DANIELE VIEIRA SILVA

Efeito da terapia oral combinada com probióticos, Hsp65 e aloantígenos do doador no transplante de pele murino

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Alergia e Imunopatologia
Orientadora:Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho

São Paulo
2016

DANIELE VIEIRA SILVA

Efeito da terapia oral combinada com probióticos, Hsp65 e aloantígenos do doador no transplante de pele murino

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Alergia e Imunopatologia
Orientadora:Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Daniele Vieira
Efeito da terapia oral combinada com probióticos, Hsp65 e aloantígenos do doador no transplante de pele murino / Daniele Vieira Silva. -- São Paulo, 2016.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho.

Descritores: 1.Tolerância imunológica 2.Transplante 3.Microbiota 4.Probióticos 5.*Lactococcus lactis* 6.Proteínas de choque térmico

USP/FM/DBD-357/16

Resumo

Silva DV. **Efeito da terapia oral combinada com probiótico, Hsp65 e aloantígenos do doador no transplante murino** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Apesar do sucesso do transplante na clínica, os importantes efeitos adversos dos imunossupressores, usados para prevenir e tratar a rejeição, apontam para a necessidade de novas terapias imunorreguladoras. A via oral tem sido efetiva na indução de imunorregulação, em diversos modelos experimentais, principalmente de doenças autoimunes. A Hsp60/65 é uma molécula com grande potencial imunoterapêutico, por sua capacidade de induzir respostas imunes pró-inflamatória e imunorreguladora. Testamos se a terapia oral com o probiótico *Lactococcus lactis* que expressa a Hsp65, combinada à administração de aloantígenos do doador (AloAg-doador), atua sinergicamente na indução de tolerância ao enxerto de pele semialogeneico murino, ou no aumento de sua sobrevida. Testamos diferentes combinações de terapia oral, assim como a influência da utilização de um anti-inflamatório, inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibe). O transplante de pele foi realizado 10 dias após a última administração oral dos probióticos e aloantígenos do doador. Não observamos efeitos benéficos na sobrevida do enxerto no grupo de animais que receberam *L.lactis* que produz Hsp65, sozinho ou em combinação com AloAg-doador e/ou o anti-inflamatório. Em contraste, a terapia oral combinada com o probiótico *L.lactis* selvagem e AloAg-doador aumentou significativamente a sobrevida do enxerto (p=0,01), em comparação com o grupo não tratado. Nesse grupo que teve maior sobrevida do aloenxerto (*L,lactis* selvagem e AloAg-doador), também observamos maior quantidade de epitélio preservado (p=0,02) e maior expressão de TGF-β (p=0,04), no enxerto, em comparação com o grupo sem tratamento. Não observamos diferenças significativas na expressão, *in situ*, de FOXP3 e IL-17, que foi baixa em todos os grupos experimentais. Concluímos que a Hsp65 não induziu efeito imunorregulador capaz de prolongar a sobrevida do enxerto. No entanto, a manipulação da microbiota com a terapia combinada com o *L.lactis* selvagem e a exposição a antígenos do doador, previamente, ao transplante, induz mecanismos imunorreguladores capazes de controlar, mesmo que parcialmente, as respostas

inflamatórias dirigidas ao aloenxerto de pele, provavelmente, com a participação de TGF-beta.

Descritores: tolerância imunológica, transplante, microbiota, probióticos, *Lactococcus lactis*, proteínas de choque térmico,

Abstract

Silva DV. **Effect of combined oral therapy with probiotics, Hsp65 and donor alloantigens in murine skin transplantation** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Despite the success of clinical transplantation, the significant side effects induced by immunosupressants used to prevent and treat rejection, indicate the need for novel immunoregulatory therapies. The oral route has been effective in inducing immunoregulation in several experimental models, mostly in pathological autoimmunity. Heat Shock protein 60/65 (Hsp) displays great immunotherapeutic potential due to its capacity to induce both pro-inflammatory and immunregulatory responses. We tested whether oral therapy with the probiotic *Lactococcus lactis* that expresses Hsp65, in combination with donor alloantigens (Donor-Allo-Ag), acted synergically, inducing immunotolerance or increasing graft survival, in a murine model of semiallogeneic skin transplantation. We tested different oral therapy combinations, as well as the association with a COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drug (celecoxib). Skin transplantation was performed 10 days after the last oral administration of probiotics and Donor-Allo-Ag. We observed no beneficial effect on graft survival in the group that received *L.lactis* that produce Hsp65, alone or in combination with Donor-Allo-Ag/and/or the anti-inflammatory drug. In contrast, combined oral therapy with wild type *L.lactis* and Donor-Allo-Ag significantly prolonged graft survival (p=0.01), in comparison to non-treated animals. In this prolonged-survival group (*L.lactis* and Donor-Allo-Ag), we also found higher extension of preserved epithelium (p=0.02) and higher expression of TGF-beta (p=0.04), within the graft, in comparison to non-treated animals. We found no significant differences in the intragraft expression of FOXP3 and IL-17, which was essentially absent or very low. We conclude that Hsp65 did not induce immunoregulatory effects capable of prolonging graft survival. However, the microbiota manipulation with the combined oral therapy with wild type *L.lactis* and Donor-Allo-Ag, prior to transplantation, induce immunoregulatory mechanisms capable of partially controlling the inflammatory responses to the graft, most likely involving the participation of TGF-beta.

Descriptors: immune tolerance, transplantation, microbiota, probiotics, *Lactococcus lactis*, heat-shock proteins

Agradecimentos

À minha mãe pela paciência, compreensão, apoio incondicional, muito amor e dedicação, pelos dias de ausência nesses anos de crescimento pessoal e acadêmico.

À minha orientadora Verônica, por todo incentivo, apoio, investimento, por acreditar no meu potencial, por toda confiança depositada em mim, muita dedicação em apresentar esse novo mundo, mostrar novos caminhos de conhecimento e aprendizagem e aos abraços que muitas vezes eu precisava.

À Priscila Carmona, pela ajuda incondicional, tanto profissional quanto pessoal, pelas duvidas compartilhadas, pelas conversas e muitas risadas por acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava, me ajudar a ver sempre o lado positivo das situações vividas

À todos do grupo TX, aos que passaram e aos que permaneceram, me recebendo muito bem nesse mundo novo e, com qualidades individuais me proporcionaram uma visão diferente de tudo que eu já havia visto.

A Edilberto Postol e Luiz Mundel, por todo apoio e ensinamento, muitas piadas, risadas, e, além disso, muito respeito por essas duas pessoas.

A todos do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) –Faculdade de Medicina da USP, por estarem sempre dispostos a me ouvir e me ajudar.

À Ana Maria Caetano de Faria, primeiramente por me receber com muita atenção, me proporcionar momentos muito ricos em suas discussões científicas e sempre nos ajudando a pensar nas alternativas científicas.

À Laila Horta que me me recebeu não apenas em seu ambiente de trabalho mas em sua vida pessoal também, por todos os protocolos feitos juntas e finais de semana da Federal, por nos momentos de desespero sempre achar graça e me fazer perceber o

quanto estava sendo dramática, por risadas e desentendimentos também, porque é assim que se constrói uma amizade.

À Dona Carlina (mãe de Laila), por me receber como uma filha, e foi assim que me senti durante esse período tão conturbado, pelas risadas e puxões de orelha, além dos cafezinhos e pão de queijo de fazenda.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Imunologia ICB- UFMG, Belo Horizonte, por me fazer sentir parte do laboratório.

Ao Professor Jorge Kalil, diretor do de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) – Faculdade de Medicina da USP, por ceder o laboratório para o meu aprendizado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos.

A iii-INCT (Instituto de Investigação em Imunologia).

