ESTEVAM JOSÉ BALDON

**INFLUÊNCIA DA Hsp65 DE *Mycobacterium leprae* SOBRE O
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E RESPOSTA IMUNE DE
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

Estevam José Baldon

**INFLUÊNCIA DA Hsp65 DE *Mycobacterium leprae* SOBRE O
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E RESPOSTA IMUNE DE
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant’Anna

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Valquiria Bueno

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Baldon, Estevam José.

Influência da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* sobre o processo de envelhecimento e resposta imune de camundongos geneticamente selecionados / Estevam José Baldon. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant Anna.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Ação de proteínas de choque térmico sobre processo de envelhecimento.

Versão do título para o inglês: *Mycobacterium leprae* Hsp65 influences over the aging process and immunological response of aged genetically selected mice.

1. Imunologia celular 2. Envelhecimento 3. Anticorpos
4. Proteínas do choque térmico 5. Sobrevivência animal I. Sant Anna, Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0210/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Estevam José Baldon.

Título da Tese: Influência da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* sobre o
processo de envelhecimento e resposta imune de
camundongos geneticamente selecionados.

Orientador(a): Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant Anna.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **016** nas fls. **99** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Oswaldo Augusto Brazil Esteves Sant`Anna**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Fatores genéticos e ambientais que atuam na influência da Hsp65r de Mycobacterium leprae sobre o processo de envelhecimento e resposta imune de camundongos geneticamente selecionados"* do qual participam o(s) alunos **Estevam José Baldon** e o pesquisador **Marcelo De Franco**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **15.02.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Fatores genéticos e ambientais que atuam na influência da Hsp65r de *Mycobacterium leprae* sobre o processo de envelhecimento e resposta imune de camundongos geneticamente selecionados” **protocolo nº 809/11**, sob a responsabilidade de Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna e Estevam José Baldon, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/03/2011.

We certify that the research entitled “Genetic and environmental factors that act on the effect of *Mycobacterium leprae* rHsp65 in aging process and immune response of genetically selected mice”, **protocol nº 809/11**, under the responsibility of Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna and Estevam José Baldon, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/10/2011.

Vigência do Projeto: 04/2011 – 12/2014	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunoquímica	496 camundongos – HIII, LIII, F ₁ (F ₁ H e F ₁ L)

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Aos meus preciosos amigos, cientistas ou não, que tornaram o desenvolvimento de minha vida acadêmica e científica tão prazerosa quanto da vida pessoal. Que prazer fazer aquilo que se gosta sem se cansar!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, pelos conselhos distribuídos ao longo de todos esses anos, ensinando-me a desenvolver a pesquisa científica e, acima de tudo, que a ciência deve ser feita para a sociedade e não para satisfação própria.

À minha mãe Nely, pelo apoio incondicional e por sempre se preocupar e acreditar no meu desenvolvimento profissional.

Aos amigos e mais que amigos: Mariana, Felipe Guidolin, André, Michel, Karina, Luciana, Eliana. Através de amizade sincera, críticas, elogios, paciência e uma convivência fantástica, construí uma formação intelectual e emocional sólida. Meus mais sinceros agradecimentos a vocês!

À Dra. Valquiria Bueno pela ajuda na discussão de tantos resultados e por indicar diferentes caminhos a serem tomados!

À Dra. Denise Vilarinho Tambourgi, diretora do Laboratório de Imunoquímica, pela oportunidade de desenvolver o trabalho nesse laboratório, e aos demais alunos e funcionários pela excelente convivência e momentos prazerosos durante o café da tarde!

À banca de qualificação e à comissão julgadora, por participarem dessa nova etapa de minha vida científica.

À Dra. Nancy Starobinas, por estar sempre disponível para conversar sobre as linhagens de camundongos utilizadas e cedê-las para o trabalho.

Ao Instituto Butantan, por ser um centro de excelência em pesquisa científica e que foi fundamental ao desenvolvimento da pesquisa.

À FAPESP e CNPq pelo financiamento que tornou possível o desenvolvimento do projeto.

“O conhecimento não tem pressa”.

Osvaldo Augusto B. E. Sant’Anna

“Existem muitas hipóteses em ciência
que estão erradas. Isso é perfeitamente
aceitável, elas são a abertura para achar
as que estão certas”.

Carl Sagan

RESUMO

BALDON, E. J. **Influência da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* sobre o processo de envelhecimento e resposta imune de camundongos geneticamente selecionados.** 2013. 139 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As proteínas de choque térmico (Hsp), moléculas conservadas em todos os organismos, vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de tratamentos para autoimunidades e tumores. Contudo, o mecanismo de ação dessas proteínas em processos crônico-degenerativos ainda não foi completamente esclarecido, uma vez que elas podem estar envolvidas no agravamento autoimune e inflamatório, interferindo também no processo da imunosenescência. Dados prévios mostraram que fêmeas da linhagem H_{III} de 9 meses de idade apresentam redução da sobrevida após a administração intraperitoneal de Hsp65 de *M. leprae*, o mesmo não ocorrendo em machos de mesma idade ou em fêmeas da linhagem L_{III}. Buscando entender a interferência da Hsp65 no sistema imune durante o processo de envelhecimento nessa linhagem, realizamos a fenotipagem de leucócitos do baço e do sangue em fêmeas H_{III} envelhecidas após a administração de 2,5 µg/animal da Hsp65. Adicionalmente, utilizando-se de camundongos híbridos provenientes de cruzamentos recíprocos das linhagens da Seleção III, a saber, F₁H [♀H_{III} x ♂L_{III}] e F₁L [♀L_{III} x ♂H_{III}], investigou-se a influência da constituição genética envolvida na susceptibilidade à Hsp65 através de análises do tempo médio de sobrevida, produção de anticorpos anti-Hsp65 e alterações celulares. No baço, ♀H_{III} envelhecidas apresentaram aumento de da expressão de CD45RA e CD154 na superfície de linfócitos CD4⁺, redução de CD44 em linfócitos CD8⁺ e aumento da porcentagem de células B, sem alterações em macrófagos e células dendríticas. No sangue, a administração da Hsp65 em ♀H_{III} envelhecidas acarretou em maior frequência de CD11c⁺ e da expressão de CD11b e CD11c na superfície de granulócitos, enquanto a expressão de CD80, CD86, CD14 e TLR4 não foi alterada. O tempo médio de sobrevida em ♀F₁H injetadas com Hsp65 foi menor em relação ao grupo controle, havendo semelhança na variância ambiental e no tempo entre as mortes em relação aos dados obtidos anteriormente em ♀H_{III}. Fêmeas F₁L, ♂F₁H e ♂F₁L não apresentaram alterações de sobrevida; a produção de IgG anti-Hsp65 aumentou nos ♂F₁ tratados, e a de IgM anti-Hsp65 foi maior nos animais inoculados com a Hsp65, independentemente do sexo. Em contraste à baixa ativação celular em ♀H_{III}, ♀F₁H e ♀F₁L envelhecidas inoculadas com a Hsp65 apresentaram aumento das porcentagens de linfócitos T CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD154⁺, CD8⁺, CD8⁺CD44⁺ e de células CD11c⁺, e maior expressão de CD154, CD44 e CD86; machos não exibiram alterações celulares significativas. Conclui-se que a inoculação da Hsp65 induz, *in vivo*, ativação do sistema imune principalmente em fêmeas envelhecidas H_{III} e F₁, indicando a ação fisiológica da molécula e sua capacidade de modular características imunológicas; a susceptibilidade à proteína pode ser dada pela interação entre um efeito específico no sexo feminino somado à influência genética da linhagem H_{III}.

Palavras-chave: Hsp65. *Mycobacterium leprae*. Processo de Envelhecimento. Produção de Anticorpos. Fenotipagem celular. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

BALDON, E. J. *Mycobacterium leprae* Hsp65 influences over the aging process and immunological response of aged genetically selected mice. 2013. 139 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The heat shock proteins (Hsp), conserved molecules among the evolutionary scale, have been used for the development of autoimmunities and tumors treatments. However, the mechanism of action of these proteins in chronic-degenerative processes has not been fully enlightened, since they may be involved in worsening of autoimmune and inflammation, also interfering in immunosenescence. Previous data showed that 9-mo female H_{III} mice showed reduced survival after *M. leprae* Hsp65 intraperitoneal administration, which did not occur in aged males H_{III} or female L_{III} mice. In order to understand the interference of Hsp65 in the immune system during the aging process, we performed a phenotypic analysis of leukocytes from spleen and blood of aged H_{III} females after administration of 2.5µg/animal of Hsp65. Additionally, using hybrid mice originated of reciprocal crosses from Selection III strains, namely F₁H [♀H_{III} x ♂L_{III}] and F₁L [♀L_{III} x ♂H_{III}], we investigated the genetic influence in Hsp65 susceptibility through analysis of the mean survival time, anti-Hsp65 antibody production and cellular changes in these mice. In the spleen, aged ♀H_{III} showed increased expression of CD45RA and CD154 in CD4 T lymphocytes, reduction of CD44 in CD8 T lymphocytes and augmented frequency of B cells. In the blood, the administration of Hsp65 in aged ♀H_{III} resulted in amplified occurrence of CD11c and expression of CD11c and CD11b in granulocytes, whereas the expression of CD80, CD86, CD14 and TLR4 did not change. The survival of aged ♀F₁H injected with Hsp65 was reduced compared to the control group, with similar environmental variance and the time between the deaths related to data previously obtained in ♀H_{III}. ♀F₁H, ♂F₁H e ♂F₁L showed no changes in survival; the anti-Hsp65 IgG production increased in ♂F₁ male mice injected with the protein, and the anti-Hsp65 IgM was increased after injection regardless of gender. In contrast, ♀F₁H and ♀F₁L mice showed increased percentage of CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD154⁺, CD8⁺, CD8⁺CD44⁺ and CD11c⁺ cells, with augmented expression of CD154, CD44 and CD86; male mice did not present any significant changes in cellularity. We concluded that the inoculation of *M. leprae* Hsp65 induces in vivo, activation of the immune system, especially in aged H_{III} and F₁ female mice, indicating the physiological actions of the molecule and its ability to modulate immunological characteristics. The susceptibility to the protein can be given by the interaction between specific gender effects in females and some genetic influence of the H_{III} strain.

Keywords: Hsp65. *Mycobacterium leprae*. Aging process. Antibody production. Cell phenotyping. Flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura e funcionamento da chaperonina GroEL-GroES	23
FIGURA 2 – Plano de acasalamentos recíprocos para obtenção dos camundongos híbridos.....	38
FIGURA 3 – Número total de células do baço de ♀H _{III} envelhecidas antes e após a inoculação da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	44
FIGURA 4 – Fenotipagem de linfócitos T CD4 esplênicos em ♀H _{III} envelhecidas	45
FIGURA 5 – Expressão de CD45RA, CD154 e CD28 na superfície de linfócitos T CD4 esplênicos em ♀H _{III} envelhecidas	46
FIGURA 6 – Análise de linfócitos T CD8 em ♀H _{III} envelhecidas antes e após a administração da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	47
FIGURA 7 – Frequência e estado de ativação de linfócitos B em ♀H _{III} envelhecidas antes e após a administração da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	48
FIGURA 8 – Fenotipagem de células dendríticas esplênicas em ♀H _{III} envelhecidas ...	49
FIGURA 9 – Expressão de CD11b e CD11c em esplenócitos em ♀H _{III} envelhecidas .	49
FIGURA 10 – Frequência de linfócitos T e B e de células <i>natural killer</i> (NK) na população de linfócitos do sangue de ♀H _{III} envelhecidas	50
FIGURA 11 – Fenotipagem de monócitos do sangue em ♀H _{III}	51
FIGURA 12 – Frequência de neutrófilos no sangue de ♀H _{III} inoculadas com Hsp65 ..	52
FIGURA 13 – Curvas de sobrevivência de fêmeas e machos F ₁ H e F ₁ L após a inoculação da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	55

FIGURA 14 – Produção de anticorpos IgG anti-Hsp65 em híbridos F ₁ H e F ₁ L.....	56
FIGURA 15 – Produção de anticorpos IgM anti-Hsp65 em híbridos F ₁	57
FIGURA 16 – Análise dos linfócitos T CD4 e seus marcadores de ativação após a inoculação da Hsp65 em híbridos F ₁	58
FIGURA 17 – Fenotipagem de linfócitos T CD8 após tratamento com Hsp65 em híbridos F ₁	59
FIGURA 18 – Fenotipagem de linfócitos B em camundongos híbridos F ₁	60
FIGURA 19 – Fenotipagem de macrófagos esplênicos no baço de híbridos F ₁ após inoculação da Hsp65	61
FIGURA 20 – Porcentagem de células dendríticas no baço de animais envelhecidos F ₁ inoculados com Hsp65.....	62
FIGURA 21 – Fenotipagem dos receptores de superfície de células dendríticas em híbridos envelhecidos F ₁	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Tempo médio de sobrevivência de fêmeas F₁H e F₁L inoculadas com Hsp65 aos 9 meses de idade 54

TABELA 2 – Compilação dos resultados obtidos da fenotipagem celular e produção de anticorpos anti-Hsp65 de ♀H_{III} e híbridos F₁ envelhecidos aos 7 dias da inoculação da Hsp65 de *M. leprae*..... 64

TABELA 3 – Compilação dos resultados obtidos da fenotipagem celular e produção de anticorpos anti-Hsp65 de ♀H_{III} e híbridos F₁ envelhecidos aos 14 dias da inoculação da Hsp65 de *M. leprae*..... 65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Anticorpos monoclonais (BD Pharmigen™) utilizados para fenotipagem de células esplênicas de fêmeas H _{III} e machos e fêmeas F ₁ H e F ₁ L após a inoculação da Hsp65	39
QUADRO 2 – Anticorpos monoclonais (BD Pharmigen™) utilizados para fenotipagem celular do sangue de fêmeas H _{III} envelhecidas.....	40
QUADRO 3 – Anticorpos monoclonais utilizados para fenotipagem celular do baço de machos e fêmeas F ₁ H e F ₁ L no processo de envelhecimento.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – células apresentadoras de antígeno

ATP – adenosina trifosfato

BCR – receptor de linfócito B

BSA – bovine serum albumine (soroalbumina bovina)

D.O. – densidade óptica

DC – células dendríticas

DMBA – 7,12-dimetilbenz[α]antraceno

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Hsp – proteínas de choque térmico

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular-1

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G1

IgG2a – Imunoglobulina G2a

IgM – Imunoglobulina M

IL – interleucina

INF- γ – interferon- γ

iNOS – isoforma induzível de óxido nítrico sintase

LPS – lipopolissacarídeo

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MIF – mediana de intensidade de fluorescência

NF- κ B – nuclear factor kappa B

NK – natural killer

NO – óxido nítrico

NZB – camundongos New Zeland Black

NZW – camundongos New Zeland White

PBS – Phosphate buffer solution (solução tampão de fosfato)

QTL – quantitative trait loci / loci de características quantitativas

TCR – receptor de linfócito T

Th – células T auxiliaadoras

TLR – receptor do tipo Toll

TMB – 3,3',5,5'-Tetrametillbenzidina

TMS – tempo médio de sobrevivência

TPA – 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

VA – variância ambiental

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular-1

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

kDa – kilodalton

λ – comprimento de onda

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

nm – nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Proteínas de choque térmico (Hsp)	21
1.2 Hsp relacionada a processos crônico-degenerativos	25
1.3 Imunosenescência	28
1.4 Linhagens da Seleção III como modelo de estudo da Hsp65	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Obtenção e purificação da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	37
4.2 Animais	37
4.3 Análise quantitativa e qualitativa dos fenótipos celulares do baço após a inoculação da Hsp65r nativa de <i>M. leprae</i> em fêmeas H _{III} e híbridos F ₁ H e F ₁ L envelhecidos	38
4.4 Análise quantitativa e qualitativa dos fenótipos celulares no sangue de fêmeas H _{III} envelhecidas após a inoculação da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	39
4.5 Análise da sobrevivência de híbridos F ₁ após a inoculação da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	40
4.6 Análise da produção de anticorpos IgG e IgM em híbridos F ₁ após a inoculação da Hsp65	41
4.7 Caracterização das populações celulares do baço no processo de envelhecimento de camundongos híbridos F ₁ H e F ₁ L	41
4.8 Análises Estatísticas	42
5 RESULTADOS	44
5.1 Fenotipagem celular de leucócitos esplênicos após a inoculação da Hsp65 nativa de <i>M. leprae</i> em fêmeas H _{III} envelhecidos	44
5.2 Fenotipagem de células do sangue após a inoculação da Hsp65 de <i>M. leprae</i> em fêmeas H _{III} envelhecidas	50
5.3 Análise da sobrevivência de híbridos F ₁ H e F ₁ L após a inoculação da Hsp65 de <i>M. leprae</i>	52
5.4 Análise da produção de anticorpos IgG e IgM anti-Hsp65 em híbridos F ₁	55
5.5 Fenotipagem celular de leucócitos esplênicos após a inoculação da Hsp65 nativa de <i>M. leprae</i> em híbridos F ₁ envelhecidos	57

6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	92
APÊNDICE A – Gates para análise fenotípica de linfócitos esplênicos de fêmeas H _{III} e híbridos F ₁	92
APÊNDICE B – Esquema de análise celular no sangue de ♀H _{III} envelhecidas	93
APÊNDICE C – Esquema de obtenção das populações celulares avaliadas durante o processo de envelhecimento de fêmeas H _{III} e híbridos F ₁	94
APÊNDICE D - Resumo apresentado em congresso nacional: “Aged [H _{III} xL _{III}]F ₁ hybrid mice immunoresponse to <i>M. leprae</i> Hsp65” no XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, Campos do Jordão, Brazil, 2012.	95
APÊNDICE E - Resumo publicado em anal de congresso internacional: “How <i>M. leprae</i> Hsp65 influences the imune response in genetically selected aged mice?” no 15th International Congress of Immunology (ICI), 2013.	96
APÊNDICE F - Resumo apresentado em congresso nacional: “How <i>M. leprae</i> Hsp65 influences the imune response in genetically selected aged mice?” XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, Natal, Brazil, 2013.	97
APÊNDICE G - Artigo científico publicado: “The role of <i>M. leprae</i> Hsp65 protein and peptides in the pathogenesis of Uveitis”, Autoimmune Dis. 2012;2012:197648. doi: 10.1155/2012/197648. Epub 2012 Aug 27.	98
APÊNDICE H – Artigo científico submetido para publicação na revista Immunity & Aging: “ <i>Mycobacterium leprae</i> Hsp65 administration reduces the lifespan of aged high antibody producer mice”	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas de choque térmico (Hsp)

Os organismos são frequentemente expostos a fatores ambientais estressantes, como alterações de temperatura, contato com toxinas, influências hormonais e processos inflamatórios e infecções, dependendo da capacidade fisiológica intrínseca em readquirir a homeostase para sobreviverem. A resposta a esses estímulos é caracterizada por alterações fisiológicas drásticas, incluindo a produção de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - Hsp) (POCKLEY, 2003; SRIVASTAVA, 2002b; WELCH, 1993), observada em todas as células, em organismos procariotos e eucariotos, indicando uma resposta biológica crítica para a homeostase (LINDQUIST, 1986). Essas moléculas foram descobertas quando Ferruccio Ritossa notou a expressão diferencial de genes nas glândulas salivares de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao aumento de temperatura (RITOSSA, 1962). Porém, o termo *heat shock protein* foi proposto após a observação do aumento dessas proteínas com o acréscimo de 5 °C na temperatura corpórea do inseto (TISSIERES; MITCHELL; TRACY, 1974). As Hsp são essenciais à viabilidade celular e, em condições fisiológicas, constituem cerca de 5% do total de proteínas intracelulares (BUKAU; HORWICH, 1998; GEORGOPOULOS, 1992). Contudo, seus níveis encontram-se até quintuplicados mediante a situações de estresse que levam a alterações proteicas, ocorrendo o retorno a níveis basais da proteína após a resolução dessas condições estressantes (ZUGEL; KAUFMANN, 1999). A produção dessas moléculas no organismo deve ser extremamente controlada, pois a persistência de grande quantidade pode induzir mudanças em funções intracelulares e homeostáticas além de induzir morte celular (POCKLEY, 2003).

As Hsp são classificadas de acordo com a massa molecular aproximada e seus graus de homologia sendo observadas variações intra- e interespécies dessas moléculas (POCKLEY, 2003; SRIVASTAVA, 2002b). Como principal função fisiológica, atuam como chaperonas moleculares e proteases, características relacionadas à proteção e manutenção da homeostase celular, assegurando que proteínas estejam em sua conformação correta e funcionais ou que sejam degradadas quando necessário (HARTL; HAYER-HARTL, 2002; HIGHTOWER, 1991; TISSIERES; MITCHELL; TRACY, 1974). Fisiologicamente, o enovelamento, oligomerização, transporte e degradação de proteínas requerem que elas tenham, temporariamente, uma conformação parcialmente estruturada ou denaturada e, como

consequência, algumas regiões ficam aptas à interação com outras proteínas. O descontrole nesse processo causa um fenômeno prejudicial denominado agregação proteica, comumente observada no envelhecimento (COHEN, 2012). São nesses passos que as proteínas de choque térmico citosólicas atuam, interagindo com proteínas em vias de agregação, polipeptídeos não nativos ou com proteínas destinadas a degradação. As Hsp70 coordenam funções celulares direcionando substratos para desenovelamento, desagregação, enovelamento ou degradação; as Hsp90 agem em estágios mais tardios de enovelamento de proteínas importantes na sinalização celular e na proteólise (SAIBIL, 2013).

A família das Hsp de 60 kDa, denominada chaperoninas, inclui moléculas abundantes e evolutivamente conservadas em todos os organismos, apresentando como funções fisiológicas, na dependência de ATP, a capacidade de enovelamento e estruturação proteica em fases mais precoces da produção, além de participarem da regulação do tráfego intracelular e translocação molecular através das membranas celulares (TOWER, 2009). Essas proteínas, acompanhadas pelas co-chaperoninas, formam um complexo simétrico, onde os locais de ligação ao substrato e/ou nucleotídeos estão protegidos dentro de cavidades onde ocorrem os dobramentos proteicos; o complexo mais conhecido é o presente na *Escherichia coli*: GroEL-GroES (FIGURA 1) (HORWICH; FENTON, 2009). A Hsp65 de *Mycobacterium leprae*, proteína utilizada nesse estudo, tem massa molecular de aproximadamente 57 kDa, o que a inclui na família das chaperoninas (ELLIS; VAN DER VIES, 1991), sendo considerada a principal molécula de micobactérias responsáveis pela ativação do sistema imune (THOLE et al., 1988).

FIGURA 1 – Estrutura e funcionamento da chaperonina GroEL-GroES.

(A) Estrutura cristalina do complexo GroEL-GroES evidenciando a porção de ligação com a GroES (cis) e o anel oposto (trans). (B) Esquema da maquinaria resumindo as mudanças conformacionais de substratos proteicos durante o processo de estruturação. (1) O substrato proteico é encaminhado pelo complexo DnaK-DnaJ até a GroEL; após ligação, o substrato sofre desdobramento local. (2) O movimento do domínio ATP-dependente da porção apical da GroEL resulta em alongamento de regiões fortemente ligadas do substrato e na liberação e compactação parcial das regiões menos estáveis. (3) A compactação é completada após a encapsulação da sequência peptídica pela GroES. (4) Estruturação da proteína no interior da chaperonina. (5) Liberação do substrato após dissociação da GroES. (6) Nova ligação caso não tenha ocorrido uma estruturação completa da proteína. N= estado nativo; I= estruturação intermediária; ADP= adenosina difosfato; ATP= adenosina trifosfato. **FONTE:** Hartl e Hayer-Hartl (2009).

A capacidade de ligação das Hsp a proteínas também permite realizar o transporte de peptídeos concomitante à produção de estímulos para APCs (células apresentadoras de antígenos) que, subsequentemente, podem ativar linfócitos T antígeno-específicos, estimulando a imunogenicidade de polipeptídeos heterólogos ligados ou não ligados covalentemente as Hsp (ANDERSON; SRIVASTAVA, 2000; SRIVASTAVA, 2002a; SUZUE et al., 1997). Assim, são consideradas adjuvantes naturais, pois estimulam a internalização e apresentação, via moléculas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I ou II, de antígenos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, indução da iNOS (isoforma induzível de óxido nítrico sintase) e produção de NO (óxido nítrico) por macrófagos e DC (células dendríticas) (LEHNER et al., 2000; MORE; BRELOER; VON BONIN, 2001).

Acreditava-se que as proteínas de choque térmico apresentavam exclusivamente funções intracelulares quando em situação de homeostase. Atualmente, sabe-se que as Hsp60 também são localizadas no meio extracelular e, conseqüentemente, associadas às membranas celulares (GUPTA; KNOWLTON, 2007; MERENDINO et al., 2010; SHAMAEI-TOUSI et al., 2007). Uma vez fora das células, as Hsp60 entram em contato com leucócitos, levando à ativação e regulação de funções celulares, transdução de sinais, manutenção do ciclo celular e

apoptose. A questão que permanece é como, quando e por que essas moléculas são liberadas para o exterior das células em diversos contextos imunes, principalmente naqueles associados ao desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas.

A descoberta de que as Hsp induzem ativação celular conduziu à pesquisa de possíveis receptores e ligantes, sugerindo papéis imunorreguladores distintos para essas moléculas. Essas proteínas são reconhecidas por TCR (receptor de linfócito T), BCR (receptor de linfócito B) e TLR (receptores do tipo *Toll*), o que evidencia sua ampla ação sobre células potencialmente imunocompetentes (VAN EDEN et al., 2007). O efeito adjuvante é observado quando as Hsp ativam TLR em células do sistema imune inato, particularmente macrófagos e DCs, ou quando atuam como carreadoras para apresentação de antígenos via moléculas do MHC, aumentando a expressão de moléculas coestimuladoras e ativação de APCs e melhorando a indução da imunidade adquirida (ASEA, 2006; HENDERSON; LUND; COATES, 2010; MURSHID et al., 2011). As Hsp60 e Hsp70 são ligantes de TLR-2 e TLR-4, importantes receptores mediadores da resposta imune inata (VABULAS et al., 2002). Em estudo envolvendo a resposta comparativa entre a estimulação celular pela Hsp60 de *Chlamydia* ou LPS, monócitos e macrófagos aumentaram a secreção de citocinas pró-inflamatórias dependente da ligação dessas proteínas ao CD14; em contraste a GroEL de *E. coli* e a Hsp65 de *M. tuberculosis* estimularam monócitos humanos independentemente da ligação com esse receptor (KOL et al., 2000). Além disso, já foi demonstrado que linfócitos T são ativados por Hsp via TLR-4 (CARAMALHO et al., 2003).

O reconhecimento das proteínas de choque térmico por receptores celulares demonstra a variabilidade intra- e interespecie da ação fisiológica da Hsp quanto à proliferação celular, reatividade de células T e produção de citocinas. Tais diferenças, por exemplo, são relacionadas ao perfil genético de linhagens de camundongos BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b), e C3H/HePas (H-2^k) como demonstrado pelos estudos abaixo citados. Na linhagem C57BL/6 obteve-se resposta proliferativa induzida principalmente por peptídeos da porção N-terminal e intermediários da Hsp60 murina; a produção de interferon- γ (INF- γ) foi induzida por diferentes regiões da molécula nas 3 linhagens estudadas e a IL-10 e IL-4 foram identificadas somente em C3H/HePas e BALB/c (LUNA et al., 2007). As Hsp também induzem a expressão de moléculas de adesão, normalmente quando liberadas em eventos de necrose celular. Nesse caso, a presença extracelular pode induzir resposta pró-inflamatória, aumentando a expressão de E-selectina, ICAM-1 (molécula de adesão intracelular-1) e

VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) em células endoteliais, de músculo liso e macrófagos (KOL et al., 1999; KOL et al., 2000).

1.2 Hsp relacionada a processos crônico-degenerativos

Os estudos que demonstram a relação das Hsp e a ativação imune oferecem um importante campo de investigação da interação do sistema imune com Hsp próprias ou de origem microbiana, apresentando essas moléculas não somente como proteínas reguladoras da produção intracelular, mas também exibindo funções distintas e complexas num panorama sistêmico. As Hsp65 de micobactérias apresentam mais de 97% de homologia entre os procariontes e mais de 70% de homologia com a Hsp60 humana (RAJAIAH; MOUDGIL, 2009), explicando porque pode ocorrer a resposta antigênica e reconhecimento cruzado com as proteínas de vertebrados após a interação com as Hsp60 bacterianas (OLDSTONE, 1987). Ainda, verificou-se que a diferença entre a Hsp60 humana e Hsp65 de micobactérias compreende regiões da molécula de epítomos reconhecidos por células T (KONG et al., 1993). Essa relação de **mimetismo molecular**, no qual determinantes antigênicos comuns são compartilhados por potentes antígenos não próprios e proteínas próprias altamente conservadas de mamíferos, também é afetada pela condição ambiental do indivíduo; as alterações do sistema imune no envelhecimento podem propiciar um aumento de mimetismo molecular, resultando no desenvolvimento de autoimunidades (ALARD et al., 2007; PERSCHINKA et al., 2003).

