ESTEVAM JOSÉ BALDON

**AÇÕES DAS Hsp65r NATIVA E SUA MUTANTE K⁴⁰⁹A
DE *Mycobacterium leprae* DURANTE O
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna

São Paulo
2010

RESUMO

BALDON, E. J. **Ações das Hsp65r nativa e sua mutante K⁴⁰⁹A de *Mycobacterium leprae* durante o processo de envelhecimento.** 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As Hsp60 acham-se conservadas nos organismos ao longo da escala evolutiva, apresentando como funções a capacidade de enovelamento, estruturação e translocação de proteínas através das membranas celulares, além de apresentarem papel essencial no crescimento e diferenciação celular e participarem em processos crônico-degenerativos. Neste estudo foi avaliada a ação das Hsp65r nativa (WT) e sua mutante K⁴⁰⁹A de *M. leprae* no processo de envelhecimento e resposta imune de camundongos. Análises do Tempo Médio de Sobrevida (TMS), titulação dos isótipos IgG1 e IgG2a, ensaios de avidéz de IgG anti-Hsp65 e análises histopatológicas foram realizadas em camundongos geneticamente selecionadas para alta e baixa produção de anticorpos, linhagens H_{III} e L_{III} respectivamente, inoculados intraperitonealmente aos 120 ou 270 dias de vida com 2,5 µg/mL (em 200 µL de PBS) das Hsp65r. Verificou-se diminuição no TMS de fêmeas envelhecidas H_{III} inoculadas com a proteína WT ($p \leq 0,01$) em relação ao grupo controle e mutante. Fêmeas H_{III} adultas tratadas com a molécula WT apresentaram redução do TMS ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo K⁴⁰⁹A, sendo que o intervalo entre o tratamento e a primeira morte foi maior (247 dias) em relação às envelhecidas (18 dias). Diferentemente, a inoculação da Hsp65r WT em fêmeas em processo de envelhecimento da linhagem L_{III} resultou no aumento ($p \leq 0,01$) do TMS em relação ao grupo controle e K⁴⁰⁹A; machos envelhecidos das linhagens H_{III} e L_{III} não apresentaram diferença no TMS. A dosagem dos anticorpos não revelou alterações marcantes na produção de IgG1 e IgG2a nos grupos estudados, porém a avidéz de IgG foi menor ($p \leq 0,05$) nas fêmeas H_{III} envelhecidas inoculadas com a proteína nativa em relação ao grupo controle e K⁴⁰⁹A. A análise histopatológica mostrou a presença de influxo inflamatório principalmente nos rins de fêmeas H_{III} envelhecidas inoculadas com a proteína nativa. Os resultados indicam a interferência da Hsp65r WT na imunidade durante o processo de senescência de fêmeas envelhecidas constitutivamente boas produtoras de anticorpos. Esses resultados são discutidos e relacionados com os obtidos anteriormente sobre o efeito da Hsp65 em processos autoimunes.

Palavras-chave: Hsp65r nativa e mutante K⁴⁰⁹A. Processo de Envelhecimento. Produção de Anticorpos. Mimetismo Molecular.

ABSTRACT

BALDON, E. J. **The influence of *Mycobacterium leprae* rHsp65 wild type and its mutant K⁴⁰⁹A during the ageing process.** 2010. 78 p. Master Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The Hsp60 are conserved in all organisms along the evolutionary scale, involved in protein folding, refolding and translocation across cell membranes, besides having a main role in cell growth and differentiation and been associated in chronic-degenerative processes. In the present study was evaluated the actions of *M. leprae* native rHsp65 (WT) and its mutant K⁴⁰⁹A in the aging process and immunoresponse of mice. Analyses of mean survival time (MST), titration of IgG1 and IgG2a isotypes, avidity tests of anti-Hsp65 IgG antibodies and histopathological analyses were performed in mice genetically selected for High and Low antibody production, H_{III} and L_{III}, respectively, inoculated intraperitoneally at 120 or 270 days of life with 2.5 µg/mL (200 µL of PBS) of Hsp65r. There was a decrease in MST in aged H_{III} females inoculated with the WT protein ($p \leq 0.01$) compared to control and mutant. Adult H_{III} females treated with the WT molecule showed a reduction of MST ($p \leq 0.05$) compared to group K⁴⁰⁹A, and the interval between the treatment and first death was higher in these (247 days) in relation to aging mice (18 days). In contrast, WT rHsp65 inoculation in aged L_{III} females resulted in increased ($p \leq 0.01$) of MST compared with control and K⁴⁰⁹A groups; aged males mice from H_{III} and L_{III} lines showed no difference in survivor. The antibodies titration showed no marked changes in the production of IgG1 and IgG2a isotypes in all groups, but the IgG avidity was lower ($p \leq 0.05$) in old H_{III} female treated with native protein when compared with control and K⁴⁰⁹A groups. Histopathological analyses showed the presence of inflammatory influx in the kidneys of aged H_{III} females mice inoculated with WT. The presented results revealed the interference of WT rHsp65 in immunity during the senescence of aged females from H_{III} line and are discussed and related to those obtained previously on the effect of rHsp65 in autoimmune processes.

Keywords: Wild type rHsp65 and its mutant K⁴⁰⁹A. Ageing process. Antibody production. Molecular mimicry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema imune e o processo de envelhecimento

Progressos médicos, melhorias nas políticas de saúde pública e certo desenvolvimento socioeconômico possibilitaram uma redução da taxa de mortalidade, com consequente aumento da expectativa de vida da população global (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ; SIGNER, 2009). O processo de envelhecimento, caracterizado por um declínio na habilidade do organismo em manter sua homeostase ou se adaptar ao ambiente, é influenciado por condições nutricionais e mudanças que ocorrem ao longo da vida (HASLER e ZOUALI, 2005) como alterações genéticas adaptativas que, transmitidas através de gerações, promovem variações na longevidade dos indivíduos e influenciam a sobrevivência de uma espécie (JAENISCH e BIRD, 2003; LITHGOW, 2006; TOWER, 2009).