“Não há no mundo coisa mais
diícil do que a sinceridade e mais
fácil do que a lisonja”

Fiódor Dostoiévski

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do plamídeo que expressa Hsp65 e sua expressão.....22
Figura 2: Protocolo # 1 - Administração oral de *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT com e sem inibidor de cox-2 (Celecoxibe).....26
Figura 3: Protocolo # 2: Administração oral de aloantígenos e *L.lactis* HSP65 ou *L.lactis* WT com celecoxibe.....27
Figura 4: Protocolo # 3 – Administração oral de aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis WT*.....28
Figura 5: Figuras representativas dos transplantes de pele singeneico e semialogeneico.....32
Figura 6: Curva de sobrevida Protocolo # 1 Administração oral L.lactis HSP65 e L.lactis WT: transplante de pele semialogeneico com ou sem celecoxibe.....35
Figura 7: Curva de sobrevida Protocolo # 2 Administração oral com aloantígenos e *L.lactis* HSP65 ou *L.lactis* WT.....38
Figura 8: Curva de sobrevida Protocolo # 3.....41
Figura 9: Análise histopatológica de enxertos de pele.....43
Figura 10: Análise histopatológica quantitativa do tecido doado.....44
Figura 11: Análise Quantitativa de TGF-beta.....46
Figura 12: Análise Quantitativa de TGF-beta.....47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos Experimentais, número de animais e tratamentos.....28
Tabela 2:Análise macroscópica dos aloenxertos de pele. Protocolo #1 administração de *L.lactis* Hsp, *L.lactis* Selvagem com e sem celecoxibe.....33
Tabela 3: Análise individual do tempo de sobrevida Protocolo #1.....34
Tabela 4:Análise Macroscópica de aloenxertos de pele. Protocolo #2 administração de aloantígenos do doador e *L.lactis* Hsp ou *L.lactis* Selvagem com celecoxibe.....36
Tabela 5:Análise individual do tempo de sobrevida. Protocolo # 2 administração oral com aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe.....37
Tabela 6:Análise macroscópica de aloenxertos de pele. Protocolo #3 administração de aloantígenos e *L.lactis* Hsp ou L.lactis Selvagem.....39
Tabela 7:Análise individual do tempo de sobrevida Protocolo # 3 Administração oral com aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico.....40
Tabela 8: Análises histopatológicas dos grupos que tiveram aumento de sobrevida.....42
Tabela9:Avaliação de aloenxertos por imunohistoquímica de Foxp3,IL-17 e TGF-β.....45

Sumário

Resumo
Abstract
Lesista de Figuras
Lista de Tabelas

1. Introdução....1
Transplante....1
Tolerância Imunológica....3
Mucosa intestinal e Microbiota....11
Lactococcus Lactis....14
Proteína de Choque Térmico....15
2. Objetivos....20
3. Métodos....21
3.1. Delineamento Experimental....21
3.2. Local de desenvolvimento....22
3.3. Origem das cepas L.lactis WT e L.lactis Hsp65....22
3.4. Condições de crescimento das bactérias....23
3.5. Produção dos *L.lactis* WT e *L.lactis* Hsp65, indução de expressão de Hsp65 por Xilose e administração....23
3.6. Animais....23
3.7. Obtenção do extrato proteico de células alogeneicas....24
3.8. Transplante....25
3.9. Protocolo # 1: Administração oral de *L.lactis* Hsp65 e *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com ou sem celecoxibe....25
3.10. Protocolo # 2: Administração oral de aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe....26
3.11. Protocolo # 3: Administração oral com aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico....27
3.12. Grupos experimentais....28
3.13. Análise macroscópica do enxerto....29
3.14. Eutanásia....29
3.15. Análise Histolopatológica....29
3.16. Imunohistoquímica....30
3.17. Análise estatística....31
4. Resultados....32
4.1. Protocolo # 1: Administração oral *L.lactis* Hsp65 e *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com ou sem celecoxibe....33
4.2. Protocolo # 2: Administração oral com aloantígenos do doador e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe....35
4.3. Protocolo # 3: Administração oral com aloantígenos do doador e *L.lactis* Hps65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico....39
4.4. Análise histopatológica – Hematoxilina& Eosina....41
4.5. Análise imunopatológica – Imunohistoquímica....44
5. Discussão....48
6. Conclusões....59
Anexos....61
Anexo A....62
Anexo B....63
Referencias....64

1. Introdução

Transplante

O transplante é a alternativa mais importanteno tratamento de perda de função de órgãos (coração, fígado, pulmões, rins, pâncreas) e tecidos (medula óssea, córnea, ossos). Apesar do sucesso do transplante na clínica, a rejeição ainda é um problema muito importante, principalmente a rejeição crônica, assim como o desfio de induzir tolerância na clínica continua.

Os mecanismos de rejeição são desencadeados após o alorreconhecimento, que é a ativação dos linfócitos T frente ao reconhecimento de antígenos polimórficos do doador, principalmente as moléculas MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, Complexo Principal de Histocompatibilidade) presentes na superfície das células do aloenxerto, pela interação molecular com o receptor de células T (TCR do inglês, *T Cell Receptor*) do receptor.

As moléculas MHC são compostas por um complexo de proteínas que têm a capacidade de apresentar antígenos, em forma de peptídeos. Os linfócitos T $CD8^+$ reconhecem moléculas MHC classe I presentes, constitutivamente, na superfície de todas as células nucleadas, apresentando antígenos próprios, mas também antígenos não próprios como, por exemplo, de patógenos intracelulares. Já os linfócitos T $CD4^+$ reconhecem moléculas MHC de classe II presentes, principalmente, nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APC do inglês, *Antigen Presenting Cells*, células apresentadoras de antígenos), como as células dendríticas e os macrófagos que apresentam antígenos, principalmente, do meio extracelular.

O alorreconhceimento pode acontecer pela via direta, onde as células T do receptor reconhecem aloantígenos diretamente da superfície das APC do doador (Warrens *et al.*, 1994). Na via indireta, o reconhecimento alogeneico se dá após o processamento de aloantígenos derivados do doador, pelas APC do receptor, e sua apresentação na forma de peptídeos dentro das moléculas MHC, para os receptores de linfócitos T (Lechler e Batchelor, 1982). Pode acontecer ainda, o alorreconhecimento pela via semidireta, onde os complexos MHC-peptídeos das células do doador são transferidos para a superfície das APCs ou dos linfócitos do receptor que, assim, passam a ativar outros linfócitos alorreativos (Herrera *et al.*, 2004).

Os principais mecanismos efetores de rejeição são: citotoxicidade mediada por linfócitos CD4 e CD8, secretores de granzimas e perforinas, ou indutores de morte celular por apoptose (Robertson *et al.*, 1996); hipersensibilidade tardia, mediada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente por linfócitos T auxiliares; atuação de anticorpos fixadores de complemento, mediando lise celular, ou citotoxicidade dependente de anticorpo (Cai e Terasaki, 2005). Também há descrita a participação da IL-17, nas respostas inflamatórias, durante a rejeição de transplante renal humano (Van Kooten *et al.*, 1998), bem com a participação das células Th17 na rejeição de aloenxerto cardíaco, em camundongos (Min *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2010) e a supressão da expansão de células T reguladoras pela presença de IL-17 (Itoh *et al.*, 2011).

Atualmente, o tratamento da rejeição é feito com drogas imunossupressoras. Entretanto, além de suprimir a ação da resposta imune inflamatória contra o órgão transplantado, elas também suprimem respostas imunes de células efetoras importantes, causando maior suscetibilidade a infecções e ao desenvolvimento de câncer, além de

cardio e nefrotoxicidades (Bennett *et al.*, 1994). Assim, é de grande importância desenvolver novas estratégias de manipulação do sistema imune, que diminuam o processo inflamatório e controlem os mecanismos efetores de rejeição ou mesmo que possam estimular mecanismos imunorreguladores endógenos e induzir tolerância imunológica ao enxerto.

Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica é um estado, no qual não há resposta inflamatória descontrolada dirigida a antígenos, sejam eles autólogos ou heterólogos, que levem a dano tecidual.

Podemos observar diferentes contextos de tolerância imunológica. Aquela na qual não há agressão a tecidos próprios (tolerância imunológica ao próprio) (Klein *et al.*, 2014), aquela em que o sistema imune não agride tecidos alogeneicos (tolerância imunológica alogeneica); um exemplo fisiológico de tolerância alogeneica é a tolerância materno-fetal (Billington, 2003) e, na clínica, no contexto da tolerância operacional, quando não há rejeição do órgão transplantado após a parada do uso de drogas imunossupressoras (Roussey-Kesler *et al.*, 2006). Também podemos chamar de tolerância imunológica a relação não deletéria entre o nosso sistema imune e a nossa microbiota e, não menos importante, também podemos qualificar como tolerância imunológica, aquelas respostas a antígenos ingeridos e inalados, quando não desenvolvemos reações inflamatórias descontroladas (tolerância oral) (Weiner *et al.*, 2011).

Pode-se dizer que a tolerância central inicia-se no timo, durante o processo de desenvolvimento e maturação de células T e que, ao final da sua maturação, sairão do

timo linfócitos com a habilidade de reconhecimento molecular do próprio e não próprio, além de, durante esse processo, serem geradas células T reguladoras que possuem a habilidade de suprimir respostas efetoras exacerbadas (Caramalho *et al.*, 2015).

No processo de maturação de linfócitos T, os precursores de células T, migram da medula óssea para o timo e, interagem com complexos MHC- peptídeo presentes nas células medulares epiteliais tímicas mTECs (do inglês, *medullary thymic epitelial cells*, células medulares epiteliais tímicas) que apresentam um repertório de peptídeos derivados de autoantígenos, inclusive autoantígenos tecido-específicos, cuja expressão é regulada, principalmente, pelo gene AIRE (do inglês, *autoimune regulator*) (Nagamine *et al.*, 1997). Quando os timócitos, cujos receptores de células T (TCR) interagem com complexos MHC+peptídeos, com avidez intermediária, ocorre seleção positiva, e eles completam sua maturação, migrando, posteriormente, para os órgãos linfoides periféricos. Quando a interação é de avidez muito baixa, as células morrem por negligência, e quando a interação é de alta avidez, os timócitos, em geral, sofrem seleção negativa e morrem por apoptose (Caramalho *et al.*, 2015). Entretanto, a despeito do robusto processo de seleção negativa (mais de 90% dos precursores de timócitos, em processo de maturação no timo, são deletados), parte do repertório de linfócitos T maduros escapam da seleção negativa e chegam à periferia (Bouneaud *et al.*, 2000; Danke *et al.*, 2004). As células T reguladoras tímicas (tTreg, $CD4^{+}CD25^{+}FOXP3^{+}$), que são geradas durante o processo de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T, são selecionadas positivamente, a despeito de sua interação com os complexos MHC+peptídeos ser, geralmente, de alta avidez (Sakaguchi, 2004). Seu desenvolvimento depende de haver competição inter clonal durante a maturação,

sugerindo um programa populacional de desenvolvimento baseado em especificidade e dinâmica populacional (Bautista et. al., 2009; Leung et. al.,2009).

Comumente chamadas de Tregs naturais, as Treg tímicas expressam as moléculas CD4, um co-receptor que atua, sinergicamente, com o TCR durante o reconhecimento de antígenos em moléculas MHCII, e a molécula CD25, o receptor de alta afinidade da IL-2, e o fator de transcrição FOXP3 (do inglês, *forkhead box P3*) que controla a transcrição de diversas moléculas envolvidas na atividade supressora das Tregs (Fontenot *et al.*, 2003). A atividade supressora de células Treg é mediada pela inibição de proliferação e da ação pró-inflamatória das células efetoras, tanto no contato célula-célula (Sakaguchi, 2006), quanto pela ação de citocinas imunorreguladoras como IL-10 e TGF-β (do inglês, *transforming growth factor β*, ou fator de crescimento transformador β) (Zheng *et al.*, 2004).

Apesar de a seleção tímica ser intensa quanto à eliminação de células autorreativas, parte dessas células autorreativas sai do timo e, embora uma pequena porcentagem dessas células sejam células T reguladoras tímicas, outras células autorreativas são potencialmente patogênicas. O controle dessas células se dá por mecanismos de tolerância periférica, que ocorrem nos órgãos linfoides secundários (linfonodos e baço), mas também, nos microambientes de outros tecidos e na interação com eles (Matzinger e Kamala, 2011). Conforme o indivíduo nasce, cresce e envelhece, ele passa por diversos desafios imunológicos, como infecções, contato com diversos antígenos, como os da alimentação, respiração e microbiota, e aloantígenos, quando recebe transfusão sanguínea, transplante ou na gravidez.

Diversos mecanismos estão envolvidos na tolerância periférica, dentre eles incluem-se: modificação da atividade efetora de linfócitos T, com inibição da

proliferação e produção de citocinas anti-inflamatórias (Knoechel *et al.*, 2006); deleção de células efetoras, seja por indução de apoptose seja por citotoxicidade mediada por perforina e granzima (Wells *et al.*, 2001); ação de células dendríticas com perfil tolerogênico (Thomson e Robbins, 2008); ação de macrófagos M2 com perfil imunorregulador (Verreck *et al.*, 2004); supressão mediada por diferentes tipos de células T reguladoras (Chen *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Sakaguchi *et al.*, 1995; Levings e Roncarolo, 2000; Weiner, 2001); atuação de subpopulação de linfócitos B com atividade reguladora (Mizoguchi e Bhan, 2006); e, bem provavelmente, também pela atuação de células tronco mesenquimais (MSC, do inglês, *mesenchymal stem cells*) que têm atividade imunorreguladora (Pittenger *et al.*, 1999).

Apesar de haver diferentes tipos celulares envolvidos nos mecanismos de tolerância periférica, as células T reguladoras paracem ter um papel crítico. Há diversos fenótipos de células Treg na periferia, como as tTreg $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ que saíram do timo após a sua maturação, e diferentes tipo de Tregs que são induzidas na periferia (iTreg), frente aos diferentes estímulos que ativam o sistema imune. As mais bem estudadas são as Tr1 produtoras, principalmente, de IL-10 (Levings e Roncarolo, 2000), as Th3, produtoras, principalmente, de TGF-β (Weiner, 2001) e, também foram descritas as células Treg que expressam LAP (do inglês, *latency associated peptide*, peptídeo latente associado), uma forma precursora de TGF-β associado à membrana (Miyazono *et al.*, 1993) e que suprime a proliferação de células T efetoras $CD4^{+}CD25^{-}$ (Nakamura *et al.*, 2001).

As células que expressam as moléculas CD4 e LAP foram descritas tanto com expressão de CD25 (Nakamura *et al.*, 2001) quanto negativas para esta molécula (Oida *et al.*, 2003). Foi observado que essas células secretam TGF-β que, por sua vez, pode

que inibir a ativação de células efetoras e induzir mudança de perfil perfil funcional de células apresentadoras de antígenos para um perfil imunorregulador. Sua atividade supressora, também, pode ser mediada pela ligação do TGF-β associado à membrana (LAP) ao receptor TGF-βR na célula alvo, por meio de contato célula-célula (Nakamura *et al.*, 2001). Após a ligação de TGF-β com seu receptor, TGF-βR, são ativados sinais intracelulares que induzem a fosforilação de SMAD2 e SMAD3 fatores de transcrição envolvidos na regulação imune, como a supressão de células pró-inflamatórias (Takimoto *et al.*, 2010).