Devido à sua alta indução em eventos de estresse celular, as Hsp tornam-se alvos de respostas imunes e interferem nesses processos, como descrito na interação entre as proteínas de parasita e o sistema imune do hospedeiro (MARESCA; KOBAYASHI, 1994) e autoimunidades como nas doenças de Behçet, uveíte e lúpus eritematoso sistêmico (STANFORD et al., 1994; STEPHANOU; LATCHMAN; ISENBERG, 1998). O início de respostas imunes celulares e humorais dado por Hsp próprias ou microbianas é um componente crítico de eventos imunes relacionados à indução e manutenção de muitas doenças como artrite autoimune induzida por adjuvantes, aterosclerose, diabetes e encefalomielite autoimune experimental (revisado por RAJAIAH; MOUDGIL, 2009). Nesses casos, as Hsp podem ativar macrófagos e células dendríticas através de sua ligação aos receptores específicos anteriormente descritos (FLOHE et al., 2003) e essas respostas imunes iniciais às Hsp podem, por sua vez, induzir uma resposta de anticorpos direcionada a alvos

específicos como órgãos ou tecidos, podendo ativar mecanismos patogênicos. Além disso, a maior quantidade de Hsp-própria produzida durante eventos estressantes induzidos por Hsp exógenas pode induzir e propagar um evento inflamatório, constituindo um microambiente propício à migração e ativação de células imunes e anticorpos, alterando o padrão de processamento de antígenos e levando ao reconhecimento de antígenos crípticos, gerando autoimunidades (MOUDGIL; DURAI, 2008). A Hsp65 também está envolvida em respostas imunes em infecções por *E. coli*, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia* spp. (CHMIELA et al., 2003; MAYR et al., 1999), câncer de mama (WANG et al., 2010) e inflamação induzida por traumas (GEORGE et al., 2003).

Entretanto, apesar das Hsp induzirem e prolongarem a duração de algumas condições patológicas, essas moléculas também possuem atributos imunorreguladores e são usadas na tentativa da modulação de desordens imunes. Seus mecanismos reguladores incluem a indução de tolerância, desvio para um padrão Th2 de produção de citocinas, supressão da resposta Th17, indução de apoptose de células T autorreativas patogênicas e ativação e expansão de células T reguladoras. Curiosamente, a Hsp65 participa na regulação nas autoimunidades onde ela também é definida como gatilho (RAJAIAH; MOUDGIL, 2009). As condições que controlam o balanço entre regulação e indução são indefinidas. Porém, sabe-se que na artrite induzida por adjuvantes, células T, que antes conferem proteção à doença, quando primadas por epítomos altamente conservados de Hsp65 de micobactérias tornam-se autorreativas após reestimulação *in vitro*. Esses linfócitos T autoproliferativos tem a capacidade de induzir a produção de IL-4, IL-10 e INF- γ e de expressar B7.2, mostrando que essas células tem a capacidade de reduzir a inflamação apesar do seu fenótipo autorreativo (PRAKKEN et al., 2003). Além de autoimunidades, o uso da Hsp65 no controle de tumores passa por fase III de testes clínicos para o tratamento de carcinoma colorretal metastático, melanoma metastático, linfoma não-Hodgkin, adenocarcinoma pancreático e carcinomas de células renais (REITSMA; COMBEST, 2012), demonstrando a capacidade eficiente dessa molécula no controle de respostas autoimunes ou na ativação direcionada em tumores.

A ação da Hsp65 de *M. leprae* em processos autoimunes já iniciados no organismo vem sendo estudada por nosso grupo utilizando modelos de camundongos lúpicos e de uveíte autoimune experimental. Os resultados indicam a participação da Hsp65 no agravamento dessas doenças e a interferência da proteína no equilíbrio endógeno do sistema imunobiológico. A inoculação da Hsp65 de *M. leprae* reduz em 46% o tempo médio de sobrevida de camundongos lúpicos (fêmeas F₁[NZBxNZW]), com um aumento da razão

IgG2a/IgG1 de anticorpos anti-DNA; ainda, o soro desses animais injetados com a proteína induz necrose em macrófagos de camundongos BALB/c, demonstrando toxicidade. Os efeitos da molécula nativa correlacionam-se com a idade, são dose-dependentes e dependente do peptídeo da Hsp65 utilizado, já que a administração da molécula mutante (K⁴⁰⁹A Hsp65) é capaz de atenuar o efeito deletério da proteína nativa (MARENGO et al., 2008; MARENGO et al., 2011). Na uveíte autoimune experimental, doença inflamatória intraocular mediada por células T, a inoculação da Hsp65 de *M. leprae* conduziu a um agravamento da doença que se associou à expansão de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-17⁺, indicando que a proteína é capaz de quebrar a homeostase para um estado patogênico, promovendo respostas do tipo Th1 e Th17 (MARENGO et al., 2009). Como no lúpus murino, o efeito também é dependente do peptídeo, e a molécula K⁴⁰⁹A aumenta a produção de IL-10 e diminui as porcentagens de células CD4⁺IFN- γ ⁺, reduzindo o estado da doença (COMMODARO et al., 2012). Esses estudos sustentam o conceito que as respostas imunes contra as Hsp são importantes na exacerbação, perpetuação ou mesmo no controle de doenças autoimunes órgão-específicas.

Com base nas observações do efeito da Hsp65 em doenças autoimunes, nosso grupo caracterizou o papel da proteína na resposta de anticorpos e sobrevida de camundongos geneticamente selecionados da Seleção III (H_{III} e L_{III}) e envelhecidos onde verificou-se a redução da sobrevida de fêmeas H_{III} quando inoculadas com a Hsp65 nativa, mais evidente em animais envelhecidos (9 meses de idade) que em adultos (3 meses de idade), em relação ao grupo controle e ao inoculado com a K⁴⁰⁹A Hsp65. A morte das fêmeas H_{III} envelhecidas, que ocorre entre 18 e 45 dias após a inoculação, segue o mesmo padrão apresentado por fêmeas lúpicas F₁[NZBxNZW], de maneira repentina e sem sinais clínicos como ascite ou piloericação; ressalta-se que machos envelhecidos das linhagens H_{III} e L_{III} não apresentam alterações na sobrevivência após a inoculação das proteínas. Ainda, não há alteração na produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA ou anti-Hsp65; análises histopatológicas aos 14 dias pós-injeção não indicaram alterações morfológicas importantes nesses animais. Os resultados indicam a interferência da Hsp65 em animais mais velhos, principalmente em fêmeas constitutivamente boas produtoras de anticorpos, mesmo sem uma produção marcadamente alterada de anticorpos contra a proteína (BALDON, 2010).

1.3 Imunosenescência

Progressos na medicina, melhorias nas políticas de saúde pública e o desenvolvimento socioeconômico possibilitaram a redução da taxa de mortalidade e aumento da expectativa de vida da população (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ; SIGNER, 2009). O processo de senescência, caracterizado por um declínio na habilidade do organismo em manter a homeostase ou de adaptar-se ao ambiente, é dependente de mudanças ao longo da vida que promovem variações de longevidade de uma espécie (HASLER; ZOUALI, 2005; JAENISCH; BIRD, 2003; LITHGOW, 2006; TOWER, 2009). O envelhecimento já foi considerado um processo estocástico com declínio progressivo; entretanto, a descoberta de vias metabólicas capazes de modular esse processo mudou tal visão. Três principais fatores influenciam a taxa da senescência, contribuindo para a manutenção da proteostase (homeostase proteica) e longevidade. A primeira, a restrição calórica, que demonstra aumentar a expectativa de vida em 60% (MAIR; DILLIN, 2008); outra via é a da redução da atividade da via de sinalização pelo receptor Insulina/IgF-1-like, que também prolonga a sobrevida em invertebrados e vertebrados (BARTKE, 2008). A terceira consiste na redução da atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, já observado em *Drosophila* e roedores (COPELAND et al., 2009; LIU et al., 2005), porém, não se conhece o mecanismo. Esses processos são considerados independentes em relação à forma de ação, a combinação deles parece ter um efeito aditivo na longevidade (DILLIN et al., 2002; LAKOWSKI; HEKIMI, 1998), e são temporais, ou seja, agem apenas na vida adulta ou no processo de desenvolvimento do organismo (DILLIN; CRAWFORD; KENYON, 2002; DILLIN et al., 2002; MAIR et al., 2003).

Um dos principais aspectos do envelhecimento é a **imunosenescência**, resultado de um processo de remodelamento contínuo do sistema imune, cujas funções podem apresentar-se reduzidas, aumentadas ou inalteradas caso ocorra um envelhecimento saudável (FRANCESCHI et al., 1995). Alterações na função imune resultam na maior susceptibilidade a infecções bacterianas e virais (JANSSENS; KRAUSE, 2004; LYNCH; WALSH, 2007), diminuição da resposta ótima a vacinação (BOUREE, 2003), desenvolvimento de tumores, de autoimunidades e de outras doenças inflamatórias (JOHNSON; CAMBIER, 2004; YUNG; JULIUS, 2008; ZHANG; GRIZZLE, 2003).

Existem controvérsias em relação às alterações quantitativas e qualitativas de cada componente do sistema imune nos diferentes organismos. Alterações nas células progenitoras

da medula óssea parecem conduzir para um aumento da mielopoiese em detrimento da linfopoiese o que já constituiria mudanças no balanço das células resultantes (CHINN et al., 2012). Assim, na imunidade inata, os números de macrófagos e granulócitos encontram-se inalterados em indivíduos velhos (KRAUSE et al., 1999; MIYAJI et al., 2000; RYBKA et al., 2003); neutrófilos não apresentaram mudanças na quimiotaxia e adesão, mas redução na capacidade fagocítica de antígenos opsonizados (BUTCHER; CHAHÉL; LORD, 2000; WENISCH et al., 2000). A função dos macrófagos também é alterada, com diminuição nos níveis de moléculas do MHC de classe II (PLOWDEN et al., 2004), redução da secreção de citocinas e quimiocinas (PAWELEC et al., 1998), redução da produção de superóxido (PLACKETT et al., 2004) que, associada à deficiente expressão e função TLRs, dificultam a fagocitose e a morte intracelular de bactérias, conduzindo ao aumento na susceptibilidade a infecções (RENSHAW et al., 2002). Inicialmente, acreditava-se que não ocorriam alterações quanto à diferenciação e maturação de células dendríticas em indivíduos envelhecidos (STEGE; MACZEK; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 1996); entretanto, estudos mais recentes mostram diminuição na capacidade fagocítica (AGRAWAL; AGRAWAL; GUPTA, 2007), o que acaba por afetar a resposta de linfócitos T no envelhecimento. As células NK, importantes na imunidade contra infecções virais, apresentam diminuição em sua capacidade citotóxica no envelhecimento; estudo recente demonstrou esse fenótipo utilizando um modelo de transferência adotiva dessas células entre camundongos de diferentes idades. As células NK, tanto de animais jovens quanto de velhos, respondem de maneira satisfatória à estimulação antigênica em camundongos jovens; em contraste, as células NK de animais jovens transferidas para indivíduos envelhecidos apresentam deficiência na ativação celular. De fato, é o meio ambiente do indivíduo que controla a resposta dessas células através da alteração de citocinas, como a diminuição de IL-15 e o aumento de IL-10, alterações comuns no processo de envelhecimento (CHIU et al., 2013).

Tanto em modelos animais de estudo do envelhecimento quanto em humanos idosos, as respostas celulares e humorais apresentam-se deficientes na imunidade adquirida (PAWELEC; SOLANA, 1997), havendo diminuição do número absoluto de linfócitos T *naïves*, particularmente os CD8⁺, embora CD4⁺ e CD8⁺ estejam alterados em camundongos e haja redução da diversidade de repertório de TCR (GORONZY; LEE; WEYAND, 2007; HAKIM; GRESS, 2007). A diminuição de células T *naïves* inviabiliza a resposta imune a novos antígenos e leva ao acúmulo de células de memória, as quais apresentam menor diversidade, funcionalidade e capacidade citotóxica, dificultando, assim, a resposta a

infecções reincidentes (ASPINALL; ANDREW, 2000; BLACKBURN et al., 2009). Essas células de memória velhas expressam menos CD2, importante molécula coestimuladora, alteração na transdução de sinal pela via do NF- κ B e diminuição na sinalização e formação da sinapse imunológica (EISENBRAUN; TAMIR; MILLER, 2000; ENGWERDA; HANDWERGER; FOX, 1994; TREBILCOCK; PONNAPPAN, 1998). Acredita-se que as alterações do sistema imune se iniciem desde a atrofia tímica, caracterizada pela diminuição do tamanho do órgão e a troca da medula e córtex funcionais por tecido fibroadiposo, relacionada, parcialmente, à falha dos timócitos em se diferenciarem e expressarem TCR, diminuindo a produção dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (ASPINALL, 1997; ASPINALL; ANDREW, 2000). Além disso, os linfócitos T de idosos apresentam menor produção de IL-2 e da expressão do receptor dessa citocina, e reduzida expressão da molécula coestimuladora CD28, ambos contribuindo para o decréscimo dessa população celular (CHAMBERLAIN; FALTA; KOTZIN, 2000; WEYAND et al., 1998). Além disso, observa-se em indivíduos envelhecidos o aumento da produção de IL-4 que conduz a mudanças no padrão de citocinas, do perfil Th1 para Th2, com possível ativação de autoanticorpos (STACY et al., 2002).

Como consequência dessas alterações quantitativas e qualitativas de células da imunidade inata e de linfócitos T, observam-se também no processo de envelhecimento alterações no número de linfócitos B *naïves* e antígeno-específicos, na produção de imunoglobulinas e no repertório de anticorpos em termos de especificidade, isótipos e afinidade (WEKSLER, 2000). A redução da hipermutação somática em células dos centros germinativos em órgãos linfóides (ZHENG et al., 1997), e falhas na troca de classes de imunoglobulinas (FRASCA et al., 2004) causam nos indivíduos envelhecidos a incapacidade da produção de anticorpos de maior afinidade a determinados antígenos. Embora animais envelhecidos apresentem um número de linfócitos B circulantes semelhante aos jovens, há ampliação de linfócitos B de memória, substituição da população *naïve*, resultando em resposta predominada por anticorpos de baixa afinidade (STACY et al., 2002; WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009). Ocorre, ainda, aumento da resposta policlonal contra diversos mitógenos, com diminuição da resposta antígeno-específica e aumento da frequência de autoanticorpos (GINALDI et al., 1999; KISHIMOTO et al., 1978; PAHWA; PAHWA; GOOD, 1981).

As alterações do sistema imunológico com o avanço da idade podem aumentar a predisposição a processos crônico-degenerativos, seja por alteração na tolerância ao próprio, por perda da integridade tecidual ou por maior incidência de processos infecciosos que

induzem a liberação de novos antígenos com consequente ativação de linfócitos não responsivos (*bystander activation*) e por mimetismo molecular (OLSON; CROXFORD; MILLER, 2001). Algumas hipóteses tentam explicar o envelhecimento e sua relação com o aparecimento de patologias causadas por infecções, parasitas, eventos autoimunes ou alterações genéticas, relatando grande quantidade de efeitos biológicos atribuídos à senescência observados em órgãos específicos ou sistemicamente (CARNES; STAATS; SONNTAG, 2008). Dentre elas, a teoria *ANTÍGENO NÃO ESPECÍFICO* propõe que o sistema imunológico é ativado pela liberação normal de proteínas endógenas em consequência da necrose induzida por micro-organismos, e por APC ativadas por estímulos microbianos e que passam a apresentar efetivamente antígenos próprios antes tolerizados (WUCHERPFENNIG, 2001). A teoria *ANTÍGENO ESPECÍFICO* é exemplificada pelo conceito do mimetismo molecular, no qual antígenos próprios e microbianos compartilham similaridades estruturais, facilitando o reconhecimento cruzado e a quebra da tolerância (BENOIST; MATHIS, 2001). Por exemplo, a presença de anticorpos e linfócitos T que reagem contra a Hsp60 humana ou a Hsp65 de microrganismos reforça essa hipótese. Anticorpos contra diversos membros das famílias das proteínas de choque térmico também foram detectados em pacientes com autoimunidades. Indivíduos envelhecidos podem apresentar produção de autoanticorpos dependente do contato prolongado com antígenos exógenos (PANDEY et al., 1979; RAMOS-CASALS et al., 2003) e anticorpos anti-DNA nuclear estão entre os mais detectados, atuando tanto em doenças autoimunes sistêmicas quanto no controle tumoral (IAKOUBOV; TORCHILIN, 1997). Apesar de doenças autoimunes serem comumente observadas no envelhecimento, idosos muitas vezes não apresentam resposta imunológica efetiva a estímulos antigênicos (PRELOG, 2006).

No envelhecimento também são observadas alterações em proteínas intracelulares. O papel fisiológico das Hsp também muda desde o início da vida até idades avançadas, estando envolvidas em processos de senescência celular (MACARIO et al., 2010); os níveis de chaperonas induzidos por estresse diminuem com o avançar da idade (NJEMINI; DEMANET; METS, 2008) e modificações patológicas que causam um mau funcionamento da maquinaria de chaperonas e proteases parecem estar diretamente implicadas na progressão do processo de envelhecimento, afetando moléculas, células e tecidos (CAPPELLO et al., 2013). Em humanos, os níveis de Hsp60 diminuem com o passar dos anos, mas não os de anticorpos contra essa proteína (REA; MCNERLAN; POCKLEY, 2001) e a razão pela qual os níveis de anticorpos não declinam deve-se à interação do sistema imune não somente com

a Hsp60 autóloga, mas também às suas formas homólogas presentes em patógenos, apresentando constante reestímulo e produção de anticorpos contra essa proteína (CAPPELLO et al., 2009).

1.4 Linhagens da Seleção III como modelo de estudo da Hsp65

As alterações no envelhecimento de cada indivíduo podem ser igualmente influenciadas pela genética e fatores ambientais e é necessário saber de que modo os genes e seus produtos interagem para entender a contribuição deles ao organismo e ao fenótipo apresentado. Um conjunto genotípico adaptado a uma determinada fase do ciclo da vida pode se tornar comprometedor em outra etapa, mas a capacidade adaptativa produzida por todas essas características é que determina a aptidão de um indivíduo (HERSKOWITZ, 1977). O modelo experimental do estudo da influência da Hsp65 no processo de envelhecimento consiste de camundongos geneticamente selecionados da Seleção III para expressar alta (H_{III}) ou baixa (L_{III}) produção de anticorpos. A característica fenotípica escolhida para obtenção das linhagens H_{III} e L_{III}, a partir do intercruzamento de quatro populações distintas de camundongos geneticamente heterogêneos *Swiss* (SIQUEIRA et al., 1976), foi a resposta secundária, máxima ou mínima, a antígenos flagelares de *Salmonella*, seguindo cruzamentos em gerações sucessivas de animais apresentando os fenótipos extremos após imunizações alternadas com os antígenos não *cross*-reativos de *S. entérica* sorotipo Typhimurium e sorotipo Oranienburg, evitando-se, assim, a interferência de anticorpos maternos passivamente transmitidos à prole. O cruzamento bidirecional dos camundongos que apresentavam alta ou baixa resposta de anticorpos levou à divergência progressiva dos fenótipos durante 16 gerações sucessivas, quando se atingiu a **homozigose dos grupos de genes que controlam o fenótipo** (BIOZZI et al., 1979).

A pressão seletiva bidirecional exercida em cada linhagem resultou no acúmulo de alelos em múltiplos *loci* (*loci* de características quantitativas / *quantitative trait loci* [QTL]) dotados de ações distintas sobre as diferentes etapas de regulação da biossíntese de anticorpos. Estudos genéticos determinaram que a característica “*produção quantitativa de anticorpos*” está sob o controle poligênico de 5 a 10 *loci* independentes (REIS et al., 1992; SANT'ANNA et al., 1982). Esses animais são homozigotos apenas nos genes relacionados à produção de anticorpos, e heterogêneos no restante do seu genótipo como a linhagem original. O mapeamento gênico nas linhagens H_{III} e L_{III} demonstrou QTLs altamente significantes

ligados à produção de anticorpos contra o antígeno flagelar de *Salmonella* nos cromossomos 3 e 9, relacionados pela primeira vez à regulação da resposta de anticorpos, e no cromossomo 8, também descrito na Seleção I (DE SOUZA et al., 2004; PUEL; MOUTON, 1996). Ressalta-se que os camundongos da Seleção III apresentam resposta multiespecífica, diferindo na resposta a antígenos não relacionados aos utilizados durante o processo de seleção, o que indica uma modificação geral no mecanismo de síntese de imunoglobulinas (SANT'ANNA et al., 1991).

Porém, apesar de direcionados para uma resposta máxima ou mínima de anticorpos, o processo de seleção levou ao aparecimento de outras características fenotípicas nas linhagens da Seleção III, dentre elas a relação inversa entre a produção de anticorpos e a quantidade de heparina; o fato de essas duas linhagens apresentarem distribuição inversa da produção de heparina e os níveis de anticorpos sugere que essa relação não ocorre ao acaso. A heparina, que possui função anticoagulante, anti-homeostática, inibidora de enzimas, atividade antibactericida e ação antiviral, pode agir alternativamente como mecanismo de vigilância do organismo contra alguns patógenos (STRAUS et al., 1984). Essas linhagens também representam um modelo adequado para investigar fatores genéticos e ambientais atuantes no sistema imunológico inato e adquirido em estudos de resistência ou susceptibilidade a patógenos, toxinas, tumores e autoimunidades. Em relação à tumorigênese, camundongos bons respondedores (Seleções I, III e G) são mais susceptíveis ao tumor de pele iniciado com 7,12-dimetilbenz[α]antraceno [DMBA] e promovido com 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato [TPA] que os maus respondedores; essa observação sugere que a resistência a esse carcinoma de pele pode estar geneticamente relacionada com os genes de baixa resposta de anticorpos (IBANEZ et al., 1999). Outras pesquisas mostraram a susceptibilidade à artrite, nos quais H_{III} são resistentes e L_{III} extremamente vulneráveis a artrite induzida por pristane. Nesse estudo foi indicada a colocalização de genes nos cromossomos 1, 6, 9 e 12 responsáveis pela produção de anticorpos e a susceptibilidade da doença (JENSEN et al., 2006). Um fator importante para o desenvolvimento desses estudos de envelhecimento é o tempo médio de sobrevivência que, na Seleção III, é semelhante entre H_{III} (611 ± 153 dias de vida) e L_{III} (622 ± 166 dias de vida) (DORIA et al., 1997).

Vários fatores associados à imunosenescência durante o processo de envelhecimento ainda não estão esclarecidos como a possibilidade de herança de genes associados tanto a longevidade quanto a regulação do sistema imune (PELLICANO et al., 2013), e a forma diferencial como a imunosenescência ocorre no gênero masculino e feminino (GAMEIRO; ROMAO, 2010; HIROKAWA et al., 2013; MARTTILA et al., 2013). Assim, visando a maior

compreensão do processo de imunosenescência, utilizaremos as linhagens da seleção III para o estudo da influência da Hsp65 no sistema imune durante o processo de envelhecimento.

2 JUSTIFICATIVA

Fundamentado nas relações já estabelecidas das proteínas de choque térmico e autoimunidades, nosso grupo verificou que a Hsp65 de *M. leprae* participa na redução da sobrevida de fêmeas lúpicas F₁(NZBxNZW), induzindo a produção de anticorpos anti-Hsp65 e anti-DNA e participando na mudança do balanço Th1/Th2. Baseando-se nas alterações imunes e na observação de processos crônico-degenerativos em indivíduos idosos, investigamos se há influência da Hsp65 na produção de anticorpos e nas alterações do envelhecimento. Observamos durante o mestrado que a inoculação intraperitoneal da Hsp65 induziu redução do TMS em fêmeas H_{III} velhas (9 meses); esse efeito também foi observado em fêmeas H_{III} adultas (4 meses), mas em menor intensidade. Contudo, diferentemente do observado em camundongos lúpicos, a produção dos isótipos IgG1 e IgG2a em fêmeas H_{III} não se modificou. Os resultados indicaram a interferência efetiva da Hsp65 na sobrevida de fêmeas envelhecidas constitutivamente boas respondedoras, porém, não vinculada à produção de anticorpos. Como o mecanismo de ação da Hsp65 no desenvolvimento e evolução de processos crônico-degenerativos é pouco conhecido, sugerimos que a proteína tenha efeito pleiotrópico no sistema imune. Considerando que em indivíduos envelhecidos o sistema imune já se encontra modificado, a Hsp65 poderia exacerbar as alterações agindo em componentes da imunidade inata e adaptativa e no recrutamento e ativação celular. Não desconsideramos que o efeito observado seja, eventualmente, influenciado pelo método de seleção das linhagens H_{III} e L_{III} e influenciado pela constituição genética de cada uma delas, uma vez que são susceptíveis à indução de doenças autoimunes. No presente estudo, levantamos a hipótese que a administração da Hsp65 conduza a alterações das células imunes envolvidas na resposta anti-Hsp65 em fêmeas H_{III} e que essa susceptibilidade seja devida a mecanismos genéticos.

3 OBJETIVOS

Identificar a influência da administração passiva da Hsp65 de *M. leprae* no sistema imune de fêmeas H_{III} envelhecidas através da análise das possíveis alterações nos padrões celulares no baço e no sangue periférico, além da ativação de linfócitos T e B. Para evidenciar um possível componente genético relacionado à susceptibilidade à Hsp65 realizaremos a análise comparativa dos níveis de anticorpos IgG e IgM, da fenotipagem celular e do TMS, em camundongos híbridos F₁H e F₁L (obtidos de cruzamentos recíprocos das linhagens H_{III} e L_{III}, a saber, F₁H [♀H x ♂L] e F₁L [♀L x ♂H]) após a inoculação passiva dessa proteína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e purificação da Hsp65 de *M. leprae*

O clone pIL161, contendo a sequência que codifica para a Hsp65 de *M. leprae*, cedido pelo Prof. Dr. Célio L. Silva da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto foram amplificadas em *Escherichia coli* DH5 α *Heat Shock*. As expressões da proteína recombinante Hsp65 foram realizadas como descrito por Portaro et al. (2002). As proteínas recombinantes presentes no *pellet* do extrato bacteriano foram solubilizadas em ureia 6M e submetidas a SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) preparativo e a banda que contém Hsp65 foi recortada do gel para obtenção da Hsp65 purificada, seguida de eluição em PBS (PEREIRA et al., 2005). A homogeneidade das preparações de Hsp65r de *M. leprae* foi analisada por eletroforese de gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) seguido de coloração por nitrato de prata e submetidos à análise de espectrometria de massas – *Peptide Mass Fingerprint* (WESTERMEIER; NAVEM, 2002). Determinaram-se as concentrações proteicas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, realizou-se a análise de dosagem de LPS utilizando o kit LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*), e como controle positivo a endotoxina de *E. coli* (Biowhittaker Cambres Inc. – USA) 2,5 Unidades de Endotoxina/mL (UE/mL); essas dosagens foram realizadas na Seção de Controle de Qualidade do Instituto Butantan.

4.2 Animais

Fêmeas H_{III} de 9 meses de idade foram utilizadas para a fenotipagem de células imunes do baço e do sangue após a administração da Hsp65 de *M. leprae*. Para o estudo da influência de constituição genética na susceptibilidade à Hsp65, foram obtidos híbridos F_I provenientes de cruzamentos recíprocos, através do acasalamento de camundongos das linhagens H_{III} e L_{III} (F_IH [♀H x ♂L] e F_IL [♀L x ♂H]) seguindo o esquema apresentado na **FIGURA 2**.

FIGURA 2 – Plano de acasalamentos recíprocos para obtenção dos camundongos híbridos.

Os animais F_1H (**A**), derivados de mães H_{III} , e F_1L (**B**), de mães L_{III} , foram provenientes do intercruzamento de machos e fêmeas das linhagens H_{III} e L_{III} .

Os animais H_{III} e L_{III} foram obtidos no Biotério do Laboratório de Imunogenética, e os cruzamentos para obtenção dos híbridos F_1 e sua manutenção foram realizados no Biotério do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, em condições padrão de acomodação e alimentação. Todos os experimentos estão em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB #809/11) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - USP, nº 016, fls. 99 do livro 02).

4.3 Análise quantitativa e qualitativa dos fenótipos celulares do baço após a inoculação da Hsp65r nativa de *M. leprae* em fêmeas H_{III} e híbridos F_1H e F_1L envelhecidos

Fêmeas H_{III} e híbridos F_1H e F_1L , de 9 meses de idade (4-7 animais/grupo), foram inoculados intraperitonealmente com 2,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (volume final de 200 μL de PBS) da proteína recombinante de Hsp65 ou PBS (grupo controle). Para verificação de alterações celulares após a inoculação da proteína, os animais foram eutanasiados e os baços coletados e processados, como descrito no item 4.5. As células foram marcadas em duplas ou triplas marcações com os fluorocromos indicados no **QUADRO 1**; em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1400 rpm (4 °C) e ressuspensas em tampão de citometria contendo paraformaldeído 1%. Como controles experimentais na leitura, células foram incubadas somente com um dos fluorocromos.

QUADRO 1 – Anticorpos monoclonais (BD Pharmigen™) utilizados para fenotipagem de células esplênicas de fêmeas H_{III} e machos e fêmeas F_IH e F_IL após a inoculação da Hsp65.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Isótipo	Diluição
Anti-CD3	PE-Cy5	17A2	Rat (SD) IgG2b, κ	1/200
Anti-CD4	FITC	GK1.5	Rat (LEW) IgG2b, κ	1/400
Anti-CD154	PE	MR1	Armenian Hamster IgG3, κ	1/200
Anti-CD28	PE	37.51	Syrian Hamster IgG2, λ1	1/200
Anti-CD45RA	PE	14.8	Rat IgG2b, κ	1/133
Anti-CD44	PE	IM7	Rat IgG2b, κ	1/200
Anti-CD8α	FITC	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	1/400
Anti-CD80	PE	16-10A1	Armenian Hamster IgG2a, κ	1/100
Anti-CD86	PE	GL1	Rat (LOU) IgG2a, κ	1/133
Anti-CD11c	FITC	HL3	Armenian Hamster IgG1, λ2	1/400
Anti-CD11b	FITC	M1/70	Rat (DA) IgG2b, κ	1/200
Anti-CD45R/B220	FITC	RA3-6B2	IgG2a, κ	1/400
Anti-CD138	PE	281-2	Rat (F344) IgG2a, κ	1/100
Anti-CD40	PE	3123	Rat (LOU) IgG2a, κ	1/133

Os gates utilizados para as obtenções das amostras são indicados no **APÊNDICE A**. Aquisição em citômetro de fluxo FACSCantoII (Becton & Dickson) utilizando-se o software FACSDiva (Tree Stars, Inc.); os resultados estão indicados em porcentagem ou número total de células marcadas dentro de 10 mil eventos adquiridos ou pela mediana de intensidade de fluorescência de cada fluorocromo utilizado.

