must unlearn what you have learned”

Yoda

REFERÊNCIAS

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosomatic Medicine**, v. 37, n. 4, p. 333–40, 1975.

ADLER, H. S.; STEINBRINK, K. **Tolerogenic dendritic cells in health and disease: Friend and foe!** *European Journal of Dermatology*, 2007. .

ALCALAY, J.; KRIPKE, M. L. Antigen-presenting activity of draining lymph node cells from mice painted with a contact allergen during ultraviolet carcinogenesis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 6, p. 1717–21, 15 mar. 1991.

AMKRAUT, A. A.; SOLOMON, G. F.; KRAEMER, H. C. Stress, early experience and adjuvant-induced arthritis in the rat. **Psychosomatic Medicine**, v. 33, n. 3, p. 203–14, 1971.

AMKRAUT, A.; SOLOMON, G. F. Stress and Murine Sarcoma Virus (Moloney) - induced. **Cancer research**, v. 32, n. July, p. 1428–1433, jul. 1972.

ANDERSON, A. E.; SAYERS, B. L.; HANIFFA, M. A.; SWAN, D. J.; DIBOLL, J.; WANG, X.-N.; ISAACS, J. D.; HILKENS, C. M. U. **Differential regulation of naïve and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells.** *Journal of Leukocyte Biology*, 3 abr. 2008. .

ANGEL, C. E.; GEORGE, E.; BROOKS, A. E. S.; OSTROVSKY, L. L.; BROWN, T. L. H.; DUNBAR, P. R. Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 10, p. 5730–4, 15 maio 2006.

ANGEL, C. E.; LALA, A.; CHEN, C. J. J.; EDGAR, S. G.; OSTROVSKY, L. L.; DUNBAR, P. R. CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. **International Immunology**, v. 19, n. 11, p. 1271–1279, 6 set. 2007.

BACHEM, A.; GÜTTLER, S.; HARTUNG, E.; EBSTEIN, F.; SCHAEFER, M.; TANNERT, A.; SALAMA, A.; MOVASSAGHI, K.; OPITZ, C.; MAGES, H. W.; HENN, V.; KLOETZEL, P.-M.; GURKA, S.; KROCZEK, R. A. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 6, p. 1273–1281, 7 jun. 2010.

BACIU, I.; SOTUZ, V.; STOICA, N.; RADUCANU, N. Sur les centres nerveux régulateurs de l'érythropoïèse. **Rev. Roum. Physiol.**, v. 2, p. 123–133, 1965.

BAKDASH, G.; VAN CAPEL, T. M. M.; MASON, L. M. K.; KAPSENBERG, M. L.; DE JONG, E. C. Vitamin D3 metabolite calcidiol primes human dendritic cells to promote the development of immunomodulatory IL-10-producing T cells. **Vaccine**, v. 32, n. 47, p. 6294–6302, 29 out. 2014.

BAKER, A. J.; FULLER, R. W. Loss of response to beta-adrenoceptor agonists during the maturation of human monocytes to macrophages in vitro. **Journal of leukocyte biology**, v. 57, n. March, p. 395–400, mar. 1995.

BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 4, p. 296–306, abr. 2005.

BARBUTO, J. A. M. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? **Immunotherapy**, v. 5, n. 2, p. 105–7, fev. 2013.

BARBUTO, J. A. M.; ENSINA, L. F. C.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K. R. M.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 53, n. 12, p. 1111–8, dez. 2004.

BARCALA TABARROZZI, A. E.; ANDREONE, L.; DECKERS, J.; CASTRO, C. N.; GIMENO, M. L.; ARIOLFO, L.; BERGUER, P. M.; ANTUNICA-NOGUEROL, M.;

LIBERMAN, A. C.; VETTORAZZI, S.; TUCKERMANN, J. P.; DE BOSSCHER, K.; PERONE, M. J. GR-independent down-modulation on GM-CSF bone marrow-derived dendritic cells by the selective glucocorticoid receptor modulator Compound A. **Scientific reports**, v. 6, n. October 2015, p. 36646, 18 nov. 2016.

BARTROP, R. W.; LAZARUS, L.; LUCKHURST, E.; KILOH, L. G.; PENNY, R. DEPRESSED LYMPHOCYTE FUNCTION AFTER BEREAVEMENT. **The Lancet**, v. 309, n. 8016, p. 834–836, 16 abr. 1977.

BELGE, K.-U.; DAYYANI, F.; HORELT, A.; SIEDLAR, M.; FRANKENBERGER, M.; FRANKENBERGER, B.; ESPEVIK, T.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 7, p. 3536–3542, 1 abr. 2002.

BENETATO, G. Central nervous mechanism of the leukocytic and phagocytic reaction. **J. Physiol. (Paris)**, v. 47, p. 391–403, 1955.

BENETATO, G.; BACIU, I.; VITEBSKI, V.; DEREVENCO, V.; TELIA, M. Despre rolul scoartie cerebrale in activarea sistemului fagocitar si mobilizarea anticorpilor. **Studii si. cercetari ale Fil. Acad. R.P.R. Chij.**, v. 8, p. 164–270, 1952.

BENNACEUR, K.; CHAPMAN, J. A.; TOURAIN, J.-L.; PORTOUKALIAN, J. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1795, n. 1, p. 16–24, jan. 2009.

BENSCHOP, R. J.; RODRIGUEZ-FEUERHAHN, M.; SCHEDLOWSKI, M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. **Brain, behavior, and immunity**, v. 10, n. 2, p. 77–91, jun. 1996.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 126, n. 1, p. 385–7, jan. 1981.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R.; HONEGGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science (New York, N.Y.)**, v. 221, n. 4610, p. 564–6, 5 ago. 1983.

BESEDOVSKY, H. O. Delay in skin allograft rejection in rats grafted with fetal adrenal glands. **Experientia**, v. 27, n. 6, p. 697–698, jun. 1971.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MÜLLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 150, n. 2, p. 466–70, nov. 1975.

BLALOCK, J. E.; HARP, C. Interferon and adrenocorticotrophic hormone induction of steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity. **Archives of virology**, v. 67, n. 1, p. 45–9, 1981.

BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. Human leukocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 10, p. 5972–4, out. 1980.

BOGUNOVIC, M.; GINHOUX, F.; HELFT, J.; SHANG, L.; HASHIMOTO, D.; GRETER, M.; LIU, K.; JAKUBZICK, C.; INGERSOLL, M. A.; LEBOEUF, M.; STANLEY, E. R.; NUSSENZWEIG, M.; LIRA, S. A.; RANDOLPH, G. J.; MERAD, M. Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 513–525, 18 set. 2009.

BOKS, M. A.; KAGER-GROENLAND, J. R.; HAASJES, M. S. P.; ZWAGINGA, J. J.; VAN HAM, S. M.; TEN BRINKE, A. IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction — A comparative study of human clinical-applicable DC. **Clinical Immunology**, v. 142, n. 3, p. 332–342, mar. 2012.

BOSMA, B. M.; METSELAAR, H. J.; NAGTZAAM, N. M. A.; DE HAAN, R.; MANCHAM, S.; VAN DER LAAN, L. J. W.; KUIPERS, E. J.; KWEKKEBOOM, J. Dexamethasone

transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. **Immunology**, v. 125, n. 1, p. 91–100, set. 2008.

BOTTA, F.; MAESTRONI, G. J. M. Adrenergic modulation of dendritic cell cancer vaccine in a mouse model: role of dendritic cell maturation. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, v. 31, n. 3, p. 263–70, abr. 2008.

BOUHLEL, M. A.; DERUDAS, B.; RIGAMONTI, E.; DIÈVART, R.; BROZEK, J.; HAULON, S.; ZAWADZKI, C.; JUDE, B.; TORPIER, G.; MARX, N.; STAELS, B.; CHINETTI-GBAGUIDI, G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137–43, ago. 2007.

BRENK, M.; SCHELER, M.; KOCH, S.; NEUMANN, J.; TAKIKAWA, O.; HACKER, G.; BIEBER, T.; VON BUBNOFF, D. Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4+CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 145–154, 1 jul. 2009.

CALMETTE, J.; ELLOUZE, M.; TRAN, T.; KARAKI, S.; RONIN, E.; CAPEL, F.; PALLARDY, M.; BACHELERIE, F.; KRZYSIEK, R.; EMILIE, D.; SCHLECHT-LOUF, G.; GODOT, V. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is Sufficient To Drive Regulatory T Cells Expansion In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 12, p. 5863–5872, 15 dez. 2014.

CAMINSCHI, I.; PROIETTO, A. I.; AHMET, F.; KITSOULIS, S.; SHIN TEH, J.; LO, J. C. Y.; RIZZITELLI, A.; WU, L.; VREMEC, D.; VAN DOMMELEN, S. L. H.; CAMPBELL, I. K.; MARASKOVSKY, E.; BRALEY, H.; DAVEY, G. M.; MOTTRAM, P.; VAN DE VELDE, N.; JENSEN, K.; LEW, A. M.; WRIGHT, M. D.; HEATH, W. R.; SHORTMAN, K.; LAHOUD, M. H. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3264–73, 15 out. 2008.

CAO, W.; LEE, S. H.; LU, J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 1, p. 85–93, 1 jan. 2005.