Um dos principais aspectos do envelhecimento é a senescência do sistema imunológico, resultado de um processo de remodelamento contínuo e cujas funções imunológicas podem apresentar-se intactas, reduzidas ou mesmo aumentadas (FRANCESCHI et al., 1995). Um declínio na função imune pode resultar na incapacidade de discriminar antígenos próprios e não próprios (PRELOG, 2006), com consequências importantes como a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais (JANSSENS e KRAUSE, 2004; LYNCH e WALSH, 2007), diminuição da resposta a vacinas (BOUREE, 2003), desenvolvimento de tumores (ZHANG e GRIZZLE, 2003) e de autoimunidades e outras doenças inflamatórias (JOHNSON e CAMBIER, 2004; YUNG e JULIUS, 2008).

Dados na literatura científica mostram controvérsias acerca das alterações quantitativas e qualitativas de cada componente do sistema imune nos diferentes organismos. Na imunidade inata, o número de macrófagos e granulócitos encontram-se inalterados em indivíduos envelhecidos (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 se encontra alterada, com diminuição nos níveis de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC-II) (PLOWDEN et al., 2004), redução da secreção de citocinas e quimiocinas (PAWELEC et al., 1998), além da redução da produção de ânions superóxido (PLACKETT et al., 2004) que, associada à deficiência na expressão e função de receptores do tipo *Toll* (TLR), dificultam a

fagocitose e a morte intracelular de bactérias gerando aumento na susceptibilidade a infecções (RENSHAW et al., 2002). Nas células dendríticas (DC), aptas a capturar e apresentar antígenos e secretar citocinas ligando a imunidade inata à adquirida, não há indicação concreta de alterações quanto à diferenciação e maturação em indivíduos envelhecidos (STEGER; MACZEK; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 1996); entretanto, estudos mostram diminuição na sua capacidade fagocítica (AGRAWAL; AGRAWAL; GUPTA, 2007), afetando a resposta de linfócitos T no envelhecimento. As células NK, importantes na imunidade contra infecções virais, apresentam diminuição em sua capacidade citotóxica (MIYAJI et al., 2000).

Observou-se, tanto em modelos experimentais quanto em humanos, que as respostas mediadas por células e humorais apresentam-se reduzidas na imunidade adquirida (PAWELEC e SOLANA, 1997). Há queda no número de linfócitos T *naïves*, particularmente os CD8⁺, embora CD4⁺ e CD8⁺ estejam prejudicados em camundongos, com redução da diversidade de repertório dos receptores de células T (TCR) (GORONZY; LEE; WEYAND, 2007; HAKIM e GRESS, 2007). Ainda, observa-se a expansão compensatória de células de memória, as quais apresentam menor diversidade, funcionalidade e capacidade citotóxica, dificultando a resposta a infecções reincidentes (ASPINALL e ANDREW, 2000; BLACKBURN et al., 2009). A involução do timo, caracterizada pela diminuição do tamanho do órgão e a troca da medula e córtex funcionais por tecido gorduroso, é a principal causa da diminuição dessas células (ASPINALL e ANDREW, 2000). Estudos em modelos murinos demonstram que a atrofia tímica relaciona-se, parcialmente, à falha das células T tímicas em se diferenciarem e expressarem TCR, diminuindo a produção de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (ASPINALL, 1997). Além disso, em idosos há diminuição na produção de Interleucina-2 (IL-2) e da expressão do seu receptor e redução da expressão da molécula coestimuladora CD28 em linfócitos T, contribuindo para o decréscimo dessa população celular (CHAMBERLAIN; FALTA; KOTZIN, 2000; WEYAND et al., 1998).

Alterações no número de linfócitos B *naïves* e antígeno-específicos, na produção de imunoglobulinas, no repertório de anticorpos em termos de especificidade, isótipos e afinidade são observadas no processo de envelhecimento (WEKSLER, 2000). Acredita-se que a diminuição do número e função de células T CD4⁺ (MILLER, 1996), a redução da hipermutação somática em centros germinativos (ZHENG et al., 1997), bem como defeitos nas alterações de classes de imunoglobulinas (FRASCA et al., 2004) levam à incapacidade de indivíduos envelhecidos produzirem anticorpos de maior afinidade. Embora animais

envelhecidos apresentem, na periferia, um número de linfócitos B semelhante aos jovens, há ampliação do número de linfócitos B de memória, substituindo a população de B *naïves*, causando resposta menos efetiva com anticorpos de baixa afinidade (STACY et al., 2002; WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009). Ocorre, ainda, aumento da resposta policlonal contra diversos mitógenos, porém com diminuição da resposta antígeno-específica, e aumento da frequência de autoanticorpos (GINALDI et al., 1999; KISHIMOTO et al., 1978; PAHWA; PAHWA; GOOD, 1981). Mudanças no padrão de produção de citocinas do perfil Th1 para Th2 foram observadas em indivíduos envelhecidos, levando à ativação de autoanticorpos (STACY et al., 2002). O aumento na concentração plasmática de IL-6, IL-1 β e Fator- α de Necrose Tumoral (TNF- α) também foram descritos em populações envelhecidas (BRUUNSGAARD et al., 2003; ERSHLER e KELLER, 2000; O'MAHONY et al., 1998). Por outro lado, a administração de IL-12 reverteu o padrão Th1/Th2 em camundongos envelhecidos que desenvolvem Lupus Eritematoso Sistêmico (SEGAL et al., 2003).

Quanto à tolerância a antígenos próprios, os processos alterados pelo envelhecimento tende a desequilibrar os mecanismos da imunidade inata e adquirida, podendo resultar em processos crônico-degenerativos como inflamação, formação de tumores e autoimunidades, aumento na susceptibilidade a infecções, e consequente perda da qualidade de vida (COSSARIZZA et al., 1997; FRANCESCHI et al., 2000; HASLER e ZOUALI, 2005; LICASTRO et al., 2005).