4.4 Análise quantitativa e qualitativa dos fenótipos celulares no sangue de fêmeas H_{III} envelhecidas após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae*

A fim de se esclarecer os mecanismos celulares envolvidos no fenômeno de abreviação da sobrevida observada em ♀H_{III} envelhecidas inoculadas com Hsp65, foi realizada a análise qualitativa e quantitativa dos fenótipos celulares do sangue desses animais. Para tanto, coletou-se sangue de fêmeas H_{III} de 9 meses de idade (4 animais em cada tempo analisado), inoculadas intraperitonealmente com 2,5 µg/animal (volume final de 200 µL de PBS) da Hsp65 ou PBS (grupo controle) aos dias 3, 7 e 14 pós-inoculação, e na sequência seguiu-se fenotipagem das células por citometria de fluxo. O período de tempo foi escolhido com base nos resultados obtidos anteriormente (BALDON, 2010), nos quais fêmeas H_{III} apresentaram a primeira morte aos 18 dias pós-inoculação da Hsp65.

O sangue foi coletado através do plexo retro-orbital com a adição de anticoagulante (EDTA 10%, pH 7.20.); 25 µL das amostras de sangue total individuais foram distribuídos em placas de 96 poços de fundo em U (COSTAR), sendo incubadas por 30 minutos (escuro, temperatura ambiente) com os anticorpos monoclonais em duplas ou triplas marcações (BD

Pharmigen™) já diluídos em tampão FACS (**QUADRO 2**). Após incubação, acrescentou-se 200 µL de solução de lise de hemácias (BD Pharmigen™) durante 10 minutos (escuro, temperatura ambiente), com subsequente centrifugação (5 minutos, 1800 rpm, 4° C) e descarte do sobrenadante. Os pellets celulares foram ressuspensos em 200 µL de tampão de FACS para lavagem e o processo seguiu o protocolo da mesma maneira que para a obtenção de células do baço. Como controles experimentais, células foram incubadas somente com um dos fluorocromos.

QUADRO 2 – Anticorpos monoclonais (BD Pharmigen™) utilizados para fenotipagem celular do sangue de fêmeas H_{III} envelhecidas.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Isótipo	Diluição
Anti-CD11b	FITC	M1/70	Rat (DA) IgG2b, κ	1/200
Anti-CD11c	FITC	HL3	Armenian Hamster IgG1, λ2	1/400
Anti-CD80	PE	16-10A1	Armenian Hamster IgG2a, κ	1/100
Anti-CD86	PE	GL1	Rat (LOU) IgG2a, κ	1/100
Anti-CD14	PE	rmC5-3	Rat IgG1, κ	1/200
Anti-TLR4	PE	MTS510	Rat IgG2a, κ	1/200
Anti-NKG1A/C/E	FITC	20d5	Rat (LEW) IgG2a, κ	1/400
Anti-Ly6G	PE	1A8	Rat (LEW) IgG2a, κ	1/400
Anti-CD45R/B220	FITC	RA3-6B2	IgG2a, κ	1/400
Anti-CD3	PE-Cy5	17A2	Rat (SD) IgG2b, κ	1/200
Anti-CD4	FITC	GK1.5	Rat (LEW) IgG2b, κ	1/400
Anti-CD8α	PE	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	1/400

As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCantoII (Becton & Dickson) utilizando-se o software FACSDiva (Tree Stars, Inc.) seguindo os esquemas de análises no **APÊNDICE B**, e os resultados expressos em porcentagem de células marcadas dentro de 10 mil eventos adquiridos ou pela mediana de intensidade de fluorescência.

4.5 Análise da sobrevida de híbridos F₁ após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae*

Para analisar a influência genética no efeito da Hsp65 foram utilizados machos e fêmeas F₁H e F₁L (4-6 animais/grupo). Os animais foram inoculados seguindo-se o protocolo utilizado anteriormente: aos 9 meses de idade com dose única de 2,5 µg de Hsp65 pela via intraperitoneal, em volume final de 200 µL de PBS; o grupo controle recebeu apenas 200 µL de PBS. Os animais foram acompanhados até a morte para o cálculo do tempo médio de sobrevida (TMS), mediana de sobrevivência e variância ambiental (VA), e sangrados, aos 7 e 14 dias pós-inoculação, para avaliação dos níveis de anticorpos IgG e IgM anti-Hsp65.

4.6 Análise da produção de anticorpos IgG e IgM em híbridos F₁ após a inoculação da Hsp65

Camundongos híbridos F₁H e F₁L, machos e fêmeas (4 animais/grupo) foram inoculados com 2,5 µg de Hsp65 de *M. leprae* pela via intraperitoneal (volume final de 200 µL de PBS) e aos 0, 7 e 14 dias, os níveis de anticorpos IgG e IgM anti-Hsp65 foram detectados pelo método de ELISA indireto. Poços de placas de fundo chato com propriedades de alta ligação (Nunc Maxisorp™, Roskild, Denmark) foram sensibilizados por 18 horas com 1 µg/poço (0,1 µg/mL) da proteína Hsp65 de *M. leprae*, diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6, a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com PBS-T / BSA 1% a 37 °C por 1 hora, seguido de nova lavagem. Foi realizada diluição seriada partindo-se de um inicial 1:16 de soro, com incubação a temperatura ambiente por 1 hora. As placas foram novamente lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpos anti-IgG (1:10000) ou anti-IgM (1:1000) (BD Pharmingen™ - BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), ambos conjugados com peroxidase, em 100 µL/poço PBS-T/BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi adicionado 100 µL/poço do tampão substrato TMB (v/v; BD Bioscience) e a reação foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos e interrompida utilizando-se 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando-se um leitor de ELISA (Molecular Devices - Mountain View, CA, EUA). Os títulos de anticorpos foram expressos como log₂, estabelecidos em 20% do valor da D.O. (densidade óptica) máxima (1:16) de cada amostra na leitura.

4.7 Caracterização das populações celulares do baço no processo de envelhecimento de camundongos híbridos F₁H e F₁L

Para a fenotipagem de células do baço em camundongos F₁H e F₁L, machos e fêmeas (3-4 animais/grupo), aos 2, 5 e 9 meses de idade, por citometria de fluxo, os animais foram eutanasiados e os baços coletados em tubos tipo Falcon (BD Falcon, BD Bioscience, NJ, USA) contendo 10 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, NY, USA); em seguida, foram macerados e as suspensões celulares individuais foram mantidas a 4 °C por 12 minutos para sedimentação dos grumos. Seguiu-se transferência das suspensões para um novo tubo, seguido de centrifugação por 5 minutos a 1400 rpm (4 °C). Para lise das hemácias foi adicionado tampão hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM) na proporções de 2 mL/baço durante 2 minutos, seguido da adição de 8 mL de meio RPMI 1640.

Após centrifugação, a 1400 rpm por 5 min a 4 °C, o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI 1640 para lavagem das células seguida de nova centrifugação a 1400 rpm por 5 min a 4 °C; o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de FACS (PBS, BSA 1%, azida sódica 0,01%). A concentração e viabilidade celular foram determinadas por contagem celular em câmara de Neubauer, utilizando azul de Tripán 0,2%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo em U (COSTAR, Corning Incorporated, NY, USA) na concentração de 1×10^6 células/poço. Para impedir as ligações inespecíficas, as células foram incubadas com anticorpo anti-Fc γ RII/RIII (10 μ L/ 10^6 células) por 30 minutos a 4 °C, seguidas de centrifugação a 1400 rpm por 5 min a 4 °C e, então, as células foram ressuspensionadas em tampão de FACS. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30-60 minutos com anticorpos monoclonais (BD Pharmingen™) em simples ou duplas marcações de acordo com o fabricante e descritas no **QUADRO 3**; os esquemas de *gates* para análise são demonstrados no **APÊNDICE A**.

QUADRO 3 – Anticorpos monoclonais utilizados para fenotipagem celular do baço de machos e fêmeas F₁H e F₁L no processo de envelhecimento.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Isótipo	Diluição
Anti-CD11b	FITC	M1/70	Rat (DA) IgG2b, κ	1/200
Anti-CD11c	FITC	HL3	Armenian Hamster IgG1, λ 2	1/400
Anti-CD45R/B220	FITC	RA3-6B2	IgG2a, κ	1/400
Anti-CD3	PE-Cy5	17A2	Rat (SD) IgG2b, κ	1/200
Anti-CD4	FITC	GK1.5	Rat (LEW) IgG2b, κ	1/400
Anti-CD8 α	FITC	53-6.7	IgG _{2a} , κ	1/400

As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCantoII (Becton & Dickson, San Jose, CA, EUA) e os resultados expressos em porcentagem ou número total de células marcadas dentro de 10 mil eventos adquiridos ou pela mediana de intensidade de fluorescência.

4.8 Análises Estatísticas

Foram obtidas as médias e desvios padrão das porcentagens celulares, número total de células e da MIF em cada uma das marcações celulares para cada indivíduo. A comparação entre os grupos deu-se pelo teste de análise de variância (*one-way* ou *two-way* ANOVA) complementados pelo teste de Bonferroni para comparação entre os grupos ou em relação ao grupo controle, com nível de significância mínimo de 95%.

As curvas de sobrevida dos grupos experimentais foram analisadas através do método Mantel-Cox e comparadas pelo teste de “log rank”, considerando a probabilidade mínima de 95% para diferenças encontradas na porcentagem de sobrevivência. A variância ambiental (VA), que demonstra a influência de fatores externos nos fenótipos observados, é obtida através do quadrado do desvio padrão da média de sobrevida. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Graphpad Prism 5.00 (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Fenotipagem celular de leucócitos esplênicos após a inoculação da Hsp65 nativa de *M. leprae* em fêmeas H_{III} envelhecidos

Resultados obtidos anteriormente demonstraram que ♀H_{III} têm sobrevida reduzida após a inoculação com Hsp65, mesmo não apresentando mudanças marcantes na produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 e anti-DNA. Essa observação conduziu à busca das alterações celulares possivelmente envolvidas na morte desses animais. Para tanto, ♀H_{III} envelhecidas (9 meses de idade) foram inoculadas com 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* (ou PBS, grupo controle) por via intraperitoneal. As análises das populações de leucócitos esplênicos foram realizadas aos 7 e 14 dias após a administração da proteína, já que nossos resultados anteriores demonstraram início de data de mortes aos 18 dias após a inoculação da Hsp. Após a injeção da proteína, não houve mudança significativa no número total de leucócitos no baço (**FIGURA 3**).

FIGURA 3 – Número total de células do baço de ♀H_{III} envelhecidas antes e após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae*.

Fêmeas H_{III} de 9 meses de idade (4 animais/grupo) foram sacrificadas para fenotipagem celular antes (grupo controle, PBS) e após 7 e 14 dias da injeção intraperitoneal de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae*. One-Way ANOVA (pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

Avaliou-se a porcentagem de linfócitos T CD4 e de receptores importantes para a ativação desse tipo celular: o CD154 (ou CD40L) e o CD28 são moléculas expressas principalmente em células T ativadas e se ligam, respectivamente, ao CD40 e CD80/86 presentes em APC. Além disso, foi utilizada a marcação da molécula CD45RA que está expressa tanto na superfície de linfócitos T *naïves* quanto na superfície de linfócitos T

efetores de memória capazes de re-expressar esse receptor. A análise da porcentagem e do número total de linfócitos CD4 e seus subtipos evidenciou redução da frequência de $CD4^+CD28^+$ aos 14 dias (de $\pm 10\%$ para $\pm 4\%$, $p < 0,05$, **FIGURA 4D**), com consequente aumento da porcentagem de células T $CD4^+CD28^-$ (de $\pm 90\%$ para $\pm 96\%$, $p < 0,05$), denotando exaustão devido a estimulação com diminuição da expressão de CD28. Contudo, a análise do número total dessas células no baço não demonstrou alterações (dados não mostrados).

FIGURA 4 – Fenotipagem de linfócitos T CD4 esplênicos em ♀H_{III} envelhecidas.

Após injeção de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* por via intraperitoneal (4 animais/grupo), os animais foram sacrificadas após 7 ou 14 dias para obtenção da porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ (A), $CD4^+CD45RA^+$ (B), células T ativadas $CD154^+$ (C) e $CD28^+$ (D) por citometria de fluxo. O grupo controle foi injetado com PBS. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

Após a inoculação da Hsp65, o marcador CD45RA aumentou na superfície de linfócitos CD4 aos 7 dias pós-inoculação (de ± 4500 para ± 6700 , $p < 0,05$), reduzindo após 14 dias (para ± 3500) (**FIGURA 5A**). As expressões de CD154 e CD28 aumentaram (de ± 550 para ± 6900 , $p < 0,05$ e de ± 22800 para ± 34000 , $p < 0,05$, respectivamente), entretanto o CD28 apresentou diminuição aos 14 dias (para ± 14200 , $p < 0,05$) (**FIGURA 5B e C**, respectivamente).

FIGURA 5 – Expressão de CD45RA, CD154 e CD28 na superfície de linfócitos T CD4 esplênicos em ♀H_{III} envelhecidas.

Após injeção de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* por via intraperitoneal (4 animais/grupo), os animais foram sacrificados após 7 ou 14 dias e a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD45RA (A), CD154 (B) e CD28 (C) foram obtidas da população de linfócitos T CD4⁺ por citometria de fluxo. Grupo controle injetado com PBS. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

Os linfócitos T CD8 são fundamentais no controle de infecções virais e tumores e, a partir do reconhecimento de antígenos pelo TCR e ativação apresentam aumento de expressão de CD44 na superfície, o qual tem função de molécula de adesão. Assim, células T CD8⁺CD44⁺ são consideradas células ativadas ou efetoras de memória. Com a administração da Hsp65 de *M. leprae*, não houve alteração nessas células, mas sim reduzida expressão de CD44 aos 14 dias após a injeção da Hsp65 (de ± 4800 para ± 2500 , $p < 0,01$, **FIGURA 6E**). A análise do número total dessas células em cada tempo não revelou alterações (dados não mostrados).

FIGURA 6 – Análise de linfócitos T CD8 em ♀H_{III} envelhecidas antes e após a administração da Hsp65 de *M. leprae*.

Porcentagem e número total de células T CD8⁺ (A e B), CD8⁺CD44⁺ (C e D) e da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do receptor CD44 nos linfócitos T CD8 (E) em ♀H_{III} (4 animais/grupo) injetadas com PBS (controle) ou após 7 e 14 dias da inoculação de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* por via intraperitoneal. ***p* < 0,01 (One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

Os linfócitos B (marcados aqui com B220⁺) são células responsáveis pela produção de anticorpos e expressam CD138 e CD40, indicando diferenciação para plasmócitos (memória) a ativação celular, respectivamente. Tais eventos levam à troca de classe de anticorpos e proliferação celular, e a interação entre o CD40 (do linfócito B) e CD154 (do linfócitos T) tem papel na coestimulação e regulação imune. Ressalta-se que ♀H_{III} tiveram uma pequena redução não significativa aos 7 dias de linfócitos B, mas com aumento (±10% para ±21%, *p* < 0,05) aos 14 dias; a porcentagem de células B220⁺CD138⁺ e o número total

dessas células no baço ou na expressão de CD138 e CD40 permaneceram inalterados com o tratamento (**FIGURA 7**).

FIGURA 7 – Frequência e estado de ativação de linfócitos B em ♀H_{III} envelhecidas antes e após a administração da Hsp65 de *M. leprae*.

Frequência de linfócitos B (A), B CD40⁺ (B), B CD138⁺ (C) e intensidade de fluorescência de CD40 (D) e CD138 (E) após 7 e 14 dias da inoculação de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* (4 animais/grupo) por via intraperitoneal. O grupo controle foi injetado com PBS. * $p < 0,05$ (One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

Em relação às células fagocíticas, foram avaliadas as populações de CD11b⁺, principalmente expresso em macrófagos, e CD11c⁺, marcador utilizado na identificação de células dendríticas. Tanto a porcentagem quanto o número total de macrófagos não foram alterados após a inoculação da Hsp65, permanecendo em $\pm 4\%$ e $\pm 5 \times 10^6$ células para CD11b (dados não mostrados). Analisou-se nas células dendríticas (**FIGURA 8**), a porcentagem de expressão de CD80 e CD86, moléculas fundamentais para o processo de ativação celular pelas DC. Notou-se reduzida porcentagem de células CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ aos 14 dias da inoculação da Hsp (de $\pm 15\%$ para $\pm 2,5\%$, $p < 0,05$) (**FIGURA 8B**); porém nenhuma alteração foi observada em relação à porcentagem e o número total das células dendríticas ($\pm 2,5\%$ e $\pm 4,8 \times 10^6$ células).

FIGURA 8 – Fenotipagem de células dendríticas esplênicas em ♀H_{III} envelhecidas.

Porcentagem de células dendríticas (DC) CD11c⁺ (A), CD11c⁺CD80⁺ (B) e CD11c⁺CD86⁺ (C) e expressão superficial de CD80 (D) e CD86 (E) em ♀H_{III} (4 animais/grupo, 9 meses de idade) não inoculadas (controle) e após 7 e 14 dias após injeção de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* por via intraperitoneal. O grupo controle foi injetado com PBS. **p*<0,05 (One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

A expressão na superfície celular dos receptores CD11b e CD11c foi analisada em células esplênicas nas fêmeas H_{III} envelhecidas. Após o tratamento dos animais com a Hsp65, houve aumento da expressão de CD11b na superfície de macrófagos (MIF de ±750 para ±1000, *p*<0,05) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Expressão de CD11b e CD11c em splenócitos em ♀H_{III} envelhecidas

A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foi medida em células CD11b⁺ e CD11c⁺ do baço de ♀H_{III} envelhecidas (4 animais/grupo) antes (grupo controle, inoculado com PBS) e após 7 e 14 dias da injeção de 2,5 µg/animal da Hsp65 de *M. leprae* por via intraperitoneal. **p*<0,05 (One-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla entre os grupos).

5.2 Fenotipagem de células do sangue após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae* em fêmeas H_{III} envelhecidas

Como não foram observadas alterações significativas nas frequências celulares do baço de $\text{♀}H_{III}$ envelhecidas, verificamos se ocorreram alterações celulares no sangue periférico desses animais aos 3, 7 e 14 dias (9 meses de idade, 3-4 animais/grupo) após a inoculação de 2,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de Hsp65 ou PBS (grupo controle). Em relação ao número total de leucócitos sanguíneos viáveis obtidos em cada leitura (10000 eventos), não foram observadas diferenças nas frequências celulares de $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$, B220^+ , células NKG1A/C/E^+ , CD11b^+ , CD11c^+ e Ly6G^+ em nenhum dos tempos analisados (dados não mostrados). Na análise específica de cada população celular sanguínea (**APÊNDICE B**) foi observada ampliação da frequência de células NK dentre os linfócitos analisados (NKG1A/C/E^+ , de $\pm 0,7\%$ para $\pm 2\%$, $p < 0,01$, **FIGURA 10D**) no terceiro dia após a injeção da Hsp65, retornando ao nível basal nos dias subsequentes; não houveram alterações na porcentagem de linfócitos T CD4^+ , CD8^+ e B220^+ (**FIGURA 10A-C**).

FIGURA 10 – Frequência de linfócitos T e B e de células *natural killer* (NK) na população de linfócitos do sangue de $\text{♀}H_{III}$ envelhecidas.

Fêmeas H_{III} (9 meses de idade, 3-4 animais/grupo) inoculadas com 2,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de Hsp65 ou PBS (grupo controle), foram sangradas e a frequência de linfócitos T CD4 (A), CD8 (B), B220 (C) e células NK (D) foi analisada por citometria de fluxo; o *gate* utilizado engloba somente linfócitos. ** $p < 0,01$ (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni em relação ao grupo controle).

Como definido para as células do baço, verificamos a expressão das moléculas de superfície na população de monócitos (**APÊNDICE A, B e C**). A análise das moléculas CD11b e CD11c no sangue é importante pois estas fazem parte de um complexo receptor de proteínas dos sistema complemento, tendo sua expressão aumentada durante a ativação celular de granulócitos e células dendríticas. A população de monócitos mostrou aumento da frequência de células CD11c⁺ até o sétimo dia (de $\pm 29\%$ para $\pm 56\%$, $p < 0,01$, **FIGURA 11A**) e redução de células CD11b⁺CD86⁺ (de $\pm 27\%$ para $\pm 5\%$, $p < 0,01$, **FIGURA 11C**) após o tratamento com a Hsp65. Não foram observadas alterações na frequência de células CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ (**FIGURA 11D**). A expressão de receptores na superfície celular indicou aumento da mediana de intensidade de fluorescência de CD11b (de ± 760 para ± 1500 , $p < 0,001$) e CD11c (de ± 700 para ± 1000 , $p < 0,001$) até o 7º dia, porém apresentaram-se reduzidas aos 14 dias (**FIGURA 11B**); concomitantemente, houve redução da MIF de CD80 (p < 0,05) e tendência a diminuição de CD86 em células CD11c⁺ (dados não mostrados). Ainda, CD14 e TLR4, dois dos receptores já descritos para a Hsp65, não apresentaram alteração na superfície nas células CD11b⁺ e CD11c⁺ (não detectados).

FIGURA 11 – Fenotipagem de monócitos do sangue em ♀H_{III}.

Frequência de CD11b⁺ e CD11c⁺ (**A**), mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD11b e CD11c (**B**) e porcentagem celular de CD80⁺ e CD86⁺ em células CD11b⁺ (**C**) e CD11c⁺ (**D**) no sangue de ♀H_{III} (9 meses de idade, 3-4 animais/grupo) aos 3, 7 e 14 dias pós-inoculação de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (grupo controle). O *gate* utilizado engloba a população de monócitos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni em relação ao grupo controle).

Avaliou-se a frequência de neutrófilos (Ly6G⁺) na população de granulócitos (APÊNDICE A, A), a qual não apresentou alteração após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae* (FIGURA 12).

FIGURA 12 – Frequência de neutrófilos no sangue de ♀ H_{III} inoculadas com Hsp65.

Porcentagem de Ly6G⁺ no sangue de fêmeas H_{III} envelhecidas (9 meses de idade, 3-4 animais/grupo) após 3, 7 e 14 dias da inoculação de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (controle). O *gate* utilizado engloba a população de granulócitos. *Two-Way ANOVA* (pós-teste de Bonferroni para comparação em relação ao grupo controle).

5.3 Análise da sobrevivência de híbridos F₁H e F₁L após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae*

Um estudo recente em seres humanos demonstrou que indivíduos onde pelo menos um dos genitores era longo vivo apresentavam menores expressões de marcadores de senescência do sistema imune do que filhos de genitores não longevos. Os dados mostram que a razão CD4/CD8, e a expressão de CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺ (células *naïve*) nas populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ encontram-se menos diminuídos, ou seja, mais próximos dos dados em indivíduos jovens, nos filhos de indivíduos longevos. Observou-se também em filhos de longevos o menor aumento das populações de células altamente diferenciadas (tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺) CD27⁻CD28⁻CD45RA⁺. Os achados sugerem a herança da regulação do envelhecimento do sistema imune (PELLICANO et al., 2013).

Em estudos anteriores (BALDON, 2010) nosso grupo mostrou o efeito diferencial da Hsp65 de *M. leprae* nas linhagens H_{III} e L_{III} no processo de envelhecimento, nos quais as fêmeas H_{III} velhas (9 meses de idade) tinham sua sobrevivência diminuída após a inoculação da Hsp65; da mesma maneira, fêmeas adultas (4 meses de idade) também apresentavam reduzida sobrevivência, porém em grau menor que as envelhecidas. Diferentemente, fêmeas L_{III} envelhecidas tiveram sua sobrevivência aumentada após a injeção da proteína, e machos de ambas as linhagens não foram afetados pelos tratamentos (BALDON, 2010). No presente estudo

nosso interesse foi verificar se esse efeito está vinculado a genes selecionados, mas não relacionados aos de produção de anticorpos, e, conseqüentemente, se são transmitidos à prole por mecanismos de herança, ou se é decorrente apenas de um efeito limitado ao gênero já que alguns estudos em humanos mostram diferenças quanto às alterações no sistema imune em homens e mulheres idosos (GAMEIRO; ROMAO, 2010; HIROKAWA et al., 2013; MARTTILA et al., 2013). Para verificar tal hipótese, machos e fêmeas F₁H e F₁L foram inoculadas aos 9 meses de idade com 2,5 µg/animal de Hsp65 (ou PBS no grupo controle) e acompanhadas até a morte (**TABELA 1 e FIGURA 13**).

TABELA 1 – Tempo médio de sobrevivência de fêmeas F₁H e F₁L inoculadas com Hsp65 aos 9 meses de idade.

Linhagem	Sobrevivência (dias)	Intervalo entre primeira e última morte (dias)	Morte após a inoculação (dias)
♀F ₁ H	302		32
Controle	313		43
(PBS)	450		180
	500	288	230
	535		265
	535		265
	536		266
	590		320
TMS	470		
Variância Ambiental	11664		
♀F ₁ H*	379		109
2,5µg Hsp65	399		129
	399	67	129
	406		136
	422		152
	446		176
TMS	409		
Variância Ambiental	529		
♀F ₁ L	391		121
Controle	465		195
(PBS)	505	249	235
	630		360
	640		370
TMS	505		
Variância Ambiental	11449		
♀F ₁ L	479		209
2,5µg Hsp65	550		280
	551	188	281
	624		354
	667		397
	667		397
TMS	588		
Variância Ambiental	5625		

Tempo médio de sobrevivência (TMS) de fêmeas F₁H e F₁L inoculadas com 2,5 µg/animal de Hsp65 de *M. leprae* ou com PBS (grupo controle). A variância ambiental é dada pelo desvio padrão ao quadrado de cada grupo analisado. **p*<0,05 referente ao teste log-rank (Mantel-Cox) para comparação da mediana de sobrevivência entre os grupos “F₁H Controle” e “F₁H Hsp65”; não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Hsp65 em fêmeas híbridas F₁L. Os machos híbridos F₁H e F₁L não são indicados na tabela, pois não ocorreram mortes até o momento (550 pós-inoculação de Hsp65 ou PBS).

FIGURA 13 – Curvas de sobrevida de fêmeas e machos F₁H e F₁L após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae*.

Fêmeas e machos F₁H e F₁L (4-6 animais/grupo) foram inoculados com 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (grupo controle) aos 270 dias de idade (linha pontilhada) e acompanhados até a morte. * $p < 0,05$ entre fêmeas “F₁H Controle” e fêmeas “F₁H Hsp65”, método Mantel-Cox (“log rank”) para comparação das curvas de sobrevida (dada pela mediana de sobrevivência) dos diferentes grupos. Os grupos ♂F₁H e ♂F₁L, inoculados ou não com a Hsp65, não apresentaram nenhuma morte até o momento (550 de vida).

Houve redução na sobrevida de ♀F₁H inoculadas com Hsp65 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (**FIGURA 13** e **TABELA 1**). Além disso, notou-se redução da variância ambiental nos grupos injetados com Hsp65 (VA= 529 dias em ♀F₁H; VA= 5625 em ♀F₁L) em relação aos respectivos grupos controle (VA= 11664 em ♀F₁H; VA= 11449 em ♀F₁L) (**TABELA 1**), indicando interferência da Hsp65 no tempo médio de sobrevida desses animais. Vale ressaltar que ♀F₁H inoculadas com a Hsp65 apresentaram morte em menor intervalo de tempo (67 dias entre a primeira e última morte) em relação ao controle (288 dias entre a primeira e última morte), sendo o mesmo observado em ♀F₁L (249 dias entre a primeira e última morte no grupo não inoculado *versus* 188 dias no grupo Hsp65) (**TABELA 1**). Em relação aos machos, após 550 dias desde a inoculação, não ocorreram mortes nos grupos injetados com a Hsp65 ou nos controles.

5.4 Análise da produção de anticorpos IgG e IgM anti-Hsp65 em híbridos F₁

Em continuidade ao estudo da resposta imune dos híbridos F₁, foi examinada a produção dos anticorpos IgG e IgM anti-Hsp65 no soro de machos e fêmeas, F₁H e F₁L de 9

meses de idade, zero (grupo pré-imune), 7 e 14 dias após a inoculação de 2,5 µg/animal da Hsp65. Como observado na **FIGURA 14**, apenas ♂F₁H (aos 14 dias) e ♂F₁L (aos 7 dias) apresentaram aumento significativo do título de IgG anti-Hsp65 ($p<0,01$). Analisando-se a diferença interlinhagem e sexos, verificou-se que ♂F₁H produzem mais IgG anti-Hsp65 que ♂F₁L ($p<0,05$) e que, após 14 dias da inoculação da proteína essa diferença é maior ($p<0,001$), bem como em comparação com ♀F₁H ($p<0,05$) (dados não mostrados).

FIGURA 14 – Produção de anticorpos IgG anti-Hsp65 em híbridos F₁H e F₁L.

Machos e fêmeas F₁H e F₁L (4 animais/grupo) foram injetados com 2,5 µg/animal de Hsp65 aos 270 dias de idade e sangrados aos 7 e 14 dias pós-inoculação. O grupo controle refere-se ao soro pré-imune (sangria pré-inoculação). ** $p<0,01$ (*Two-Way ANOVA*, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Em relação aos anticorpos IgM anti-Hsp65, ♂F₁H e ♂F₁L apresentaram aumento em relação ao grupo controle aos 7 e 14 dias pós-inoculação; já ♀F₁H apresentaram maior titulação aos 7 dias ($p<0,001$), enquanto que ♀F₁L exibiram títulos maiores aos 14 dias ($p<0,01$) após a injeção da Hsp65 (**FIGURA 15**). A análise interlinhagem e sexos demonstrou que, uma semana após a inoculação, ♀F₁H apresentam maiores títulos de IgM anti-Hsp65 em relação às ♀F₁L ($p<0,001$) e ♂F₁H ($p<0,05$), e que ♂F₁L apresentaram maior produção de IgM aos 7 dias comparando-se às ♀F₁L ($p<0,05$); além disso, após 14 dias, ♂F₁H tem maior produção de IgM anti-Hsp65 em relação às ♀F₁H (dados não mostrados).