CHAUX, P.; MOUTET, M.; FAIVRE, J.; MARTIN, F.; MARTIN, M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 74, n. 5, p. 975–83, maio 1996.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 281–288, 24 abr. 2014.

CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 213–219, 7 jan. 2007.

CHU, C.-C.; ALI, N.; KARAGIANNIS, P.; DI MEGLIO, P.; SKOWERA, A.; NAPOLITANO, L.; BARINAGA, G.; GRYS, K.; SHARIF-PAGHALEH, E.; KARAGIANNIS, S. N.; PEAKMAN, M.; LOMBARDI, G.; NESTLE, F. O. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 5, p. 935–45, 7 maio 2012.

COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 22–30, set. 2013.

COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune Interactions in Stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196–199, 2010.

COX, K.; NORTH, M.; BURKE, M.; SINGHAL, H.; RENTON, S.; AQEL, N.; ISLAM, S.; KNIGHT, S. C. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 5, p. 1142–52, 7 nov. 2005.

CURTIN, N. M.; MILLS, K. H. G.; CONNOR, T. J. Psychological stress increases expression of IL-10 and its homolog IL-19 via β -adrenoceptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 3, p. 371–379, mar. 2009.

CZERNIELEWSKI, J. M.; DEMARCHEZ, M. Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 88, n. 1, p. 17–20, jan. 1987.

DE GRUIJL, T. D.; SOMBROEK, C. C.; LOUGHEED, S. M.; OOSTERHOFF, D.; BUTER, J.; VAN DEN EERTWEGH, A. J. M.; SCHEPER, R. J.; PINEDO, H. M. A postmigrational switch among skin-derived dendritic cells to a macrophage-like phenotype is predetermined by the intracutaneous cytokine balance. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 12, p. 7232–42, 15 jun. 2006.

DE JONG, E. C.; VIEIRA, P. L.; KALINSKI, P.; KAPSENBERG, M. L. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 2, p. 201–4, ago. 1999.

DE ROOIJ, J.; ZWARTKRUIS, F. J.; VERHEIJEN, M. H.; COOL, R. H.; NIJMAN, S. M.; WITTINGHOFFER, A.; BOS, J. L. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 474–7, 3 dez. 1998.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; ARRENBRECHT, S. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, II. **Cellular Immunology**, v. 63, n. 2, p. 329–334, dez. 1981.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and Glucocorticoid Hormones Integrate an Immunoregulatory Feedback Circuit. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 496, n. 1, p. 85–90, 8 ago. 1987.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress

suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, behavior, and immunity**, v. 11, n. 4, p. 286–306, dez. 1997.

DHABHAR, F. S.; VISWANATHAN, K. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 289, n. 3, p. R738-44, 1 set. 2005.

DONNELLY, L. E.; TUDHOPE, S. J.; FENWICK, P. S.; BARNES, P. J. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 36, n. 1, p. 178–186, 1 jul. 2010.

DORIAN, B.; GARFINKEL, P.; BROWN, G.; SHORE, A.; GLADMAN, D.; KEYSTONE, E. Aberrations in lymphocyte subpopulations and function during psychological stress. **Clinical and experimental immunology**, v. 50, n. 1, p. 132–8, out. 1982.

DORNER, B. G.; DORNER, M. B.; ZHOU, X.; OPITZ, C.; MORA, A.; GÜTTLER, S.; HUTLOFF, A.; MAGES, H. W.; RANKE, K.; SCHAEFER, M.; JACK, R. S.; HENN, V.; KROCZEK, R. A. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 823–33, 20 nov. 2009.

DUDEK, A. M.; MARTIN, S.; GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 438, 11 dez. 2013.

DZIOONEK, A.; FUCHS, A.; SCHMIDT, P.; CREMER, S.; ZYSK, M.; MILTENYI, S.; BUCK, D. W.; SCHMITZ, J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 11, p. 6037–46, 1 dez. 2000.

EBNER, S.; RATZINGER, G.; KRÖSBACHER, B.; SCHMUTH, M.; WEISS, A.; REIDER, D.; KROCZEK, R. A.; HEROLD, M.; HEUFLE, C.; FRITSCH, P.; ROMANI,

N. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 1, p. 633–41, 1 jan. 2001.

ELFTMAN, M. D.; HUNZEKER, J. T.; MELLINGER, J. C.; BONNEAU, R. H.; NORBURY, C. C.; TRUCKENMILLER, M. E. Stress-Induced Glucocorticoids at the Earliest Stages of Herpes Simplex Virus-1 Infection Suppress Subsequent Antiviral Immunity, Implicating Impaired Dendritic Cell Function. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 1867–1875, 15 fev. 2010.

ELFTMAN, M. D.; NORBURY, C. C.; BONNEAU, R. H.; TRUCKENMILLER, M. E. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 279–90, out. 2007.

ESCORS, D. Tumour Immunogenicity, Antigen Presentation, and Immunological Barriers in Cancer Immunotherapy. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1–25, 5 jan. 2014.

EZEAMUZIE, C. I.; SHIHAB, P. K.; AL-RADWAN, R. Loss of surface beta-2 adrenoceptors accounts for the insensitivity of cultured human monocytes to beta-2 adrenoceptor agonists. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1189–94, set. 2011.

EZZELARAB, M.; THOMSON, A. W. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. **Seminars in immunology**, v. 23, n. 4, p. 252–63, ago. 2011.

FELTEN, D. L.; ACKERMAN, K. D.; WIEGAND, S. J.; FELTEN, S. Y. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, n. 1, p. 28–36, 1987.

FILIPP, G.; SZENTIVANY, A.; MESS, B. Anaphylaxis and nervous systemle. **Acta Med Hung**, v. 2, n. 163–73, 1952.

FILIPP, G.; SZENTIVANYI, A. Anaphylaxis and the nervous system. Part III. **Allergy**, v. 16, p. 306–311, 1958.

FINGERLE, G.; PFORTE, A.; PASSLICK, B.; BLUMENSTEIN, M.; STRÖBEL, M.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. **Blood**, v. 82, n. 10, p. 3170–6, 15 nov. 1993.

FOGG, D. K.; SIBON, C.; MILED, C.; JUNG, S.; AUCOUTURIER, P.; LITTMAN, D. R.; CUMANO, A.; GEISSMANN, F. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. **Science**, v. 311, n. 5757, p. 83–87, 6 jan. 2006.

FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology & behavior**, v. 77, n. 2–3, p. 205–15, nov. 2002.

FRAGALA, M. S.; KRAEMER, W. J.; MASTRO, A. M.; DENEGAR, C. R.; VOLEK, J. S.; HÄKKINEN, K.; ANDERSON, J. M.; LEE, E. C.; MARESH, C. M. Leukocyte β 2-adrenergic receptor expression in response to resistance exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 43, n. 8, p. 1422–32, ago. 2011.

FRANCHIMONT, D. Overview of the Actions of Glucocorticoids on the Immune Response: A Good Model to Characterize New Pathways of Immunosuppression for New Treatment Strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1024, n. 1, p. 124–137, jun. 2004.

GABRILOVICH, D. I.; NADAF, S.; CORAK, J.; BERZOFSKY, J. A.; CARBONE, D. P. Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. **Cellular immunology**, v. 170, n. 1, p. 111–9, 25 maio 1996.

GALIBERT, L.; DIEMER, G. S.; LIU, Z.; JOHNSON, R. S.; SMITH, J. L.; WALZER, T.; COMEAU, M. R.; RAUCH, C. T.; WOLFSON, M. F.; SORENSEN, R. A.; VAN DER

VUURST DE VRIES, A.-R.; BRANSTETTER, D. G.; KOELLING, R. M.; SCHOLLER, J.; FANSLOW, W. C.; BAUM, P. R.; DERRY, J. M.; YAN, W. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 23, p. 21955–64, 10 jun. 2005.

GÁRATE, D.; ROJAS-COLONELLI, N.; PEÑA, C.; SALAZAR, L.; ABELLO, P.; PESCE, B.; ARAVENA, O.; GARCÍA-GONZÁLEZ, P.; RIBEIRO, C. H.; MOLINA, M. C.; CATALÁN, D.; AGUILLÓN, J. C. Blocking of p38 and transforming growth factor β receptor pathways impairs the ability of tolerogenic dendritic cells to suppress murine arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 1, p. 120–129, jan. 2013.

GARCÍA-GONZÁLEZ, P.; MORALES, R.; HOYOS, L.; MAGGI, J.; CAMPOS, J.; PESCE, B.; GÁRATE, D.; LARRONDO, M.; GONZÁLEZ, R.; SOTO, L.; RAMOS, V.; TOBAR, P.; MOLINA, M.; PINO-LAGOS, K.; CATALÁN, D.; AGUILLÓN, J. A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 128, 24 maio 2013.

GILLIET, M.; CAO, W.; LIU, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 8, p. 594–606, ago. 2008.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 23 jun. 2014.