Algumas populações de células $TCD8^+$ também foram descritas com perfil imunorregulador (Tang *et al.*, 2005), como, por exemplo, a atividade supressora das células $TCD8^+CD28^-$ sobre a alorreatividade de células T efetoras, *in vitro*, (Liu *et al.*, 1998). Em humanos, também foi descrito que uma subpopulação de timócitos $CD8^+CD25^+$ tem atividade supressora sobre células T efetoras, dependente da expressão de CTLA-4 e TGF-β (Cosmi *et al.*, 2003). Em modelo experimental de encefalomielite autoimune experimental EAE (do inglês, *experimental autoimune encephalomyelitis*), outra subpopulação identificada foi a $TCD8^+LAP^+$, com perfil imunorregulador, que produz TGF-β, sendo capaz de diminuir os efeitos da EAE induzida, pela ação TGF-β e IFNγ (Chen *et al.*, 2009).

Durante a alimentação, ingerimos uma diversidade de antígenos da dieta. Na maior parte dos microambientes do corpo, o sistema imune organiza uma resposta robusta envolvendo a eliminação desses antígenos estranhos. Entretanto, apesar de haver inflamação, o microambiente gastrointestinal é, predominantemente, imunorregulador. Assim, a exposição desses antígenos da alimentação não induz uma resposta inflamatória patológica. Podemos, então, chamar de tolerância oral, o fenômeno

imunológico decorrente da exposição de antígenos via oral, no qual o organismo não desenvolve resposta inflamatória patológica dirigida a esses antígenos (Weiner *et al.*, 2011).

O contato dos antígenos presentes no intestino, com o tecido linfoide associado à mucosa, desencadeia uma ativação imunológica não inflamatória, principalmente com a participação de células T reguladoras, tanto tímicas (tTreg) quanto induzidas (iTreg) (Yamazaki e Morita, 2013), além da participação de diferentes tipos celulares residentes da mucosa intestinal e no tecido linfoide residente, com produção de citocinas predominantemente imunorreguladoras, como TGF-β e IL-10.

A exposição de antígenos via oral, tem se mostrado um método efetivo no estímulo de mecanismos imunorreguladores periféricos importantes, em diferentes modelos experimentais (Weiner *et al.*, 2011). Assim, parece promissor desenvolver protocolos para indução de tolerância, em casos de quebra de tolerância ou em casos nos quais a indução de tolerância seja importante, como por exemplo, em doenças autoimunes e nos transplantes, respectivamente.

Na utilização de antígenos pela via oral para indução de tolerância, é descrito que a dose de antígenos administrada é importante na indução de distintos perfis de resposta imunorreguladora. Em geral, a administração de altas doses de antígenos (por volta de 5mg em dias alternados ou 20mg/dose única) induz um perfil imunológico com deleção de células efetoras e mudança de perfil funcional, com inibição da proliferação e ausência da produção de IL-2 (Friedman e Weiner, 1994; Chen *et al.*, 1995; Van Houten e Blake, 1996). Quando administradas baixas doses de antígenos (por volta de 1mg/ml 5 doses) a resposta imunorreguladora é mediada, principalmente, por células reguladoras e produção de citocinas imunorreguladoras (Chen *et al.*, 1994; Friedman e

Weiner, 1994; Chen *et al.*, 1995). Doses baixas e contínuas de OVA via oral, por exemplo, foram capazes de suprimir a produção de IL-2 e IFN-γ e aumentar a produção de IL-10 e TGF-β, *in vitro*, em células esplênicas de animais OVA-TCR transgênicos (Faria *et al.*, 2003). Foi observado também que a administração de proteína básica de mielina, MBP (do inglês, *myelin basic protein*), em doses baixas e contínuas, via oral, suprime a indução de EAE em camundongos, mediada pelo aumento da produção de IL-10 e TGF-β (Faria *et al.*, 2003).

A indução de tolerância via oral tem sido efetiva em vários contextos experimentais. No modelo experimental de EAE, foi observado que a administração oral de MBP induziu uma atividade imunorreguladora, mediada por células Treg $CD4^+$, com especificidade à MBP, e aumento de citocinas imunorreguladoras, IL-10 e IL-4 (Chen *et al.*, 1994). Ainda no modelo de EAE, a administração oral de um lactococcus recombinante que produz a Hsp65, preveniu o desenvolvimento do EAE, sendo o efeito associado à redução de IL-17 e aumento da produção de IL-10, além do aumento do número de células Treg $CD4^+Foxp3^+$ e Treg $CD4^+LAP^+$ (Rezende *et al.*, 2013). Neste modelo, a depleção de células LAP^+ eliminou o efeito benéfico da administração *L.lactis* produtor de Hsp65 no modelo de EAE, mostrando o seu papel crítico nos mecanismos imunorreguladores.

Em um modelo murino de artrite, observou-se supressão na indução da doença, após a administração oral de colágeno tipo II, um autoantígeno presente na cartilagem, antes da indução da doença, induzida pela administração de colágeno tipo II com adjuvante (Nagler-Anderson *et al.*, 1986). Em modelo experimental de diabetes, a administração oral de insulina humana ou peptídeos da cadeia β da insulina foi eficaz na

inibição do diabetes em camundongos NOD (do inglês, *Non-obese diabetic*, diabéticos não obesos) (Maron *et al.*, 2001).

Em outro diferente exemplo de indução de tolerância via oral, no modelo de colite experimental, observou-se que a administração oral de HCP (do inglês, *haptenized colonic proteins*, proteínas do cólon conjugados a haptenos) foi capaz de suprimir a habilidade do TNBS (do inglês, *haptenizing reagente 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*, reagente de ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno conjugado a hapteno) de induzir colite, e foi sugerido que a supressão era mediada pela geração de células T produtoras de TGF-β e citocinas do perfil Th2 na mucosa (Neurath *et al.*, 1996). Em outro estudo, as células T com o fenótipo $CD4^{+}CD25^{-}LAP^{+}$ foram capazes de suprimir a indução de colite experimental, por meio de secreção de TGF-β, e o bloqueio, *in vivo*, do TGF-β elimina o efeito supressor, mostrando que o efeito supressor das células Treg $CD4^{+}CD25^{-}LAP^{+}$ era dependente dessa citocina (Oida *et al.*, 2003).

Todos esses trabalhos mostram que a exposição de antígenos via oral, com o objetivo de induzir mecanismos imunorreguladores, foi efetiva em diferentes contextos de inflamação e doenças autoimunes. Entretanto, há poucos dados de indução de tolerância, via oral, no contexto de transplantes.

Em modelo experimental de transplante de coração, observou-se inibição de respostas inflamatórias ao aloenxerto, com protocolo de indução de tolerância via oral, administrando-se esplenócitos de ratos Lewis (LEW, RT-11) doadores, para ratos Brown Norway (BN, RT-1n) receptores de transplante, associada com a diminuição de IL-2 e IFN-γ e com concentrações elevadas de IL-4 e IL-10 em sobrenadantes de reação mista de linfócitos (MLR, do inglês *mixed lymphocyte reaction*) (Ishido *et al.*, 1999). Ainda em modelo experimental de transplante, foi observado que a prévia

administração, via oral, de colágeno tipo V para receptores de aloenxerto pulmonar, reduziu a resposta aos antígenos do doador com maior produção sistêmica de TGF-β (Yasufuku *et al.*, 2001).