1.2 Proteínas de Choque Térmico

Organismos são frequentemente expostos a fatores ambientais estressantes como temperatura, toxinas, carência nutricional, influências hormonais, infecções e variações metabólicas, dependendo da capacidade em suportar tais mudanças para sobreviverem. A resposta a esses fatores é caracterizada por alterações fisiológicas drásticas, incluindo a produção de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - Hsp) (POCKLEY, 2003; SRIVASTAVA, 2002; WELCH, 1993), moléculas descobertas quando Ferruccio notou 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, quando da observação no aumento do nível dessas proteínas com o acréscimo em 5 °C da temperatura corpórea desse inseto (TISSIERES; MITCHELL; TRACY, 1974).

Seus genes codificadores estão presentes em todas as células de organismos procariontes e eucariontes (incluindo as plantas) (POCKLEY, 2003; ZUGEL e KAUFMANN, 1999) e essas proteínas são encontradas em diferentes compartimentos intracelulares como citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndrias e cloroplastos (HIGHTOWER, 1991).

As Hsp são essenciais à viabilidade celular em situações normais de crescimento, participando de processos como duplicação do DNA, degradação de proteínas, enovelamento e desenovelamento de peptídeos, estruturação e desestruturação de complexos oligoméricos e translocação proteica através de membranas (BUKAU e HORWICH, 1998; GEORGOPOULOS, 1992). Em condições fisiológicas, constituem cerca de 5% da quantidade total de proteínas intracelulares; entretanto, seus níveis encontram-se até quintuplicados mediante a exposição a estresses que levam à denaturação, agregação ou fluxo de proteínas recém-sintetizadas não nativas, retornando a níveis normais após o impacto de fatores exógenos (POCKLEY, 2003; ZUGEL e KAUFMANN, 1999). A produção dessas moléculas deve ser extremamente controlada, pois sua persistência pode levar a mudanças na homeostase e em funções intracelulares, além de promover morte celular (POCKLEY, 2003). A regulação da expressão de Hsp é feita pela interação entre Fatores de Choque Térmico (*Heat Shock Factors*, HSF) e fatores ambientais estressantes sobre a região do gene que promove a produção de Hsp (VOELLMY, 1994). Em vertebrados, quatro HSF foram identificados, sendo que somente HSF1, envolvidos em respostas fisiológicas e ambientais (SARGE; MURPHY; MORIMOTO, 1993; ZUO et al., 1994), e HSF2, induzido durante a diferenciação e desenvolvimento precoce (PIRKKALA; NYKANEN; SISTONEN, 2001), são amplamente expressados e conservados (NAKAI e MORIMOTO, 1993; SARGE et al., 1991). O aumento da expressão de Hsp e a resistência a estresses foram descritos em monócitos, linfócitos B (CLAYTON et al., 2005), células tumorais (DAVIES et al., 2006) e alguns órgãos (SNOECKX et al., 2001).

As Hsp são classificadas em famílias nomeadas de acordo com sua massa molecular aproximada e seus graus de homologia. Todas as famílias estão presentes em cada organismo, no entanto, nalgumas ocorrem variações na distribuição intraespécie e interespecies, (POCKLEY, 2003; SRIVASTAVA, 2002). Em mamíferos (TABELA 1), quatro famílias de Hsp são reconhecidas: HSP90, HSP70, HSP60 e HSP de baixo peso molecular (sHSP) (GARRIDO et al., 2001).

Tabela 1 – Nomenclatura, localização e função chaperona de Hsp em mamíferos (GARRIDO et al., 2001).

Família	Chaperona	Localização	Principal Função
sHSP	Hsp27 α A-crystallin α B-crystallin	Citosol	Estabilização contra agregação celular.
HSP60	Hsp60 (chaperonina)	Mitocôndria	Estruturação e prevenção de agregação de proteínas denaturadas.
HSP70	Hsp70	Citosol / núcleo	Estruturação de polipeptídios nascentes, transporte inter-organelar, reestruturação de proteínas denaturadas.
	Hsc70	Citosol / núcleo	
	mHsp70	Mitocôndria	
HSP90	GRP78	RE	Maturação conformacional de receptores de hormônios esteroides e de quinases tradutoras de sinais.
	Hsp90 α	Citosol	
	Hsp90 β	Citosol	
	GRP94	RE	

RE= retículo endoplasmático

Atuam como chaperonas intracelulares ou proteases, características relacionadas à proteção celular e manutenção da homeostase (HARTL e HAYER-HARTL, 2002; HIGHTOWER, 1991; TISSIERES; MITCHELL; TRACY, 1974). O termo chaperonina foi utilizado na descrição de uma família de proteínas de cerca de 60 kDa altamente homólogas, que agiam como chaperonas moleculares encontradas em cloroplastos (Rubisco), mitocôndrias (Hsp60) e em eubactérias como *Escherichia coli* (GroEL) (HARTL e HAYER-HARTL, 2009; HEMMINGSEN et al., 1988). Processos como síntese de proteínas em compartimentos intracelulares requerem que essas moléculas tenham sua conformação desestruturada ou parcialmente estruturada, possibilitando então a exposição de suas regiões internas e a interação com outras proteínas (agregação proteica); as Hsp citosólicas ligam-se a essas regiões interativas, facilitando a estruturação dos polipeptídios denaturados ou recém-sintetizados, agindo como chaperoninas (BUKAU e HORWICH, 1998). A família das Hsp de 60 kDa, 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, regulação do tráfego intracelular e a translocação das proteínas através das membranas celulares (TOWER, 2009). A Hsp65 de *M. leprae* tem massa molecular de aproximadamente 57 kDa, o que a inclui na família da GroEL (FIGURA 1) ou das Hsp60 denominadas chaperoninas (ELLIS e VAN DER VIES, 1991), sendo considerada a principal proteína imunorreativa em micobactérias (THOLE et al., 1988).

FIGURA 1 – A 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 a 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).

Processos como o enovelamento, oligomerização, transporte e degradação de proteínas requerem que as proteínas tenham, temporariamente, uma conformação parcialmente estruturada ou denaturada. Como consequência, algumas regiões dessas proteínas ficam expostas, podendo interagir com outras proteínas. Esse fenômeno é denominado de agregação proteica, prejudicial para a vida celular. As chaperonas moleculares protegem essas superfícies interativas, ligando-se a elas por meio de ligações não-covalentes e ATP-dependentes, facilitando a estruturação dos polipeptídeos denaturados ou recém-sintetizados (SLAVOTINEK e BIESECKER, 2001).