GIORDANI, L.; CUZZIOL, N.; DEL PINTO, T.; SANCHEZ, M.; MACCARI, S.; MASSIMI, A.; PIETRAFORTE, D.; VIORA, M. β 2-Agonist clenbuterol hinders human monocyte differentiation into dendritic cells. **Experimental Cell Research**, v. 339, n. 2, p. 163–173, 10 dez. 2015.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction:

implications for health. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 3, p. 243–51, mar. 2005.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K.; SPEICHER, C. E.; HOLLIDAY, J. E. Stress, loneliness, and changes in herpesvirus latency. **Journal of behavioral medicine**, v. 8, n. 3, p. 249–60, set. 1985.

GOLDSTEIN, D. S.; MCEWEN, B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 5, n. 1, p. 55–8, 7 fev. 2002.

GORCZYNSKI, R.; CHEN, Z.; KAI, Y.; LEE, L.; WONG, S.; MARSDEN, P. A. CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 12, p. 7744–9, 15 jun. 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.

GORDY, C.; PUA, H.; SEMPOWSKI, G. D.; HE, Y.-W. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 618–629, 13 jan. 2011.

GOYARTS, E.; MATSUI, M.; MAMMONE, T.; BENDER, A. M.; WAGNER, J. A.; MAES, D.; GRANSTEIN, R. D. Norepinephrine modulates human dendritic cell activation by altering cytokine release. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 3, p. 188–96, mar. 2008.

GRAILER, J. J.; HAGGADONE, M. D.; SARMA, J. V.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Induction of M2 Regulatory Macrophages through the α_2 -Adrenergic Receptor with Protection during Endotoxemia and Acute Lung Injury. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 5, p. 607–618, 2014.

GREBE, K. M.; HICKMAN, H. D.; IRVINE, K. R.; TAKEDA, K.; BENNINK, J. R.; YEWDELL, J. W. Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8+ T cell

responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 13, p. 5300–5, 31 mar. 2009.

GYORKI, D. E.; ASSELIN-LABAT, M.-L.; VAN ROOIJEN, N.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. R62, 26 ago. 2009.

HAAKE, D. A.; ZUCKERT, W. R. The leptospiral outer membrane. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 187–221, 2014.

HALLIDAY, G. M.; LUCAS, A. D.; BARNETSON, R. S. Control of Langerhans' cell density by a skin tumour-derived cytokine. **Immunology**, v. 77, n. 1, p. 13–8, set. 1992.

HALLIDAY, G. M.; REEVE, V. E.; BARNETSON, R. S. Langerhans cell migration into ultraviolet light-induced squamous skin tumors is unrelated to anti-tumor immunity. **The Journal of investigative dermatology**, v. 97, n. 5, p. 830–4, nov. 1991.

HANIFFA, M.; BIGLEY, V.; COLLIN, M. Human mononuclear phagocyte system reunited. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 41, p. 59–69, maio 2015.

HANIFFA, M.; COLLIN, M.; GINHOUX, F. Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse. In: **Advances in immunology**. [s.l: s.n.]120p. 1–49.

HANIFFA, M.; GINHOUX, F.; WANG, X.-N.; BIGLEY, V.; ABEL, M.; DIMMICK, I.; BULLOCK, S.; GRISOTTO, M.; BOOTH, T.; TAUB, P.; HILKENS, C.; MERAD, M.; COLLIN, M. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 2, p. 371–85, 16 fev. 2009.

HANIFFA, M.; SHIN, A.; BIGLEY, V.; MCGOVERN, N.; TEO, P.; SEE, P.; WASAN, P. S.; WANG, X.-N.; MALINARICH, F.; MALLERET, B.; LARBI, A.; TAN, P.; ZHAO, H.; POIDINGER, M.; PAGAN, S.; COOKSON, S.; DICKINSON, R.; DIMMICK, I.;

JARRETT, R. F.; RENIA, L.; TAM, J.; SONG, C.; CONNOLLY, J.; CHAN, J. K. Y.; GEHRING, A.; BERTOLETTI, A.; COLLIN, M.; GINHOUX, F. Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 60–73, 27 jul. 2012.

HASKÓ, G.; SZABÓ, C.; NÉMETH, Z. H.; SALZMAN, A. L.; VIZI, E. S. Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice. **Journal of neuroimmunology**, v. 88, n. 1–2, p. 57–61, 1 ago. 1998.

HENCH, P. S.; KENDALL, E. C.; SLOCUMB, C. H.; POLLEY, H. F. Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. **Archives of internal medicine (Chicago, Ill. : 1908)**, v. 85, n. 4, p. 545–666, abr. 1950.

HERVÉ, J.; DUBREIL, L.; TARDIF, V.; TERME, M.; POGU, S.; ANEGON, I.; ROZEC, B.; GAUTHIER, C.; BACH, J.-M.; BLANCOU, P. β 2-Adrenoreceptor agonist inhibits antigen cross-presentation by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 7, p. 3163–71, 1 abr. 2013.

HIGUCHI, H.; SHOJI, T.; IJIMA, S.; NISHIJIMA, K. Constitutively expressed Siglec-9 inhibits LPS-induced CCR7, but enhances IL-4-induced CD200R expression in human macrophages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 6, p. 1141–1148, 2 jun. 2016.

HILKENS, C. M. U.; ISAACS, J. D. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? **Clinical and experimental immunology**, v. 172, n. 2, p. 148–57, maio 2013.

HUYSAMEN, C.; WILLMENT, J. A.; DENNEHY, K. M.; BROWN, G. D. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16693–701, 13 jun. 2008.

IRWIN, M.; PATTERSON, T.; SMITH, T. L.; CALDWELL, C.; BROWN, S. A.; GILLIN, J. C.; GRANT, I. Reduction of immune function in life stress and depression. **Biological psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 22–30, 1 jan. 1990.

ITO, T.; YANG, M.; WANG, Y.-H.; LANDE, R.; GREGORIO, J.; PERNG, O. A.; QIN, X.-F.; LIU, Y.-J.; GILLIET, M. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 1, p. 105–115, 22 jan. 2007.

IZEBOUD, C. A.; MOCKING, J. A. J.; MONSHOUWER, M.; VAN MIERT, A. S. J. P. A. M.; WITKAMP, R. F. Participation of β -Adrenergic Receptors on Macrophages in Modulation of LPS-Induced Cytokine Release. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 19, n. 1–4, p. 191–202, 10 jan. 1999.

JAGUIN, M.; HOULBERT, N.; FARDEL, O.; LECUREUR, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. **Cellular Immunology**, v. 281, n. 1, p. 51–61, 2013.

JAKUBZICK, C.; BOGUNOVIC, M.; BONITO, A. J.; KUAN, E. L.; MERAD, M.; RANDOLPH, G. J. Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 12, p. 2839–2850, 24 nov. 2008.

JOFFRE, O. P.; SEGURA, E.; SAVINA, A.; AMIGORENA, S. Cross-presentation by dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 557–569, 13 jul. 2012.

JOHNSON, T.; LAVENDER, J. F.; HULTIN, E.; RASMUSSEN, A. F. THE INFLUENCE OF AVOIDANCE-LEARNING STRESS ON RESISTANCE TO COXSACKIE B VIRUS IN MICE. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 91, p. 569–75, nov. 1963.

JONGBLOED, S. L.; KASSIANOS, A. J.; MCDONALD, K. J.; CLARK, G. J.; JU, X.;

ANGEL, C. E.; CHEN, C.-J. J.; DUNBAR, P. R.; WADLEY, R. B.; JEET, V.; VULINK, A. J. E.; HART, D. N. J.; RADFORD, K. J. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 6, 2010.

KALIŃSKI, P.; HILKENS, C. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunology today**, v. 20, n. 12, p. 561–7, dez. 1999.

KALINSKI, P.; WIECKOWSKI, E.; MUTHUSWAMY, R.; DE JONG, E. Generation of stable Th1/CTL-, Th2-, and Th17-inducing human dendritic cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 595, p. 117–33, 2010.

KANITAKIS, J.; MORELON, E.; PETRUZZO, P.; BADET, L.; DUBERNARD, J.-M. Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. **Experimental dermatology**, v. 20, n. 2, p. 145–6, fev. 2011.

KANITAKIS, J.; PETRUZZO, P.; DUBERNARD, J.-M. Turnover of epidermal Langerhans' cells. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 25, p. 2661–2, 16 dez. 2004.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 12, p. 984–93, dez. 2003.

KAWASAKI, H.; SPRINGETT, G. M.; MOCHIZUKI, N.; TOKI, S.; NAKAYA, M.; MATSUDA, M.; HOUSMAN, D. E.; GRAYBIEL, A. M. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5397, p. 2275–9, 18 dez. 1998.

KIECOLT-GLASER, J. K.; GARNER, W.; SPEICHER, C.; PENN, G. M.; HOLLIDAY, J.; GLASER, R. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. **Psychosomatic Medicine**, v. 46, n. 1, p. 7–14, 1984.

KIM, B. J.; JONES, H. P. Epinephrine-primed murine bone marrow-derived dendritic cells facilitate production of IL-17A and IL-4 but not IFN- γ by CD4⁺ T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1126–1136, out. 2010.

KIZAKI, T.; IZAWA, T.; SAKURAI, T.; HAGA, S.; TANIGUCHI, N.; TAJIRI, H.; WATANABE, K.; DAY, N. K.; TOBA, K.; OHNO, H. Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappaB activation through beta-arrestin 2. **Immunology**, v. 124, n. 3, p. 348–56, jul. 2008.