Há também, dados em modelos experimentais com desenvolvimento de GVHD (do inglês, *graft versus host disease*, doença do enxerto contra o hospedeiro) que, após a administração oral de extrato de aloproteínas do receptor para o doador, melhorou a inflamação caracterizada como GVHD, causada no receptor, após a infusão de esplenócitos do doador tolerizado, (Nagler *et al.*, 2000). Este mesmo grupo também observou que, a administração oral de antígenos do doador (C57BL/6) para o receptor (F1- Balb/c x C57BL/6), induziu melhora das manifestações clínicas e patológicas no fígado, intestino delgado e pele do receptor, após o transplante de células tronco hematopoiéticas semialogeneicas, no modelo de GVHD (Nagler *et al.*, 2003). Recentemente, foi observado, também em modelo de GVHD, que o tratamento via oral com a combinação de aloantígenos do receptor e probióticos (*L.lactis*) para doadores, melhorou as manifestações clínicas e alterações patológicas, induzindo 100% de sobrevida dos receptores e imunocompetência preservada (Mercadante *et al.*, 2014). Estes estudos indicam que indução de tolerância, via oral, pode ser efetiva no contexto de transplantes, no entanto, como já mencionado, poucos são os estudos nesse contexto.

Mucosa intestinal e Microbiota

A mucosa intestinal é a maior porta de entrada de antígenos, sendo composta por uma rica diversidade de componetes do sistema imune. Na mucosa intestinal, está presente um tecido linfóide, o GALT (do inglês, *Gut Associated Lymphoid Tissue*) composto por tecidos linfóides especializados, como lâmina própria (LP), sítios

linfóides secundários que compreendem os linfonodos mestéricos (mLNs) (do inglês, *mesenteric lymph nodes*), a Placa de Peyer (PP), além de folículos linfóides isolados e a placa de cripitas ou “cryptopatches” (Hamada *et al.*, 2002).

Estamos expostos, diariamente, a uma infinidade de antígenos, derivados da dieta e da microbiota. A mucosa intestinal possui diferentes mecanismos de interação com esses estímulos, permitindo a manutenção da homeostase (Macdonald e Monteleone, 2005). O primeiro mecanismo é uma barreira física composta, na parte mais externa junto ao lúmen intestinal, pela microbiota que compete por espaço com os microrganismos potencialmente patogênicos, e há uma camada de muco produzido pelas células caliciformes, formando uma camada entre o lumen e o epitélio. Na camada do muco, encontram-se peptídeos antimicrobianos e anticorpos, em sua maioria IgA, que atuam na eliminação, bloqueio e sinalização de patógenos e, por último, a camada de células epiteliais (Macdonald e Monteleone, 2005).

Na camada epitelial, encontram-se as células M, que são especializadas no transporte de bactérias e antígenos do lúmen intestinal para o folículo associado ao epitélio (Owen, 1999). As células dendríticas e macrófagos residentes do GALT também têm a capacidade de passar entre as proteínas de junção, ou junções apertadas (do inglês, *tight junctions*) e transportar bactérias e antígenos do lúmen intestinal para o tecido linfoide, sem causar danos às células epiteliais, além de serem potentes células apresentadoras de antígenos (APCs) (Rescigno *et al.*, 2001).

O transporte, o processamento e apresentação de antígenos do lúmen intestinal para o tecido linfóide associado ao intestino, desencadeiam a ativação de células residentes que participam da organização de uma resposta imune, seja na eliminação de antígenos e patógenos, ativando células $TCD4^+$ $TCD8^+$, seja numa resposta de tolerância

a antígenos da dieta e ou à microbiota, induzindo células reguladoras e produção de citocinas imunorreguladoras (Stagg *et al.*, 2003). A tolerância periférica, principalmente a tolerância oral, está intimamente relacionada com a interação simbiótica da mucosa intestinal, e seus componentes imunológicos, com a microbiota intestinal (Weiner *et al.*, 2011).

A microbiota é um conjunto de microrganismos não patogênicos que possuem uma relação de simbiose com seu hospedeiro. Na mucosa intestinal, a microbiota está envolvida na manutenção da homeostase, evitando a colonização por microrganismos patogênicos, atuando no metabolismo de compostos químicos, produzindo nutrientes, ao mesmo tempo em que participa no desenvolvimento da arquitetura intestinal e interage com componentes do sistema imune na mucosa, promovendo a indução de um microambiente tolerogênico (Korecka e Arulampalam, 2012).

Tem sido relatado haver uma relação entre o repertório de microrganismos da microbiota intestinal e o estado de saúde ou doença do indivíduo, indicando que distúrbios da microbiota intestinal podem acarretar em quebra de equilíbrio no sistema imune e desencadear doenças inflamatórias do intestino (Round e Mazmanian, 2009). Ademais, a microbiota parece também ter importância na geração de células T reguladoras, uma vez que camundongos *germ-free*, desprovidos de microrganismos intestinais, apresentam menores números de células Treg $CD4^{+}Foxp3^{+}$ e menor produção de IL-10, em comparação com animais monocolonizados com a bactéria comensal *B. fraglis* (Round e Mazmanian, 2010). Isto indica que a presença de componentes da microbiota intestinal tem a capacidade de estimular ou induzir células T reguladoras.

Como a microbiota intestinal é composta por uma variedade de bactérias não patogênicas, o potencial dessas bactérias para aplicações terapêuticas tem sido alvo de muitos estudos. Um exemplo é o uso dos *Lactococcus lactis*, já descritos como vetores vivos para a entrega de genes, drogas terapêuticas e proteínas (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011).

Lactococcus Lactis

O *Lactococcus lactis* é uma bactéria ácido láctica (LAB, do inglês, *lactic acid bacteria*) gram-positiva, considerada segura (GRAS – Generally Recognized As Safe) (Adams e Marteau, 1995) e amplamente utilizada para a produção de alimentos fermentados.

Em estudos de engenharia genética com o *Lactococcus lactis*, foi possível promover a produção de diferentes proteínas, apontando um potencial terapêutico (Bermúdez-Humarán, 2009). Dentro desta visão, nossos colaboradores desenvolveram um sistema de indução de expressão de proteínas por *Lactococcus lactis* NCDO2118, utilizando-se um promotor ativado por xilose (Miyoshi et al., 2004), visando a aplicações terapêuticas.

Em estudos clínicos de fase I, utilizaram-se *Lactococcus lactis*, geneticamente modificados para produzir IL-10, e trataram pacientes com doença de Crohn, havendo melhora da doença, e apenas pequenos eventos adversos, indicando ser uma abordagem segura (Braat et al., 2006). Este estudo abriu novos horizontes para a utilização de bactérias geneticamente modificadas, como vetores vivos. Entretanto, ainda não está bem claro qual o destino específico das bactérias nas mucosas, após a sua administração por via oral. Também não está bem elucidado qual o impacto na

sobrevivência dessas bactérias, quais os estímulos imunorreguladores induzidos neste período de sobrevida, assim como, se a dosagem de bactérias administrada influencia na tolerância imunológica almejada, após a expressão de antígenos introduzidos.

A administração de moléculas terapêuticas por meio da mucosa, para a indução de tolerância imunológica, parece oferecer importantes vantagens, como a possibilidade de maior controle de eventuais efeitos colaterais dessas moléculas e, também, a possibilidade de modulação da resposta imune inflamatória, não apenas localmente nas mucosas, mas também sistematicamente (Bermúdez-Humarán, 2009). Neste contexto, a Hsp60 (do inglês, *Heat Shock Protein 60*) humana, por ser uma molécula que possui atividades tanto pró-inflamatória quanto imunorreguladora, é promissora candidata para indução de imunorregulação pela via oral.

Proteína de Choque Térmico

As proteínas de choque térmico, ou Hsps, pertencem a uma grande família de proteínas auxiliares, também chamadas de chaperonas, que se ligam e estabilizam proteínas em fase de síntese, quando instáveis, e auxiliam na sua estruturação, dobramento e transporte. Também são chamadas de proteínas de estresse pois protegem as células quando há um “estresse celular” como, por exemplo, altas temperaturas, desidratação e outros (Hendrick e Hartl, 1993). São proteínas altamente conservadas, evolutivamente, e também importantes nos processos iniciais de formação e manutenção de um organismo (Ritossa, 1964).