Após quase 20 anos da identificação e caracterização (GEORGOPOULOS, 1992), estudo mostrou que a Hsp65r de *M. leprae* possui atividade enzimática e que a substituição do resíduo de Lys⁴⁰⁹ por Ala causa perda completa da sua atividade proteolítica (PORTARO et al., 2002). Assim, somente a Hsp65 de *M. leprae* teve sua atividade proteolítica observada. Estudos verificaram também uma possível atividade autolítica, sugerindo que esse processo possa gerar peptídeo(s)- epítipo(s) de forma independente do proteasoma (MARENCO, 2003; MARQUES et al., 1998; PARADA, 2007). A função chaperona das Hsp permite realizar a entrega de peptídeos, concomitantemente com a produção de estímulos pró-

inflamatórios, em células apresentadoras de antígenos (APC), com subsequente ativação de linfócitos T peptídeos-específicos (ANDERSON e SRIVASTAVA, 2000). Sendo assim, as Hsp são consideradas adjuvantes naturais, ativando APCs que internalizam e as apresentam para outras células do sistema imune via moléculas do MHC de classe I ou II. As Hsp65 de micobactérias foram descritas como adjuvantes em doenças como Artrite Reumatoide (COBELENS et al., 2000), Aterosclerose (WICK; PERSCHINKA; MILLONIG, 2001) e Tuberculose (BONATO et al., 1998), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF); quimiocinas como proteína cofator de membrana tipo 1 (MCP-1), proteína-2 inflamatória do macrófago (MIP-2) e RANTES (quimiocinas reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelos linfócitos T); indução da isoforma induzível de Óxido Nítrico Sintase (iNOS) e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos e DC (LEHNER et al., 2000; MORE; BRELOER; VON BONIN, 2001). Quando presentes no meio extracelular relacionam-se à ativação e regulação de células, transdução de sinais, regulação do ciclo celular e apoptose. Sabe-se que as Hsp60 são reconhecidas por TCR, Receptor de Células B (BCR) e TLR, evidenciando a ampla ação dessas proteínas sobre células potencialmente imunocompetentes (VAN EDEN et al., 2007).

A descoberta de que Hsp induzem a produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão levou à pesquisa de seus possíveis receptores celulares (GALDIERO; DE L'ERO; MARCATILI, 1997; KOL et al., 1999; KOL et al., 2000). A identificação de ligantes para os diferentes membros da família das HSP60 em macrófagos sugere distintos papéis imunorreguladores entre essas moléculas. As Hsp60 e Hsp70 são ligantes endógenos de TLR-2 e TLR-4, importantes mediadores da resposta imune inata presentes em diversos tipos celulares, e o antígeno CD14 foi identificado como receptor de Hsp em monócitos humanos (KOL et al., 2000; VABULAS et al., 2002). Além disso, linfócitos T reguladores parecem ser ativados por essas proteínas (CARAMALHO et al., 2003). Recentemente foi demonstrada a variabilidade intraespécie e interesespécie da ação fisiológica da Hsp quanto à proliferação celular, reatividade de células T e produção de citocinas, sendo que tais diferenças relacionadas ao perfil genético H-2 das linhagens de camundongos BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b), e C3H/HePas (H-2^k) (LUNA et al., 2007).

Normalmente as Hsp são liberadas somente por células necróticas e sua presença extracelular pode induzir respostas pró-inflamatórias; sabe-se que Hsp60 humana induz a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, molécula de adesão intracelular-1

(ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) nas células endoteliais, células de músculo liso e macrófagos (KOL et al., 1999; KOL et al., 2000). Contudo, alguns trabalhos mostram que essas moléculas possam ser liberadas passivamente (BASSAN et al., 1998; HIGHTOWER e GUIDON, 1989; LIAO et al., 2000; POCKLEY, 2003). Níveis de Hsp60 e Hsp70 e anticorpos anti-Hsp60 e anti-Hsp70 humanos e anti-Hsp65 de micobactéria foram detectados em indivíduos saudáveis entre 20 e 96 anos de idade, porém sem correlação significativa entre o nível de anticorpos anti-Hsp60 com o sexo e o aumento de idade (REA; MCNERLAN; POCKLEY, 2001). Por outro lado, verificou-se semelhança entre o aumento de anticorpos anti-Hsp65 e o aumento da idade, sugerindo-se que estes representem marcadores potenciais de idade (MANTLE; SINGH; HACHINSKI, 1995).

1.3 Relação entre as Hsp e processos patológicos no envelhecimento

Dentre os processos patológicos na imunosenescência destacam-se o aparecimento de câncer e a maior susceptibilidade a infecções (TRZONKOWSKI et al., 2009), além de doenças envolvendo o processamento anormal, modificação e agregação de proteínas, nas quais as Hsp estão tipicamente associadas (MORIMOTO, 2008; TOWER, 2009). Na literatura científica são amplamente discutidas as duas relações entre as Hsp (próprias e bacterianas) e seus envolvimento em patologias. Membros da família das HSP60 são considerados *IMUNODOMINANTES* em vários processos infecciosos (KAUFMANN, 1990) e participam do contexto pró-inflamatório de Artrite, Diabetes tipo I, Esclerose Múltipla e Aterosclerose (AFEK et al., 2000; BONATO et al., 1998; GEORGOPOULOS e MCFARLAND, 1993; WICK; PERSCHINKA; MILLONIG, 2001); a ligação a TLR-2 e TLR-4 sugere que essas proteínas atuem como um sinal endógeno de perigo, com consequente liberação de citocinas inflamatórias e aumento da resposta imune tipo Th1 (HIGHTOWER, 1991; KOL et al., 2000). Sendo a proteína mais abundante na parede microbiana, Hsp65 é considerada como toxina e antígeno dominante em várias doenças infecciosas, capazes de induzir resposta imune humoral e celular (KONG et al., 1993; QAMRA e MANDE, 2004; QAMRA; SRINIVAS; MANDE, 2004). Por outro lado, estudos evidenciam a função *IMUNORREGULADORA* das Hsp60/65 sobre células T, na supressão da resposta imune em doenças como Artrite Reumatoide (DE KLEER et al., 2003; VAN EDEN et al., 2005); pacientes em processos crônicos de Artrite apresentaram reatividade de células com fenótipo de linfócitos T reguladores para as Hsp associada ao abrandamento e remissão

da doença (VAN EDEN et al., 2007). Estudos realizados em pacientes que apresentam Artrite Reumatoide mostraram os diferentes papéis dessas proteínas na ativação de linfócitos T: a estimulação com a proteína humana (Hsp60) leva a produção de citocinas reguladoras do tipo Th2, enquanto que a estimulação com Hsp60 bacteriana induziu a produção de interferon- γ (INF- γ), consistente com uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1 (VAN ROON et al., 1997).