FIGURA 15 – Produção de anticorpos IgM anti-Hsp65 em híbridos F₁.

Machos e fêmeas F₁H e F₁L (4 animais/grupo) inoculados com 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (grupo controle) aos 270 dias de idade e sangrados aos 7 e 14 dias pós-inoculação. O grupo controle refere-se ao soro pré-imune (sangria pré-inoculação). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (*Two-Way ANOVA*, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

5.5 Fenotipagem celular de leucócitos esplênicos após a inoculação da Hsp65 nativa de *M. leprae* em híbridos F₁ envelhecidos

Para comparar os fenótipos apresentados pelas fêmeas H_{III} envelhecidas e verificar a existência de herança genética em relação ao fenótipo desencadeado pela Hsp65, foram analisadas as alterações dos fenótipos celulares de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas em camundongos híbridos F₁. Para tal, machos e fêmeas F₁H e F₁L (4-7 animais/grupo) de 9 meses de idade foram injetados intraperitonealmente com dose única de 2,5 µg/animal de Hsp65 WT ou PBS (grupo controle) e analisados aos 7 e 14 dias pós-inoculação, período escolhido com base no início das mortes de fêmeas H_{III} tratadas com a molécula nativa (16-18 dias após a inoculação).

A inoculação da Hsp65 induziu redução na porcentagem de células CD4⁺ após 14 dias em ♀F₁L (de ±19% para ±5%, $p < 0,001$) e em ♂F₁H e ♂F₁L (de ±23% para ±17%, $p < 0,05$) (**FIGURA 16A**); ♀F₁H (14 dias) e ♀F₁L (7 dias) apresentaram aumento do percentual de linfócitos CD4⁺CD45RA⁺ de ±5% para ±57% e ±80%, respectivamente ($p < 0,001$ para ambos os grupos, **FIGURA 16B**) e CD4⁺CD154⁺ (de ±1% para ±57% e ±26%, respectivamente; $p < 0,001$, **FIGURA 16C**), permanecendo inalterados nos demais grupos. Observou-se diminuição do receptor CD45RA na superfície celular aos 14 dias em ♀F₁L (de ±1200 para ±370, $p < 0,01$) enquanto fêmeas F₁H apresentaram ampliação da expressão de CD45RA (de ±900 para ±2100, $p < 0,001$) (**FIGURA 16D**) e expressão reduzida de CD154 em

♀F₁L (de ± 2400 para ± 600 , $p < 0,01$) 7 e 14 dias após o tratamento com a proteína (**FIGURA 16E**).

FIGURA 16 – Análise dos linfócitos T CD4 e seus marcadores de ativação após a inoculação da Hsp65 em híbridos F₁.

Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ (A) e das subpopulações CD45RA⁺ (B) e CD154⁺ (C) e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) dos receptores CD45RA (D) e CD154 (E) na superfície de linfócitos T CD4 no baço de fêmeas e machos F₁H e F₁L (9 meses de idade, 4-7 animais/grupo) após 7 e 14 dias da administração de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (controle). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Continuando a análise de linfócitos T, após a inoculação da Hsp65 de *M. leprae*, observou-se aumento da porcentagem de linfócitos CD8 no baço de ♀F₁H (de ±4% para ±15% aos 14 dias, $p<0,001$) e ♀F₁L (de 5% para ±12% aos 7 dias, $p<0,001$) (**FIGURA 17A**), juntamente com o maior frequência de CD8⁺CD44⁺ (de ±8% para ±88% em ♀F₁H e de ±29% para ±87% em ♀F₁L; $p<0,001$ para ambas linhagens) (**FIGURA 17B**) e da expressão de CD44 (de ±1250 para ±3800, $p<0,001$ para ♀F₁H e ♀F₁L) (**FIGURA 17C**). Apesar da ampliação de CD8⁺CD44⁺ em ♂F₁H aos 7 dias pós-inoculação (de ±52% para ±74%, $p<0,05$), houve redução 14 dias (para ±31%, $p<0,01$ e $p<0,001$ em ♂F₁H e ♂F₁L, respectivamente).

FIGURA 17 – Fenotipagem de linfócitos T CD8 após tratamento com Hsp65 em híbridos F₁.

Fenotipagem de linfócitos T CD8 (A) e da subpopulação CD8⁺CD44⁺ (B) e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD44 (C) em células do baço de fêmeas e machos F₁H e F₁L (9 meses de idade, 4-7 animais/grupo) após 7 e 14 dias da administração de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (controle). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Em relação às alterações de linfócitos B nos camundongos híbridos F_1 , ♂ F_1H apresentaram, uma semana após a inoculação da proteína, redução de $\pm 19,7\%$ para $\pm 3,6\%$ de linfócitos $B220^+$ ($p < 0,01$) com sequencial ampliação para $\pm 40\%$ ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle; da mesma forma, ♂ F_1L mostraram aumento de linfócitos $B220^+$ ($\pm 5,6\%$ para $\pm 31,4\%$, $p < 0,001$) aos 14 dias (**FIGURA 18A**). A porcentagem de linfócitos $B220^+CD138^+$ permanecendo inalterada nos grupos (**FIGURA 18B**), e a expressão de CD138 aumentou com o tratamento em ♀ F_1L aos 7 dias ($p < 0,001$, **FIGURA 18C**).

FIGURA 18 – Fenotipagem de linfócitos B em camundongos híbridos F_1 .

Células ($B220^+$) (A), a subpopulação $B220^+CD138^+$ (B) e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD138 (C) foram quantificadas no baço de fêmeas e machos F_1H e F_1L (9 meses de idade, 4-7 animais/grupo) após 7 e 14 dias da administração de $2,5 \mu\text{g}/\text{animal}$ de Hsp65 ou PBS (controle). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Dentre as células fagocíticas, ♀F₁H apresentaram aumento de células CD11b⁺ 7 dias após a administração da proteína (de ±3% para ±5%, $p<0,05$) retornando ao nível do grupo controle, enquanto ♀F₁L mostraram redução dessa população celular 14 dias pós-inoculação (de ±3,7% para ±0,7%, $p<0,001$; **FIGURA 19A**). Aos 7 dias houve diminuição na expressão do receptor (de ±960 para ±300, $p<0,001$) e aumento em ♀F₁L (de ±354 para ±1500, $p<0,001$) com retorno a um estado basal aos 14 dias (**FIGURA 19B**).

FIGURA 19 – Fenotipagem de macrófagos esplênicos no baço de híbridos F₁ após inoculação da Hsp65.

Frequência de células CD11b⁺ (A) e da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do receptor (B) no baço de fêmeas e machos F₁H e F₁L (9 meses de idade, 4-7 animais/grupo) após 7 e 14 dias da administração de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (controle). * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Como observado nas células CD11b⁺, a administração da Hsp65 de *M. leprae* ocasionou aumento da frequência de células CD11c⁺ em ♀F₁H (de ±2% para ±6% aos 14 dias, $p<0,001$) e ♀F₁L (de ±1,5% para ±9% aos 7 dias, $p<0,001$) (**FIGURA 20A**). Nessas células foram analisados CD80 e CD86, moléculas que tem sua expressão aumentada após a ativação celular e se ligam ao CD28 de linfócitos T, induzindo ativação. Observou-se o aumento de CD80 em células dendríticas de ♀F₁L aos 7 dias (de ±0,5% para ±3%, $p<0,01$) (**FIGURA 20B**) e redução de CD86 em ♂F₁L ($p<0,05$, **FIGURA 20C**).

FIGURA 20 – Porcentagem de células dendríticas no baço de animais envelhecidos F₁ inoculados com Hsp65.

Fenotipagem de células CD11c⁺ (A) e das subpopulações CD11c⁺CD80⁺ (B) e CD11c⁺CD86⁺ (C) no baço de fêmeas e machos F₁H e F₁L (9 meses de idade, 4-7 animais/grupo) após 7 e 14 dias da administração de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (controle). **p*<0,05 e ****p*<0,001 (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Comparativamente, a expressão de CD11c foi aumentada em ♀F₁H (de ±680 para ±1900, *p*<0,001 aos 14 dias) e ♀F₁L (de ±560 para ±1600, *p*<0,001 aos 7 dias), permanecendo inalterado nos outros grupos (**FIGURA 21A**). O aumento de CD80 e CD86 na superfície celular é importante para a capacidade ativadora dessas células durante a resposta imune, e a administração da Hsp65 foi capaz de modular a expressão de CD86 em ♀F₁H (de ±50 para ±1300, *p*<0,001) e ♀F₁L (de ±270 para ±2000, *p*<0,001), aos 14 e 7 dias pós-inoculação, respectivamente (**FIGURA 21C**). A expressão de CD80 na superfície de células CD11c⁺ não foi modulada (**FIGURA 21B**).

FIGURA 21 – Fenotipagem dos receptores de superfície de células dendríticas em híbridos envelhecidos F₁.

Expressão na superfície celular de CD11c (A), CD80 (B) e CD86 (C) nos em células CD11c⁺ no baço de fêmeas e machos F₁H e F₁L (9 meses de idade, 4-7 animais/grupo) após 7 e 14 dias da administração de 2,5 µg/animal de Hsp65 ou PBS (controle). ****p*<0,001 (Two-Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni para comparação ao grupo controle).

Após as análises celulares em ♀H_{III} envelhecidas e de camundongos híbridos, os resultados das fenotipagens do baço de ♀H_{III} e híbridos F₁ (machos e fêmeas) foram agrupados nas **TABELAS 2 e 3**. Todos os animais apresentavam 9 meses de idade para a inoculação de 2,5µg de Hsp65 via intraperitoneal; o aumento (+) ou redução (-) das porcentagens celulares e das medianas de intensidade de fluorescência de cada fluorocromo analisado, indicados na tabela, referem-se à comparação ao grupo controle.

TABELA 2 – Compilação dos resultados obtidos da fenotipagem celular e produção de anticorpos anti-Hsp65 de ♀H_{III} e híbridos F₁ envelhecidos aos 7 dias da inoculação da Hsp65 de *M. leprae*

Hsp65 7 dias	♀H _{III}	♀F ₁ H	♀F ₁ L	♂F ₁ H	♂F ₁ L
% CD4	.	.	.	.	.
% CD4 ⁺ CD45RA ⁺	.	.	+++	.	.
% CD4 ⁺ CD154 ⁺	.	.	++	.	.
MIF CD45RA	+	.	.	.	.
MIF CD154	+	+++	--	.	.
% CD8 ⁺	.	.	+++	.	.
% CD8 ⁺ CD44 ⁺	.	+	+++	++	.
MIF CD44	.	.	+++	.	.
% B220 ⁺	.	.	.	--	.
% B220 ⁺ CD138 ⁺	.	.	.	.	.
MIF CD138	.	-	+++	.	.
% CD11b ⁺	.	+	.	.	.
MIF CD11b	.	---	+++	.	.
% CD11c ⁺	.	.	+++	.	.
% CD11c ⁺ CD80 ⁺	.	.	+++	.	.
% CD11c ⁺ CD86 ⁺	.	.	.	.	-
MIF CD11c	.	.	+++	.	.
MIF CD80	.	.	.	.	.
MIF CD86	.	.	+++	.	.
Anticorpos anti-Hsp65	.	+++IgM	.	++IgM	++IgM
	.	.	.	.	+ IgG

“+” ou “+ +” ou “+ + +”, aumento significativo, em relação ao grupo controle, após a inoculação da Hsp65 ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente); “-“, “- -“ ou “- - -“, redução significativa, em relação ao grupo controle, após a inoculação da Hsp65 ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente); “•” significa ausência de alteração em relação ao grupo controle. MIF = mediana de intensidade de fluorescência.

TABELA 3 – Compilação dos resultados obtidos da fenotipagem celular e produção de anticorpos anti-Hsp65 de ♀H_{III} e híbridos F₁ envelhecidos aos 14 dias da inoculação da Hsp65 de *M. leprae*.

Hsp65 14 dias	♀H _{III}	♀F ₁ H	♀F ₁ L	♂F ₁ H	♂F ₁ L
% CD4	.	.	---	-	-
% CD4 ⁺ CD45RA ⁺	.	+++	.	.	.
% CD4 ⁺ CD154 ⁺	.	+++	.	.	.
MIF CD45RA	.	+++	---	.	.
MIF CD154	.	.	---	.	.
% CD8 ⁺	.	+++	.	.	.
% CD8 ⁺ CD44 ⁺	.	+++	--	--	---
MIF CD44	--	+++	.	-	-
% B220 ⁺	+	.	.	+++	++
% B220 ⁺ CD138 ⁺	.	.	.	.	.
MIF CD138	.	.	.	.	.
% CD11b ⁺	.	.	---	.	.
MIF CD11b	.	.	.	.	.
% CD11c ⁺	.	+++	-	.	.
% CD11c ⁺ CD80 ⁺	-	.	.	.	.
% CD11c ⁺ CD86 ⁺	-	.	.	.	-
MIF CD11c	.	+++	.	.	.
MIF CD80	.	.	.	.	.
MIF CD86	.	+++	.	.	.
Anticorpos anti-Hsp65	.	.	++IgM	+++IgM	+IgM
	++IgG1*	.	.	++IgG	.

“+” ou “+ +” ou “+ + +”, aumento significativo, em relação ao grupo controle, após a inoculação da Hsp65 ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente); “-”, “- -” ou “- - -”, redução significativa, em relação ao grupo controle, após a inoculação da Hsp65 ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente); “•” significa ausência de alteração em relação ao grupo controle. *Dados obtidos anteriormente. MIF = mediana de intensidade de fluorescência.

6 DISCUSSÃO

Inevitável e irreversível, o envelhecimento é associado ao declínio de funções fisiológicas e da imunidade sendo a somatória de fatores genéticos e ambientais (TROEN, 2003). As modificações do sistema imune durante a senescência contribuem para o aumento da mortalidade e morbidade, havendo dificuldade de montar uma resposta eficiente frente a novos antígenos e eficácia limitada de vacinas, o que torna o indivíduo mais suscetível a doenças infecciosas e à instalação de processos autoimunes (DEY; CHAUDHURY, 1997).

A evidente redução da sobrevida de fêmeas da linhagem H_{III} após a administração da Hsp65 de *M. leprae* (BALDON, 2010) é semelhante ao observado em experimentos anteriores que mostram a participação dessa proteína no agravamento do quadro de autoimunidades como observado em camundongos lúpicos (MARENGO et al., 2008). Como a sinalização e resposta celular podem modificar-se de acordo com o ambiente onde as células se encontram, sendo influenciadas por fatores genéticos e epigenéticos, a inoculação da Hsp65 de *M. leprae* pode levar a alterações na imunidade no organismo. Nesse contexto, buscamos os fatores responsáveis pela interferência da Hsp65 em fêmeas H_{III} envelhecidas através da análise da resposta celular anti-Hsp65 e, utilizando-se camundongos híbridos F₁, verificamos se a susceptibilidade de fêmeas H_{III} observada anteriormente é proveniente, ou não, das diferentes constituições genéticas dessa linhagem ou apresenta um efeito restrito ao gênero masculino ou feminino.

Sabe-se que as Hsp estabelecem diferentes relações com o sistema imune e são alvos de linfócitos e anticorpos específicos. Durante o curso de autoimunidades nas proteínas de choque térmico, como as Hsp60 e Hsp65, foram identificados epítomos que induzem uma resposta patogênica ou reguladora após ativação de linfócitos T ou B (QUINTANA; COHEN, 2008). Após as observações das mortes em fêmeas H_{III} inoculadas com a Hsp65 observadas anteriormente (BALDON, 2010), esperava-se que houvesse aumento na frequência de linfócitos, macrófagos e células dendríticas ativadas, sugerindo superestimulação do sistema imune que poderia ser responsável pelo menor tempo de sobrevida; porém, a proteína não foi capaz de induzir um alto estado de ativação nas fêmeas H_{III}.

Em relação aos linfócitos T CD4 esplênicos, os resultados mostraram redução percentual apenas em camundongos F₁ (fêmeas F₁L e machos F₁H e F₁L), o que conduziu à análise da expressão de moléculas de superfície nesses linfócitos para verificar o estado de ativação celular. Células *naïves* e de memória podem ser definidas pela exclusão mútua de duas isoformas de CD45, respectivamente CD45RA e CD45RO, amplamente utilizadas para

se caracterizar, em humanos e animais, o processo de ativação celular (WU et al., 2010). Ainda, em humanos, células $CD4^+CD45RA^+CD27^+$ incluem células *naïves*, e $CD4^+CD45RA^+CD27^-$ constituem uma população de linfócitos T de memória efetores com re-expressão do receptor RA na superfície (DI MITRI et al., 2011). O aumento da porcentagem de células T $CD4^+CD45RA^+$ ocorreu em fêmeas F_1H e F_1L e a maior expressão desse receptor foi observada em fêmeas (H_{III} e híbridas F_1) após a injeção da Hsp65. Apesar de não ter sido verificada a expressão do receptor CD27 nessas células, observou-se aumento de CD154 em fêmeas H_{III} e fêmeas F_1H , indicando estado ativado desses linfócitos. Como no envelhecimento há uma menor produção de células T *naïves* que são substituídas por uma população de memória (FAGNONI et al., 2000), os resultados apresentados podem indicar a capacidade da Hsp65 em ativar e induzir a re-expressão de CD45RA em linfócitos T $CD4^+$ de memória efetores presentes em maior proporção no camundongo idoso. Apesar de não ter uma origem clara, esse fenótipo celular já foi descrito em pacientes com infecções virais persistentes e com síndromes inflamatórias como artrite reumatoide (DI MITRI et al., 2011), que também são comuns no envelhecimento.

Em nossos experimentos com fêmeas H_{III} , a porcentagem de $CD4^+CD28^+$ foi reduzida, porém com expressão na superfície celular de CD28 aumentada. Linfócitos $CD4^+CD28^-$, células de memória efetoras com capacidade citotóxica e potencial patogênico, foram descritas em pacientes com doenças autoimunes como a artrite reumatoide (BROUX et al., 2012). O CD28 também é necessário para a ativação celular, ligando-se aos coestimuladores CD80 e CD86 de células apresentadoras de antígenos. Já foi descrito que o envelhecimento é associado à expansão de células T efetoras $CD28^-$ que tenta compensar a progressiva diminuição de células *naïves* (ENGWERDA; HANDWERGER; FOX, 1994; FAGNONI et al., 2000) e que a redução de células $CD4^+CD28^+$ é acompanhada, no envelhecimento, pelo decréscimo da expressão de CD154, reduzindo ainda mais a capacidade de induzir a proliferação de linfócitos B e sua produção de anticorpos (WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009), como observado em fêmeas H_{III} . Observou-se, ainda, diferença na cinética dos fenótipos de linfócitos $CD4^+$ nos camundongos híbridos: fêmeas F_1H exibiram fenótipo de ativação ($CD45RA^+$ e $CD154^+$) quatorze dias após a inoculação, e fêmeas F_1L aos sete dias, retornando ao nível pré-imune após 7 dias. Os resultados apresentados corroboram para a existência de um efeito do gênero feminino relacionado ao estado de ativação de linfócitos T $CD4^+$. Apesar do percentual não diferir entre os grupos, alguns estudos relatam uma maior contagem de $CD4^+$ em fêmeas, mas,

aparentemente, a função dessas células (células *naïves*, de memória ou efetoras) é que parece ser importante nas respostas entre machos e fêmeas (AMADORI et al., 1995; RUDY et al., 2002; UPPAL; VERMA; DHOT, 2003).

Em relação aos linfócitos CD8, um aumento percentual foi observado em fêmeas híbridas (F₁H aos 14 dias e F₁L aos 7 dias pós-inoculação da Hsp65), com maior frequência de CD8⁺CD44⁺ e da intensidade de fluorescência de CD44. O CD44 é uma proteína de membrana envolvida em diversos processos como interações célula-célula, adesão e migração celular, ativação de linfócitos, recirculação e *homing* (DEGRENDELE; ESTESS; SIEGELMAN, 1997; DEGRENDELE et al., 1997). Dessa forma, a Hsp65 foi responsável pela maior porcentagem de células CD8 em estado de ativação no baço em fêmeas F₁ que podem entrar em processo de migração para o local alvo da resposta imune induzida pela Hsp, além de representarem, como nas células CD4 acima descritas, uma população de células de memória efetoras. Nossos resultados sugerem que, em fêmeas envelhecidas, a administração intraperitoneal da Hsp65 induz o aumento de moléculas coestimuladoras na superfície de linfócitos T, indicando a capacidade de ativação celular da proteína.

Dados prévios indicam que a inoculação da Hsp65 de *M. leprae* é capaz de induzir a produção de anticorpos contra a proteína e que esses anticorpos podem estar relacionados ao desenvolvimento e progressão de diferentes autoimunidades como lúpus, artrite e uveíte (COMMODARO et al., 2012; MARENGO et al., 2009; MARENGO et al., 2008). A administração da Hsp65 em fêmeas H_{III} e machos F₁ envelhecidos aumentou o percentual de B220⁺, sem a alteração de B220⁺CD138⁺, independente do aumento da frequência de linfócitos CD4 nesses grupos. Ainda, esse aumento de linfócitos B é refletido na maior produção de anticorpos IgG e IgM anti-Hsp65 produzidos nos machos híbridos F₁, principalmente aos 14 dias pós-inoculação da Hsp. Porém, sabe-se que no processo de envelhecimento há um aumento de células de memória à custa da redução de células B *naïves* nos órgãos linfoides secundários, sem a diminuição de células B na circulação (WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009). A baixa taxa de linfócitos B em fêmeas H_{III} inoculadas com a Hsp65, somando-se à necessidade de linfócitos T auxiliares para a troca de classe de IgM para IgG, podem explicar a menor síntese de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 e anti-DNA observada anteriormente (BALDON, 2010); além disso, uma menor capacidade de ativação dos linfócitos B desse grupo é demonstrada pela baixa expressão de CD40 na superfície celular, fenótipo já relatado durante o envelhecimento (COLONNA-ROMANO et al., 2003). Pode-se considerar, também, que em fêmeas haja

indução de apoptose células B pela Hsp65, já que as Hsp60 são capazes de induzir a morte celular (CHANDRA; CHOY; TANG, 2007; DI FELICE et al., 2005), porém, tal ensaio precisa ser realizado para confirmar essa hipótese. Assim, os resultados apresentados demonstraram redução progressiva de linfócitos B na imunosenescência em fêmeas, com consequente deficiência da função celular frente à administração da Hsp65. Isso reforça dados anteriormente obtidos em fêmeas H_{III}, indicando que não é a quantidade de anticorpos anti-Hsp65 produzida responsável pela morte desses indivíduos, mas outros fatores atribuídos ao efeito da Hsp; tais condições ainda serão estudadas nessas linhagens para se entender a causa de morte desses animais.

A produção de anticorpos contra proteínas de choque térmico significa um estado de estresse no organismo, e também pode ser o gatilho para o desenvolvimento de processos crônico-degenerativos através do mimetismo molecular e reconhecimento cruzado com proteínas próprias altamente conservadas (CAPPELLO et al., 2013). Portanto, a quantificação dos níveis de anticorpos anti-Hsp65 é importante para a verificação do efeito dessa molécula. Resultados anteriores mostram que no modelo de lúpus murino (MARENGO et al., 2008), uveíte autoimune induzida (MARENGO et al., 2009) e nas linhagens H_{III} e L_{III} envelhecidas (BALDON, 2010) não há alteração marcante na produção de anticorpos anti-Hsp65 após a inoculação da proteína, principalmente dos isótipos IgG1 e IgG2a. Contudo, camundongos F₁, geneticamente heterogêneos em relação aos genes de produção de anticorpos, apresentaram maior produção de IgG anti-Hsp65 em machos, e IgM anti-Hsp65 em machos e fêmeas; isso indica a ocorrência de uma resposta imune humoral primária contra a Hsp65 (produção de IgM) e, em machos F₁, a indução de troca de isótipo para IgG pela injeção da proteína. Em humanos, a produção de anticorpos anti-Hsp não é restrita a pacientes com autoimunidades e pode ser detectada durante o processo de envelhecimento (POCKLEY et al., 1999; POCKLEY; SHEPHERD; CORTON, 1998; REA; MCNERLAN; POCKLEY, 2001; XU et al., 2000).

Os resultados das fenotipagens dos linfócitos T e B não demonstraram aumento da porcentagem ou do número total no baço de fêmeas H_{III}, conduzindo-nos a averiguar se esse efeito é relacionado ao estado de ativação de células da imunidade inata frente à administração da Hsp65. A principal via de ativação de linfócitos T é através do processamento e apresentação de antígenos, via moléculas do MHC de classe I ou II, realizados principalmente pelas APC. Em camundongos, CD11b está presente em macrófagos, células NK, linfócitos ativados e também em células B-1 da cavidade peritoneal;

já o aumento da expressão de CD11c na superfície celular é um marcador de células dendríticas relacionado com internalização de partículas opsonizadas, além de participar da migração celular (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). As porcentagens de macrófagos e de células dendríticas permaneceram inalteradas em fêmeas H_{III} envelhecidas após a administração da Hsp65, corroborando com o fato de linfócitos T e B não apresentarem aumento de porcentagem nesses indivíduos; situação semelhante ocorreu em machos híbridos F₁. Diferentemente, fêmeas F₁H e F₁L, que apresentaram aumento de CD11c⁺ e da expressão de CD86 na superfície dessas células, também apresentaram maior resposta de linfócitos T e B, confirmando a resposta imune anti-Hsp65. Como a expressão de CD80 e CD86 é normalmente aumentada nesses tipos celulares quando ativados por antígenos, concluiu-se que a administração da Hsp65 levou à modulação dessas moléculas apenas nas fêmeas F₁. Assim, a Hsp65 foi capaz de levar a indução e ativação de células dendríticas no baço de fêmeas F₁H e F₁L, refletindo no aumento de células T CD4 *naïves* e que expressam CD154 e de linfócitos T CD8 relatado anteriormente.

O aumento de células B220⁺ em machos híbridos F₁ após a inoculação da Hsp65, sem a alteração de células apresentadoras de antígenos e de suas moléculas coestimuladoras, pode indicar uma possível ativação direta pela molécula, não exigindo a participação de linfócitos T auxiliares no desenvolvimento da resposta de anticorpos. Essa hipótese é reforçada por estudos que indicam o reconhecimento de epítomos das proteínas da família das Hsp60 por TCR, BCR e TLR, evidenciando a ampla ação dessas proteínas sobre células potencialmente imunocompetentes (VAN EDEN et al., 2007). De maneira semelhante, parece haver ativação direta de linfócitos T em fêmeas H_{III}, uma vez que o aumento dos marcadores CD45RA e CD154 em linfócitos T CD4 foi independente da participação de macrófagos e células dendríticas.

Ainda, a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ reduzida no processo de envelhecimento, e não alterada pela inoculação da Hsp65 em fêmeas H_{III}, pode estar relacionada à dificuldade de geração de linfócitos B reguladores, afetando a ativação de uma resposta imune efetora e controle de autoimunidades. Células T ativadas através do complexo TCR/CD3 promovem um sinal coestimuladora para a secreção de IL-10, citocina supressora da resposta celular, por células B reguladoras (B_{reg}) CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (BLAIR et al., 2010) ou CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi} (YANABA et al., 2008) através da ligação de seu CD154 (CD40L) no CD40 dos linfócitos B (DUGGAL et al., 2013). Em nossos experimentos, observamos o aumento de CD154 em linfócitos T CD4⁺, principalmente em fêmeas híbridas, refletindo na

produção de anticorpos IgM que foi pouco maior após 7 dias da inoculação comparando-se aos machos. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados em humanos (BLAESER; MCGLAUCHLEN; VOGEL, 2008; DUGGAL *et al.*, 2013), nos quais se observou que a proporção de linfócitos B e B_{reg} CD40⁺ e da expressão desse receptor permanece estável no processo de envelhecimento, mas que o declínio da função reguladora dessas células (produção de IL-10) é causado pela redução da porcentagem de células T CD4⁺CD154⁺ e da capacidade de expressão de CD154 em idosos (entre 60 e 84 anos). Em nossos experimentos, a observação do aumento de anticorpos IgG em machos híbridos inoculados com a Hsp65 indica que a troca de isótipo pode estar ocorrendo de maneira independente de linfócitos T auxiliares, uma vez que células B podem ser ativadas por produtos microbianos via TLR (YANABA *et al.*, 2009); já foi demonstrado que esses linfócitos são capazes de resolver desordens autoimunes inibindo a ação de células T patogênicas através da produção de IL-10 (MIZOGUCHI; BHAN, 2006). Ainda, como não se observou alterações na porcentagem de células apresentadoras de antígenos em machos F₁ e, paralelamente, foi observada produção de anticorpos anti-Hsp65, o efeito da proteína na ativação do sistema imune pode ser T independente.

Continuando a análise da hipótese de que a inoculação da Hsp65 acarretaria alterações sistêmicas nas porcentagens celulares, verificamos a porcentagem de linfócitos, monócitos e células dendríticas, neutrófilos e células *natural killer* (NK) no sangue de fêmeas H_{III} envelhecidas. Apesar dos efeitos observados no baço, os resultados obtidos do sangue de fêmeas H_{III} envelhecidas inoculadas com a Hsp65 mostraram aumento de células dendríticas e NK e a redução da frequência de células CD11b⁺CD80⁺ e CD11b⁺CD86⁺. Vale ressaltar que houve aumento da expressão das moléculas CD11b e CD11c na superfície de granulócitos. Deve-se levar em consideração que indivíduos envelhecidos podem apresentar um estado contínuo de inflamação, denominado, *inflammaging*, no qual há redução da produção de IL-10 e reduzida capacidade supressora de células T reguladoras (FRANCESCHI, 2007); as Hsp podem estar relacionadas a esse processo durante o curso de autoimunidades, participando tanto na regulação quanto na progressão de doenças. Na aterosclerose, a Hsp60 tem função pró-inflamatória (WICK, 2000), enquanto que na artrite reumatoide ela tem papel anti-inflamatório (QUINTANA *et al.*, 2008). Independentemente da via de liberação, já é estabelecido que a presença das proteínas de choque térmico no espaço extracelular facilita o contato com células imunes, promovendo sua ativação (CAPPELLO *et al.*, 2013). Entretanto, o papel da Hsp65 de *M. leprae* no desencadeamento ou na regulação ou de processos

inflamatórios em fêmeas H_{III} envelhecidas permanece obscuro, demonstrado pela porcentagem inalterada de neutrófilos sanguíneos até duas semanas após a injeção da proteína. O aumento da produção de autoanticorpos é comum no desenvolvimento de processos autoimunes durante o envelhecimento, levando à ativação, pela porção Fc do anticorpo, de células inflamatórias e da cascata do sistema complemento (HOGARTH, 2002). Dessa forma, podemos tentar relacionar a maior produção de IgM e IgG com um contínuo estado inflamatório dos híbridos F₁ envelhecidos; a análise de células inflamatórias nesses animais não foi abordada neste estudo, porém será feita para comprovar essa hipótese.