Além de atuar no auxílio e manutenção dos processos celulares, as Hsps são antígenos imunodominantes (Cohen e Young, 1991); participam tanto em respostas

imunes inflamatórias (Moseley, 1998), como em respostas imunorreguladoras (Coelho e Faria, 2011).

Quando há estresse celular como, por exemplo, uma infecção associada com dano celular, há liberação de componentes intracelulares e alguns desses componentes, incluindo as Hsps, podem atuar como padrões moleculares associados ao perigo, (DAMPs do inglês, *damage associated molecular patterns*), sinalizando que há algo de errado e promovendo respostas inflamatórias (Rubartelli e Lotze, 2007).

Tanto a Hsp60 quanto a Hsp70 humana podem se ligar, *in vitro*, ao CD14 nos monócitos, um co-receptor que atua, principalmente, em conjunto com TLR-4, no reconhecimento de LPS (do inglês, *Lipopolysaccharides*, lipopolissacarídeo de bactérias), levando a um aumento o fluxo de cálcio, ativando o fator de transcrição NF-κB que regula a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando, assim, a produção de TNF-α, IL-1β e IL-6 (Kol *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho, foi observado que, em cultura de macrófagos humanos e camundongos, estimulados com Hsp60 humana, há produção imediata de TNF-α (Asea *et al.*, 2000). Em outro trabalho, a Hsp60 humana também induziu a produção de IL-12 e IL-15, caracterizadas como citocinas de perfil Th1 (Chen *et al.*, 1999). Observou-se, também, que a estimulação, *in vitro*, de células dendríticas (DC) derivadas da medula de camundongos, com Hsp60, induz a maturação dessas células, além de induzir um perfil de resposta Th1 com produção de TNF- α, IL-12, and IL-1 β (Flohé *et al.*, 2003). No entanto, muito foi discutido sobre a contaminação das Hsps recombinantes com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), nos ensaios *in vitro*, uma vez que, mesmo em concentrações muito baixas, pode influenciar a produção de citocinas e atividade funcional das células

imunes (Henderson *et al.*, 2010). Assim, o efeito pró-inflamatório das Hsps induzidas *in vitro*, com proteínas recombinantes precisa ser considerado com reservas.

Por outro lado, as Hsps também podem exercer papel imunorregulador. A Hsp60 e seus peptídeos, por exemplo, têm sido usados em modelos experimentais para a indução de imunorregulação. Já foi observado que após a administração do peptídeo P-277 da região C-terminal da Hsp60, em modelo experimental de diabetes tipo 1, houve melhora da doença, com diminuição da hiperglicemia (Birk *et al.*, 1996). Mais recentemente, em ensaios clínicos de fase III, o peptídeo da região C-terminal da Hsp60 (Diapep 277) foi bem sucedido para tratar pacientes de diabetes tipo 1 autoimune, gerando grandes expectativas sobre o potencial imunorregulador de peptídeos da Hsp60 na clínica (Raz *et al.*, 2014). Em outro contexto de autoimunidade patológica, a administração de Hsp65 de micobactérias, em camundongos transgênicos deficientes de receptor de LDL (do inglês, *Low-density lipoprotein*, lipoproteína de baixa densidade) reduziu a inflamação associada à aterosclerose, com diminuição da placa aórtica e um menor número de células T CD4+ e macrófagos, assim como de IFN-γ, junto com aumento de IL-10, indicando efeito imunorregulador in vivo (Maron *et al.*, 2002).

Nosso grupo vem investigando a atividade imunorreguladora da Hsp60 e seus peptídeos. Há alguns anos, observamos resposta imune, tanto predominantemente imunorreguladora (REGULA) quanto pró-inflamatória (INFLAMA), dirigida a peptídeos de diferentes regiões da Hsp60, em três linhagens de camundongos, com produção de IFNγ e IL-10 (Luna *et al.*, 2007). Identificamos, também peptídeos da Hsp60 que induzem respostas imunes predominantemente imunorreguladoras, na interação com células mononucleares de sangue periférico humano (Martello, 2009)

esplenócitos murinos (Guembes, 2010) (esses trabalhos aguardam submissão de patente para publicação). Esses peptídeos são candidatos promissores para o uso terapêutico.

No contexto do transplante renal humano, nosso grupo observou um perfil funcional distinto da autorreatividade celular à Hsp60 humana, sendo a resposta proliferativa no período pré-transplante, predominantemente inflamatória, associada ao desenvolvimento de rejeição no período precoce (< 1 ano) do transplante e, um perfil predominantemente imunorregulador no período tardio (> 1 ano), associado à ausência de rejeição (Granja *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que as células autorreativas à Hsp60, no transplante humano, são células com atividade predominantemente pró-inflamatória, precocemente, mas que seu perfil funcional muda para um perfil imunorregulador em períodos tardios do transplante. Em outro trabalho, observamos um perfil da autorreatividade a peptídeos da Hsp60 de células mononucleares de sangue, predominantemente imunorregulador, com indução de IL-10, no período tardio do transplante renal, sugerindo que as células T autorreativas à Hsp60, neste contexto, são células com atividade imunorreguladora (Caldas *et al.*, 2004).

Em modelo de transplante de pele murino, com disparidade de antígenos secundários, observamos um aumento da sobrevida dos enxertos, após tratamento intranasal com um peptídeo de Hsp60 (P277) encapsulado (Luna *et al.*, 2007) apontando o potencial terapêutico de peptídeos da Hsp60 pela via das mucosas. Esses dados indicam que a Hsp60 e seus peptídeos têm um potencial terapêutico promissor. Entretanto, apesar do nosso grupo ter conseguido aumentar a sobrevida de aloenxertos de camundongos com a Hsp60, ainda não conseguimos induzir tolerância a aloenxertos nos nossos modelos experimentais. Foi observado, por outro grupo, que o pré-

tratamento com Hsp60, de camundongos submetidos a alotransplante de pele, induziu tolerância ao transplante de pele (Birk *et al.*, 1999), mas não foi reproduzido.

Recentemente, foi demonstrado que a combinação das propriedades anti-inflamatórias de bactérias láticas como o *Lactococcus lactis* e a administração oral de Hsp65 derivada de *Mycobacterium leprae* tem efeitos imunomoduladores em modelos experimentais de doenças autoimunes. A administração da bactéria recombinante, *Lactococcus lactis* produtora de Hsp65, resultou na prevenção da encefalomielite autoimune experimental (EAE) e esse efeito mostrou-se dependente de células T reguladoras CD4+LAP+ (Rezende *et al.*, 2013).

Em conjunto, estes estudos indicam que as Hsp60 e seus peptídeos têm um grande potencial para a indução de tolerância, promovendo a produção de citocinas com perfil predominantemente regulador, aumentando o potencial imunorregulador de células do sistema imune. Levantamos a hipótese de que, a combinação das atividades tolerogênicas da Hsp65, expressa por um probiótico (*Lactococcus lactis*) capaz de atuar como um adjuvante tolerôgenico na tolerância oral (Mercadante et al, 2014), a via oral de administração, e a prévia exposição oral a aloantígenos do doador, estimule sinergicamente, mecanismos imunorreguladores periféricos, diminuindo o processo inflamatório dirigido ao aloenxerto e aumente a sua sobrevida, ou mesmo induza tolerância.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Testar se as atividades imunológicas da Hsp65, em combinação com o probiótico *Lactococcus lactis* e a exposição a aloantígenos do doador, via mucosa oral, atuam sinergicamente, induzindo aumento da sobrevida do aloenxerto ou tolerância, no transplante de pele murino.