KLECHEVSKY, E.; MORITA, R.; LIU, M.; CAO, Y.; COQUERY, S.; THOMPSON-SNIPES, L.; BRIERE, F.; CHAUSSABEL, D.; ZURAWSKI, G.; PALUCKA, A. K.; REITER, Y.; BANCHEREAU, J.; UENO, H. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 497–510, 19 set. 2008.

KUEBLER, U.; WIRTZ, P. H.; SAKAI, M.; STEMMER, A.; EHLERT, U. Acute Stress Reduces Wound-Induced Activation of Microbicidal Potential of Ex Vivo Isolated Human Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55875, 8 fev. 2013.

LAMKIN, D. M.; HO, H.-Y.; ONG, T. H.; KAWANISHI, C. K.; STOFFERS, V. L.; AHLAWAT, N.; MA, J. C. Y.; AREVALO, J. M. G.; COLE, S. W.; SLOAN, E. K. β -Adrenergic-stimulated macrophages: Comprehensive localization in the M1-M2 spectrum. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 57, p. 338–346, out. 2016.

LANDMANN, R. M.; MÜLLER, F. B.; PERINI, C.; WESP, M.; ERNE, P.; BÜHLER, F. R. Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecholamines. **Clinical and experimental immunology**, v. 58, n. 1, p. 127–35, out. 1984.

LANGERHANS, P. Über die nerven der menschlichen haut. **Archives of Pathological Anatomy**, v. 44, p. 325–37, 1868.

LANGLET, C.; TAMOUTOUNOUR, S.; HENRI, S.; LUCHE, H.; ARDOUIN, L.;

GRÉGOIRE, C.; MALISSEN, B.; GUILLIAMS, M. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 4, p. 1751–60, 15 fev. 2012.

LAUTERBACH, H.; BATHKE, B.; GILLES, S.; TRAILD-HOFFMANN, C.; LUBER, C. A.; FEJER, G.; FREUDENBERG, M. A.; DAVEY, G. M.; VREMEC, D.; KALLIES, A.; WU, L.; SHORTMAN, K.; CHAPLIN, P.; SUTER, M.; O'KEEFFE, M.; HOCHREIN, H. Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 12, p. 2703–17, 22 nov. 2010.

LEME, J. G.; SCHAPOVAL, E. E. Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. **British journal of pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 75–83, jan. 1975.

LI, M.; YAO, W.; LI, S.; XI, J. Norepinephrine induces the expression of interleukin-6 via β -adrenoreceptor-NAD(P)H oxidase system -NF- κ B dependent signal pathway in U937 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 4, p. 1029–1034, 15 maio 2015.

LIMA, A. P. N. **Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos balb/c**. 2014. Universidade de São Paulo, 2014.

LIU, K.; NUSSENZWEIG, M. C. Origin and development of dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 45–54, mar. 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LIVNAT, S.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; BELLINGER, D. L.; FELTEN, D. L.

Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. **Journal of neuroimmunology**, v. 10, n. 1, p. 5–30, nov. 1985.

LOMBARDI, M. S.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J. Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. **Critical reviews in immunology**, v. 22, n. 2, p. 141–63, 2002.

LORTON, D.; BELLINGER, D. Molecular Mechanisms Underlying β -Adrenergic Receptor-Mediated Cross-Talk between Sympathetic Neurons and Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5635–5665, 11 mar. 2015.

MA, L.; PEI, G. beta-arrestin signaling and regulation of transcription. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 2, p. 213–218, 15 jan. 2007.

MACDONALD, K. P. A.; MUNSTER, D. J.; CLARK, G. J.; DZIOONEK, A.; SCHMITZ, J.; HART, D. N. J. Characterization of human blood dendritic cell subsets. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4512–4520, 15 dez. 2002.

MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 35, p. 417–48, jan. 1995.

MAESTRONI, G. J. Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 12, p. 6743–7, 15 dez. 2000.

MAESTRONI, G. J. M.; MAZZOLA, P. Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. **Journal of neuroimmunology**, v. 144, n. 1–2, p. 91–9, nov. 2003.

MAISEL, A. S.; HARRIS, T.; REARDEN, C. A.; MICHEL, M. C. Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. Alterations in normal individuals and

patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 82, n. 6, p. 2003–10, dez. 1990.

MAKARENKOVA, V. P.; SHURIN, G. V.; TOURKOVA, I. L.; BALKIR, L.; PIRTSKHALAISHVILI, G.; PEREZ, L.; GEREIN, V.; SIEGFRIED, J. M.; SHURIN, M. R. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 145, n. 1–2, p. 55–67, dez. 2003.

MANNI, M.; GRANSTEIN, R. D.; MAESTRONI, G. β 2-Adrenergic agonists bias TLR-2 and NOD2 activated dendritic cells towards inducing an IL-17 immune response. **Cytokine**, v. 55, n. 3, p. 380–386, 2011.

MATTHEWS, K.; CHUNG, N. P. Y.; KLASSE, P. J.; MOORE, J. P.; SANDERS, R. W. Potent induction of antibody-secreting B cells by human dermal-derived CD14+ dendritic cells triggered by dual TLR ligation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 12, p. 5729–44, 15 dez. 2012.

MCEWEN, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 174–185, 7 abr. 2008.

METALNIKOV, S.; CHORINE, V. Rôle des reflexes conditionnels dans la formation des anticorps. **CR Société de Biologie**, v. 99, p. 142–145, 1928.

METCHNIKOFF, I.; PRIZE, N. Mini - review : Macrophage Polarization. **Biorad**, v. 2, p. 1–8, 2015.

MOOS, R. H.; SOLOMON, G. F. PERSONALITY CORRELATES OF THE RAPIDITY OF PROGRESSION OF RHEUMATOID ARTHRITIS. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 23, p. 145–51, mar. 1964a.

MOOS, R. H.; SOLOMON, G. F. MINNESOTA MULTIPHASIC PERSONALITY INVENTORY RESPONSE PATTERNS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID

ARTHRITIS. **Journal of psychosomatic research**, v. 8, p. 17–28, jul. 1964b.

MOOS, R. H.; SOLOMON, G. F. Psychologic comparisons between women with rheumatoid arthritis and their non-arthritic sisters. **Psychosomatic Medicine**, v. 27, n. 2, p. 135–149, 1965.

MORAES, F. R.; GARCIA LEME, J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvascular Research**, v. 23, n. 3, p. 281–293, 1982.

MORENO-FIERROS, L.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. L.; ILHUICATZI-ALVARADO, D.; RIVERA-SANTIAGO, L.; TORRES-MARTÍNEZ, M.; RUBIO-INFANTE, N.; LEGORRETA-HERRERA, M. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1051–1066, dez. 2013.

MORET, F. M.; HACK, C. E.; VAN DER WURFF-JACOBS, K. M.; DE JAGER, W.; RADSTAKE, T. R.; LAFEVER, F. P.; VAN ROON, J. A. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, n. 5, p. R155, 20 out. 2013.

MOSEMAN, E. A.; LIANG, X.; DAWSON, A. J.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; KRIEG, A. M.; LIU, Y.-J.; BLAZAR, B. R.; CHEN, W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 7, p. 4433–42, 1 out. 2004.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–69, dez. 2008.

MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A.; GILROY, D. W.; GOERDT, S.; GORDON, S.; HAMILTON, J. A.; IVASHKIV, L. B.; LAWRENCE, T.;

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; MARTINEZ, F. O.; MEGE, J.-L.; MOSSER, D. M.; NATOLI, G.; SAEIJ, J. P.; SCHULTZE, J. L.; SHIREY, K. A.; SICA, A.; SUTTLES, J.; UDALOVA, I.; VAN GINDERACHTER, J. A.; VOGEL, S. N.; WYNN, T. A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 17 jul. 2014.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 14 out. 2011.

NAIK, S. H.; METCALF, D.; VAN NIEUWENHUIJZE, A.; WICKS, I.; WU, L.; O'KEEFFE, M.; SHORTMAN, K. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 663–71, 7 jun. 2006.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 6, p. 736–45, ago. 2007.

NÉRON, S.; THIBAUT, L.; DUSSAULT, N.; CÔTÉ, G.; DUCAS, É.; PINEAULT, N.; ROY, A. Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells. **Transfusion**, v. 47, n. 6, p. 1042–1049, jun. 2007.

NICOLAU, I.; ANTINESCU-DIMITRIU, O. L'influence des réflexes conditionnels sur l'exsudat péritonéal. **C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil**, v. 102, p. 144–145, 1929a.

NICOLAU, I.; ANTINESCU-DIMITRIU, O. Rôle des réflexes conditionnels dans la formation des anticorps. **C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil**, v. 102, p. 133–134, 1929b.

NIIDA, S.; KAKU, M.; AMANO, H.; YOSHIDA, H.; KATAOKA, H.; NISHIKAWA, S.; TANNE, K.; MAEDA, N.; NISHIKAWA, S.; KODAMA, H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 2, p. 293–8, 19 jul. 1999.

NIJHUIS, L. E.; OLIVIER, B. J.; DHAWAN, S.; HILBERS, F. W.; BOON, L.; WOLKERS, M. C.; SAMSOM, J. N.; DE JONGE, W. J. Adrenergic $\beta 2$ receptor activation stimulates anti-inflammatory properties of dendritic cells in vitro. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85086, jan. 2014.