As Hsp60 e Hsp70 são ligantes endógenos de receptores da imunidade inata como os TLR-2, TLR-4 e o CD14, presentes em monócitos humanos (KOL et al., 2000; VABULAS et al., 2002). Entretanto, há controvérsias se a ativação celular dada pela ligação da proteína nesses receptores necessita de subprodutos bacterianos, como o LPS, flagelina ou lipoproteínas (HENDERSON et al., 2010; TSAN; GAO, 2009). Para a Hsp65 de micobactérias, a sinalização ocorre primariamente via CD14; em contraste, as Hsp60 parecem não depender desse receptor e pode sinalizar diretamente via TLR-4 (PALLISER et al., 2004) e influenciar a ativação de APC, linfócitos T e B, apresentando papel importante na apresentação cruzada via moléculas de MHC de classe I (BINDER; SRIVASTAVA, 2005; CALDERWOOD; CIOCCA, 2008). Verificamos que não houve aumento da porcentagem ou expressão de CD14 e TLR-4 nos leucócitos sanguíneos de fêmeas H_{III} velhas devido à baixa imunogenicidade da molécula. Além disso, esse resultado corrobora com a presença de níveis muito baixos de LPS contaminante nas amostras da Hsp65 purificadas, não interferindo na expressão desses marcadores, reforçando a ideia de ligação direta da proteína ao TCR ou BCR nos linfócitos.

Como nosso modelo de estudo da influência da Hsp no processo de envelhecimento envolve a utilização de camundongos selecionados geneticamente para a alta e baixa resposta de anticorpos, verificamos a susceptibilidade à proteína pode ser relacionada aos genes envolvidos na resposta de anticorpos através de camundongos híbridos F₁ obtidos pelo intercruzamento das linhagens H_{III} e L_{III}. Os resultados do tempo médio de sobrevivência obtidos nos camundongos F₁ evidenciaram redução na sobrevivência de fêmeas F₁H inoculadas com a proteína, com intervalo de morte (contando-se os dias entre a primeira e a última morte de animais de cada grupo) e a variância ambiental semelhante ao obtido em fêmeas H_{III} (BALDON, 2010), vivendo por cerca de 70 dias após o tratamento com a Hsp65. Assim, o fenótipo de morte observado em fêmeas H_{III} e em fêmeas F₁H (provenientes de fêmeas H_{III}),

precedido ou não por alterações celulares, pode indicar a ligação entre o efeito da Hsp e a transmissão deste para a prole através de características herdadas das fêmeas. Excluem-se a herança ligada ao cromossomo X e por herança extracromossomial pelo DNA mitocondrial (NARDI, 2004), pois machos não são susceptíveis à morte pela administração da proteína (BALDON, 2010). O envelhecimento, moldado por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e estocásticos, apresenta mudanças que podem ser transmitidas de maneira sexo-específica para a prole, sendo um tipo de herança não-Mendeliana chamada de herança epigenética transgeracional, que influencia no dimorfismo sexual e acarreta num ciclo de transmissão de mãe para filha ou pai para filho (FRAGA, 2009; VIGE; GALLOU-KABANI; JUNIEN, 2008); essa hipótese também pode ser aplicada em relação à susceptibilidade a Hsp65 nas fêmeas H_{III} envelhecidas.

Apesar do processo de seleção dos camundongos da Seleção III ter direcionado a escolha de genes responsáveis pela produção máxima ou mínima de anticorpos, outros genes ou segmentos de DNA de *loci* específicos podem ter sido herdados como consequência de sua proximidade física, evento conhecido como *linkage*; quanto maior a proximidade de dois *locus*, maior é a ligação e menor é a frequência de recombinação entre eles (CUTTER; PAYSEUR, 2013). Portanto, se a susceptibilidade à Hsp65 em fêmeas da Seleção III deriva desse tipo de herança, provavelmente o gene alvo estará presente próximo aos *loci* selecionados para a produção de anticorpos. Nos camundongos da Seleção III, no cromossomo 3 estão os genes responsáveis pelos receptores Fc de alta afinidade de IgG, IL-12 α e IL-6R α , enquanto que o gene que codifica para o receptor β 2 da IL-12 está colocalizado no cromossomo 8; no cromossomo 9 estão presentes os genes para o CD3, IL-10 α R e para a produção da citocina IL-18 (DE SOUZA et al., 2004). O QTL encontrado no cromossomo 9 é envolvido na susceptibilidade a tumor de pele (NAGASE; MAO; BALMAIN, 1999) bem como observado na seleção III (DE SOUZA et al., 2004); nos cromossomos 3 e 9 também foram demonstradas a presença de QTL relacionados à artrite induzida (OTTO et al., 1999; WEIS et al., 1999; YANG et al., 1999).

Ao se analisar a susceptibilidade à Hsp65 de *M. leprae* nas linhagens H_{III} e L_{III} e seus híbridos F₁H e F₁L deve-se levar em consideração o fato do sistema imune, aparentemente em todos os aspectos, ser regulado de forma diferente entre os sexos e influenciado pelos hormônios sexuais (CANDORE et al., 2010; OERTELT-PRIGIONE, 2012; VIGE; GALLOU-KABANI; JUNIEN, 2008). Tal dimorfismo é relacionado com a diferente susceptibilidade a infecções, doenças autoimunes e incidência de tumores (OTTONELLO et

al., 2002; SINGH; RAI; SINGH, 2005), mais observados em idade avançada. Assim, a natureza e a intensidade da resposta imune, diferentes em machos e fêmeas, são diretamente influenciadas por hormônios e pela genética individual, abrindo um campo de estudo em relação à susceptibilidade à Hsp65 de *M. leprae* nas fêmeas H_{III}. O sistema imune de camundongos híbridos F₁ responde de maneira diferente frente à inoculação da proteína, sendo regulado, talvez, por um efeito do gênero feminino. Fêmeas têm maior concentração de anticorpos no plasma e maior resposta primária e secundária de anticorpos frente a uma grande quantidade de antígenos, porém apresentam aspectos da imunidade celular mais fracos em relação a machos (revisado por PLOTNIKOFF; FAITH, 2007). Tais diferenças estendem-se também em relação a doenças autoimunes: fêmeas têm maior prevalência de artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla (PLOTNIKOFF; FAITH, 2007). Os hormônios têm papel fundamental na ativação do sistema imune, incluindo esteroides, glicocorticoides, hormônio do crescimento, prolactina e hormônios tímicos (GROSSMAN, 1989). O ciclo estral causa variações nas subpopulações celulares sanguíneas, correlacionadas ao nível de progesterona e estradiol (MATHUR et al., 1979). Existem indicações de que andrógenos podem inibir o desenvolvimento de autoimunidades em machos, e que o tratamento com esses hormônios melhorou o lúpus eritematoso sistêmico, enquanto que estrógenos exacerbaram a condição (HOROWITZ et al., 1977).

Os resultados aqui apresentados podem ser diferentes de publicações que discutem as alterações celulares no processo de envelhecimento. Isso pode ser relacionado às distintas definições utilizadas para determinar quando um camundongo atinge idade avançada: alguns autores consideram que um camundongo seja idoso a partir de 12 meses (LY et al., 2010; SMALLWOOD; LOPEZ-FERRER; SQUIER, 2011), enquanto outros concluem que o animal necessita ter idade entre 18 e 24 meses (MAHBUB; DEBURGHGRAEVE; KOVACS, 2012), além da incidência de sarcopenia (perda da massa e força da musculatura esquelética) (YUAN et al., 2009). Mesmo assim, em nosso modelo foram observadas alterações celulares e humorais relacionadas ao processo de envelhecimento e descritas em outros trabalhos. Vale ressaltar que, mesmo utilizando animais que não apresentam desenvolvimento espontâneo de autoimunidades e que sejam considerados idosos jovens, fêmeas H_{III} sofreram a interferência efetiva da Hsp65.

Embora não tenhamos investigado a capacidade proliferativa *in vitro* de linfócitos e a produção de citocinas, esse estudo funcional poderá trazer esclarecimentos em relação à produção de anticorpos após a inoculação da Hsp65, uma vez que a troca de classe e o

aumento de anticorpos é induzido por citocinas, como observado pelos níveis de IgM que aumentam nos grupos inoculados com a proteína mesmo quando não há aumento da porcentagem de linfócitos B220⁺ ou de moléculas de ativação. Ao contrário, a produção de IgG, maior em machos pós-inoculação da proteína, não é tão evidente; essa observação levanta a questão da qualidade do estímulo que a Hsp65 exerce sobre o sistema imune para sua ativação e capacidade de mudança de isótipo de anticorpo após sua inoculação. É importante ressaltar que, apesar da já conhecida diminuição do número de células que migram da medula óssea no envelhecimento, o número e porcentagem celular na periferia se mantêm a custa de proliferação homeostática devido às citocinas IL-7 e IL-15 e os clones de células que proliferam são geralmente aqueles previamente primados, aumentando o número de linfócitos efetores e/ou de memória, enquanto que células *naïves* saem em menor quantidade, tanto da medula óssea quanto do timo (PALMER, 2013).

Torna-se claro que as atividades das Hsp dependem do contexto imunológico que se encontram e da história imunológica do indivíduo, sendo afetadas por múltiplos fatores. Dentre a resposta imune direcionada a diferentes proteínas de estresse, a concentração, o tempo de exposição do indivíduo à molécula e o meio fisiopatológico global no sítio-alvo são elementos responsáveis pelas diferentes respostas observadas (COLACO et al., 2013). Apesar das Hsp apresentarem papel imunorregulador em um ambiente fisiológico, cuidados devem ser tomados na análise dos resultados, levando em conta o modelo de estudo utilizado. Ressaltando a preocupação da utilização de modelos experimentais que sejam mais fiéis em termos de representação de uma população natural; nosso grupo vem estudando o papel da Hsp65 em diferentes modelos de autoimunidades, demonstrando que a inoculação da proteína nativa é capaz de induzir a morte em camundongos lúpicos F₁(NZBxNZW) e o agravamento de uveíte autoimune induzida (MARENGO et al., 2009; MARENGO et al., 2008). Porém, camundongos injetados com os peptídeos da Hsp65 K⁴⁰⁹A foram capazes de inibir o desenvolvimento/agravamento da doença, fato associado ao aumento de IL-10 e a diminuição de células T CD4⁺IFN- γ ⁺, enquanto que animais injetados com Hsp65 K⁴⁰⁹A e o *Leader pep* da Hsp65 nativa são capazes de exacerbar a uveíte (COMMODARO et al., 2012). Usamos a proteína íntegra da Hsp65 de *M. leprae* nos camundongos da Seleção III; esse modelo animal representa uma população natural, heterogênea em relação à constituição genética, mesmo com homozigose dos genes envolvidos na produção máxima ou mínima de anticorpos, e a observação da ativação de linfócitos e células dendríticas após a injeção da Hsp65, principalmente em fêmeas F₁ envelhecidas expõe a importância da Hsp65 como fator

ambiental responsável pela morte prematura das fêmeas H_{III} e F_1H , mas não diretamente relacionado a esse fenótipo. Além disso, o fato de um grande número de genes, apresentando diferentes expressões entre os sexos, contribuir para as diferenças na susceptibilidade a doenças autoimunes mostra que em nosso modelo pode haver susceptibilidade genética à Hsp65, sendo principalmente um efeito observado no gênero feminino e influenciado pelo meio ambiente, inoculação da Hsp65 e idade.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram a participação da Hsp65 de *M. leprae* na ativação do sistema imune em indivíduos envelhecidos, agindo distintamente nas linhagens H_{III} e nos híbridos F₁. As alterações celulares observadas principalmente em fêmeas, a saber, reativação de linfócitos T de memória em fêmeas H_{III} e ativação de células apresentadoras e de linfócitos T e B nos híbridos F₁, evidenciaram um efeito do gênero na resposta anti-Hsp65, mas não estão diretamente relacionadas à redução da sobrevida, uma vez que fêmeas F₁L não apresentam tal fenótipo. Ainda, uma menor sobrevida foi observada em fêmeas F₁H, evidenciando que tal susceptibilidade, além de ser sexo-específica, possivelmente é transmitida geneticamente, e pode indicar que os genes selecionados para a alta produção de anticorpos ou relacionados podem estar envolvidos na susceptibilidade à Hsp65, seja por *linkage* ou deriva genética durante a produção da Seleção III. Descarta-se a hipótese de herança ligada ao cromossomo X, evidenciado pela menor ativação celular e ausência de alteração da sobrevida em machos. A determinação das ações biológicas das proteínas de choque térmico é importante na compreensão de processos crônico-degenerativos e de mudanças na homeostase do indivíduo. Os dados contribuem para o entendimento geral do papel das Hsp na modulação de características imunológicas e da sua importância em eventos imunes que ocorrem durante o envelhecimento.

REFERÊNCIAS¹

- AGRAWAL, A.; AGRAWAL, S.; GUPTA, S. Dendritic cells in human aging. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 5, p. 421-426, May 2007.
- ALARD, J. E. et al. Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases. **Autoimmun. Rev.**, v. 6, n. 7, p. 438-443, Aug 2007.
- AMADORI, A. et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. **Nat. Med.**, v. 1, n. 12, p. 1279-1283, Dec 1995.
- ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses. **Immunol. Lett.**, v. 74, n. 1, p. 35-39, Sep 15 2000.
- ASEA, A. Initiation of the Immune response by extracellular Hsp72: chaperokine activity of Hsp72. **Curr Immunol Rev**, v. 2, n. 3, p. 209-215, Aug 2006.
- ASPINALL, R. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3037-3045, Apr 1 1997.
- ASPINALL, R.; ANDREW, D. Thymic involution in aging. **J. Clin. Immunol.**, v. 20, n. 4, p. 250-256, Jul 2000.
- BALDON, E. J. **Ações das Hsp65r nativa e sua mutante K⁴⁰⁹A de *Mycobacterium leprae* durante o processo de envelhecimento.** 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BARTKE, A. Insulin and aging. **Cell Cycle**, v. 7, n. 21, p. 3338-3343, Nov 2008.
- BENOIST, C.; MATHIS, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 797-801, Sep 2001.
- BINDER, R. J.; SRIVASTAVA, P. K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 6, p. 593-599, Jun 2005.
- BIOZZI, G. et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 85, p. 31-98, 1979.
- BLACKBURN, S. D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 29-37, Jan 2009.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLAESER, A.; MCGLAUCHLEN, K.; VOGEL, L. A. Aged B lymphocytes retain their ability to express surface markers but are dysfunctional in their proliferative capability during early activation events. **Immun. Ageing**, v. 5, p. 15, 2008.

BLAIR, P. A. et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 129-140, Jan 2010.

BOUREE, P. Immunity and immunization in elderly. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 51, n. 10, p. 581-585, Dec 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BROUX, B. et al. Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. **Trends. Mol. Med.**, v. 18, n. 8, p. 446-453, Aug 2012.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-366, Feb 1998.

BUTCHER, S.; CHAHÉL, H.; LORD, J. M. Review article: ageing and the neutrophil: no appetite for killing? **Immunology**, v. 100, n. 4, p. 411-416, Aug 2000.

CALDERWOOD, S. K.; CIOCCA, D. R. Heat shock proteins: stress proteins with Janus-like properties in cancer. **Int. J. Hyperthermia**, v. 24, n. 1, p. 31-39, Feb 2008.

CANDORE, G. et al. Gender-related immune-inflammatory factors, age-related diseases, and longevity. **Rejuvenation Res.**, v. 13, n. 2-3, p. 292-297, Apr-Jun 2010.

CAPPELLO, F. et al. Chlamydia trachomatis infection and anti-Hsp60 immunity: the two sides of the coin. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 8, p. e1000552, Aug 2009.

CAPPELLO, F. et al. Hsp60 and human aging: Les liaisons dangereuses. **Front. Biosci.**, v. 18, p. 626-637, 2013.

CARAMALHO, I. et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 4, p. 403-411, Feb 2003.

CARNES, B. A.; STAATS, D. O.; SONNTAG, W. E. Does senescence give rise to disease? **Mech. Ageing Dev.**, v. 129, n. 12, p. 693-699, Dec 2008.

CHAMBERLAIN, W. D.; FALTA, M. T.; KOTZIN, B. L. Functional subsets within clonally expanded CD8(+) memory T cells in elderly humans. **Clin. Immunol.**, v. 94, n. 3, p. 160-172, Mar 2000.

CHANDRA, D.; CHOY, G.; TANG, D. G. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 43, p. 31289-31301, Oct 2007.

CHINN, I. K. et al. Changes in primary lymphoid organs with aging. **Semin. Immunol.**, v. 24, n. 5, p. 309-320, Oct 2012.

CHIU, B. C. et al. The host environment is responsible for aging-related functional NK cell deficiency. **J. Immunol.**, v. 191, n. 9, p. 4688-4698, Nov 2013.

CHMIELA, M. et al. A link between *Helicobacter pylori* and/or *Chlamydia* spp. infections and atherosclerosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 187-192, May 25 2003.

COHEN, E. Aging, protein aggregation, chaperones, and neurodegenerative disorders: mechanisms of coupling and therapeutic opportunities. **Rambam Maimonides Med. J.**, v. 3, n. 4, p. e0021, Oct 2012.

COLACO, C. A. et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 461230, 2013.

COLONNA-ROMANO, G. et al. B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. **Mech. Ageing Dev.**, v. 124, n. 4, p. 389-393, Apr 2003.

COMMODARO, A. G. et al. The role of *M. leprae* Hsp65 protein and peptides in the pathogenesis of uveitis. **Autoimmune Dis.**, v. 2012, p. 197648, 2012.

COPELAND, J. M. et al. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. **Curr. Biol.**, v. 19, n. 19, p. 1591-1598, Oct 13 2009.

CUTTER, A. D.; PAYSEUR, B. A. Genomic signatures of selection at linked sites: unifying the disparity among species. **Nat. Rev. Genet.**, v. 14, n. 4, p. 262-274, Apr 2013.

DE SOUZA, C. M. et al. Quantitative trait loci in Chromosomes 3, 8, and 9 regulate antibody production against *Salmonella* flagellar antigens in the mouse. **Mamm. Genome**, v. 15, n. 8, p. 630-636, Aug 2004.

DEGRENDELE, H. C.; ESTESS, P.; SIEGELMAN, M. H. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. **Science**, v. 278, n. 5338, p. 672-675, Oct 24 1997.

DEGRENDELE, H. C. et al. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. **J. Immunol.**, v. 159, n. 6, p. 2549-2553, Sep 15 1997.

DEY, A. B.; CHAUDHURY, D. Infections in the elderly. **Indian J. Med. Res.**, v. 106, p. 273-285, Oct 1997.

DI FELICE, V. et al. Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, n. 1, p. 4-9, Jan 2005.

DI MITRI, D. et al. Reversible senescence in human CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ memory T cells. **J. Immunol.**, v. 187, n. 5, p. 2093-2100, Sep 2011.

DILLIN, A.; CRAWFORD, D. K.; KENYON, C. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 830-834, Oct 2002.

DILLIN, A. et al. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. **Science**, v. 298, n. 5602, p. 2398-2401, Dec 2002.

DORIA, G. et al. Genetic control of immune responsiveness, aging and tumor incidence. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 96, n. 1-3, p. 1-13, Jun 1997.

DORSHKIND, K.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; SIGNER, R. A. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 57-62, Jan 2009.

DUGGAL, N. A. et al. An age-related numerical and functional deficit in CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells is associated with an increase in systemic autoimmunity. **Ageing Cell**, v. 12, n. 5, p. 873-881, Oct 2013.

EISENBRAUN, M. D.; TAMIR, A.; MILLER, R. A. Altered composition of the immunological synapse in an anergic, age-dependent memory T cell subset. **J. Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6105-6112, Jun 2000.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, p. 321-347, 1991.

ENGWERDA, C. R.; HANDWERGER, B. S.; FOX, B. S. Aged T cells are hyporesponsive to costimulation mediated by CD28. **J. Immunol.**, v. 152, n. 8, p. 3740-3747, Apr 1994.

FAGNONI, F. F. et al. Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. **Blood**, v. 95, n. 9, p. 2860-2868, May 2000.

FLOHE, S. B. et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. **J. Immunol.**, v. 170, n. 5, p. 2340-2348, Mar 2003.

FRAGA, M. F. Genetic and epigenetic regulation of aging. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 446-453, Aug 2009.

FRANCESCHI, C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? **Nutr. Rev.**, v. 65, n. 12 Pt 2, p. 173-176, Dec 2007.

FRANCESCHI, C. et al. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. **Immunol. Today**, v. 16, n. 1, p. 12-16, Jan 1995.

FRASCA, D. et al. Reduced Ig class switch in aged mice correlates with decreased E47 and activation-induced cytidine deaminase. **J. Immunol.**, v. 172, n. 4, p. 2155-2162, Feb 15 2004.

GAMEIRO, C.; ROMAO, F. Changes in the immune system during menopause and aging. **Front. Biosci. (Elite Ed.)**, v. 2, p. 1299-1303, 2010.

GEORGE, J. et al. Immunity to heat shock protein 65--an additional determinant in intimal thickening. **Atherosclerosis**, v. 168, n. 1, p. 33-38, May 2003.

GEORGOPOULOS, C. The emergence of the chaperone machines. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 17, n. 8, p. 295-299, Aug 1992.

GINALDI, L. et al. Immunological changes in the elderly. **Aging (Milano)**, v. 11, n. 5, p. 281-286, Oct 1999.

GORONZY, J. J.; LEE, W. W.; WEYAND, C. M. Aging and T-cell diversity. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 5, p. 400-406, May 2007.

GROSSMAN, C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. **J. Steroid. Biochem.**, v. 34, n. 1-6, p. 241-251, 1989.

GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 292, n. 6, p. 3052-3056, Jun 2007.

HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 3, p. 179-189, Sep 2007.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, Mar 8 2002.

HASLER, P.; ZOUALI, M. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. **Cell Immunol.**, v. 233, n. 2, p. 102-108, Feb 2005.

HENDERSON, B. et al. Caught with their PAMPs down? The extracellular signalling actions of molecular chaperones are not due to microbial contaminants. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, n. 2, p. 123-141, Mar 2010.

HENDERSON, B.; LUND, P. A.; COATES, A. R. Multiple moonlighting functions of mycobacterial molecular chaperones. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 90, n. 2, p. 119-124, Mar 2010.

HERSKOWITZ, I. H. **Principles of Genetics**. 2nd ed. New York, NY: MacMillan Publishing Co., INC., 1977. 836 p.

HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 191-197, Jul 1991.

HIROKAWA, K. et al. Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. **Immun. Ageing**, v. 10, n. 1, p. 19-26, 2013.

HOGARTH, P. M. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 798-802, Dec 2002.

HOROWITZ, S. et al. Induction of suppressor T cells in systemic lupus erythematosus by thymosin and cultured thymic epithelium. **Science**, v. 197, n. 4307, p. 999-1001, Sep 1977.

HORWICH, A. L.; FENTON, W. A. Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. **Q. Rev. Biophys.**, v. 42, n. 2, p. 83-116, May 2009.

IAKOUBOV, L. Z.; TORCHILIN, V. P. A novel class of antitumor antibodies: nucleosome-restricted antinuclear autoantibodies (ANA) from healthy aged nonautoimmune mice. **Oncol. Res.**, v. 9, n. 8, p. 439-446, 1997.

IBANEZ, O. M. et al. Low antibody responsiveness is found to be associated with resistance to chemical skin tumorigenesis in several lines of Biozzi mice. **Cancer Lett.**, v. 136, n. 2, p. 153-158, Mar 1999.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, v. 33, p. 245-254, Mar 2003. Suppl.

JANSSENS, J. P.; KRAUSE, K. H. Pneumonia in the very old. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 112-124, Feb 2004.

JENSEN, J. R. et al. Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. **Genes Immun.**, v. 7, n. 1, p. 44-50, Jan 2006.

JOHNSON, S. A.; CAMBIER, J. C. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. **Arthritis Res. Ther.**, v. 6, n. 4, p. 131-139, 2004.

KISHIMOTO, S. et al. Age-related changes in the subsets and functions of human T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 121, n. 5, p. 1773-1780, Nov 1978.

KOL, A. et al. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 4, p. 571-577, Feb 1999.

KOL, A. et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. **J. Immunol.**, v. 164, n. 1, p. 13-17, Jan 2000.

KONG, T. H. et al. Mycobacterium tuberculosis expresses two chaperonin-60 homologs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 7, p. 2608-2612, Apr 1993.

KRAUSE, D. et al. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 112, n. 1, p. 43-57, Dec 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970.

LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 22, p. 13091-13096, Oct 1998.

- LEHNER, T. et al. Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 2, p. 594-603, Feb 2000.
- LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 1151-1191, 1986.
- LITHGOW, G. J. Why aging isn't regulated: a lamentation on the use of language in aging literature. **Exp. Gerontol.**, v. 41, n. 10, p. 890-893, Oct 2006.
- LIU, X. et al. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. **Genes Dev.**, v. 19, n. 20, p. 2424-2434, Oct 2005.
- LUNA, E. et al. Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 2, p. 112-122, Summer 2007.
- LY, L. V. et al. In aged mice, outgrowth of intraocular melanoma depends on proangiogenic M2-type macrophages. **J. Immunol.**, v. 185, n. 6, p. 3481-3488, Sep 2010.
- LYNCH, J. P., 3RD; WALSH, E. E. Influenza: evolving strategies in treatment and prevention. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 28, n. 2, p. 144-158, Apr 2007.
- MACARIO, A. J. et al. Chaperonopathies of senescence and the scrambling of interactions between the chaperoning and the immune systems. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1197, p. 85-93, Jun 2010.
- MAHBUB, S.; DEBURGHGRAEVE, C. R.; KOVACS, E. J. Advanced age impairs macrophage polarization. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 32, n. 1, p. 18-26, Jan 2012.
- MAIR, W.; DILLIN, A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 727-754, 2008.
- MAIR, W. et al. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. **Science**, v. 301, n. 5640, p. 1731-1733, Sep 2003.
- MARENGO, E. B. et al. Administration of *Mycobacterium leprae* rHsp65 aggravates experimental autoimmune uveitis in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7912, 2009.
- MARENGO, E. B. et al. Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3025, 2008.
- MARENGO, E. B. et al. A *Mycobacterium leprae* Hsp65 mutant as a candidate for mitigating lupus aggravation in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24093, 2011.
- MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. **Experientia**, v. 50, n. 11-12, p. 1067-74, Nov 1994.
- MARTTILA, S. et al. Transcriptional analysis reveals gender-specific changes in the aging of the human immune system. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66229, 2013.

MATHUR, S. et al. Cyclic variations in white cell subpopulations in the human menstrual cycle: correlations with progesterone and estradiol. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 13, n. 3, p. 246-253, Jul 1979.

MAYR, M. et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. **Circulation**, v. 99, n. 12, p. 1560-1566, Mar 1999.

MERENDINO, A. M. et al. Hsp60 is actively secreted by human tumor cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9247, 2010.

MIYAJI, C. et al. Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. **Hum. Immunol.**, v. 61, n. 9, p. 908-916, Sep 2000.

MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 2, p. 705-710, Jan 2006.

MORE, S. H.; BRELOER, M.; VON BONIN, A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. **Int. Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 1121-1127, Sep 2001.

MOUDGIL, K. D.; DURAI, M. Regulation of autoimmune arthritis by self-heat-shock proteins. **Trends Immunol.**, v. 29, n. 9, p. 412-418, Sep 2008.

MURSHID, A. et al. Heat shock proteins and cancer vaccines: developments in the past decade and chaperoning in the decade to come. **Expert Rev. Vaccines**, v. 10, n. 11, p. 1553-1568, Nov 2011.

NAGASE, H.; MAO, J. H.; BALMAIN, A. A subset of skin tumor modifier loci determines survival time of tumor-bearing mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 26, p. 15032-15037, Dec 1999.

NARDI, N. B. Denças genéticas: gênicas, cromossômicas, complexas. In: MIR, L. (Ed.). **Genômica**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, v.1, 2004. cap. 11, p. 209-226.

NJEMINI, R.; DEMANET, C.; METS, T. Aging-related differences in basal heat shock protein 70 levels in lymphocytes are linked to altered frequencies of lymphocyte subsets. **Aging Cell**, v. 7, n. 4, p. 498-505, Aug 2008.

OERTELT-PRIGIONE, S. The influence of sex and gender on the immune response. **Autoimmun. Rev.**, v. 11, n. 6-7, p. A479-A4785, May 2012.

OLDSTONE, M. B. Molecular mimicry and autoimmune disease. **Cell**, v. 50, n. 6, p. 819-820, Sep 1987.

OLSON, J. K.; CROXFORD, J. L.; MILLER, S. D. Virus-induced autoimmunity: potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease. **Viral Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 227-250, 2001.

OTTO, J. M. et al. Identification of multiple loci linked to inflammation and autoantibody production by a genome scan of a murine model of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 12, p. 2524-2531, Dec 1999.

OTTONELLO, L. et al. Delayed neutrophil apoptosis induced by synovial fluid in rheumatoid arthritis: role of cytokines, estrogens, and adenosine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 966, p. 226-231, Jun 2002.