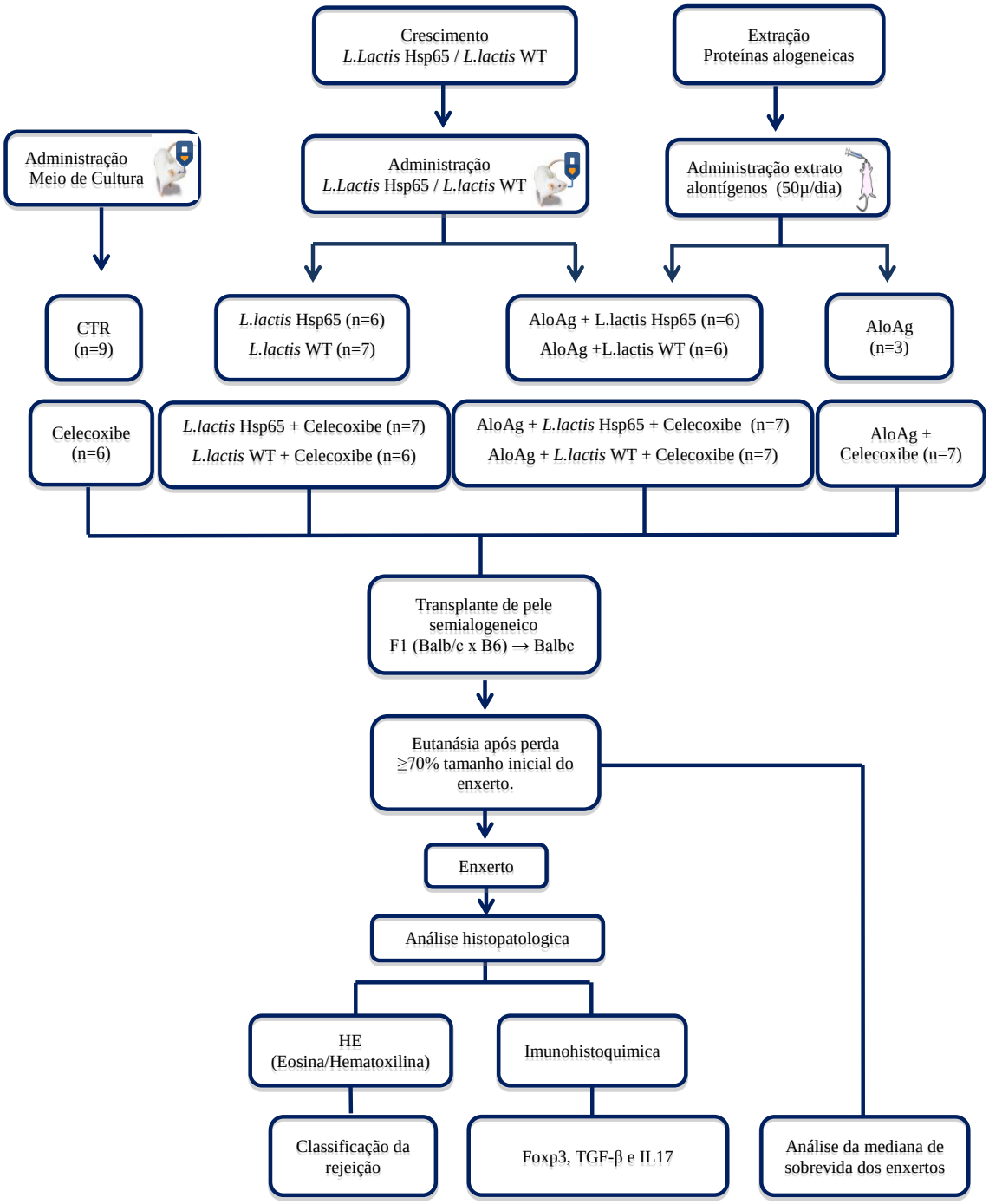
Objetivos Específicos

Testar se o uso de anti-inflamatório diminui o processo inflamatório inicial do transplante e favorece a evolução do aloenxerto, auxiliando a terapia combinada de probióticos e/ou aloantígenos.

Determinar potenciais mecanismos envolvidos, quando houver aumento na sobrevida do enxerto.

3. Métodos

3.1. Delineamento Experimental



3.2. Local de desenvolvimento

O presente trabalho teve a colaboração do grupo da Prof.ª Dra. Ana M. C. Faria da Universidade Federal de Minas Geral (UFMG) e integrante do Instituto de investigação em Imunologia iii-INCT. Em seu laboratório (Laboratório de Bioquímica e Imunologia) foram realizados todos os procedimentos experimentais, *in vivo*, do trabalho. Experimentos com material coletado, em formol, e análises, foram realizadas Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) LIM19.

3.3. Origem das cepas L.lactis WT e L.lactis Hsp65

As cepas utilizadas no presente trabalho foram cedidas pelo Prof. Dr. Anderson Miyoshi do Laboratório de Tecnologia Genética (TecnoGen) da UFMG, responsável pela confecção da cepa recombinante de *L.lactis* NCDO 2118 (de Azevedo, Rocha et al. 2012) que secreta Hsp65 de *M. leprae*, por meio de um plasmídeo que usa um sistema de indução de expressão por xilose (Figura 1A). A análise da produção de Hsp65 extracelular foi verificada (Figura 1B).

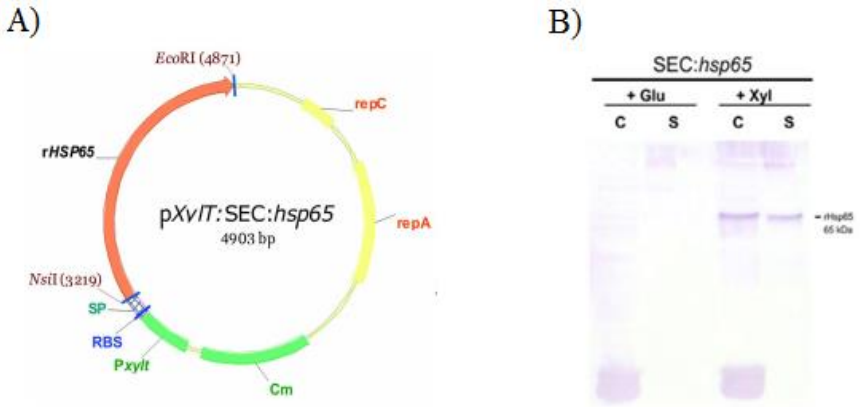


Figura 1. Representação esquemática do plamídeo que expressa Hsp65 e sua expressão. A) Plasmídeo com gene que expressa Hsp65 induzido por um promotor ativado por xilose. PxylT: promotor induzível por xilose; RBSUsp45= local de ligação ao ribossoma de Usp45; rHsp65= sequência recombinante da hsp65 de *Mycobacterium leprae*; Cm= resistência ao cloranfenicol; SP= sinal de peptídeo; repA e repC= origem da replicação; e EcoRI NsiI= enzimas de restrição. B) Produção de Hsp65 recombinante (rHsp65). Extrato de proteína não induzida (Glu) e induzido com xilose (Xyl) da cultura de *L.lactis* NCDO2118(SEC:hsp65 - expressão no sobrenadante) análise das bactérias (C) e do sobrenadante (S) na fase estacionária (OD.600 = 2.0) analisado por Western blotting usando-se um anticorpo anti-Hsp65 (De Azevedo *et al.*, 2012).

3.4. Condições de crescimento das bactérias

A cepa selvagem (*L.lactis* WT) e a cepa recombinante (*L.lactis* Hsp65) foram cultivadas em meio M17 (Difico) suplementado com glicose 0,5% ou 1% de xilose e 10mg/ml de cloranfenicol (Sigma), quando cultivada a cepa recombinante, em estufa, a 30 °C.