OCHOA, M. T.; LONCARIC, A.; KRUTZIK, S. R.; BECKER, T. C.; MODLIN, R. L. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 9, p. 2225–31, set. 2008.

OSTRAVSKAYA, O. Le réflex conditionnel et les réactions de l'immunité. **Ann. Inst. Pasteur Paris**, v. 44, p. 340–345, 1930.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17, n. 1, p. 43–54, fev. 2003.

PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FÁVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and teratology**, v. 23, n. 5, p. 497–507, jan. 2001.

PANINA-BORDIGNON, P.; MAZZEO, D.; LUCIA, P. D.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.; FABBRI, L.; SELF, C.; SINIGAGLIA, F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 6, p. 1513–9, 15 set. 1997.

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2527–34, 15 nov. 1989.

PENEL-SOTIRAKIS, K.; SIMONAZZI, E.; PÉGUET-NAVARRO, J.; ROZIÈRES, A. Differential capacity of human skin dendritic cells to polarize CD4+ T cells into IL-17, IL-21 and IL-22 producing cells. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e45680, 30 nov. 2012.

PERUSSIA, B.; FANNING, V.; TRINCHIERI, G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. **Natural immunity and cell growth regulation**, v. 4, n. 3, p. 120–37, 1985.

PETERS, J. H.; RUPPERT, J.; GIESELER, R. K.; NAJAR, H. M.; XU, H. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? **Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, v. 59, n. 3, p. 122–6, 1991.

PINHO, M. P.; SUNDARASETTY, B. S.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; STEPONAVICIUS-CRUZ, K.; FERREIRA, A. K.; STRIPECKE, R.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic-tumor cell hybrids induce tumor-specific immune responses more effectively than the simple mixture of dendritic and tumor cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 4, p. 570–580, abr. 2016.

PLANTINGA, M.; GUILLIAMS, M.; VANHEERSWYNGHEL, M.; DESWARTE, K.; BRANCO-MADEIRA, F.; TOUSSAINT, W.; VANHOUTTE, L.; NEYT, K.; KILLEEN, N.; MALISSEN, B.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 322–35, 21 fev. 2013.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, abr. 2009.

POULIN, L. F.; SALIO, M.; GRIESSINGER, E.; ANJOS-AFONSO, F.; CRACIUN, L.; CHEN, J.-L.; KELLER, A. M.; JOFFRE, O.; ZELENAY, S.; NYE, E.; LE MOINE, A.; FAURE, F.; DONCKIER, V.; SANCHO, D.; CERUNDOLO, V.; BONNET, D.; REIS E SOUSA, C. Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 6, p. 1261–71, 7 jun. 2010.

POWELL, N. D.; BAILEY, M. T.; MAYS, J. W.; STINER-JONES, L. M.; HANKE, M. L.; PADGETT, D. A.; SHERIDAN, J. F. Repeated social defeat activates dendritic cells

and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 2, p. 225–231, fev. 2009.

POWELL, N. D.; MAYS, J. W.; BAILEY, M. T.; HANKE, M. L.; SHERIDAN, J. F. Immunogenic dendritic cells primed by social defeat enhance adaptive immunity to influenza A virus. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 1, p. 46–52, jan. 2011.

PULENDRAN, B.; TANG, H.; MANICASSAMY, S. Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. **Nature Immunology**, v. 11, n. 8, p. 647–655, 20 ago. 2010.

RADOJCIC, T.; BAIRD, S.; DARKO, D.; SMITH, D.; BULLOCH, K. Changes in beta-adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: an analysis of T cells and macrophages. **Journal of neuroscience research**, v. 30, n. 2, p. 328–35, out. 1991.

RANDOLPH, G. J.; INABA, K.; ROBBIANI, D. F.; STEINMAN, R. M.; MULLER, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 753–61, dez. 1999.

RASMUSSEN, A. F.; MARSH, J. T.; BRILL, N. Q. Increased susceptibility to herpes simplex in mice subjected to avoidance-learning stress or restraint. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 96, n. 1, p. 183–9, out. 1957.

RATGE, D.; WIEDEMANN, A.; KOHSE, K. P.; WISSER, H. Alterations of beta-adrenoceptors on human leukocyte subsets induced by dynamic exercise: effect of prednisone. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 15, n. 1, p. 43–53, jan. 1988.

RAUSCH, E.; KAISERLING, E.; GOOS, M. Langerhans cells and interdigitating reticulum cells in the thymus-dependent region in human dermatopathic lymphadenitis. **Virchows Archiv. B, Cell pathology**, v. 25, n. 4, p. 327–43, 21 nov. 1977.

RISSOAN, M. C.; SOUMELIS, V.; KADOWAKI, N.; GROUARD, G.; BRIERE, F.; DE WAAL MALEFYT, R.; LIU, Y. J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5405, p. 1183–6, 19 fev. 1999.

ROBBINS, S. H.; WALZER, T.; DEMBÉLÉ, D.; THIBAUT, C.; DEFAYS, A.; BESSOU, G.; XU, H.; VIVIER, E.; SELLARS, M.; PIERRE, P.; SHARP, F. R.; CHAN, S.; KASTNER, P.; DALOD, M. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. **Genome biology**, v. 9, n. 1, p. R17, 24 jan. 2008.

ROLINSKI, J.; HUS, I. Breaking immunotolerance of tumors: A new perspective for dendritic cell therapy. **Journal of Immunotoxicology**, v. 11, n. 4, p. 311–318, 4 out. 2014.

ROMANI, N.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Changing Views of the Role of Langerhans Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 872–881, mar. 2012.

ROMANI, N.; GRUNER, S.; BRANG, D.; KÄMPGEN, E.; LENZ, A.; TROCKENBACHER, B.; KONWALINKA, G.; FRITSCH, P. O.; STEINMAN, R. M.; SCHULER, G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 1, p. 83–93, 1 jul. 1994.

ROMANI, N.; LENZ, A.; GLASSEL, H.; STÖSSEL, H.; STANZL, U.; MAJDIC, O.; FRITSCH, P.; SCHULER, G. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. **The Journal of investigative dermatology**, v. 93, n. 5, p. 600–9, nov. 1989.

SAINT-MEZARD, P.; CHAVAGNAC, C.; BOSSET, S.; IONESCU, M.; PEYRON, E.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J.-F.; BÉRARD, F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 8, p. 4073–4080, 15 out. 2003.

SALLUSTO, F. 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. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 4, p. 1109–1118, 1 abr. 1994.

SANCHO, D.; JOFFRE, O. P.; KELLER, A. M.; ROGERS, N. C.; MARTINEZ, D.; HERNANZ-FALCON, P.; ROSEWELL, I.; REIS E SOUSA, C. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 899–903, 16 abr. 2009.

SANDERS, V. M. The role of adrenoceptor-mediated signals in the modulation of lymphocyte function. **Advances in neuroimmunology**, v. 5, n. 3, p. 283–98, jan. 1995.

SANDERS, V. M. Interdisciplinary research: Noradrenergic regulation of adaptive immunity. In: Brain, Behavior, and Immunity, 1, **Anais...**jan. 2006.

SAPOLSKY, R. M. The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. **Science**, v. 308, n. 5722, p. 648–652, 29 abr. 2005.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 12, p. 965–975, dez. 2002.

SCHINNERLING, K.; GARC??A-GONZ??LEZ, P.; AGUILL??N, J. C. **Gene expression profiling of human monocyte-derived dendritic cells - Searching for molecular regulators of tolerogenicity**Frontiers in ImmunologyFrontiers Media SA, , 2015. .

SCHULER, G.; STEINMAN, R. M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 161, n. 3, p. 526–46, 1 mar. 1985.

SCHULZ, O.; DIEBOLD, S. S.; CHEN, M.; NÄSLUND, T. I.; NOLTE, M. A.;

ALEXOPOULOU, L.; AZUMA, Y.-T.; FLAVELL, R. A.; LILJESTRÖM, P.; REIS E SOUSA, C. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. **Nature**, v. 433, n. 7028, p. 887–92, 24 fev. 2005.

SEIFFERT, K.; HOSOI, J.; TORII, H.; OZAWA, H.; DING, W.; CAMPTON, K.; WAGNER, J. A.; GRANSTEIN, R. D. Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 12, p. 6128–35, 15 jun. 2002.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230–1, jan. 1998.

SERBINA, N. V.; CHERNY, M.; SHI, C.; BLEAU, S. A.; COLLINS, N. H.; YOUNG, J. W.; PAMER, E. G. Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 4, p. 2678–2687, 15 ago. 2009.

SHURIN, M. R.; SHURIN, G. V.; LOKSHIN, A.; YURKOVETSKY, Z. R.; GUTKIN, D. W.; CHATTA, G.; ZHONG, H.; HAN, B.; FERRIS, R. L. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? **Cancer metastasis reviews**, v. 25, n. 3, p. 333–56, set. 2006.

SHURIN, M. R.; YURKOVETSKY, Z. R.; TOURKOVA, I. L.; BALKIR, L.; SHURIN, G. V. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 1, p. 61–68, 1 set. 2002.