PAHWA, S. G.; PAHWA, R. N.; GOOD, R. A. Decreased in vitro humoral immune responses in aged humans. **J. Clin. Invest.**, v. 67, n. 4, p. 1094-1102, Apr 1981.

PALLISER, D. et al. A role for Toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8⁺ T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. **J. Immunol.**, v. 172, n. 5, p. 2885-2893, Mar 2004.

PALMER, D. B. The Effect of Age on Thymic Function. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 316-320, 2013.

PANDEY, J. P. et al. Autoantibodies in healthy subjects of different age groups. **Mech. Ageing Dev.**, v. 10, n. 6, p. 399-404, Jul 1979.

PAWELEC, G.; SOLANA, R. Immunosenescence. **Immunol. Today**, v. 18, n. 11, p. 514-516, Nov 1997.

PAWELEC, G. et al. Impact of aging on innate immunity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 64, n. 6, p. 703-712, Dec 1998.

PELLICANO, M. et al. Evidence for Less Marked Potential Signs of T-Cell Immunosenescence in Centenarian Offspring Than in the General Age-Matched Population. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, p. 1-15, Aug 2013.

PEREIRA, C. M. et al. IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 31, p. 28316-28323, Aug 5 2005.

PERSCHINKA, H. et al. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 6, p. 1060-1065, Jun 2003.

PLACKETT, T. P. et al. Aging and innate immune cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 291-299, Aug 2004.

PLOTNIKOFF, N. O.; FAITH, R. E. Gender differences, stress and immunity. In: PLOTNIKOFF, N. O.; FAITH, R. E., et al (Ed.). **Cytokines: stress and immunity**. 2nd Edition. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, v.1, 2007. cap. 21, p. 371-385.

PLOWDEN, J. et al. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 161-167, Aug 2004.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **Lancet**, v. 362, n. 9382, p. 469-476, Aug 2003.

POCKLEY, A. G. et al. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. **Cell Stress Chaperones**, v. 4, n. 1, p. 29-35, Mar 1999.

POCKLEY, A. G.; SHEPHERD, J.; CORTON, J. M. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. **Immunol. Invest.**, v. 27, n. 6, p. 367-377, Dec 1998.

PRAKKEN, B. J. et al. Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 25, n. 1, p. 47-63, Aug 2003.

PRELOG, M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? **Autoimmun. Rev.**, v. 5, n. 2, p. 136-139, Feb 2006.

PUEL, A.; MOUTON, D. Genes responsible for quantitative regulation of antibody production. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 16, n. 3, p. 223-250, 1996.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. HSP60 speaks to the immune system in many voices. **Novartis Found. Symp.**, v. 291, p. 101-111, 2008.

QUINTANA, F. J. et al. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e4026, 2008.

RAJIAIAH, R.; MOUDGIL, K. D. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 8, n. 5, p. 388-393, Mar 2009.

RAMOS-CASALS, M. et al. Autoimmunity and geriatrics: clinical significance of autoimmune manifestations in the elderly. **Lupus**, v. 12, n. 5, p. 341-355, 2003.

REA, I. M.; MCNERLAN, S.; POCKLEY, A. G. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. **Exp. Gerontol.**, v. 36, n. 2, p. 341-352, Feb 2001.

REIS, M. H. et al. T-helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4⁺ monoclonal antibody. **Immunology**, v. 75, n. 1, p. 80-85, Jan 1992.

REITSMA, D. J.; COMBEST, A. J. Challenges in the development of an autologous heat shock protein based anti-tumor vaccine. **Hum. Vaccin. Immunother.**, v. 8, n. 8, p. 1152-1155, Aug 2012.

RENSHAW, M. et al. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. **J. Immunol.**, v. 169, n. 9, p. 4697-4701, Nov 2002.

RITOSSA, F. M. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, n. 18, p. 3, 1962.

RUDY, B. J. et al. Peripheral blood lymphocyte subsets in adolescents: a longitudinal analysis from the REACH project. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 959-965, Sep 2002.

RYBKA, K. et al. Age related natural antiviral non-specific immunity of human leukocytes. **Med. Sci. Monit.**, v. 9, n. 12, p. BR413-BR417, Dec 2003.

SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. **Nat. Rev. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 630-642, Oct 2013.

SANT'ANNA, O. A. et al. Isotypic distribution of antibody responses in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, n. 4, p. 407-416, 1991.

SANT'ANNA, O. A. et al. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. **J. Immunogenet.**, v. 9, n. 3, p. 191-205, Jun 1982.

SHAMAEI-TOUSI, A. et al. Plasma heat shock protein 60 and cardiovascular disease risk: the role of psychosocial, genetic, and biological factors. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 4, p. 384-392, Winter 2007.

SINGH, M. P.; RAI, A. K.; SINGH, S. M. Gender dimorphism in the progressive in vivo growth of a T cell lymphoma: involvement of cytokines and gonadal hormones. **J. Reprod. Immunol.**, v. 65, n. 1, p. 17-32, Feb 2005.

SIQUEIRA, M. et al. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. **Eur. J. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 241-249, Apr 1976.

SMALLWOOD, H. S.; LOPEZ-FERRER, D.; SQUIER, T. C. Aging enhances the production of reactive oxygen species and bactericidal activity in peritoneal macrophages by upregulating classical activation pathways. **Biochemistry**, v. 50, n. 45, p. 9911-9922, Nov 2011.

SRIVASTAVA, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 395-425, 2002a.

_____. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 185-194, Mar 2002b.

STACY, S. et al. Immunological memory and late onset autoimmunity. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 123, n. 8, p. 975-985, Apr 2002.

STANFORD, M. R. et al. Heat shock protein peptides reactive in patients with Behcet's disease are uveitogenic in Lewis rats. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, n. 2, p. 226-231, Aug 1994.

STEGER, M. M.; MACZEK, C.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 105, n. 3, p. 544-550, Sep 1996.

STEPHANOU, A.; LATCHMAN, D. S.; ISENBERG, D. A. The regulation of heat shock proteins and their role in systemic lupus erythematosus. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 28, n. 3, p. 155-162, Dec 1998.

STRAUS, A. H. et al. An inverse relationship between heparin content and antibody response in genetically selected mice. Sex effect and evidence of a polygenic control for skin heparin concentration. **Biochem. J.**, v. 220, n. 3, p. 625-630, Jun 1984.

SUZUE, K. et al. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 24, p. 13146-13151, Nov 1997.

THOLE, J. E. et al. Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDA mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen. **Microb. Pathog.**, v. 4, n. 1, p. 71-83, Jan 1988.

TISSIERES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **J. Mol. Biol.**, v. 84, n. 3, p. 389-398, Apr 1974.

TOWER, J. Hsps and aging. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 5, p. 216-222, Jul 2009.

TREBILCOCK, G. U.; PONNAPPAN, U. Nuclear factor-kappaB induction in CD45RO⁺ and CD45RA⁺ T cell subsets during aging. **Mech. Ageing Dev.**, v. 102, n. 2-3, p. 149-163, May 1998.

TROEN, B. R. The biology of aging. **Mt. Sinai J. Med.**, v. 70, n. 1, p. 3-22, Jan 2003.

TSAN, M. F.; GAO, B. Heat shock proteins and immune system. **J. Leukoc. Biol.**, v. 85, n. 6, p. 905-910, Jun 2009.

UPPAL, S. S.; VERMA, S.; DHOT, P. S. Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking. **Cytometry B. Clin. Cytom.**, v. 52, n. 1, p. 32-36, Mar 2003.

VABULAS, R. M. et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 23, p. 20847-20853, Jun 2002.

VAN EDEN, W. et al. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1113, p. 217-237, Oct 2007.

VIGE, A.; GALLOU-KABANI, C.; JUNIEN, C. Sexual dimorphism in non-Mendelian inheritance. **Pediatr. Res.**, v. 63, n. 4, p. 340-347, Apr 2008.

WANG, X. J. et al. Immunization with a recombinant GnRH vaccine fused to heat shock protein 65 inhibits mammary tumor growth in vivo. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 59, n. 12, p. 1859-1866, Dec 2010.

WEIS, J. J. et al. Identification of quantitative trait loci governing arthritis severity and humoral responses in the murine model of Lyme disease. **J. Immunol.**, v. 162, n. 2, p. 948-956, Jan 1999.

WEISKOPF, D.; WEINBERGER, B.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. The aging of the immune system. **Transpl. Int.**, v. 22, n. 11, p. 1041-1050, Nov 2009.

WEKSLER, M. E. Changes in the B-cell repertoire with age. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1624-1628, Feb 2000.

WELCH, W. J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 339, n. 1289, p. 327-333, Mar 1993.

WENISCH, C. et al. Effect of age on human neutrophil function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 1, p. 40-45, Jan 2000.

WESTERMEIER, R.; NAVEM, T. **Proteomics in practice - A laboratory manual of proteome analysis**. 3rd Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VHC, 2002. 342 ISBN 978-3-527-30354-0.

WEYAND, C. M. et al. Functional properties of CD4+ CD28- T cells in the aging immune system. **Mech. Ageing Dev.**, v. 102, n. 2-3, p. 131-147, May 1998.

WICK, G. Atherosclerosis--an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. **Herz**, v. 25, n. 2, p. 87-90, Mar 2000.

WU, Z. et al. Consequences of increased CD45RA and RC isoforms for TCR signaling and peripheral T cell deficiency resulting from heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like mutation. **J. Immunol.**, v. 185, n. 1, p. 231-238, Jul 2010.

WUCHERPFENNIG, K. W. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 8, p. 1097-1104, Oct 2001.

XU, Q. et al. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. **Circulation**, v. 102, n. 1, p. 14-20, Jul 2000.

YANABA, K. et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 5, p. 639-650, May 2008.

YANABA, K. et al. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. **J. Immunol.**, v. 182, n. 12, p. 7459-7472, Jun 2009.

YANG, H. T. et al. Identification of genes controlling collagen-induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. **J. Immunol.**, v. 163, n. 5, p. 2916-2921, Sep 1999.

YUAN, R. et al. Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. **Aging Cell**, v. 8, n. 3, p. 277-287, Jun 2009.

YUNG, R. L.; JULIUS, A. Epigenetics, aging, and autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 41, n. 4, p. 329-335, May 2008.

ZHANG, H. G.; GRIZZLE, W. E. Aging, immunity, and tumor susceptibility. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 23, n. 1, p. 83-102, vi, Feb 2003.

ZHENG, B. et al. Immunosenescence and germinal center reaction. **Immunol. Rev.**, v. 160, p. 63-77, Dec 1997.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, Oct 2010.

ZUGEL, U.; KAUFMANN, S. H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 19-39, Jan 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Gates para análise fenotípica de linfócitos esplênicos de fêmeas H_{III} e híbridos F_I .

Após o processamento e obtenção das células do baço de ♀ H_{III} e híbridos F_I envelhecidos (9 meses de idade), injetadas ou não com a Hsp65 (2,5 µg/animal), as suspensões celulares foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Do total de células adquiridas (10000 eventos), foi selecionada a população de leucócitos viáveis (A), com base no tamanho e complexidade das células (forward scatter - área [FSC-A] x side scatter - área [SSC-A]), de onde foram analisadas as outras populações celulares. Dos linfócitos T $CD4^+$ (B) marcados com CD3 (PE-Cy5) e CD4 (FITC) foram verificadas as populações de células $CD28^+$ (PE), $CD45RA^+$ (PE) e $CD154^+$ (PE); dentro dos linfócitos T $CD8^+$ (C) marcados com CD3 (PE-Cy5) e CD8 (FITC) foi analisada a população $CD44^+$ (PE) e na população englobando os linfócitos B ($B220^+$, FITC) (D) foram verificadas as células que também expressavam $CD138^+$ (PE) e $CD40^+$ (PE). As citometrias foram realizadas no citômetro FACSCantoII (Becton & Dickson) utilizando-se o software FACSDiva (Tree Stars, Inc.) e as análises com o software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

APÊNDICE B – Esquema de análise celular no sangue de ♀H_{III} envelhecidas.

Após obtenção e processamento das células do sangue de ♀H_{III} (9 meses de idade), injetadas com a Hsp65 (2,5 µg/animal) ou PBS, as amostras foram marcadas e submetidas à análise por citometria de fluxo (FACSCantoII (Becton & Dickson, software FACSDiva (Tree Stars, Inc.) e FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA)). As células foram adquiridas com base no tamanho e complexidade (forward scatter - área [FSC-A] x side scatter - área [SSC-A], 10000 eventos por leitura), e selecionadas nas seguintes populações: P1 – leucócitos viáveis; P2 – linfócitos; P3 – monócitos e P4 – granulócitos (A). A partir de P3 analisou-se populações de CD11b⁺ (FITC) ou CD11c⁺ (FITC) (B) e, dessas, as populações M1 (C) compostas por CD80⁺ (PE), CD86⁺ (PE), CD14⁺ (PE) ou TLR4⁺ (PE). Do gate P2 foram avaliados linfócitos T CD4 (D) e CD8 (E) (CD3 PE-Cy5, CD4 FITC, CD8 PE). A população P4 foi utilizada para a marcação de neutrófilos (Ly6G⁺).

APÊNDICE C – Esquema de obtenção das populações celulares avaliadas durante o processo de envelhecimento de fêmeas H_{III} e híbridos F₁.

A partir de células obtidas do macerado do baço (10000 eventos adquiridos para cada animal) de camundongos F₁H e F₁L, machos e fêmeas, de acordo com os graus de tamanho e complexidade (forward scatter - área [FSC-A] x side scatter - área [SSC-A]); foram constituídos 2 gates principais: P1 - linfócitos e P2 – não linfócitos (A). A partir de P1 foram analisadas as populações de linfócitos T CD4 (B), CD8 (C) e células B (D). O gate P2 foi utilizado para verificar as populações CD11b (E) e CD11c (F). Os fluorocromos utilizados nas análises foram: CD3 PE-Cy5, CD4 FITC, CD8 PE, B220 FITC, CD11b FITC e CD11c FITC. As citometrias foram realizadas no citômetro FACSCantoII (Becton & Dickson) utilizando-se o software FACSDiva (Tree Stars, Inc.) e as análises com o software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

APÊNDICE D – Resumo apresentado em congresso nacional: “Aged [$H_{III} \times L_{III}$] F_1 hybrid mice immunoresponse to *M. leprae* Hsp65” no XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, Campos do Jordão, Brazil, 2012.

www.sbicongressos.com

Campos do Jordão SP Brazil
October 20 - 24, 2012

AGED [$H_{III} \times L_{III}$] F_1 HYBRID MICE IMMUNORESPONSE TO *M. leprae* Hsp65
ESTEVAM JOSÉ BALDON⁽¹⁾; ELIANA BLINI MARENGO⁽²⁾; MARCELO DE FRANCO⁽³⁾; NANCY STAROBINAS⁽³⁾; OSVALDO AUGUSTO SANT'ANNA⁽¹⁾.

(1)Immunochemistry Laboratory and (3)Immunogenetic Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP;
(2)Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil.

Introduction and aim: Aging process is followed by humoral and cell-mediated immunity changes; alongside these modifications, chronic-degenerative processes, such as autoimmunities, can emerge. Heat shock proteins (Hsp) are involved in autoimmune and inflammatory events and can interfere in immunosenescence course, since induce imbalance of the immunological homeostasis. Our previous data showed *M. leprae* Hsp65 inoculation abbreviates survival of aged genetically selected high responder H_{III} female mice, and not interferes on young female or aged male of this line. The eventual cell immune alterations after Hsp65 injection and the interference of Hsp65 in aged F_1 hybrid mice obtained from $H_{III} \times L_{III}$ reciprocal crosses were evaluated. **Methods and Results:** Two hundred days-old F_1H and F_1L were intraperitoneally injected with 2.5 μ g/animal of *M. leprae* Hsp65 or PBS (control group) (n= 3-6 animals/group). Splenic immune cell phenotypes were analyzed by flow cytometry at day 7 and 14 days after Hsp administration. The F_1H_{f} (at 14 days) and F_1L_{f} (at 7 days) mice presented significant increased frequency ($p < 0.001$) of $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ (10-times), $CD3^+CD4^+CD154^+$ (30-times), $CD3^+CD8^+$ (3-times), $CD3^+CD8^+CD44^+$ (10-times) and $CD11c^+$ (5-times) cells; however, only aged F_1L_{f} showed reduced percentage of $CD3^+CD4^+$ and $CD11b^+$ cells ($p < 0.001$, 4-fold reduction for both cell types), with amplified frequency of $CD11c^+CD80^+$ ($p < 0.001$, 10-fold higher) compared to control group. In contrast, aged F_1H_{m} and F_1L_{m} mice presented significant reduction of $CD3^+CD4^+$ ($p < 0.05$, 1.27-fold) and $CD3^+CD8^+CD44^+$ lymphocytes ($p < 0.001$, ~2-fold) and an increase in $B220^+$ ($p < 0.001$ in F_1H_{m} and $p < 0.01$ in F_1L_{m} , ~2.3-fold) cells percentage 14 days after administration. Besides these quantitative modifications, Hsp65 inoculation did not interfere on F_1 hybrid mice survival. **Conclusions:** *M. leprae* Hsp65 administration increased the frequency of naïve and activated T CD4 and CD8 lymphocytes and dendritic cells expressing coestimulatory molecules in F_1 female mice, while F_1 male mice it reduced T CD4 and activated T CD8 cell populations and increased B lymphocytes percentage. These results may reflect a sex-effect, since it was observed difference in the immune cells compartment between F_1 female and F_1 male mice.

Financial Support: FAPESP, CNPq, INCTTOX Program.

APÊNDICE E – Resumo publicado em anal de congresso internacional: “How *M. leprae* Hsp65 influences the immune response in genetically selected aged mice?” no 15th International Congress of Immunology (ICI), 2013.

EVENT ABSTRACT

[« Back to Event](#)

How *M. leprae* Hsp65 influences the immune response in genetically selected aged mice?

Estevam J. Baldon^{1*}, Eliana B. Marengo², Valquiria Bueno³, Marcelo De Franco⁴ and Osvaldo A. Sant'Anna¹

¹ Instituto Butantan, Brazil

² Hospital Israelita Albert Einstein, Brazil

³ Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Immunology Division, Brazil

⁴ Instituto Butantan, Brazil

Heat shock proteins may trigger innate immune responses and are involved in immunosenescence and autoimmunity. We characterized some cellular and humoral alterations after intraperitoneal administration of 2.5µg *M. leprae* Hsp65 in genetically selected mice for High (HIII) or Low (LIII) antibody production (9-months-old) and in its F1 hybrids. Aged HIII female injected with Hsp65 presented a survival decrease of 42% when compared to untreated group (control); no changes in IgG1 or IgG2a anti-Hsp production were observed in HIII and LIII mice. Regarding the cellular changes, aged HIII female Hsp65-group presented amplified frequency in CD4+CD154+CD28+ cells ($p < 0.01$) and reduced percentage of B and activated CD11c+ cells ($p < 0.01$) in the spleen, and increased percentage of CD11c+ and NKG1A/C/E+ cells ($p < 0.01$) in the blood compared to control. Hsp65 acts like an imbalance trigger: post-injection, the aged F1H female Hsp65-group died 2 months after the first death, as observed in aged HIII females; however there was no statistically significance compared with F1H control group. Furthermore, aged F1H and F1L female showed amplified frequency of naïve T cells and CD11c cells in spleen ($p < 0.001$). In conclusion, our results confirm the sex dichotomy (sex effect) of the Hsp65 interference in the immunity of aged mice, becoming evident in females. Next, we will characterize innate immune cells in peritoneal cavity after Hsp65 inoculation; in addition, the role of myeloid-derived suppressor cells will be investigated as these cells are increased during ageing process and have been associated with attenuation of experimental autoimmune diseases. Support: CNPq, FAPESP, INCT-TOX.

Keywords: Heat shock proteins (HSP), Aging, immunosenescence, genetically selected mice, Molecular Mimicry

Conference: 15th International Congress of Immunology (ICI), Milan, Italy, 22 Aug - 27 Aug, 2013.

Presentation Type: Abstract

Topic: Adaptive Immunity

Citation: Baldon EJ, Marengo EB, Bueno V, De Franco M and Sant'Anna OA (2013). How *M. leprae* Hsp65 influences the immune response in genetically selected aged mice?. *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00061

Received: 08 Mar 2013; **Published Online:** 22 Aug 2013.

* Correspondence: Mr. Estevam J Baldon, Instituto Butantan, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil, ejbaldon@gmail.com

APÊNDICE F – Resumo apresentado em congresso nacional: “How *M. leprae* Hsp65 influences the immune response in genetically selected aged mice?” XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, Natal, Brazil, 2013.

11th WORLD CONGRESS ON
INFLAMMATION
International Association of Inflammation Societies

Inflammation, Immunity and Therapeutics
September 21 - 25, 2013 Natal RN Brazil

HOW M. LEPRAE HSP65 INFLUENCES THE IMMUNE RESPONSE IN GENETICALLY SELECTED AGED MICE?

ESTEAM JOSÉ BALDON¹; ELIANA BLINI MARENGO²; VALQUIRIA BUENO³; MARCELO DE FRANCO⁴; OSVALDO AUGUSTO SANT'ANNA⁵.

1,4,5. INSTITUTO BUTANTAN, SÃO PAULO - SP - BRASIL; 2. HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN, SÃO PAULO - SP - BRASIL; 3. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, SÃO PAULO - SP - BRASIL.

Introduction: The immunosenescence process affects both humoral and cellular responses leading to an imbalance of the individual homeostasis. Heat shock proteins may trigger innate immune responses and are involved in immunosenescence and autoimmunity. Previous data showed that the Hsp65 of *M. leprae* interfere with the mean survival time in H_{III} female mice, not affecting males. **Methods and results:** We characterized by flow cytometry some cellular and humoral alterations after intraperitoneal administration of 2.5µg *M. leprae* Hsp65 in genetically selected mice for High (H_{III}) or Low (L_{III}) antibody production (9-months-old) and in its F₁ hybrids. Aged H_{III} female injected with Hsp65 presented a survival decrease of 42% when compared to untreated group (control); no changes in IgG1 or IgG2a anti-Hsp production were observed in H_{III} and L_{III} mice. Regarding the cellular changes, aged H_{III} female Hsp65-group presented amplified frequency in CD4⁺CD154⁺CD28⁺ cells (p<0.01) and reduced percentage of B and activated CD11c⁺ cells (p<0.01) in the spleen, and increased percentage of CD11c⁺ and NKG1A/C/E⁺ cells (p<0.01) in the blood compared to control. Hsp65 acts like an imbalance trigger: post-injection, the aged F₁H female Hsp65-group died 2 months after the first death, as observed in aged H_{III} females; however, there was no statistically significance compared with F₁H control group. Furthermore, aged F₁H and F₁L female showed amplified frequency of naïve T cells and CD11c cells in spleen (p<0.001). **Conclusion:** our results confirm the sex dichotomy (sex effect) of the Hsp65 interference in the immunity of aged mice, becoming evident in females. Next, we will characterize innate immune cells in peritoneal cavity after Hsp65 inoculation; in addition, the role of myeloid-derived suppressor cells will be investigated as these cells increase during ageing process and have been associated with attenuation of experimental autoimmune diseases. **Financial support:** CNPq, FAPESP, INCT-TOX.

APÊNDICE G – Artigo científico publicado: “The role of *M. leprae* Hsp65 protein and peptides in the pathogenesis of Uveitis”, *Autoimmune Dis.* 2012;2012:197648. doi: 10.1155/2012/197648. Epub 2012 Aug 27.

Research Article

The Role of *M. leprae* Hsp65 Protein and Peptides in the Pathogenesis of Uveitis

Alessandra Gonçalves Commodaro,¹ Eliana Blini Marengo,² Jean Pierre S. Peron,³ Wesley Brandao,³ Christina Arslanian,³ Robson Lopes Melo,⁴ Estevam J. Baldon,⁵ Rubens Belfort Jr.,¹ Osvaldo Augusto Sant'Anna,⁵ and Luiz Vicente Rizzo²

¹ Department of Ophthalmology, São Paulo Hospital, Federal University of São Paulo, R. Botucatu 820, 04023-062 São Paulo, SP, Brazil

² Hospital Israelita Albert Einstein, Avenue Albert Einstein 627-701, 2 Subsolo Bloco A, 05651-901 São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Immunology, University of São Paulo, R. Prof. Dr. Lineu Prestes 1730, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

⁴ Center for Applied Toxinology (CAT/CEPID), Butantan Institute, Avenue Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

⁵ Immunochimistry Laboratory, Butantan Institute, Avenue Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Osvaldo Augusto Sant'Anna, gbrazil@usp.br

Received 12 June 2012; Accepted 26 July 2012

Academic Editor: Kamal D. Moudgil

Copyright © 2012 Alessandra Gonçalves Commodaro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Experimental autoimmune uveitis (EAU) is a well established model for immune-mediated organ-specific disease. Our group has recently shown that the *M. leprae* Hsp65 aggravated the uveitis in mice; in the present study, we evaluated the action of *M. leprae* K⁴⁰⁹A mutant protein and the synthetic peptides Leader pep and K⁴⁰⁹A pep (covering amino acids residues 352–371 of WT and K⁴⁰⁹A proteins of *M. leprae* Hsp65, resp.) on the pathogenesis of EAU. Mice received the 161–180 IRBP peptide and *B. pertussis* toxin followed by the intraperitoneal inoculation of K⁴⁰⁹A protein or the Leader pep or K⁴⁰⁹A pep. The Leader pep aggravated the disease, but mice receiving the K⁴⁰⁹A pep did not develop the disease and presented an increase in IL-10 levels by spleen cells and a decrease in the percentage of CD4⁺ IFN- γ ⁺ T cells. Moreover, animals receiving the Leader pep presented the highest scores of the disease associated with increase percentage of CD4⁺ IFN- γ ⁺ T cells. These results would contribute to understanding of the pathogenesis of EAU and support the concept that immune responses to Hsp are of potential importance in exacerbating, perpetuating, or even controlling organ-restricted autoimmune diseases, and it is discussed the irreversibility of autoimmune syndromes.

1. Introduction

Experimental autoimmune uveitis (EAU) is an organ-specific, T-cell-mediated disease that targets the posterior pole of the eye [1] and is characterized by granuloma formation in the neural retina, destruction of photoreceptor cells, and blindness [1, 2].

The Hsp60 family comprises molecules that are immunodominant in several infectious processes [3]. The *Mycobacterium leprae* Hsp65 is part of this family-denominated chaperonins and one of the major immuno-reactive proteins in mycobacteria [3]. It is noteworthy that this protein shares approximately 50% amino acid identity with its mammalian homologue, suggesting their participation in the

autoimmune diseases by molecular mimicry mechanism between self and exogenous Hsp molecules [4, 5]. The role of the Hsp65 has been intensively investigated in the pathogenesis of arthritis and diabetes [6, 7], murine systemic lupus erythematosus [8], ocular manifestations of Behcet's disease, and acute anterior uveitis [9, 10]. High anti-Hsp65 antibodies titers were correlated to the retinopathy in type I diabetes patients [11] and with the development and progression of atherosclerosis lesions [12, 13].

Moreover, in animals with acute EAE, lesions were accentuated by increased expression of Hsp60, primarily by infiltrating cells. In chronic EAE, Hsp60 was found predominantly on CNS components, particularly oligodendrocytes

and astrocytes, showing the participation of Hsp in CNS [14]. In addition, the 180–188 mycobacterial Hsp65 epitope, which is cross-reactive with a self-antigen in joint cartilage, is able to initiate and induce resistance to subsequent attempts to produce the adjuvant arthritis [6, 15].

Our group previously exposed that the passive administration of wild-type *M. leprae* Hsp65 interfered with endogenous equilibrium by enhancing the entropy of the immunobiological system, as expressed by the early death of the (NZB×NZW)_{F1} experimental lupus mice [8] and aggravation of the ocular disease in experimental autoimmune Uveitis [16]. Following these studies, the biological effects and the primary sequence of *M. leprae* Hsp65 Leader pep and K⁴⁰⁹A pep synthetic peptides, which cover residues 352–371, were shown [17].

In this context, in the present study, we evaluated the effects of the K⁴⁰⁹A mutant Hsp65 protein and the Leader pep and K⁴⁰⁹A pep peptides administration in the pathogenesis of EAU. We showed that K⁴⁰⁹A and Leader pep were able to aggravate the disease. On the other hand, mice injected with K⁴⁰⁹A pep did not develop the disease when compared to controls, K⁴⁰⁹A, and Leader pep.

2. Methods

2.1. Animals. Six- to eight-week-old B10.RIII mice were obtained from the animal facilities at the University of São Paulo, Brazil. All animals were housed under specific pathogen-free conditions and handled under ethical conditions. The Animal Care Committee of the Institute of Biomedical Sciences at the University of São Paulo approved all the procedures used in this study.

2.2. Expression of the Recombinant K⁴⁰⁹A Mutant *M. leprae* Hsp65 in *Escherichia coli* and Purification. Expression and purification of the recombinant K⁴⁰⁹A mutant *M. leprae* Hsp65 was done as described in [8].

2.3. Peptide Synthesis. Leader pep (ENSDDSDYDREKLQERLAKLA) of *M. leprae* Hsp65 and K⁴⁰⁹A pep (ENSDDSDYDREALQERLAKLA) of the mutated form K⁴⁰⁹A, both covering residues 352–371, were synthesized using the Fmoc (N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) procedure [18] in a Shimadzu PSSM8 peptide synthesizer (Shimadzu, Tokyo, Japan). The Fmoc-amino acids were purchased from Novabiochem (Nottingham, UK). The synthetic peptides were purified by preparative reversed-phase chromatography (reversed-phase HPLC), and the purity and identity of the peptides were confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry on Ettan MALDI-TOF/Pro instrument (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and by analytical reversed-phase high profile liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu Inc., Tokyo, Japan).