Várias hipóteses tentam explicar o envelhecimento e sua relação com patologias de origem genéticas, infecciosas, parasitárias ou autoimunes, relatando grande quantidade de efeitos biológicos atribuídos à senescência observados em órgãos específicos ou sistemicamente (CARNES; STAATS; SONNTAG, 2008). Apesar da maior incidência de doenças autoimunes, os idosos muitas vezes não apresentam resposta imunológica efetiva a estímulos antigênicos (PRELOG, 2006). Duas hipóteses, não necessariamente exclusivas, tentam explicar a relação entre a incidência de autoimunidades e processos infecciosos. A teoria *ANTÍGENO NÃO ESPECÍFICO* propõe que o sistema imunológico seja ativado tanto pela liberação normal de proteínas endógenas em consequência à morte celular induzida por micro-organismos, quanto por APC ativadas por estímulos microbianos e que apresentam mais efetivamente antígenos próprios (WUCHERPFENNIG, 2001). A teoria *ANTÍGENO ESPECÍFICO* é exemplificada pelo conceito do mimetismo molecular, no qual antígenos microbianos e próprios compartilham similaridades estruturais, facilitando a quebra da autotolerância (BENOIST e MATHIS, 2001); a presença de anticorpos e linfócitos T que reagem com Hsp60 ou Hsp65 reforça essa hipótese (DUDANI e GUPTA, 1989; FEIGE e VAN EDEN, 1996).

Indivíduos envelhecidos podem apresentar produção de autoanticorpos dependente do contato prolongado com antígenos exógenos (PANDEY et al., 1979; RAMOS-CASALS et al., 2003) e os anticorpos antinucleares e anti-DNA de dupla fita estão entre os mais detectados em idosos, atuando em doenças autoimunes sistêmicas e no controle antitumoral (IAKOUBOV e TORCHILIN, 1997). Anticorpos contra diversos membros das famílias das proteínas de choque térmico também foram detectados em pacientes com autoimunidades.

Estudos de homologia mostram que as Hsp60 de micobactérias apresentam cerca de 90% de similaridade entre si; em adição, as Hsp60 de bactérias e mamíferos possuem cerca de 50% de similaridade entre suas sequências primárias de aminoácidos (EL-ZAATARI et al., 1995; HAJEER et al., 1992). A partir de estudos imunoquímicos, verificou-se que a resposta antigênica e o reconhecimento cruzado com as Hsp60 de vertebrados são dirigidos à Hsp65 e

não à Hsp60 bacterianas; ainda, as diferenças entre Hsp60 e Hsp65 compreendem as regiões que contêm epítomos reconhecidos por células T (KONG et al., 1993). Este é um exemplo de mimetismo molecular, no qual determinantes antigênicos comuns são compartilhados por um potente antígeno bacteriano e proteínas próprias altamente conservadas (OLDSTONE, 1987). Acredita-se que Artrite Reumatoide, Esclerose Sistêmica, Psoríase, doença de Kawasaki e de Behçet sejam desencadeadas por células B e T através de epítomos que apresentam reação cruzada entre Hsp60 eucariotas e procariotas (ZUGEL e KAUFMANN, 1999).

Além desses aspectos, proteínas danificadas ou mal estruturadas acumulam-se como consequência natural do envelhecimento, promovendo um estado de sobrecarga de chaperonas que desafia os mecanismos de manutenção da homeostase (NARDAI; CSERMELY; SOTI, 2002), havendo uma relação de anticorpos anti-Hsp60/65, especialmente anti-Hsp65 de micobactérias, com processos inflamatórios, infecciosos e crônico-degenerativos (PROHASZKA et al., 1999; REA; MCNERLAN; POCKLEY, 2001; ZUGEL e KAUFMANN, 1999). Grande parte dos estudos da participação da reação cruzada do TCR focou-se em células $CD4^+$. Entretanto, o papel de T $CD8^+$ começou a ser investigado em modelo murino de inflamação intestinal usando clones de células $CD8^+$ que reconhecem ambas Hsp60 micobacteriana e murina. A doença nesse sistema é mediada pelo reconhecimento de antígenos próprios de Hsp60 pelo TCR: um clone de linfócito T que reage somente contra Hsp60 micobacteriana não causa a doença; esses resultados estabelecem o papel do reconhecimento cruzado de TCR entre a Hsp60 murina e de micobactérias, indicando que o mimetismo molecular é relevante em células citotóxicas (STEINHOFF et al., 1999).