SIEGAL, F. P.; KADOWAKI, N.; SHODELL, M.; FITZGERALD-BOCARSLY, P. A.; SHAH, K.; HO, S.; ANTONENKO, S.; LIU, Y. J.; ISAACS, A.; LINDEMANN, J.; FITZGERALD-BOCARSLY, P.; KIRCHNER, H.; PETER, H. H.; ABB, J.; ABB, H.; DEINHART, F.; PERUSSIA, B.; FANNING, V.; TRINCHIERI, G.; CHEHIMI, J.; SANDBERG, K.; STARR, S. E.; SVENSSON, H.; FELDMAN, S. B.; FELDMAN, M.; FITZGERALD-BOCARSLY, P.; FERBAS, J. J.; FELDMAN, S. B.; GHANEKAR, S.; SIEGAL, F. P.; OLWEUS, J.; RISSOAN, M.-C.; SIEGAL, F. P. The nature of the

principal type 1 interferon-producing cells in human blood. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5421, p. 1835–7, 11 jun. 1999.

SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7530–4, dez. 1981.

SOLOMON, G F, MOOS, R. H. Emotions, immunity and disease: a speculative theoretical integration. **Archives of General Psychiatry**, v. 11, p. 657–674, dez. 1964.

SOLOMON, G. F. Stress and antibody response in rats. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 35, n. 1, p. 97–104, 1969.

SOLOMON, G. F.; MERIGAN, T. C.; LEVINE, S. Variation in adrenal cortical hormones within physiologic ranges, stress and interferon production in mice. **Riv Patol Nerv Ment**, v. 87, n. 4, p. 74–79, ago. 1966.

SOLOMON, G. F.; MOOS, R. H. the Relationship of Personality To the Presence of Rheumatoid Factor in Asymptomatic Relatives of Patients With Rheumatoid Arthritis. **Psychosomatic medicine**, v. 27, p. 350–60, 1964.

SPALLANZANI, R. G.; TORRES, N. I.; AVILA, D. E.; ZIBLAT, A.; IRAOLAGOITIA, X. L. R.; ROSSI, L. E.; DOMAICA, C. I.; FUERTES, M. B.; RABINOVICH, G. A.; ZWIRNER, N. W. Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN- Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I-Specific Inhibitory Receptors. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2141–2148, 1 set. 2015.

STEFATER, J. A.; REN, S.; LANG, R. A.; DUFFIELD, J. S. **Metchnikoff's policemen: Macrophages in development, homeostasis and regeneration** **Trends in Molecular Medicine**, dez. 2011. .

STEINBRINK, K.; GRAULICH, E.; KUBSCH, S.; KNOP, J.; ENK, A. H. CD4+ and

CD8⁺ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. **Blood**, v. 99, n. 7, p. 2468–2476, 1 abr. 2002.

STEINMAN, R. M.; ADAMS, J. C.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. **The Journal of experimental medicine**, v. 141, n. 4, p. 804–20, 1 abr. 1975.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of experimental medicine**, v. 137, n. 5, p. 1142–62, 1 maio 1973.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 139, n. 2, p. 380–97, 1 fev. 1974.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 21, p. 685–711, jan. 2003.

STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 139, n. 6, p. 1431–45, 1 jun. 1974.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318–28, abr. 2006.

SZAFLARSKA, A.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; SIEDLAR, M.; WEGLARCZYK, K.; RUGGIERO, I.; HAJTO, B.; ZEMBALA, M. Antitumor response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation. **Experimental hematology**, v. 32, n. 8, p. 748–55, ago. 2004.

SZENTIVANYI, A.; FILIPP, G. Anaphylaxis and the nervous system. Part II. **Ann Allergy**, v. 16, p. 143–151, 1958.

TADA, T. THE IMMUNE SYSTEM AS A SUPERSYSTEM. **Annu. Rev. Immunol**, v. 15, n. 3, p. 1–13, mar. 1997.

TAKENAKA, M. C.; ARAUJO, L. P.; MARICATO, J. T.; NASCIMENTO, V. M.; GUERESCHI, M. G.; REZENDE, R. M.; QUINTANA, F. J.; BASSO, A. S. Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through β 2-Adrenergic Receptor-Mediated Inhibition of NF- κ B and AP-1 in Dendritic Cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 196, n. 2, p. 637–44, 15 jan. 2016.

TAKENAKA, M. C.; GUERESCHI, M. G.; BASSO, A. S. Neuroimmune interactions: dendritic cell modulation by the sympathetic nervous system. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 2, p. 165–176, fev. 2017.

TAN, K. S.; NACKLEY, A. G.; SATTERFIELD, K.; MAIXNER, W.; DIATCHENKO, L.; FLOOD, P. M. β 2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF- κ B-independent mechanisms. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 2, p. 251–260, fev. 2007.

THOMAS, R. Dendritic cells as targets or therapeutics in rheumatic autoimmune disease. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 211–8, mar. 2014.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. A. M. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 4, p. 558–567, maio 2009.

TOMOZAWA, Y.; YABUUCHI, K.; INOUE, T.; SATOH, M. Participation of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in beta-adrenoceptor-mediated interleukin-1 beta mRNA induction in cultured microglia. **Neuroscience research**, v. 22, n. 4, p. 399–409, jul. 1995.

TORRES-AGUILAR, H.; SÁNCHEZ-TORRES, C.; JARA, L. J.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y. IL-10/TGF- β -treated dendritic cells, pulsed with insulin, specifically

reduce the response to insulin of CD4⁺ effector/memory T cells from type 1 diabetic individuals. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 5, p. 659–668, 11 set. 2010.

TOURKOVA, I. L.; SHURIN, G. V; CHATTA, G. S.; PEREZ, L.; FINKE, J.; WHITESIDE, T. L.; FERRONE, S.; SHURIN, M. R. Restoration by IL-15 of MHC class I antigen-processing machinery in human dendritic cells inhibited by tumor-derived gangliosides. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 5, p. 3045–52, 1 set. 2005.

TOURKOVA, I. L.; SHURIN, G. V; WEI, S.; SHURIN, M. R. Small rho GTPases mediate tumor-induced inhibition of endocytic activity of dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 12, p. 7787–93, 15 jun. 2007.

VAN BRUSSEL, I.; LEE, W. P.; ROMBOUTS, M.; NUYTS, A. H.; HEYLEN, M.; DE WINTER, B. Y.; COOLS, N.; SCHRIJVERS, D. M. **Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: Can the unattainable dream turn into reality?** **Autoimmunity Reviews**, fev. 2014. .

VAN DER AAR, A. M. G.; SYLVA-STEENLAND, R. M. R.; BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L.; DE JONG, E. C.; TEUNISSEN, M. B. M. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 4, p. 1986–90, 15 fev. 2007.

VAN DER VLIST, M.; DE WITTE, L.; DE VRIES, R. D.; LITJENS, M.; DE JONG, M. A. W. P.; FLUITSMA, D.; DE SWART, R. L.; GEIJTENBEEK, T. B. H. Human Langerhans cells capture measles virus through Langerin and present viral antigens to CD4 + T cells but are incapable of cross-presentation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2619–2631, set. 2011.

VAN FURTH, R. ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 278, n. 1, p. 161–175, 1 set. 1976.

VAN KOOTEN, C.; GELDERMAN, K. A. In vitro-generated DC with tolerogenic functions: perspectives for in vivo cellular therapy. **Methods in molecular biology**

(Clifton, N.J.), v. 677, p. 149–59, 2011.

VAN KOOTEN, C.; STAX, A. S.; WOLTMAN, A. M.; GELDERMAN, K. A. Handbook of Experimental Pharmacology “Dendritic Cells”. In: **Handbook of experimental pharmacology**. [s.l: s.n.]p. 233–249.

VAROL, C.; LANDSMAN, L.; FOGG, D. K.; GREENSHTEIN, L.; GILDOR, B.; MARGALIT, R.; KALCHENKO, V.; GEISSMANN, F.; JUNG, S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 1, p. 171–180, 22 jan. 2007.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. **Macrophages: development and tissue specialization**. [s.l: s.n.]v. 33

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 125–163, 2002.

WELLS, C. A.; CHALK, A. M.; FORREST, A.; TAYLOR, D.; WADDELL, N.; SCHRODER, K.; HIMES, S. R.; FAULKNER, G.; LO, S.; KASUKAWA, T.; KAWAJI, H.; KAI, C.; KAWAI, J.; KATAYAMA, S.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; HUME, D. A.; GRIMMOND, S. M. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. **Genome biology**, v. 7, n. 2, p. R10, 2006.

WILLIAMS, J. M.; FELTEN, D. L. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: A comparative histofluorescence study. **The Anatomical Record**, v. 199, n. 4, p. 531–542, abr. 1981.

WILLIAMS, J. M.; PETERSON, R. G.; SHEA, P. A.; SCHMEDTJE, J. F.; BAUER, D. C.; FELTEN, D. L. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: Evidence for a functional link between the nervous and immune systems. **Brain Research Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 83–94, jan. 1981.

WIRTHMUELLER, U.; KUROSAKI, T.; MURAKAMI, M. S.; RAVETCH, J. V. Signal

transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, n. 5, p. 1381–90, 1 maio 1992.