2.4. Induction of EAU and In Vivo Treatment with Hsp65 Molecules. Mice [*n* = 4–6/group] were immunized subcutaneously (s.c.) at the base of the tail with 40 µg of

interphotoreceptor retinoid binding (IRBP) 161–180 peptide emulsified in 0.2 mL of complete Freund's adjuvant (CFA) (v/v). At the same time, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.5 µg of *Bordetella pertussis* toxin (PTX) in 0.1 mL as an additional adjuvant and followed by single-dose inoculation of 2.5 µg of K⁴⁰⁹A, Leader pep, or K⁴⁰⁹A pep i.p.

2.5. Histopathology EAU. Eyes were collected and prepared for histopathological evaluation at the end of each experiment (day 21 after immunization). The eyes were immersed for 1 h in phosphate-buffered glutaraldehyde 4%, transferred into phosphate-buffered formaldehyde 10% for 24 h, and replaced with ethanol 70% until processing. Fixed and dehydrated tissue was embedded in paraffin wax, and 4–6 µm sections were cut through the papillary-optic nerve plane. Sections were stained by hematoxylin and eosin. Presence or absence of disease was evaluated in a double-blinded fashion by examining six sections cut at different levels for each eye. Severity of EAU was scored on a scale of 0 (no disease) to 4 (maximum disease) in half-point increments, according to a semiquantitative system described previously [1], according to lesion type, size, and number. In brief, the minimal criterion to score an eye as positive by histopathology was inflammatory cell infiltration of the ciliary body, choroids, or retina (EAU grade 0.5). Progressively higher grades were assigned for the presence of discrete lesions in the tissue such as vasculitis, granuloma formation, retinal folding and/or detachment, and photoreceptor damage [1].

2.6. Determination of Cytokine Production. Spleen cells harvested 21 days after immunization were cultured in 24-well plates (10⁶ cells/well) and stimulated with 30 µg/mL IRBP. Supernatants were collected for cytokine analysis after 72 h and stored at –80°C until assayed. The level of IL-10 was assessed by ELISA using kit from BD/ Pharmingen (La Jolla, CA), and the level of IL-17 was assessed by ELISA using kit from eBioscience (San Diego, CA). All kits were used according to the manufacturer's instructions.

2.7. Intracellular Cytokine Staining and FACS Analysis. For detection of intracellular expression of IFN-γ, cells from draining lymph nodes and spleens collected at day 21 after immunization were labeled with anti-CD4 monoclonal antibody, fixed and permeabilized, stained intracellularly, and analyzed by flow cytometry evaluating the CD4 and IFN-γ expression. Cells were left unstimulated or stimulated overnight with IRBP (30 µg/mL) in the presence of either Golgiplug or Golgistop at the recommended concentrations (BD Pharmingen). All samples were acquired on a FACSCalibur (BD Biosciences), and data were analyzed with FlowJo software (TreeStar).

2.8. Statistical Analysis. Data are expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). Parametric Student's *t*-test was employed, and *P* values <0.05 were considered significant.

FIGURE 1: Administration of K⁴⁰⁹A protein and Leader pep increased EAU scores, and injection with K⁴⁰⁹A pep decreased EAU scores. B10.RIII mice were immunized with 40 μ g 161–180 IRBP peptide on day 0 and followed by a single injection with 2.5 μ g of K⁴⁰⁹A, Leader pep, or K⁴⁰⁹A pep (i.p.). Eyes were collected for histopathology 21 days after immunization. EAU scores were assigned by histopathologic examination of the eyes on a scale from 0 to 4 according to the extent of inflammation and tissue damage. ** $P < 0.01$: control versus K⁴⁰⁹A pep; K⁴⁰⁹A versus K⁴⁰⁹A pep; Leader pep versus K⁴⁰⁹A pep. Disease incidence: control group: 75% of animals presented grade 1.5; K⁴⁰⁹A: 75% of animals expressed grade 3; Leader pep: 75% of animals presented grade 3; K⁴⁰⁹A pep: 75% of animals expressed no disease.

3. Results

3.1. K⁴⁰⁹A, Leader Pep, and K⁴⁰⁹A Pep in the Disease Development in Mice. The animals were immunized and injected with K⁴⁰⁹A, Leader pep, or K⁴⁰⁹A pep. We observed that K⁴⁰⁹A and Leader pep aggravated the development of the disease when compared with K⁴⁰⁹A pep and control group (Figure 1). On the other hand, animals injected with K⁴⁰⁹A pep did not develop the disease (Figure 1). The histopathologic examination shows vasculitis and presence of inflammatory cells in the vitreous in mice with EAU on day 21 (Figures 2(a) and 2(b), controls). In animals injected with K⁴⁰⁹A (Figures 2(c) and 2(d)) and Leader pep (Figures 2(e) and 2(f)), it is possible to observe the presence of inflammatory cells in the vitreous and retinal folds. On the other hand, in animals injected with K⁴⁰⁹A pep we can observe a normal organization of the retina (Figures 2(g) and 2(h)).

3.2. Decrease of T CD4+ IFN- γ + Cell Population in Lymph Nodes and Spleens of Mice Injected with K⁴⁰⁹A Pep. It is known that autoreactive Th1 cells mediate EAU, and thus its induction correlates with the production of IFN- γ by T cells. In this work, we observe a significant increase in the frequency of CD4+IFN- γ + T cells in lymph nodes (Figure 3(a)) of animals injected with Leader pep when

FIGURE 2: Histopathologic features representative of the EAU scores. Mice control shows ocular lesions characterized by cells infiltrating the vitreous and vasculitis (a) and (b); in mice injected with K⁴⁰⁹A, it is possible to observe inflammatory cells in the vitreous and retinal folds (c) and (d); mice injected with Leader pep show cells in the vitreous and retinal folds (e) and (f); mice injected with K⁴⁰⁹A pep exhibit a normal retinal architecture corresponding to nonimmunized naïve mice (g) and (h). Representative photographs (hematoxylin-eosin staining). Original magnifications: 100 $\times$ (left); 400 $\times$ (right).

compared to those of K⁴⁰⁹A, K⁴⁰⁹A pep, and control groups. Also, there is a decrease of CD4+IFN- γ + T cells in lymph nodes and spleen of the K⁴⁰⁹A pep mice group compared to the other experimental groups (Figures 3(a) and 3(b)). These results corroborate with our score results where we showed that mice injected with K⁴⁰⁹A pep presented lower scores of the disease when compared to mice injected with K⁴⁰⁹A, Leader pep, and controls.

3.3. Analysis of IL-10 and IL-17 Levels in Spleen. The immunosuppressive cytokine IL-10 regulates EAU susceptibility and may be a factor in genetic resistance to EAU [19]. In this work, we showed an increase in IL-10 levels by mice injected with K⁴⁰⁹A pep when compared to other groups. This result corroborates the EAU score presented by K⁴⁰⁹A pep mice, in which the animals did not develop the disease

FIGURE 3: Expansion of CD4+IFN- γ + T cells in lymph nodes (a) and spleen (b) after K⁴⁰⁹A, Leader pep, and K⁴⁰⁹A pep inoculation. Cells from draining lymph nodes and spleen collected at day 21 after immunization were labeled with anti-CD4 monoclonal antibody, fixed and permeabilized, stained intracellularly, and analyzed by flow cytometry evaluating the CD4, IFN- expression. Results are expressed in mean and SD. ***P < 0.001: K⁴⁰⁹A versus K⁴⁰⁹A pep (A); **P < 0.01: K⁴⁰⁹A versus K⁴⁰⁹A pep (B); ***P < 0.001: Leader pep versus K⁴⁰⁹A pep (B).

FIGURE 4: Analyses of IL-10 and IL-17 levels. Spleen cells from K⁴⁰⁹A, Leader pep, and K⁴⁰⁹A pep inoculated, or control mice were harvested at day 21 and stimulated *in vitro* with 30 mg/mL IRBP. After 72 hours, IL-10 (a) and IL-17 (b) levels were determined by ELISA. Results are expressed as mean $\pm$ SD. **P < 0.01: control versus K⁴⁰⁹A (A); *P < 0.05: control versus Leader pep (A); **P < 0.01: control versus K⁴⁰⁹A pep (A); ***P < 0.001: K⁴⁰⁹A versus K⁴⁰⁹A pep (A); ***P < 0.001: Leader pep versus K⁴⁰⁹A pep (A).

(Figure 4(a)). In regard of IL-17 production, it was observed that spleen cells of animals injected with K⁴⁰⁹A, Leader pep, and K⁴⁰⁹A pep produced the same amount of cytokines as the control animals (Figure 4(b)).

4. Discussion

Recently, we showed that EAU scores are increased in IRBP-immunized animals and inoculated with recombinant wild-type *M. leprae* Hsp65. Interestingly, this was associated with a higher expansion of CD4+IFN- γ + (Th1) and CD4+IL-17+ T cells (Th17), and with higher levels of IFN- γ [16]. Moreover, Marengo and collaborators still demonstrated that WT Hsp65 inoculation accelerates death in mice which spontaneously develop the Systemic Lupus Erythematosus (SLE) [8].

In the present work, we showed higher EAU scores in animals injected with K⁴⁰⁹A and Leader pep. However, animals injected with K⁴⁰⁹A pep did not develop the disease. Histopathological analysis showed that animals injected with

K⁴⁰⁹A pep did not show lesions of retina when compared to controls, otherwise K⁴⁰⁹A and Leader pep presented retinal folds, vasculitis, and inflammatory infiltrating cells in the vitreous.

To evaluate the effect of K⁴⁰⁹A, Leader pep, and K⁴⁰⁹A pep in the periphery, it was evaluated the CD4+ T cells producing IFN- γ in spleen and lymph nodes of mice induced to EAU. In this model, the increase in CD4+ IFN- γ + T-cell population in lymph nodes and spleens was associated with the increased scores observed in the K⁴⁰⁹A, Leader pep, and control groups. Friedland and collaborators demonstrated that the secretion of proinflammatory cytokines from monocytes activated by mycobacterial 65 kDa Hsp may be important in the host immune response and in the development of antigen-specific T-cell-mediated immunity [20].

Th17 cells were recently described as crucial for the development of EAU [21–25]; however, it was not observed differences in IL-17 levels by splenocytes at day 21 after-immunization between the experimental groups. Thus, we

may assume that, at this phase, the Th17 cells are in the eye. On the other hand, different from that we observed in the present work, it was previously shown an expansion of CD4⁺IL-17⁺ T cells in mice injected with rHsp65 [16].

It is known that the immunosuppressive cytokine IL-10 regulates EAU susceptibility and may be a factor in genetic resistance to EAU [19]; the results showed that spleen cells from animals injected with K⁴⁰⁹A pep produced higher levels of IL-10. The increase of IL-10 levels can be associated with the absence of the disease, as IL-10 is a potent suppressive cytokine. Moreover, as we did not evaluate Tregs, it is also possible that higher levels of IL-10 observed in Leader pep mice group may be derived from this population such as Tr1 cells or IL-10 secreting Foxp3⁺ cells.

In 2006, our group showed that rGal-1 administration was able to decrease the disease in mice with EAU, and this fact was associated with increased levels of IL-10 and decreased levels of IFN- γ [26]. A study with experimental arthritis showed that antibodies against the Hsp molecule suppress inflammation by inhibiting the proinflammatory effect of the Hsp on the innate immune system. The increase in IL-10 secretion in the inflammatory site can skew the local cytokine profile from an inflammatory to an anti-inflammatory response and thus explain the mechanism of protection against inflammation by these antibodies [27].

The opposite effects of the K⁴⁰⁹A protein and their correspondent peptide which covers the 352–371 residues, the K⁴⁰⁹A pep, in EAU score were unexpected. In (NZB $\times$ NZW)F₁ mice, which present the H-2^{d/z} alleles, the inoculation of the Leader pep and K⁴⁰⁹A pep shows resembled effects to their respective proteins in the survival time, showing a amplified effect [17]. Here, in the EAU susceptible B10.RIII mice, the H-2^r allele can explain at least in part their divergent effect. We can speculate that an important participation of the genetic background and immunobiological factors occurs. EAU is a organ-specific disease mediated by T-cells commitment, and SLE is a systemic disease characterized mainly by humoral self-response. Furthermore, differences at the H-2 loci in B10.RIII and (NZB $\times$ NZW)F₁ mice suggest different or selective antigen-binding core and presentation to the immune system. Also, we can consider that the short length of the K⁴⁰⁹A pep facilitates its antigen processing of these cells, being more effective than the K⁴⁰⁹A protein. Some theoretical experiments based on molecules interaction by structural modeling studies can clarify the MHC molecules peptide binding to better comprehend the *in vivo* findings observed to the mutant forms.

Figure 5 is based on the linear equation $y = a + \blacktriangle_i$; this theoretical model presupposes that in an autoimmune process, it must be considered the entropy production [$\blacktriangle$] during the disease progression where the slope a is the intensity and degree of the process aggravation; $\blacktriangle$, although variable to each individual, is a constancy for everyone, increasing at all illness episode [i]. It was formulated the principle that *the immunological history of an individual is unique and irreversible*, being cumulative in an autoimmune process, staying progressively far from the physiological equilibrium [8]; thus, as for other autoimmunities syndromes, the uveitis

FIGURE 5: Autoimmune disease aggravation: Y : the individual state of an irreversible immune responsiveness; a : disease degree; $\blacktriangle_i$: entropy production, where i represents the number of autoimmune episodes being a time-dependent discrete variable.

is not reversible in the sense that the original immune state before the beginning of the disease cannot be reacquired. The general physiological conditions could be disrupted by similar homologous proteins, such as the *M. leprae* Hsp that, along the life time, proceeds performing a pathological role. At each new episode, the entropy production is higher, and the disease progression could only be controlled or delayed.

In conclusion, K⁴⁰⁹A and Leader pep were able to aggravate EAU development when administrated at the same time with the immunization. Moreover, mice injected with Leader pep presented high scores of the disease associated with increase percentage of CD4+IFN- γ + T cells. However, K⁴⁰⁹A pep was able to inhibit the development of EAU, and this fact can be associated with an increase observed in IL-10 levels by spleen cells and with a decrease in the percentage of CD4+IFN- γ + T cells. The results of this study would contribute significantly to understanding of the role of the Hsp molecules in the pathogenesis of ocular autoimmune diseases. They also support the concept that immune responses to Hsp have potential importance in exacerbating and perpetuating organ-restricted autoimmune diseases.

Conflict of Interests

All the authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' Contribution

A. G. Commodaro, E. B. Marengo, O. A. Sant'Anna and L. V. Rizzo contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES, the INCTTOX Program, and

FADA-UNIFESP. The authors are grateful to Paulo Albe for his assistance in the preparation of the histopathology slide.

References

- [1] R. R. Caspi, F. G. Roberge, C. C. Chan et al., "A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens," *Journal of Immunology*, vol. 140, no. 5, pp. 1490–1495, 1988.
- [2] L. V. Rizzo, P. Silver, B. Wiggert et al., "Establishment and characterization of a murine CD4⁺ T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice," *Journal of Immunology*, vol. 156, no. 4, pp. 1654–1660, 1996.
- [3] J. E. R. Thole, P. Hindersson, J. De Bruyn et al., "Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDa mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen," *Microbial Pathogenesis*, vol. 4, no. 1, pp. 71–83, 1988.
- [4] A. K. Dudani and R. S. Gupta, "Immunological characterization of a human homolog of the 65-kilodalton mycobacterial antigen," *Infection and Immunity*, vol. 57, no. 9, pp. 2786–2793, 1989.
- [5] Q. Xiao, K. Mandal, G. Schett et al., "Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study," *Stroke*, vol. 36, no. 12, pp. 2571–2576, 2005.
- [6] W. Van Eden, J. E. R. Thole, R. Van der Zee et al., "Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis," *Gynecologic Oncology*, vol. 29, no. 1, pp. 171–173, 1988.
- [7] I. R. Cohen, "Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes," *Annual Review of Immunology*, vol. 9, pp. 567–589, 1991.
- [8] E. B. Marengo, L. V. de Moraes, M. Faria et al., "Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 8, Article ID e3025, 2008.
- [9] H. Direskeneli, A. Hasan, T. Shinnick et al., "Recognition of B-cell epitopes of the 65 kDa HSP in Behçet's Disease," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 43, no. 4, pp. 464–471, 1996.
- [10] M. Huhtinen, M. Puolakkainen, K. Laasila, M. Sarvas, A. Karma, and M. Leirisalo-Repo, "Chlamydial antibodies in patients with previous acute anterior uveitis," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 42, no. 8, pp. 1816–1819, 2001.
- [11] R. Weltgasser, M. Lechleitner, T. Koch et al., "Antibodies to heat-shock protein 65 and neopterin levels in patients with type 1 diabetes mellitus," *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, vol. 111, no. 3, pp. 127–131, 2003.
- [12] Q. Xu, J. Willeit, M. Marosi et al., "Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis," *Lancet*, vol. 341, no. 8840, pp. 255–259, 1993.
- [13] J. George, D. Harats, B. Gilburd et al., "Immunolocalization of β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression," *Circulation*, vol. 99, no. 17, pp. 2227–2230, 1999.
- [14] Y. L. Gao, C. F. Brosnan, and C. S. Raine, "Experimental autoimmune encephalomyelitis: qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system," *Journal of Immunology*, vol. 154, no. 7, pp. 3548–3556, 1995.
- [15] S. M. Anderton, R. Van der Zee, A. Noordzij, and W. Van Eden, "Differential mycobacterial 65-kDa heat shock protein T cell epitope recognition after adjuvant arthritis-inducing or protective immunization protocols," *Journal of Immunology*, vol. 152, no. 7, pp. 3656–3664, 1994.
- [16] E. B. Marengo, A. G. Commodaro, J. P. S. Peron et al., "Administration of *Mycobacterium leprae* rHsp65 aggravates experimental autoimmune uveitis in mice," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 11, Article ID e7912, 2009.
- [17] E. B. Marengo, L. de Moraes, and R. L. Melo, "A *Mycobacterium leprae* Hsp65 mutant as a candidate for mitigating lupus aggravation in mice," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, Article ID e24093, 2011.
- [18] E. Atherton and R. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis—A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK, 1989.
- [19] R. K. Agarwal, R. Horai, A. M. Viley et al., "Abrogation of anti-retinal autoimmunity in IL-10 transgenic mice due To reduced T cell priming and inhibition of disease effector mechanisms," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 8, pp. 5423–5429, 2008.
- [20] J. S. Friedland, R. Shattock, D. G. Remick, and G. E. Griffin, "Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 91, no. 1, pp. 58–62, 1993.
- [21] Y. Ke, K. Liu, G. Q. Huang et al., "Anti-inflammatory role of IL-17 in experimental autoimmune uveitis," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 5, pp. 3183–3190, 2009.
- [22] A. Amadi-Obi, C. R. Yu, X. Liu et al., "TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 711–718, 2007.
- [23] R. Rajaiah, M. Puttabyatappa, S. K. Polumuri, and K. D. Moudgil, "Interleukin-27 and interferon- γ are involved in regulation of autoimmune arthritis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 4, pp. 2817–2825, 2011.
- [24] W. Ishida, K. Fukuda, T. Higuchi, M. Kajisako, S. Sakamoto, and A. Fukushima, "Dynamic changes of microRNAs in the eye during the development of experimental autoimmune uveoretinitis," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 52, no. 1, pp. 611–617, 2011.
- [25] A. G. Commodaro, J. P. S. Peron, C. T. Lopes et al., "Evaluation of experimental autoimmune uveitis in mice treated with FTY720," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 51, no. 5, pp. 2568–2574, 2010.
- [26] M. A. Toscano, A. G. Commodaro, J. M. Ilarregui et al., "Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 10, pp. 6323–6332, 2006.
- [27] R. Ulmanský, C. J. Cohen, F. Szafer et al., "Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 12, pp. 6463–6469, 2002.

APÊNDICE H – Artigo científico submetido para publicação na revista Immunity & Aging:
“*Mycobacterium leprae* Hsp65 administration reduces the lifespan of aged high antibody
producer mice”.

***Mycobacterium leprae* Hsp65 administration reduces the lifespan of aged high antibody producer mice**

Estevam José Baldon¹, Eliana Blini Marengo², Marcelo De Franco³, Nancy Starobinas³, Valquiria Bueno^{4*}, Osvaldo Augusto Sant'Anna¹.

¹Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, 05530-900, São Paulo, Brasil

²Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE), Avenida Albert Einstein, 627/701, 05652-000, São Paul, Brasil

³Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, 05530-900, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP, Rua Botucatu 862, 04023-062, São Paulo, Brasil

*Corresponding author; Prof. Valquíria Bueno, vbueno@unifesp.br

Email addresses:

EJB: ejbaldon@gmail.com

EBM: elianabm@gmail.com

VB: vbueno@unifesp.br

MDF: marcelo.franco@butantan.gov.br

NS: nancy.starobinas@butantan.gov.br

OAS: gbrazil@usp.br

Abstract

Background

Aging process may result in immune modifications that lead to disruption of innate and acquired immunity mechanisms that may induce chronic-degenerative events. The heat shock proteins (Hsp), phylogenetically conserved among organisms, present as main function the ability of folding and refolding proteins, but they also are associated with chronic-degenerative disorders. Here we evaluated the role of *M. leprae* native Hsp65 (WT) and its point-mutated (K⁴⁰⁹A) on survival and anti-DNA and anti-Hsp65 antibody production of aged genetically selected mice for high (H_{III}) and low (L_{III}) antibody production; data from 120- and 270-days old mice (named “adult” or “aged”, respectively) were compared.

Results

WT Hsp65 administration induces reduction in the mean survival time of adult and aged female H_{III} mice, this effect being stronger in aged individuals. Surprisingly, the native protein administration increased the survival of aged female L_{III} when compared to K⁴⁰⁹A and control groups. No survival differences were observed in aged male mice after Hsp65 proteins inoculation. We observed increase in IgG1 anti-Hsp65 in WT and K⁴⁰⁹A aged H_{III} female mice groups and no marked changes in the anti-DNA (adult and aged H_{III}) and anti-Hsp65 IgG1 or IgG2a isotypes production in adult H_{III} female and aged male mice. L_{III} male mice presented increased anti-DNA and anti-Hsp65 IgG2a isotype production after WT or K⁴⁰⁹A injection, and L_{III} female groups showed no alterations.

Conclusions

The results revealed that the WT Hsp65 interferes with survival of aged H_{III} female mice without involvement of a remarkable IgG1 and IgG2a anti-DNA and anti-

Hsp65 antibodies production. The deleterious effects of Hsp65 on survival time in aged H_{III} female mice could be linked to a gender-effect and are in agreement with those previously reported in lupus-prone mice.

Keywords: heat shock protein, Hsp65, aging, immunosenescence, antibody response.

Background

Aging is defined as progressive alterations of biological functions, leading to the onset of diseases and reduced ability to respond to external stimuli [1]. Alongside with the physiological aging events, the immunosenescence accumulates potential modifications of immunological functions and its components. The most important changes include the decrease of the absolute number of lymphocytes, alterations of the activation status of T cells, increasing of serum levels of immunoglobulin (mainly IgA and IgG), limitation of the protective response of specific high affinity antibody, amplification of autoantibody production and a switch for a Th2 pattern of cytokine response [2]. The altered processes in advanced age also result in the failure of self and non-self discrimination [3] and disruption of the innate and acquired immunity mechanisms, which may result in chronic-degenerative events and subsequent loss of life quality [4-7]. Altogether, these modifications lead to an increased vulnerability to infections [8, 9], reduced response to vaccines [10], development of tumors [11, 12], and autoimmune or inflammatory diseases [13, 14]. In addition, disorders related to the abnormal processing, modification, and

aggregation of proteins typically linked to biological properties of the heat shock proteins (Hsp) are reported [15, 16].

Drastic alterations in physiological responses to stressful events are related to Hsp production [17-19]. Hsp are phylogenetically conserved molecules among evolutionary scale [20, 21] which assist misfolding molecules and control the arising of toxic protein aggregates, supporting the folding and unfolding of polypeptides for degradation by proteolytic machinery [22, 23]. Hsp65, the most abundant and immunogenic protein of mycobacteria [24], is considered a toxin and dominant antigen in infectious diseases, capable of induce humoral and cellular immune responses [25-27]. Reports evidenced the immunodominant role of the Hsp60 family in infectious processes [28], besides of the role played in inflammatory processes such as arthritis, type I diabetes, multiple sclerosis and atherosclerosis [29-32]. In the opposite, some studies demonstrate its regulatory function on immune suppression in rheumatoid arthritis [33] and type I diabetes [34].

Previously, our group evaluated the immunomodulatory effects *in vivo* of *M. leprae* Hsp65 on genetically homogeneous (NZBxNZW)F₁ hybrid female mice that develop systemic lupus erythematosus (SLE); the results showed that the native protein (WT) aggravates the lupus progression in mice [35]. On the other hand, the K⁴⁰⁹A, a point-mutated Hsp65 [36], revealed a potential in mitigating lupus aggravation in these mice [37]. Hsp65 administration also increased eye lesions in mice susceptible to the development of autoimmune uveitis [38].

Autoimmune diseases are more frequent in aged and in female individuals [39] and thus we asked whether Hsp65 interference in autoimmunity is age and/or gender-related. Reports of Hsp65 interference in autoimmunity and other

biological alterations occurring during the immunosenescence process are related to gender and aging [40]. These findings lead us to investigate whether *M. leprae* Hsp65 is also involved in alterations of aged individuals, as the immunosenescence process can lead to the onset of autoimmunity. It was assessed the role played by passive administrations of WT and mutant K⁴⁰⁹A Hsp65 on the lifespan and antibody production of aged H_{III} and L_{III} mice. We conclude that the WT protein administration interferes with the survival of aged and adults H_{III} female mice, even though the anti-DNA and anti-Hsp65 antibody production was not markedly changed. As no significant changes in male mice survival and antibodies production were observed we conclude that Hsp65 effects were gender-related.

Results

WT Hsp65 administration reduces the lifespan of H_{III} female mice

Male and female two hundred-seventy-days old (aged) mice were inoculated intraperitoneally with a single dose of 2.5 µg/animal of WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 in 0.2 mL of PBS, or only PBS as control group. Mice were observed until death for mean survival time (MST) determination. FIGURE 1A illustrates the survival reduction of aged H_{III} female mice inoculated with the native protein (308 ± 25 days, $p < 0.01$) compared to controls (530 ± 123 days). Also it was observed a decrease of 24-fold in the WT group phenotypic variance (V_P = 635 days in WT group versus V_P = 15293 days in control group). Conversely, FIGURE 1B shows that aged L_{III} females inoculated with WT Hsp65 presented higher MST (615 ± 46 days; $p < 0.01$) compared to K⁴⁰⁹A (442 ± 97 days) and control group (441 ± 72 days) and a decrease in V_P (2180 days) in contrast with control (5328 days) and

K⁴⁰⁹A (9590 days) groups. No survival differences were observed in aged male mice from both H_{III} and L_{III} in all experimental groups (FIGURE 1C and D).

Since the lifespan of aged H_{III} females (270-days old) was shortened after WT Hsp65 inoculation, we asked whether the same effect could be observed in adult H_{III} female mice (120-days old) injected with Hsp65 (FIGURE 2). Adult H_{III} female mice showed a MST reduction after WT protein administration (465 ± 134 days; $p < 0.01$) when compared to K⁴⁰⁹A injected group (664 ± 37 days). The first death occurred 247 days after inoculation of the native molecule, and the phenotypical variance was lower in mutant- (1422 days, 22-fold less) and WT-inoculated animals (18181 days, about 2-fold less) compared to control group (31473 days).

It is noteworthy that in mice from both lines and ages no weight loss, piloerection or ascites were detected.

Anti-DNA and anti-Hsp65 antibody production are altered after WT Hsp65 injection

Since the antibody production against heat shock proteins are involved in autoimmune processes, we measured the anti-DNA and anti-Hsp65 IgG1 and IgG2a isotypes production after WT and point-mutated Hsp65 inoculation. In aged H_{III} female mice, WT and K⁴⁰⁹A inoculation caused a 4.5-fold increase in anti-Hsp65 IgG1 production ($p < 0.01$) (FIGURE 3A), compared to pre-immune animals (zero days), at fourteen and seven days post-inoculation, respectively. Despite the reduction observed in IgG2a anti-Hsp65 and IgG1 anti-DNA observed in aged H_{III} female mice (FIGURE 3A and B), the non-inoculated group (control) also showed this decrease, possibly indicating an environmental interference non-related with the protein injection. No differences in IgG2a anti-DNA production were observed.

Antibody production kinetics analysis of aged H_{III} female mice shows an increase of the IgG1 anti-Hsp65 ($p<0.01$) in the WT-injected group, starting at $2.8\log_2$ and reaching $5.4\log_2$ on day fourteen, and $3.3\log_2$ to $6\log_2$ in K⁴⁰⁹A group ($p<0.05$) on 7th day post-immunization when compared to pre-immune serum (data not shown). In adult H_{III} female mice, the administration of both WT and K⁴⁰⁹A Hsp65 molecules did not promote alterations in the anti-Hsp65 antibody production kinetics between all experimental groups until 33 days post-inoculation (FIGURE 4A). However, the anti-DNA titer was increased at 33rd days in WT ($p<0.01$) and K⁴⁰⁹A ($p<0.05$) groups (FIGURE 4B). Regarding aged H_{III} male mice, the isotypes titration showed only increased IgG1 anti-Hsp65 isotype production compared to pre-immune groups at the 14th day after the K⁴⁰⁹A Hsp65 injection (data not shown).

After the observation of the increased survival of aged L_{III} female mice injected with WT Hsp65, we investigated the effects of those molecules over the antibody production in low antibody responder mice. No differences were observed in IgG1 (titers range from 3.7 ± 0.8 to $4.2 \pm 0.5 \log_2$) and IgG2a (from 5.5 ± 0.8 to $7.0 \pm 1.0 \log_2$) anti-Hsp65 or IgG1 (from $2.0 \pm 0.4 \log_2$ to $2.5 \pm 0.8 \log_2$) and IgG2a (from $2.4 \pm 0.5 \log_2$ to $4.0 \pm 1.9 \log_2$) anti-DNA production in aged L_{III} female mice after WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 inoculation (FIGURE 5A and B). On the other hand, L_{III} male mice showed elevated levels of IgG2a anti-Hsp65 after 14 days subsequently the WT ($p<0.001$) or K⁴⁰⁹A ($p<0.05$) injection (FIGURE 5C), whereas the anti-DNA data displayed mainly an increase in IgG2a anti-Hsp65 after WT ($p<0.001$) and K⁴⁰⁹A ($p<0.01$) inoculation (FIGURE 5D).