1.4 As Linhagens High e Low de camundongos

O controle poligênico multiespecífico da resposta imunológica foi estabelecido a partir de cinco seleções genéticas bidirecionais independentes de linhagens de camundongos para os fenótipos de alta (H) ou baixa (L) produção de anticorpos a antígenos naturais. Esse modelo é importante para o entendimento da regulação genética da resposta imune humoral e sua influência em processos como susceptibilidade a infecções (MOUTON; STIFFEL; BIOZZI, 1985), artrite experimental (DE FRANCO et al., 1995), longevidade (COVELLI et al., 1989) e tumorigenese (IBANEZ et al., 1999). Esses estudos, iniciados em 1965, desenvolveram-se a partir do intercruzamento de populações geneticamente heterogêneas de

camundongos *Swiss* (SIQUEIRA et al., 1976). Em cada linhagem H ou L, diferentemente da obtenção de animais isogênicos, as seleções genéticas evitaram a consanguinidade. A característica fenotípica escolhida para obtenção das linhagens H_{III} e L_{III} utilizadas no presente estudo foram as respostas secundárias máxima ou mínima aos antígenos flagelares de *Salmonella*, seguindo cruzamentos em gerações sucessiva de animais apresentando fenótipos extremos, após imunizações alternadas com os antígenos não cross-reativos de *S. typhimurium* e *S. oranienburg*, evitando-se, assim, a interferência de anticorpos maternos passivamente transmitidos. O cruzamento dos camundongos que apresentavam alta ou baixa resposta levou à divergência progressiva dos fenótipos durante 16 gerações, quando se atingiu a homozigose dos *loci* que controlam o caráter (BIOZZI et al., 1979). Esses camundongos geneticamente selecionados diferem também em suas respostas a antígenos não relacionados, indicando uma modificação geral no mecanismo de síntese de anticorpos (efeito multiespecífico). Análises genéticas das linhagens H_{III} e L_{III} demonstraram que a característica *produção quantitativa de anticorpos* está sob controle poligênico de 5 a 7 *loci* independentes e que as pressões seletivas exercidas pelo método de seleção induziram modificações em diferentes etapas que promovem a síntese de anticorpos (REIS et al., 1992; SANT'ANNA et al., 1982).

Nas Seleções I, II e IVA (selecionadas por imunizações com eritrócitos de carneiro e pombo – Seleção I, eritrócitos de carneiro – Seleções II e IVA) foi demonstrado que a baixa resposta de anticorpos relaciona-se à alta atividade catabólica de seus macrófagos, limitando a quantidade de antígenos disponíveis capazes de ativar a resposta imune adquirida em camundongos L (IBANEZ et al., 1988; MOUTON et al., 1984). Por outro lado, os macrófagos de camundongos H e L da Seleção III e IV tem atividade catabólica similar (FERREIRA et al., 1985). Além disso, o tempo médio de sobrevivência é semelhante entre animais H_{III} (611 ± 153 dias de vida) e L_{III} (622 ± 166 dias de vida), contrastando com as Seleções I, II e V, na qual a sobrevivência é maior em animais H (DORIA et al., 1997).

Essas linhagens de camundongos, nas quais as potencialidades em extremos opostos foram definidas, representam também um modelo adequado para investigar fatores ambientais e genéticos atuantes no sistema imunológico inato e adquirido, sendo empregadas em estudos sobre resistência ou susceptibilidade a patógenos e/ou toxinas. Em relação à tumorigênese, camundongos bons respondedores são mais susceptíveis a indução de tumor de pele por DMBA/TPA que os maus respondedores, sugerindo que a resistência inata a esse tipo de carcinoma pode estar geneticamente relacionada com a baixa resposta de anticorpos (IBANEZ et al., 1999).

Trabalhos mostraram a susceptibilidade a doenças autoimunes nesses camundongos, nos quais H_{III} são resistentes e L_{III} extremamente vulneráveis a artrite induzida por pristano, indicando a colocação dos genes responsáveis pela produção de anticorpos e de susceptibilidade da doença. Nesse modelo é requerida a estimulação por Hsp65 de micobactérias reconhecidas na resposta autoimune que se segue após a injeção de pristano e sua semelhança com proteínas próprias a tornam uma possível candidata na indução desse tipo de autoimunidade (THOMPSON et al., 1990). Foi demonstrado que a diferente susceptibilidade dos animais H_{III} e L_{III} pode estar relacionada com o padrão de citocinas produzidas no início do desenvolvimento da doença e aos isótipos de IgG anti-Hsp65 predominantes na resposta; apesar de produzir quantidades semelhantes desses anticorpos, H_{III} e L_{III} diferem marcadamente nos isótipos produzidos durante o estabelecimento da artrite induzida por pristano (JENSEN et al., 2006).

Outro modelo patogênico estudado nessas linhagens é da infecção viral, sendo possível verificar o efeito da produção de anticorpos e suas vias de ativação do sistema imune no controle da doença. Para o Vírus-3 de Hepatite Murina (MHV3), camundongos L_{III} mostraram-se resistentes em relação aos H_{III}, mesmo que ambas as linhagens sejam capazes de produzir anticorpos contra o vírus; a resistência adquirida pelos camundongos suscetíveis H_{III} acompanha a síntese de anticorpos, inclusive quando foi realizada transferência de anticorpos anti-MHV3 anterior à infecção (VASSAO et al., 2003); camundongos bons respondedores são mais vulneráveis, indicando que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na aquisição da resistência à infecção viral (QUEIROZ-DA-SILVA; DE-FRANCO; SANT'ANNA, 1997).

A resposta imune a diversos antígenos depende da genética e da experiência imunológica pré- e pós-nascimento dos indivíduos. Baseando-se no conceito de mimetismo molecular e nos relatos de funções fisiológicas distintas para as moléculas Hsp60 próprias e Hsp65 bacteriana (autorreatividade e ação anti-inflamatória), sugere-se que as respostas a essas proteínas sejam variáveis, inclusive durante as mudanças observadas na imunosenescência. Dessa maneira, levantou-se a possibilidade de haver correlação entre a produção de Hsp e seus respectivos anticorpos com a expressão de processos patológicos presentes durante o processo de envelhecimento em linhagens de camundongos boas e más respondedoras.

2 CONCLUSÃO

Mais que um efeito do fenótipo da produção de anticorpos frente a administração da Hsp65r WT, o efeito pleiotrópico extenso do sistema imune e o aumento da entropia, provocados pelo tratamento, causaram ampliação da desordem em fêmeas H_{III}, indivíduos que devem apresentar naturalmente grau mais elevado de entropia. Além disso, o sistema imune remodelado durante o processo de envelhecimento apresentaria maior grau de entropia e a administração passiva da Hsp65r WT de *M. leprae* em fêmeas envelhecidas causa desequilíbrio em um sistema que não se assemelha àquele de indivíduos jovens, originando processos irreversíveis capazes de levar à morte. Como a história imunológica do indivíduo envelhecido é complexa e influenciada por fatores ambientais endógenos e/ou exógenos, chega-se um determinado limiar que o sistema não é capaz de reequilibrar-se, levando à morte.

REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular immunology**. 6th edition. Philadelphia, PA, USA: Elsevier, 2007. 574 p.

AFEK, A. et al. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. **J. Autoimmun.**, v. 14, n. 2, p. 115-121, 2000.

AGRAWAL, A.; AGRAWAL, S.; GUPTA, S. Dendritic cells in human aging. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 5, p. 421-426, 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, 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, 2000.

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, 1997.

ASPINALL, R.; ANDREW, D. Thymic involution in aging. **J. Clin. Immunol.**, v. 20, n. 4, p. 250-256, 2000.

BASSAN, M. et al. The identification of secreted heat shock 60 -like protein from rat glial cells and a human neuroblastoma cell line. **Neurosci. Lett.**, v. 250, n. 1, p. 37-40, 1998.

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, 2001.

BIOZZI, G. et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 85, n. p. 31-98, 1979.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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, 2009.

BONATO, V. L. et al. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 1, p. 169-175, 1998.

BOUMAN, A. et al. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 52, n. 1, p. 19-26, 2004.

BOUREE, P. Immunity and immunization in elderly. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 51, n. 10, p. 581-585, 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, n. p. 248-254, 1976.

BRUUNSGAARD, H. et al. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. **Am. J. Med.**, v. 115, n. 4, p. 278-283, 2003.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-366, 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, 2000.

CANTRELL, D. A.; SMITH, K. A. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. **J. Exp. Med.**, v. 158, n. 6, p. 1895-1911, 1983.

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, 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, 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, 2000.

CLAYTON, A. et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. **J. Cell. Sci.**, v. 118, n. Pt 16, p. 3631-3638, 2005.

COBELENS, P. M. et al. Treatment of adjuvant-induced arthritis by oral administration of mycobacterial Hsp65 during disease. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 12, p. 2694-2702, 2000.

COSSARIZZA, A. et al. Cytometric analysis of immunosenescence. **Cytometry**, v. 27, n. 4, p. 297-313, 1997.

COVELLI, V. et al. Inheritance of immune responsiveness, life span, and disease incidence in interline crosses of mice selected for high or low multispecific antibody production. **J. Immunol.**, v. 142, n. 4, p. 1224-1234, 1989.

DAVIES, E. L. et al. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n. 1, p. 183-189, 2006.

DE FRANCO, M. et al. 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.**, v. 25, n. 1, p. 132-136, 1995.

DE KLEER, I. M. et al. 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 Rheum.**, v. 48, n. 7, p. 2001-2010, 2003.

DORIA, G. et al. Genetic control of immune responsiveness, aging and tumor incidence. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 96, n. 1-3, p. 1-13, 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, 2009.

DUDANI, A. K.; GUPTA, R. S. Immunological characterization of a human homolog of the 65-kilodalton mycobacterial antigen. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 9, p. 2786-2793, 1989.

EFFROS, R. B. Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy. **Vaccine**, v. 25, n. 4, p. 599-604, 2007.

EL-ZAATARI, F. A. et al. Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 657-664, 1995.

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

ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu. Rev. Med.**, v. 51, n. p. 245-270, 2000.

FEIGE, U.; VAN EDEN, W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease. **EXS**, v. 77, n. p. 359-373, 1996.

FERREIRA, V. et al. Potentialities of immunocompetent cells in high and low antibody-producing lines of mice obtained by selective breedings for responsiveness to flagellar or somatic antigens of *Salmonellae*. **J. Immunogenet.**, v. 12, n. 6, p. 309-319, 1985.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 908, n. p. 244-254, 2000.

FRANCESCHI, C. et al. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. **Immunol. Today**, v. 16, n. 1, p. 12-16, 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, 2004.

GALDIERO, M.; DE L'ERO, G. C.; MARCATILI, A. Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 699-707, 1997.

GARRIDO, C. et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 286, n. 3, p. 433-442, 2001.

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

GEORGOPOULOS, C.; MCFARLAND, H. Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. **Immunol. Today**, v. 14, n. 8, p. 373-375, 1993.

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

GINALDI, L. et al. Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes. Infect.**, v. 3, n. 10, p. 851-857, 2001.

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

HAJEER, A. H. et al. Monoclonal antibody epitopes of mycobacterial 65-kD heat-shock protein defined by epitope scanning. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 89, n. 1, p. 115-119, 1992.

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

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 16, n. 6, p. 574-581, 2009.

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, 2002.

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

HEMMINGSEN, S. M. et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. **Nature**, v. 333, n. 6171, p. 330-334, 1988.

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

HIGHTOWER, L. E.; GUIDON, P. T., JR. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. **J. Cell Physiol.**, v. 138, n. 2, p. 257-266, 1989.

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. Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. **Immunogenetics**, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1988.

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, 1999.

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

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

KAUFMANN, S. H. Heat shock proteins and the immune response. **Immunol. Today**, v. 11, n. 4, p. 129-136, 1990.

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, 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, 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, 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, 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, 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, 1970.

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, 2000.

LIAO, D. F. et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 1, p. 189-196, 2000.

LICASTRO, F. et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. **Immun. Ageing**, v. 2, n. p. 8, 2005.

LIGHTSTONE, L. Lupus nephritis: where are we now? **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 22, n. 3, p. 252-256, 2010.

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, 2006.

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, 2007.

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, 2007.

MANTLE, R.; SINGH, B.; HACHINSKI, V. Do serum antibodies to heat-shock protein 65 relate to age or stroke? **Lancet**, v. 346, n. 8991-8992, p. 1715, 1995.

MARENGO, E. B. **Caracterização da especificidade primária da hsp65r de Mycobacterium leprae e estudo da possível relação desta atividade com o seu poder imunogênico.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - UNIFESP/Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 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.

MARQUES, M. A. et al. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2625-2631, 1998.

MCELHANEY, J. E.; EFFROS, R. B. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 418-424, 2009.

MICHAELS, R. M.; ROGERS, K. D. A sex difference in immunologic responsiveness. **Pediatrics**, v. 47, n. 1, p. 120-123, 1971.