WRIGHT, G. J.; CHERWINSKI, H.; FOSTER-CUEVAS, M.; BROOKE, G.; PUKLAVEC, M. J.; BIGLER, M.; SONG, Y.; JENMALM, M.; GORMAN, D.; MCCLANAHAN, T.; LIU, M.-R.; BROWN, M. H.; SEDGWICK, J. D.; PHILLIPS, J. H.; BARCLAY, A. N. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 6, p. 3034–3046, 15 set. 2003.

WYNN, T. A.; BARRON, L. **Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis** **Seminars in Liver Disease**, 21 ago. 2010. .

XIA, C. Q.; PENG, R.; BEATO, F.; CLARE-SALZLER, M. J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 1, p. 45–54, jul. 2005.

YAMADA, Y. A. M. A. D. A. A.; JENSEN, J. E. N. S. E. N. M. M.; RASMUSSEN, R. A. S. M. U. S. S. E. N. A. F. STRESS AND SUSCEPTIBILITY TO VIRAL INFECTIONS. 3. ANTIBODY RESPONSE AND. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.**, v. 116, p. 677–680, jul. 1964.

YANAGAWA, Y.; MATSUMOTO, M.; TOGASHI, H. Adrenoceptor-mediated enhancement of interleukin-33 production by dendritic cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 7, p. 1427–1433, out. 2011.

YANG, H.; DU, R.-Z.; QIU, J.-P.; TANG, Y.-Q.; CHEN, S.-C. Bisoprolol reverses epinephrine-mediated inhibition of cell emigration through increases in the expression of β -arrestin 2 and CCR7 and PI3K phosphorylation, in dendritic cells loaded with cholesterol. **Thrombosis research**, v. 131, n. 3, p. 230–7, mar. 2013.

YONG, X.; XIAO, Y.-F.; LUO, G.; HE, B.; LÜ, M.-H.; HU, C.-J.; GUO, H.; YANG, S.-M. Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses. **Journal**

of biomedicine & biotechnology, v. 2012, p. 605045, jan. 2012.

YOSHIKI YANAGAWA, T.; MATSUMOTO, M.; YANAGAWA, Y.; TOGASHI, H. Following Brief Exposure to Noradrenaline Adrenoceptor-Mediated PI3K Activation 2 α Enhanced Dendritic Cell Antigen Uptake via Enhanced Dendritic Cell Antigen Uptake via a 2 Adrenoceptor-Mediated PI3K Activation Following Brief Exposure to Noradrenaline. **J Immunol The Journal of Immunology The Journal of Immunology**, v. 185, n. 185, p. 5762–5768, 15 nov. 2010.

ZABA, L. C.; FUENTES-DUCULAN, J.; STEINMAN, R. M.; KRUEGER, J. G.; LOWES, M. A. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c +BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIA + macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2517–2525, 4 set. 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 3, p. 584–92, mar. 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; DALOD, M.; GRAU, V.; HART, D. N.; LEENEN, P. J. M.; LIU, Y. J.; MACPHERSON, G.; RANDOLPH, G. J.; SCHERBERICH, J.; SCHMITZ, J.; SHORTMAN, K.; SOZZANI, S.; STROBL, H.; ZEMBALA, M.; AUSTYN, J. M.; LUTZ, M. B. **Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood****Blood**, 21 out. 2010. .

apêndices

“All mentors have a way of seeing more of our faults than we would like. It's the only way we grow. ”

Padmé Amidala

APÊNDICES

APÊNDICE A – AVALIAÇÃO DO SORTING DE MONÓCITOS

Figura 28 - *Dot plots* representativos da análise do *sorting* de monócitos por beads magnéticas a partir de PBMCs.

APÊNDICE B- AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
DERIVADAS DE MONÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Legenda: Observar a menor expressão do marcador CD14 e maior expressão do marcador CD209 nas iDCs quando comparadas aos monócitos. As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos.

Fonte: Cruz (2017)

APÊNDICE C – CURVAS DE DISSOCIAÇÃO (MELT)

Figura 30 - Curvas de dissociação (*melt*) dos genes *CD14*, *FCGR1A*, *FCGR3A*, *ITGAM*

Fonte: Cruz (2017)

Figura 31 - Curvas de dissociação (*melt*) dos genes *CD163*, *CCR7*, *TGFB1*, *PPARG*

Fonte: Cruz (2017)

Figura 32 - Curvas de dissociação (*melt*) dos genes *CD1C*, *CD209*, *CD80*, *CCL5*

Fonte: Cruz (2017)

Figura 33 - Curvas de dissociação (*melt*) dos genes *CD37*, *CXCL1*, *CD83*, *CD86*

Fonte: Cruz (2017)

Figura 34 - Curvas de dissociação (*melt*) dos genes *ADRB2* e *OAZ1*

ADRB2

OAZ1

Fonte: Cruz (2017)

APÊNDICE D – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR COM IODETO DE PROPÍDIO APÓS TRATAMENTO COM LIGANTES

Figura 35 - *Dot plots* representativos da avaliação de viabilidade celular com o corante iodoeto de propídio

Legenda: As células foram tratadas com os agonistas adrenérgicos noradrenalina (1 μ M) e fenoterol 1 (μ M) e do antagonista ICI-118,551 (1 μ M) durante 6 dias. No 7º dia, a viabilidade foi avaliada.

Fonte: Cruz (2017)

APÊNDICE E – VALORES DE $2^{-\Delta\Delta CT}$ DA EXPRESSÃO GÊNICA ANALISADA

Tabela 2 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes *CD14* e *FCGR1A*

VALORES $2^{-\Delta\Delta CT}$								
CD14								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,01	0,04	0,15	0,05	0,01	0,01	2,07	2,04
Noradrenalina (1 μ M)	1,01	0,03	0,24	0,04	0,01	0,01	1,93	1,65
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	1,15	0,06	0,27	0,02	0,01	0,02	2,03	2,78
Fenoterol (1 μ M)	0,76	0,08	0,29	0,04	0,00	0,01	1,58	2,15
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,81	0,11	0,21	0,04	0,01	0,01	1,60	2,15
FCGR1A								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,00	0,26	0,44	6,77	3,90	4,07	27,29	44,86
Noradrenalina (1 μ M)	0,77	0,28	0,52	7,30	2,16	3,66	33,51	34,53
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,95	0,57	0,38	7,35	4,25	3,15	33,16	38,63
Fenoterol (1 μ M)	0,55	0,62	0,33	9,85	2,33	3,14	27,00	27,95
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,70	0,45	0,43	7,98	2,97	3,18	24,52	35,81

Fonte: Cruiz (2017)

Tabela 3 -Valores. de 2-ΔΔCT referentes a expressão dos genes FCGR3A e ITGAM

VALORES 2-ΔΔCT								
FCGR3A								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veiculo	1,00	0,83	0,72	0,78	0,31	0,38	0,58	1,09
Noradrenalina (1 μM)	0,82	0,67	0,46	0,56	0,22	0,31	0,50	0,82
ICI 118,551 (1μM) + Noradrenalina (1 μM)	0,70	0,83	0,53	0,54	0,33	0,32	0,40	1,10
Fenoterol (1 μM)	0,87	1,16	0,62	0,81	0,28	0,33	0,57	0,85
ICI 118,551 (1μM) + Noradrenalina (1 μM)	0,81	1,26	0,53	0,70	0,22	0,27	0,31	0,99
ITGAM								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veiculo	1,01	0,55	1,83	2,12	1,83	1,56	0,76	0,63
Noradrenalina (1 μM)	1,74	0,88	2,28	1,17	2,36	2,20	1,14	0,75
ICI 118,551 (1μM) + Noradrenalina (1 μM)	2,02	1,07	1,80	1,89	1,98	1,69	0,96	0,90
Fenoterol (1 μM)	1,44	1,11	1,76	2,45	2,43	1,29	0,60	0,58
ICI 118,551 (1μM) + Noradrenalina (1 μM)	1,16	1,43	2,10	2,09	3,13	1,32	0,61	0,59

Fonte: Cruiz (2017)

Tabela 4 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes CD163 e CCR7

VALORES $2^{-\Delta\Delta CT}$								
CD163								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,00	0,07	0,33	0,16	0,05	0,03	1,06	0,61
Noradrenalina (1 μ M)	1,05	0,04	0,38	0,14	0,03	0,04	1,01	0,58
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,88	0,08	0,40	0,11	0,05	0,04	0,98	0,84
Fenoterol (1 μ M)	0,76	0,08	0,38	0,20	0,03	0,04	0,84	0,59
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,70	0,09	0,31	0,14	0,03	0,03	0,54	0,54
CCR7								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,06	173,65	12,07	1,46	4,91	2,92	0,51	6,57
Noradrenalina (1 μ M)	1,92	140,38	21,74	1,20	7,84	3,66	0,41	3,36
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	1,62	102,64	20,18	1,84	3,46	5,10	0,41	1,40
Fenoterol (1 μ M)	0,61	112,51	15,50	1,21	3,11	3,98	0,39	2,33
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	1,83	85,55	12,71	1,30	3,25	3,97	0,32	2,15

Fonte: Cruiz (2017)