Discussion

Immunological functions may change with aging and lead to a deficient immune response to several infections and vaccines, predisposing the individual to chronic-degenerative processes by the decline of self-tolerance maintenance and loss of tissue integrity, directing to crypt antigens release, amplified bystander activation and molecular mimicry events [2, 41, 42]. Based on the immune alterations observed in the aging process, the reports of higher incidence of chronic-degenerative processes in elders [14, 43] and the deleterious effect of *M. leprae* Hsp65 administration on murine lupus and autoimmune uveitis [35, 38], we evaluated the interference of WT Hsp65 administration on survival time and correlation with antibody production in H_{III} and L_{III} mice. The animals from Selection III are a well-established model to understand the humoral immune response and its influences over the susceptibility to infections [44], autoimmunity [45], tumorigenesis [46] and longevity [47]; they also differ in the response to antigens not related to those used for the selection procedure [48] and present different susceptibility to autoimmune disease [49].

Native Hsp65 effects on survival of aged and adults H_{III} female mice indicate the immunological interference of the Hsp65 molecule in this model. It reduced the survival of H_{III} female mice, mainly in young aged (270-days old), with first death occurring 18 days after WT administration, whereas for adults H_{III} female mice (120-days old) it occurred 247 days post-injection, a period 14-times greater than the aged mice. In opposition, WT-inoculated aged L_{III} female mice presented higher MST (615 ± 46 days, $p < 0.01$) compared to mutant and control groups (442 ± 97 and 441 ± 72 days, respectively). Considering that L_{III} line shows an 18-fold reduction in the antibody production and low T cell proliferation [50], it is possible

to consider that the humoral response of L_{III} mice against Hsp65 is reduced, resulting in an easy management by the system to return to homeostasis. The same could be true for other mice lines with lower antibody response compared to H_{III} mice, like Swiss albino mice (foundation of Selection III lines) [48]. Contrary, the high responder rate of the immunological system in H_{III} female mice after WT injection, despite the antibody production rate, could disrupt the homeostasis and lead to a reduced survival. Homeostasis imbalance due to aging process in association with the interference of Hsp65 inoculation could explain the higher decrease in survival of H_{III} aged female. In spite of our animal model do not spontaneously develop autoimmune processes, the reduced survival time of H_{III} female mice matches to the experiments involving lupus-prone mice [35] and models of experimental autoimmune uveitis in mice [38], and reassure the involvement of Hsp in chronic-degenerative processes. The control expression and the rupture of Hsp65 balance in SLE development were ascertained through the approach of inductive disequilibrium of physiological and immune states by homologous Hsp [51] and the same could be true for the current study.

Since High and Low mice lines differ, respectively, to high or low antibody responses, the anti-DNA and anti-Hsp65 IgG isotypes production were analyzed after WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 inoculation. H_{III} and L_{III} mice, both genders, presented slightly higher production of IgG2a anti-Hsp65 and anti-DNA related to the IgG1 isotype. This balance towards a Th1 response may indicates a natural pro-inflammatory status in these strains which is confirmed by the relative easy way to induce adjuvant arthritis in H_{III} mice [52]. The time-course analyses of immunoglobulin production did not show significant intragroup differences, which might be related to the absence of a strong specific response to these proteins

demonstrated by the low antibody titers even 30 days after the protein inoculation and because this is not an immunization process. Compared to pre-immune mice, aged H_{III} females presented an increase of anti-Hsp65 IgG1 in the group treated with WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 and a non-related reduction of IgG2a. In murines, the IgG1 and IgG2a functions are dependent on the cells activation threshold determined by the affinity of antibodies and the expression of inhibitors/activators receptors [53]. The amplification of anti-Hsp65 IgG1 antibody (approximately 4-times) should be related with a switch to a Th2 response, previously observed in the immunosenescence process [2]. It also could correlate to the precocious death of aged H_{III} female mice, since the augment of Th2 cytokines, despite its regulatory effect, are involved in some diseases like asthma, allergies and autoimmunities [54, 55].

Confirmed the *M. leprae* Hsp65 effect on reduced survival in aged H_{III} female mice, it was verified whether the anti-DNA and anti-Hsp65 antibody production were age-dependent by comparing the IgG isotypes with adults H_{III} female mice. They did not present intergroup changes in kinetics of anti-DNA or anti-Hsp65 antibodies production, but adult H_{III} female mice showed increase in IgG2a titers after Hsp65 molecules injection. The IgG2a isotype titers are remarkably lower in adult mice compared to aged ones as an indicative of a better balance of Th1/Th2 response and maintaining homeostasis of the immune system, as demonstrated by the 13-times later death in adult H_{III} females after WT inoculation compared to old mice.

This dominating effect observed in the survival time of aged mice emphasizes the involvement of the Hsp65 molecule in aging processes. The effect of native molecule was gender-specific, as demonstrated by the unaltered MST in aged

male mice (H_{III} and L_{III}) inoculated with both proteins, and potentially related with the differential regulation of the immunological system by sexual hormones [56], as the dimorphism between gender is positively linked with different susceptibility for infections, autoimmune diseases and tumor incidence [40, 57]. Sexual hormones (mostly estrogen but also progesterone and testosterone) affect immune cells quantitatively and qualitatively and impact on cytokine production [58]. Females have higher plasma concentrations of immunoglobulin, increased number and strong activation of $CD4^+$ T cells, elevated levels of Th1 cytokines (IgG2a production) and stronger primary and secondary antibody response [59, 60]. Indeed, the higher incidence of SLE in females reflects the gender dimorphism [61, 62].

Here, is also relevant the animal model used to test the relationship of Hsp and aging. The opposite phenotypes of antibody production in H_{III} and L_{III} mice include immune response to a wide range of antigens [48]. The F_0 - foundation population - of Selection III mice are genetically heterogeneous: the phenotypic variance (V_P) is due to the sum of the genetic variance (V_G), and the environmental variance (V_E) emerges by all the causes of variability resulting from the environment. The bi-directional selection resulted in a progressive increase (H_{III} mice) or a decrease (L_{III} mice) in mean antibody response, followed by the decline of V_G in both lines [48, 63]. Therefore, the alterations provoked by WT or $K^{409}A$ Hsp65 administration (the environmental feature applied during the experiments) provide the variance in our experimental model. After WT inoculation, a great reduction in variance value was observed in aged female H_{III} ($V_E = 635$ versus $V_E = 15293$ of the control group) than L_{III} mice ($V_E = 2180$ versus V_E controls= 5328), showing the impact of molecule administration over the potential of death phenotype ($MST = 308 \pm 25$ in

aged H_{III} and MST = 615 ± 46 in aged L_{III} female mice). We cannot exclude the interference of others genetic factors occurred during the selective breeding, and a gender-effect that may affect the response in H_{III} and L_{III} mice. Once was proposed that the presence of anti-Hsp60 autoantibodies, innate risk factor of atherosclerosis in adulthood, may be an inherited trait, we are conducting studies about the effect of Hsp65 in (H_{III}xL_{III})F₁ hybrids to clarify the genetic influence of this susceptibility [64].

Mechanisms underlying the distinct effects of the native Hsp65 on survival of H_{III} and L_{III} mice, and the comparison between them and mutant injected individuals are under evaluation. Preliminary histopathological analysis indicates that the WT Hsp65 inoculation in aged H_{III} females results in a widespread chronic hepatitis, spleen hyperplasia, and, unlike L_{III} female, higher degree of nephrosis and chronic nephritis with inflammatory infiltration of plasma cells, macrophages and lymphocytes (data not shown), characteristics present in human lupus nephritis [65].

The adaptive management of biological systems according to environmental changes is essential for the organism survival and Hsp molecules can interfere with immune phenotypes submitted to independent polygenic control. The aging process presents an impaired cellular homeostasis and the Hsp presentation by antigen presenting cells may be diminished, being responsible for the decline in immunoregulation through the recognizing of self Hsp [66]. On the other hand, an amplified expression of stress proteins and his antigenic determinants can evolve to a pathogenic or regulation of chronic-degenerative processes [67-69]. Taking together, these facts explain the pleiotropic effects of Hsp65 on biological systems and its wide actions over different cell types and production of other molecules.

Based on pleiotropy, the *Theory of Aging* proposed by George C. Williams suggests that some genes responsible for increased fitness in young fertile individuals may contribute to the reduction of such capacity in later life [70]. Then, it is conceivable that selection for high antibody production genes, essential for the immune protection through the life of an individual, can be one of the factors that allows Hsp65 act on the immune or physiological imbalance later in life. As previously reported by our group, the WT Hsp65 passive administration affects the endogenous balance by increase the entropy of the individual system; the linear equation proposed ($y = a + \Delta i$) shows that the immunological history (y) is unique, irreversible and cumulative [35]. In this study, the animal model employed is not naturally predisposed to autoimmunity, so “a” should include the potential advent of chronic-degenerative processes in aging and “i” consists by the sum of the environmental factors that modulate the entropy: age, gender, antibody production rate, and possible cellular and molecular alterations established in Selection III after Hsp65 administration. All these elements interfere in how Hsp65 interact with the immune system; consequently, the greater their influence, greater the entropic energy, hindering the recovery of homeostasis and contributing to the deaths of H_{III} female mice.

Despite the absence of strikingly differences in antibody production in our experiments, perhaps the 2-fold higher antibodies production in H_{III} females compared to males [48], associated with the senescent immune system and influenced by hormones, they are sufficient to induce frailty after WT administration. In parallel, the high antibodies production rate in H_{III}, besides increasing the system entropy, can result in reduced antibody affinity for the protein, facilitating its subsequent binding to self-antigens. In case of imbalance

due to the overstimulation by stress or inflammation, autoimmune diseases may emerge or aggravate [35, 51]. The opposite occurs in L_{III} females, which presented increased survival when injected with the native molecule, suggesting that the low immunoglobulin production may favor the control of immune system overstimulation.

We not observed any signs of disease development during the survival time assay and this be correlated with the incapacity of the mycobacterial Hsp65 alone to induce, in some cases, autoimmunity. In an experiment of arthritis induction by Complete Freund's Adjuvant (CFA) replaced with the whole mycobacterium [71], the intradermal injection induced arthritic lesions at the same degree as CFA in ankle joints, with the production of anti-DNA and anti-Hsp65 in rats. Thus, the not remarkable increase of anti-Hsp65 antibodies presented by H_{III} and L_{III} mice may be responsible for the absence of disease.

More than a phenotypic effect by the antibody production against WT Hsp65, the extended pleiotropic effect of this protein over the immune system results in strengthening of naturally established disorders in aged H_{III} female mice who possibly present a natural higher degree of entropy. In addition, the age-remodeled immune system already shows a major entropy level and the injection of *M. leprae* WT Hsp65 in females reinforce an imbalance that does not resemble the young individuals, originating disorganizations and irreversible processes leading to death.

Conclusions

Here we verified in an aging mice model the role of *M. leprae* Hsp65 in the aggravation of phenotypes, as observed in SLE and experimental autoimmune uveitis, and outlined its interference mainly in aged H_{III} female inducing precocious death. We assume that this effect is associated to the aging process and related to gender-effect instead of the amount of antibody produced in these mice lines. Studies of cellular and cytokines alterations after the Hsp65 administration in Selection III mice and its (H_{III}×L_{III})F₁ hybrid mice are in progress to elucidate the mechanisms by which this heat shock protein and its responses act in the immune system of aged individuals.

Methods

Expression of the recombinants *M. leprae* Hsp65 in *Escherichia coli* and purification

Clone pIL161, containing the coding sequence of the *M. leprae* WT Hsp65 and its point-mutated form K⁴⁰⁹A [36] were amplified in *E. coli* DH5a cells. Expression and purification of the recombinant Hsp65 WT and K⁴⁰⁹A was described elsewhere [35].

Animals

The genetically heterogeneous selected mice for High (H_{III}) or Low (L_{III}) antibody production were bred in the animal facility of the Immunogenetic Laboratory and maintained at the animal facility of the Immunochemistry Laboratory, both in Butantan Institute. They were housed in groups of four to five in plastic cages filled with hardwood bedding, provided with water and rodent chow *ad libitum*, in a room

with 12-h light/dark cycle, controlled pressure, humidity and temperature (24 ± 2 °C). All procedures are in agreement to the International Animal Welfare Recommendations [72] and the experiments are in conformity with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the Ethical Committee for Animal Research of Butantan Institute (CEUAIB #475/08).

Administration of the WT and K⁴⁰⁹A Hsp65 molecules

Male and female H_{III} and L_{III} mice at the age of 120- or 270-days old (named here “adult” or “aged” mice, respectively) were inoculated intraperitoneally with a single dose of 2.5 µg of WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 of *M. leprae* in 0.2 mL of phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS); as controls, mice were injected with 0.2 mL PBS. In this study it is important to highlight that the periodically bleedings were performed at different time points in aged and adult female mice; from previously observations that aged H_{III} female animals death started 18 days after the WT Hsp65 administration, the bleedings occurred at seven and at fourteen days post proteins administration. Differently, adult H_{III} female individuals, which presented an extended survival time after the WT Hsp65 inoculation, were bled after fourteen and thirty-three days after the proteins injection; this longer interval was used to avoid external stress stimuli that could influence the experiment. The serum samples were stored at -20 °C until antibody titration. Each animal was observed until death for the designing of the longevity curve and examined for clinical signs that include development of ascites and lethargy.

Titration of anti-DNA and anti-Hsp65 antibodies

Levels of anti-DNA and anti-Hsp65 IgG1 and IgG2a isotypes titers were set by indirect ELISA as describe before [35] and expressed as $\log_2$ of the reciprocal serum dilution giving an absorbance value of 20% of the saturation level.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 software. The antibody dosages are expressed as mean $\pm$ SD. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons post-test were used to evaluate the antibody production between mice from control, WT and K⁴⁰⁹A groups. Kaplan-Meier plot for mean survival time (MST) was analyzed by log-rank test (Mantel-Cox) comparing the MST with age, dose or administration period of WT or K⁴⁰⁹A rHsp65. For all data, minimum statistical significance was set at $p < 0.05$.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

EJB, EBM, VB and OAS participated in the design of the study and writing of the manuscript. EJB performed the assays and analyzed the data. MDF and NS provided the mice used in all experiments and participated in the design of the experiments. VB assisted the discussion of results and writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work is supported by the National Institute of Science and Technology in Toxins (INCTTOX), São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the National

Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling CeTICS – FAPESP 2013/07467-1. EJB and EBM are recipients of an FAPESP fellowship. MDF, NS, VB and OAS are researchers of CNPq-Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Vo TK, Godard P, de Saint-Hubert M, Morrhaye G, Swine C, Geenen V, Martens HJ, Debaq-Chainiaux F, Toussaint O: **Transcriptomic biomarkers of the response of hospitalized geriatric patients with infectious diseases.** *Immun Ageing* 2010, **7**:9.
2. Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis M: **Immunosenescence and infectious diseases.** *Microbes Infect* 2001, **3**:851-857.
3. Prelog M: **Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?** *Autoimmun Rev* 2006, **5**:136-139.
4. Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C: **Cytometric analysis of immunosenescence.** *Cytometry* 1997, **27**:297-313.
5. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G: **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** *Ann N Y Acad Sci* 2000, **908**:244-254.
6. Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, Caruso C: **Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases.** *Immun Ageing* 2005, **2**:8.

7. Hasler P, Zouali M: **Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity.** *Cell Immunol* 2005, **233**:102-108.
8. Janssens JP, Krause KH: **Pneumonia in the very old.** *Lancet Infect Dis* 2004, **4**:112-124.
9. Lynch JP, 3rd, Walsh EE: **Influenza: evolving strategies in treatment and prevention.** *Semin Respir Crit Care Med* 2007, **28**:144-158.
10. Bouree P: **Immunity and immunization in elderly.** *Pathol Biol (Paris)* 2003, **51**:581-585.
11. Zhang HG, Grizzle WE: **Aging, immunity, and tumor susceptibility.** *Immunol Allergy Clin North Am* 2003, **23**:83-102, vi.
12. Trzonkowski P, Mysliwska J, Pawelec G, Mysliwski A: **From bench to bedside and back: the SENIEUR Protocol and the efficacy of influenza vaccination in the elderly.** *Biogerontology* 2009, **10**:83-94.
13. Johnson SA, Cambier JC: **Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**:131-139.
14. Yung RL, Julius A: **Epigenetics, aging, and autoimmunity.** *Autoimmunity* 2008, **41**:329-335.
15. Tower J: **Hsps and aging.** *Trends Endocrinol Metab* 2009, **20**:216-222.
16. Morimoto RI: **Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging.** *Genes Dev* 2008, **22**:1427-1438.
17. Pockley AG: **Heat shock proteins as regulators of the immune response.** *Lancet* 2003, **362**:469-476.
18. Srivastava P: **Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:185-194.

19. Welch WJ: **Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1993, **339**:327-333.
20. Lindquist S, Craig EA: **The heat-shock proteins.** *Annu Rev Genet* 1988, **22**:631-677.
21. Wong HR: **Heat shock proteins. Facts, thoughts, and dreams. A. De Maio. Shock 11:1-12, 1999.** *Shock* 1999, **12**:323-325.
22. Mayer MP: **Gymnastics of molecular chaperones.** *Mol Cell* 2010, **39**:321-331.
23. Bukau B, Weissman J, Horwich A: **Molecular chaperones and protein quality control.** *Cell* 2006, **125**:443-451.
24. Thole JE, Hindersson P, de Bruyn J, Cremers F, van der Zee J, de Cock H, Tommassen J, van Eden W, van Embden JD: **Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDA mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen.** *Microb Pathog* 1988, **4**:71-83.
25. Kong TH, Coates AR, Butcher PD, Hickman CJ, Shinnick TM: **Mycobacterium tuberculosis expresses two chaperonin-60 homologs.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:2608-2612.
26. Qamra R, Mande SC: **Crystal structure of the 65-kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2, of Mycobacterium tuberculosis.** *J Bacteriol* 2004, **186**:8105-8113.
27. Qamra R, Srinivas V, Mande SC: **Mycobacterium tuberculosis GroEL homologues unusually exist as lower oligomers and retain the ability**

- to suppress aggregation of substrate proteins. *J Mol Biol* 2004, **342**:605-617.
28. Kaufmann SH: **Heat shock proteins and the immune response.** *Immunology today* 1990, **11**:129-136.
 29. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL: **Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice.** *Infection and immunity* 1998, **66**:169-175.
 30. Wick G, Perschinka H, Millonig G: **Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update.** *Trends in immunology* 2001, **22**:665-669.
 31. Georgopoulos C, McFarland H: **Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases.** *Immunology today* 1993, **14**:373-375.
 32. Afek A, George J, Gilburd B, Rauova L, Goldberg I, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y: **Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis.** *J Autoimmun* 2000, **14**:115-121.
 33. de Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers GT, Scholtens L, Gordon G, De Jager W, Hafner R, van de Zee R, van Eden W, Kuis W, Prakken BJ: **The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10.** *Arthritis and rheumatism* 2003, **48**:2001-2010.
 34. Hooper PL, Hooper JJ: **Loss of defense against stress: diabetes and heat shock proteins.** *Diabetes technology & therapeutics* 2005, **7**:204-208.

35. Marengo EB, de Moraes LV, Faria M, Fernandes BL, Carvalho LV, Tambourgi DV, Rizzo LV, Portaro FC, Camargo AC, Sant'anna OA: **Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression.** *PLoS One* 2008, **3**:e3025.
36. Portaro FC, Hayashi MA, De Arauz LJ, Palma MS, Assakura MT, Silva CL, de Camargo AC: **The *Mycobacterium leprae* hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the *M. leprae* hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HsIVU protease.** *Biochemistry* 2002, **41**:7400-7406.
37. Marengo EB, de Moraes LV, Melo RL, Balan A, Fernandes BL, Tambourgi DV, Rizzo LV, Sant'Anna OA: **A *Mycobacterium leprae* Hsp65 mutant as a candidate for mitigating lupus aggravation in mice.** *PLoS One* 2011, **6**:e24093.
38. Marengo EB, Commodaro AG, Peron JP, de Moraes LV, Portaro FC, Belfort R, Jr., Rizzo LV, Sant'Anna OA: **Administration of *Mycobacterium leprae* rHsp65 aggravates experimental autoimmune uveitis in mice.** *PLoS One* 2009, **4**:e7912.
39. Pan Z, Chang C: **Gender and the regulation of longevity: implications for autoimmunity.** *Autoimmunity reviews* 2012, **11**:A393-403.
40. Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, Sottofattori E, Dallegri F, Cutolo M: **Delayed neutrophil apoptosis induced by synovial fluid in rheumatoid arthritis: role of cytokines, estrogens, and adenosine.** *Ann N Y Acad Sci* 2002, **966**:226-231.

41. Olson JK, Croxford JL, Miller SD: **Virus-induced autoimmunity: potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease.** *Viral Immunol* 2001, **14**:227-250.
42. McElhaney JE, Effros RB: **Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults?** *Curr Opin Immunol* 2009, **21**:418-424.
43. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA: **The ageing immune system: is it ever too old to become young again?** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:57-62.
44. Mouton D, Stiffel C, Biozzi G: **Genetic factors of immunity against infection.** *Ann Inst Pasteur Immunol* 1985, **136D**:131-141.
45. De Franco M, Gille-Perramant MF, Mevel JC, Couderc J: **T helper subset involvement in two high antibody responder lines of mice (Biozzi mice): HI (susceptible) and HII (resistant) to collagen-induced arthritis.** *Eur J Immunol* 1995, **25**:132-136.
46. Ibanez OM, Mouton D, Ribeiro OG, Bouthillier Y, De Franco M, Cabrera WH, Siqueira M, Biozzi G: **Low antibody responsiveness is found to be associated with resistance to chemical skin tumorigenesis in several lines of Biozzi mice.** *Cancer Lett* 1999, **136**:153-158.
47. Covelli V, Mouton D, Di Majo V, Bouthillier Y, Bangrazi C, Mevel JC, Rebessi S, Doria G, Biozzi G: **Inheritance of immune responsiveness, life span, and disease incidence in interline crosses of mice selected for high or low multispecific antibody production.** *J Immunol* 1989, **142**:1224-1234.
48. Biozzi G, Mouton D, Sant'Anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, Ferreira VC, Heumann AM, Bouthillier Y, Ibanez OM, et al: **Genetics of**

- immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1979, **85**:31-98.
49. Thompson SJ, Rook GA, Brealey RJ, Van der Zee R, Elson CJ: **Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis.** *Eur J Immunol* 1990, **20**:2479-2484.
 50. Reis MH, Ibanez OM, Cabrera WH, Ribeiro OG, Mouton D, Siqueira M, Couderc J: **T-helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4+ monoclonal antibody.** *Immunology* 1992, **75**:80-85.
 51. Prohaszka Z, Fust G: **Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life.** *Mol Immunol* 2004, **41**:29-44.
 52. Jensen JR, Peters LC, Borrego A, Ribeiro OG, Cabrera WH, Starobinas N, Siqueira M, Ibanez OC, De Franco M: **Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse.** *Genes Immun* 2006, **7**:44-50.
 53. Nimmerjahn F, Ravetch JV: **Fcγ receptors: old friends and new family members.** *Immunity* 2006, **24**:19-28.
 54. Oflazoglu E, Swart DA, Anders-Bartholo P, Jessup HK, Norment AM, Lawrence WA, Brasel K, Tocker JE, Horan T, Welcher AA, Fitzpatrick DR: **Paradoxical role of programmed death-1 ligand 2 in Th2 immune responses in vitro and in a mouse asthma model in vivo.** *Eur J Immunol* 2004, **34**:3326-3336.
 55. Muto G, Kotani H, Kondo T, Morita R, Tsuruta S, Kobayashi T, Luche H, Fehling HJ, Walsh M, Choi Y, Yoshimura A: **TRAF6 Is Essential for**

- Maintenance of Regulatory T Cells That Suppress Th2 Type Autoimmunity.** *PLoS One* 2013, **8**:e74639.
56. Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas MM: **Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans.** *Am J Reprod Immunol* 2004, **52**:19-26.
 57. Singh MP, Rai AK, Singh SM: **Gender dimorphism in the progressive in vivo growth of a T cell lymphoma: involvement of cytokines and gonadal hormones.** *J Reprod Immunol* 2005, **65**:17-32.
 58. Oertelt-Prigione S: **The influence of sex and gender on the immune response.** *Autoimmunity reviews* 2011.
 59. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, Chieco-Bianchi L: **Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans.** *Nat Med* 1995, **1**:1279-1283.
 60. Michaels RM, Rogers KD: **A sex difference in immunologic responsiveness.** *Pediatrics* 1971, **47**:120-123.
 61. Ishikawa S, Akakura S, Abe M, Terashima K, Chijiwa K, Nishimura H, Hirose S, Shirai T: **A subset of CD4+ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance.** *J Immunol* 1998, **161**:1267-1273.
 62. Struhar D, Harbeck R, Cherniack R: **Elastic properties of the excised lungs of NZB/W mice and their correlation with histopathologic changes.** *Lung* 1988, **166**:107-112.
 63. Sant'Anna OA, Ferreira VC, Reis MH, Gennari M, Ibanez OM, Esteves MB, Mouton D, Biozzi G: **Genetic parameters of the polygenic regulation of**

- antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae.** *J Immunogenet* 1982, **9**:191-205.
64. Patil SA, Katyayani S, Sood A, Kavitha AK, Marimuthu P, Taly AB: **Possible significance of anti-heat shock protein (HSP-65) antibodies in autoimmune myasthenia gravis.** *Journal of neuroimmunology* 2013, **257**:107-109.
 65. Lightstone L: **Lupus nephritis: where are we now?** *Curr Opin Rheumatol* 2010, **22**:252-256.
 66. Van Eden W, Wick G, Albani S, Cohen I: **Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1113**:217-237.
 67. Rajaiah R, Moudgil KD: **Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity.** *Autoimmun Rev* 2009, **8**:388-393.
 68. Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi K, Allen PM, Schreiber RD, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H: **Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells.** *J Exp Med* 2005, **201**:681-686.
 69. Paul AG, van Kooten PJ, van Eden W, van der Zee R: **Highly autoproliferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN-gamma and are protective in adjuvant arthritis.** *J Immunol* 2000, **165**:7270-7277.
 70. Williams GC: **Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence.** *Evolution* 1957, **11**:398-411.

71. Zhou L, Yu Y, Chen L, Zhang P, Wu X, Zhang Y, Yang M, Di J, Jiang H, Wang L: **Recombinant mycobacterial HSP65 in combination with incomplete Freund's adjuvant induced rat arthritis comparable with that induced by complete Freund's adjuvant.** *Journal of immunological methods* 2012, **386**:78-84.
72. Giles AR: **Guidelines for the use of animals in biomedical research.** *Thromb Haemost* 1987, **58**:1078-1084.

Figures

FIGURE 1 - Mean survival time of aged mice inoculated with Hsp65 proteins.

Female H_{III} (A) and L_{III} (B), and male H_{III} (C) and L_{III} (D) animals were intraperitoneally injected with 2.5 µg/animal of WT or K⁴⁰⁹A with 270-days old (dotted line); as controls, mice received PBS. MST: mean survival time; V_E: environmental variance, given by the square of the standard deviation (SD²). ***p*<0.01 (log rank test (Mantel-Cox)). Control groups were used as reference for statistical analysis.

FIGURE 2 - WT Hsp65 protein influences on survival of adult H_{III} female mice.

Female adults mice were intraperitoneally inoculated with 2.5 µg/animal of WT or K⁴⁰⁹A proteins or PBS (control group) at 120-days old (dotted line). MST: mean survival time; V_E: environmental variance, given by the square of the standard deviation (SD²). **p*<0.05 (log rank test (Mantel-Cox)). Control group was used as reference for the statistical analysis.

FIGURE 3 - Anti-Hsp65 and anti-DNA antibodies production in aged H_{III} female mice. Anti-Hsp65 IgG1 and IgG2a (A), and anti-DNA IgG1 and IgG2a (B) isotype production in the serum of WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 inoculation or PBS (control) of aged mice (3-6 animals/group). Antibody titers were set by ELISA before (day 0) and after 7 and 14 days post Hsp65 inoculation. **p*<0.05 and ***p*<0.01 (Two-way ANOVA, Bonferroni multiple comparisons post-test).

FIGURE 4 - Anti-Hsp65 and anti-DNA antibodies production in adult H_{III} female mice. Anti-Hsp65 IgG1 and IgG2a (A), and anti-DNA IgG1 and IgG2a (B) isotype serum production of WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 inoculation or PBS (control) in adult H_{III} female mice (4 animals/group). Antibody titers were determined by ELISA before (day 0) and after 13 and 33 days post Hsp65 inoculation. **p*<0.05 and ***p*<0.01 (Two-way ANOVA, Bonferroni multiple comparisons post-test).

FIGURE 5 - Anti-Hsp65 and anti-DNA antibodies production in aged L_{III} mice. Anti-Hsp65 IgG1 and IgG2a (A and C) and anti-DNA IgG1 and IgG2a (B and D) isotype serum production of WT or K⁴⁰⁹A Hsp65 inoculation or PBS (control) in aged L_{III} mice (4-8 animals/group, males and females). Antibody titers were determined by ELISA before (day 0) and after 7 and 14 days post-WT or -K⁴⁰⁹A Hsp65 inoculation. **p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001 (Two-way ANOVA, Bonferroni multiple comparisons post-test).

Figure 1

Groups	n	MST	V _E
Control ○	4	614	31473
WT ■	4	466	18182
K ⁴⁰⁹ A ▽	4	665	1422

Figure 2

Figure 3

Figure 4