MILLER, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 70-74, 1996.

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, 2000.

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, 2001.

MORIMOTO, R. I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. **Genes Dev.**, v. 22, n. 11, p. 1427-1438, 2008.

MOUTON, D. et al. Genetic selection for antibody responsiveness in mice: further evidence for inverse modification of macrophage catabolic activity without alteration of the expression of T-cell-mediated immunity. **Ann. Immunol. (Paris)**, v. 135D, n. 2, p. 173-186, 1984.

MOUTON, D.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G. Genetic factors of immunity against infection. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v. 136D, n. 2, p. 131-141, 1985.

NAKAI, A.; MORIMOTO, R. I. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 4, p. 1983-1997, 1993.

NARDAI, G.; CSERMELY, P.; SOTI, C. Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis. **Exp. Gerontol.**, v. 37, n. 10-11, p. 1257-1262, 2002.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fcgamma receptors: old friends and new family members. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 19-28, 2006.

NISHIKAWA, H. et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 5, p. 681-686, 2005.

O'MAHONY, L. et al. Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, n. 2, p. 213-219, 1998.

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

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, n. p. 226-231, 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, 1981.

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

PARADA, C. **Atividade autolítica da hsp65 de Mycobacterium leprae: Nova rota de apresentação de antígenos?** 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PAUL, A. G. et al. Highly autoproliiferative 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.**, v. 165, n. 12, p. 7270-7277, 2000.

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

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

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, 2005.

PIRKKALA, L.; NYKANEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB J.**, v. 15, n. 7, p. 1118-1131, 2001.

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

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

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

PORTARO, F. C. et al. The Mycobacterium leprae hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the M. leprae hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7400-7406, 2002.

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

PRIGOGINE, I. Chemical kinetics and dynamics. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 988, n. p. 128-132, 2003.

PRIGOGINE, I. Time, Structure, and Fluctuations. **Science**, v. 201, n. 4358, p. 777-785, 1978.

PROHASZKA, Z. et al. Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 1363-1370, 1999.

PROHASZKA, Z.; FUST, G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. **Mol. Immunol.**, v. 41, n. 1, p. 29-44, 2004.

PULLEN, G. R.; FITZGERALD, M. G.; HOSKING, C. S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J. Immunol. Methods**, v. 86, n. 1, p. 83-87, 1986.

QAMRA, R.; MANDE, S. C. Crystal structure of the 65-kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2, of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 23, p. 8105-8113, 2004.

QAMRA, R.; SRINIVAS, V.; MANDE, S. C. *Mycobacterium tuberculosis* GroEL homologues unusually exist as lower oligomers and retain the ability to suppress aggregation of substrate proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 342, n. 2, p. 605-617, 2004.

QUEIROZ-DA-SILVA, L. H.; DE-FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A. Rabies infection and specific effect of vaccination in mice selected for high and low immunobiological parameters. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 11, p. 1309-1313, 1997.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. HSP60 speaks to the immune system in many voices. **Novartis Found Symp.**, v. 291, n. p. 101-111; discussion 111-104, 137-140, 2008.

RAJAIAH, R.; MOUDGIL, K. D. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 8, n. 5, p. 388-393, 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, 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, 1992.

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

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

RYBKA, K. et al. Age related natural antiviral non-specific immunity of human leukocytes. **Med. Sci. Monit.**, v. 9, n. 12, p. BR413-417, 2003.

SAITO, Y. et al. Stepwise formation of the high-affinity complex of the interleukin 2 receptor. **Int. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 1167-1177, 1990.

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, 1982.

SARGE, K. D.; MURPHY, S. P.; MORIMOTO, R. I. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 3, p. 1392-1407, 1993.

SARGE, K. D. et al. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. **Genes Dev.**, v. 5, n. 10, p. 1902-1911, 1991.

SEGAL, R. et al. The effect of IL-12 on clinical and laboratory aspects of experimental SLE in young and aging mice. **Exp. Gerontol.**, v. 38, n. 6, p. 661-668, 2003.

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, 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, 1976.

SLAVOTINEK, A. M.; BIESECKER, L. G. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. **Trends Genet.**, v. 17, n. 9, p. 528-535, 2001.

SNOECKX, L. H. et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 4, p. 1461-1497, 2001.

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

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

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, 1996.

STEINHOFF, U. et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. **Immunity**, v. 11, n. 3, p. 349-358, 1999.

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, 1988.

THOMPSON, S. J. et al. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, n. 11, p. 2479-2484, 1990.

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, 1974.

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

TRZONKOWSKI, P. et al. From bench to bedside and back: the SENIEUR Protocol and the efficacy of influenza vaccination in the elderly. **Biogerontology**, v. 10, n. 1, p. 83-94, 2009.

TSUMIYAMA, K.; MIYAZAKI, Y.; SHIOZAWA, S. Self-organized criticality theory of autoimmunity. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8382, 2009.

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, 2002.

VAN EDEN, W. et al. Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. **Int. Rev. Immunol.**, v. 24, n. 3-4, p. 181-197, 2005.

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, n. p. 217-237, 2007.

VAN ROON, J. A. et al. Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 459-463, 1997.

VASSAO, R. C. et al. Antibody responsiveness during immunization and challenge of genetically modified antibody responder mice with murine hepatitis virus 3. **Immunobiology**, v. 207, n. 4, p. 275-283, 2003.

VOELLMY, R. Transduction of the stress signal and mechanisms of transcriptional regulation of heat shock/stress protein gene expression in higher eukaryotes. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 4, n. 4, p. 357-401, 1994.

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

WEKSLER, M. E. Changes in the B-cell repertoire with age. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1624-1628, 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, 1993.

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

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

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, 1998.

WICK, G.; PERSCHINKA, H.; MILLONIG, G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 12, p. 665-669, 2001.

WILLIAMS, G. C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. **Evolution**, v. 11, n. 4, p. 398-411, 1957.

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

YUNG, R. L.; JULIUS, A. Epigenetics, aging, and autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 41, n. 4, p. 329-335, 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, 2003.

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

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, 1999.

ZUO, J. et al. Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 11, p. 7557-7568, 1994.