Tabela 5 - Valores. de 2-ΔΔCT referentes a expressão dos genes *TGFB1* e *PPARG*

VALORES 2-ΔΔCT									
TGFB1									
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	
Veículo	1,00	1,49	1,26	0,79	0,85	1,91	1,83	1,61	
Noradrenalina (1 µM)	1,29	0,70	1,16	0,57	0,59	1,01	1,26	1,99	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	0,48	0,71	2,67	1,33	0,77	1,25	0,81	1,45	
Fenoterol (1 µM)	0,75	0,81	1,10	0,76	0,57	0,89	1,36	0,92	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,96	0,69	1,86	0,83	0,68	1,23	0,86	1,40	
PPARG									
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	
Veículo	1,16	3,55	0,89	4,45	3,02	4,75	3,11	1,88	
Noradrenalina (1 µM)	0,99	2,68	0,70	3,07	1,86	4,36	2,79	1,71	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	0,87	2,56	0,69	1,61	3,33	4,01	1,51	1,97	
Fenoterol (1 µM)	0,49	0,85	0,37	3,78	2,15	3,48	1,87	0,95	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,02	1,12	0,71	4,62	2,17	4,69	1,40	1,39	

Fonte: Cruiz (2017)

Tabela 6 - Valores de 2-ΔΔCT referentes a expressão dos genes CD1C e CD209

VALORES 2-ΔΔCT									
CD1C									
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	
Veículo	1,00	0,65	1,64	3,32	3,04	3,62	0,05	0,04	
Noradrenalina (1 µM)	0,84	0,50	1,45	2,03	3,10	3,07	0,10	0,04	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,46	0,78	2,20	3,24	3,65	4,21	0,04	0,04	
Fenoterol (1 µM)	0,63	1,07	1,33	3,88	2,19	3,47	0,05	0,03	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,01	0,79	1,79	3,01	3,26	3,97	0,08	0,02	
CD209									
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	
Veículo	1,01	0,25	1,09	0,41	0,24	0,17	0,07	0,10	
Noradrenalina (1 µM)	0,72	0,20	0,65	0,21	0,22	0,22	0,03	0,06	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,01	0,23	0,95	0,29	0,26	0,32	0,06	0,15	
Fenoterol (1 µM)	0,58	0,22	0,83	0,33	0,08	0,22	0,05	0,10	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	0,42	0,28	0,80	0,25	0,16	0,15	0,06	0,07	

Fonte: Cruz (2017)

Tabela 7 - Valores. de 2^{-ΔΔCT} referentes a expressão dos genes CD40 e CCL5

VALORES 2-ΔΔCT									
CD40									
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	
Veículo	1,00	5,03	2,84	1,83	4,09	9,26	1,17	1,69	
Noradrenalina (1 µM)	0,96	1,69	2,88	1,42	2,68	2,62	0,76	2,00	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	0,86	2,00	6,04	2,95	2,05	5,60	0,60	1,40	
Fenoterol (1 µM)	0,62	2,06	2,58	2,41	2,90	4,18	0,86	1,20	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	2,04	2,16	3,46	1,75	3,29	4,54	0,65	1,64	
CCL5									
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	
Veículo	1,00	268,26	6,62	13,04	51,41	22,05	0,77	64,82	
Noradrenalina (1 µM)	4,17	234,69	10,26	4,94	42,50	17,91	0,49	43,79	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	3,80	217,19	8,42	5,80	67,27	18,54	0,83	30,17	
Fenoterol (1 µM)	1,74	218,70	7,53	6,34	43,72	20,43	1,14	30,16	
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	2,67	242,63	5,88	7,43	45,11	17,90	0,40	35,34	

Fonte: Cruiz (2017)

Tabela 8 - Valores de 2-ΔΔCT referentes a expressão dos genes CD37 e CXCL1

VALORES 2-ΔΔCT								
CD37								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,02	0,76	0,65	0,65	0,57	1,91	4,54	2,23
Noradrenalina (1 µM)	1,25	0,26	0,41	0,29	0,24	0,65	3,06	3,13
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	0,79	0,24	1,54	0,93	0,43	1,14	1,38	2,00
Fenoterol (1 µM)	0,58	0,29	0,45	1,09	0,34	0,63	4,19	1,24
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,92	0,19	0,90	0,58	0,38	0,92	1,58	2,29
CXCL1								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,02	8,15	4,16	0,87	1,52	2,46	1,73	7,90
Noradrenalina (1 µM)	1,33	4,15	3,27	0,41	0,83	2,12	2,33	14,06
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,37	3,97	2,75	0,52	1,21	2,00	2,11	8,62
Fenoterol (1 µM)	1,00	7,59	3,03	0,48	0,86	1,97	2,31	10,09
ICI 118,551 (1µM) + Noradrenalina (1 µM)	1,13	7,92	2,59	0,50	0,79	1,57	0,94	9,62

Fonte: Cruz (2017)

Tabela 9 - Valores, de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão dos genes CD80 e ADRB2

VALORES $2^{-\Delta\Delta CT}$											
CD80											
	IDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS			
Veículo	1,34	49,40	9,55	1,15	3,25	1,44	2,63	13,03			
Noradrenalina (1 μ M)	2,80	26,56	7,85	0,59	0,67	0,69	2,58	11,25			
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	2,02	33,78	9,08	0,47	3,20	1,59	2,32	10,00			
Fenoterol (1 μ M)	2,29	34,25	8,50	1,07	2,03	0,66	1,29	8,81			
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	2,51	29,95	7,23	0,50	3,33	0,25	1,72	10,79			

ADRB2											
	IDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS			
Veículo	1,00	0,12	0,22	0,17	0,06	0,04	0,81	0,37	6,19		
Noradrenalina (1 μ M)	0,83	0,10	0,14	0,14	0,04	0,04	0,73	0,33	-		
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,89	0,11	0,11	0,09	0,05	0,04	0,76	0,38	-		
Fenoterol (1 μ M)	0,79	0,19	0,13	0,16	0,03	0,04	0,53	0,35	-		
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	0,65	0,13	0,11	0,14	0,04	0,03	0,49	0,32	-		

Fonte: Cruz (2017)

Tabela 10 - Valores. de 2- $\Delta\Delta CT$ referentes a expressão dos genes CD83 e CD86

VALORES 2- $\Delta\Delta CT$								
CD83								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,00	9,41	5,04	1,12	1,44	1,77	0,85	1,88
Noradrenalina (1 μM)	1,15	8,21	4,24	0,70	1,48	1,82	0,65	1,03
Fenoterol (1 μM)	0,73	8,40	4,22	0,74	1,21	1,68	0,44	0,80
CD86								
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	tolDCs	tolDCs LPS	tolDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS
Veículo	1,01	5,38	1,61	1,11	1,59	1,21	1,92	3,22
Noradrenalina (1 μM)	1,50	5,91	1,86	0,59	1,41	1,12	1,75	2,84
Fenoterol (1 μM)	0,79	5,30	1,27	0,76	1,27	1,07	1,19	1,59

Fonte: Cruz (2017)

Tabela 11 - Valores. de $2^{-\Delta\Delta CT}$ referentes a expressão do gene OAZ1

VALORES $2^{-\Delta\Delta CT}$										
OAZ1										
	iDCs	mDCs LPS	mDCs TNF	toIDCs	toIDCs LPS	toIDCs TNF	Macrófagos	Macrófagos LPS	Linfócitos	
Veículo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00	
Noradrenalina (1 μ M)	1,00	1,02	1,00	1,00	1,00	1,00	1,09	1,00	-	
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	-	
Fenoterol (1 μ M)	1,00	1,00	1,00	1,02	1,00	1,00	1,01	1,00	-	
ICI 118,551 (1 μ M) + Noradrenalina (1 μ M)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00	1,01	-	

Fonte: Cruz (2017)

anexos

“Train yourself to let go of everything you fear to lose”

Yoda

ANEXOS**ANEXO A – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** **MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO DO DOADOR PARA COLETA DE PLAQUETAS E REMOÇÃO DA CÂMARA LRS**

No. Triagem: _____

CONSENTIMENTO PARA COLETA DE PLAQUETAS POR AFÉRESE

Foi-me explicado sobre o procedimento e entendo que se trata da remoção contínua de sangue de uma veia do braço, remoção das plaquetas pelo equipamento e retorno do restante de meu sangue para mim, na mesma veia ou por veia do outro braço. Foi-me informado que este procedimento é seguro, que demorará cerca de 1 hora e meia e que meu sangue só entrará em contato com o circuito plástico (kit) estéril e descartável do equipamento.

Eu entendo que, para não ocorrer coagulação do sangue durante o procedimento, meu sangue será anticoagulado ao entrar na máquina de aférese. O produto anticoagulante é o ACD (à base de citrato de sódio), que é rapidamente destruído pelo fígado, fazendo com que seu efeito anticoagulante seja transitório.

Estou ciente que durante o procedimento posso apresentar: dor de cabeça, náusea, queda transitória na pressão arterial, sensação de formigamento no rosto (lábios) ou dedos.

Foi-me informado que as plaquetas que vou doar não me farão falta.

-AUTORIZO ESTA COLETA DE PLAQUETAS POR AFÉRESE.

Autorizo também, que no final da coleta, seja feita a remoção de parte do kit descartável de aférese (câmara LRS), contendo meu sangue residual rico em leucócitos, para ser fornecido gratuitamente para laboratórios que realizam pesquisa na área médica.

Data: ____/____/____ Assinatura do Doador: _____