3.5. Produção dos *L.lactis* WT e *L.lactis* Hsp65, indução de expressão de Hsp65 por Xilose e administração

Ambas as cepas passaram por duas etapas de crescimento, sendo a primeira etapa comum ao *L.lactis* WT (selvagem) e ao *L.lactis* Hsp65 (recombinante). Nessa etapa, crescemos *L.lactis* WT e *L.lactis* Hsp65 em meio M17 caldo, suplementado 0,5% de glicose, durante 24h, em estufa a 30°C.

Na segunda etapa, para a cepa de *L.lactis* WT, repetimos o procedimento anterior, colocando o inóculo crescido em diluição de 1:10 no meio M17 caldo, suplementado com 0,5 % de glicose, por 18h em estufa a 30°C. Para a cepa de *L.lactis* Hsp65, induzimos a expressão e produção de Hsp65 de *M. leprae*, colocando a cepa crescida anteriormente, em uma diluição de 1:10 em meio M17 caldo, substituindo a glicose, por 1% de xilose, com cloranfenicol, à concentração de 10µg/ml, durante 18h, em estufa a 30°C.

No terceiro dia, após 18h em estufa, confirmamos a densidade óptica de 2.0 em espectrofotômetro (600nm) que corresponde a aproximadamente, 2,5 x 10^8 de bactérias, e administramos em quantidade de 5ml/animal em substituição à água.

3.6. Animais

Para os transplantes alogeneicos, utilizamos camundongos machos 6-8 semanas, F1 das linhagens (Balb/c x C57BL/6) como doadores e camundongos machos da linhagem Balb/c, como receptores. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade

Federal de Minas Gerais, mantidos em microisoladores estéreis e alimentados com ração e água autoclavadas. Todas as manipulações foram feitas em condições de esterilidade, em fluxo laminar, realizados de acordo com as normas de bioética aprovadas pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais protocolo nº 2017/2014 e, também, pela Comissão de Ética no uso de animais da FMUSP (CEUA/FMUSP) sob o protocolo nº.080/15.

3.7. Obtenção do extrato proteico de células alogeneicas

Para a produção do extrato de células alogeneicas, foram utilizados entre 15 a 20 C57BL/6 machos ou fêmeas. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e seus baços extraídos e dissociados, mecanicamente, em PBS (Phosphate-Buffered Saline - NaH2PO4 anidro 1,9mM; Na2HPO4 anidro 8,1mM; NaCl 154mM; pH 7,4) gelado, para obtenção das células alogeneicas. A suspensão celular foi passada em filtros com poros de 0,4µM e submetida ao processo de lise das hemácias, por osmose. No procedimento de lise das hemácias, foram adicionados 9 ml de água destilada 10^8 células e, logo em seguida, 1 ml de PBS10x. A suspensão de células foi, então, centrifugada a 450g por 5 minutos e, o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 2 ml de PBS gelado. A suspensão celular, livre de hemácias, foi submetida ao processo de lise celular total, que compreende de 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água fervente. Terminados os ciclos, a solução foi fervida por 15 minutos para inativação das proteases. Após a centrifugação do material lisado a 1000g por 30 minutos a 4°C, a fração solúvel foi obtida. A quantificação das proteínas totais [1mg/ml] foi realizada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.8. Transplante

O procedimento foi realizado em adaptação àquele descrito por Billingham e Medawar (Billingham e Medawar, 1953), em condições estéreis. Foram retirados fragmentos de pele com cerca de 1,3cm^2 da cauda de camundongos Balb/c, para os transplantes singeneicos e, para transplantes alogênicos, de camundongos F1 (Balb/c x C57BL/6). Estes fragmentos foram lavados em solução salina a 0,9%, sob assepsia, e os enxertos foram implantados no dorso de camundongos receptores Balbc/c, após a retirada de um fragmento de pele de tamanho similar ao do transplante. A região que recebeu o enxerto foi recoberta com papel celofane, curativo adesivo (*Band-aind*), e envolta em esparadrapo, sendo todos retirados após sete dias do transplante.

Em alguns grupos, foram administradas 6 doses alternadas de inibidor de Cox2 (Celecoxibe) via intraperitoneal. Como indicado abaixo, foram feitas observação e medição diárias do enxerto até o momento da rejeição, determinada pela perda de ≥70% da área do enxerto, associada à presença de um ou mais dos critérios macroscópicos, conforme descritos por nosso grupo (Marrero *et al.*, 2005).

3.9. Protocolo # 1: Administração oral de *L.lactis* Hsp65 e *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com ou sem celecoxibe.

Camundongos receptores de transplante receberam aproximadamente a quantidade de 5 ml/animal, *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT durante quatro dias, em substituição à água livremente. Após 10 dias da última administração dos lactococcus, foi realizado o transplante de pele alogeneico, como descrito no item 3.8. Dividimos em grupos que receberam seis doses de 30mg/Kg de Celecoxibe via intraperitoneal, em dias alternados a partir do dia zero, e grupos que receberam seis doses de salina 0,9%, via intraperitoneal a partir do dia (Figura 2).

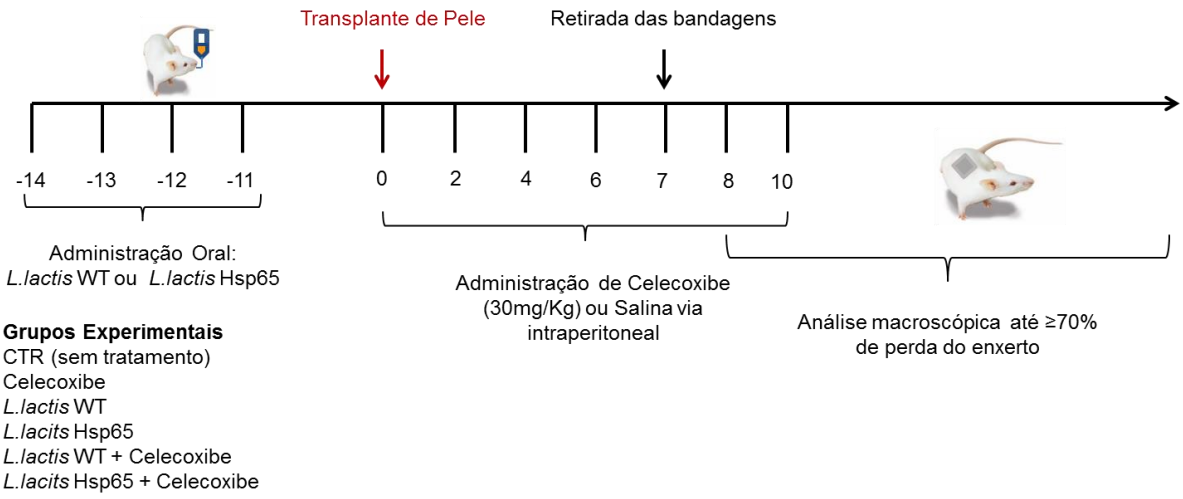


Figura 2. Protocolo # 1 - Administração oral de *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT com e sem inibidor de cox-2 (Celecoxibe). CTR: animais que receberam apenas meio de cultura; Celecoxibe: animais que receberam meio de cultura e Celcoxibe (30mg/Kg) via intraperitoneal; *L.lacits* Hsp65: animais que receberam *L.lactis* Hsp65, durante quatro dias em substituição à água; *L.lactis* WT: animais que receberam *L.lactis* WT, durante quatro dias em substituição à água; *L.lacits* Hsp65 + Celecoxibe: animais que receberam *L.lactis* Hsp65, durante quatro dias em substituição à água e celcoxibe (30mg/Kg) via intraperitoneal; *L.lactis* WT + Celecoxibe: animais que receberam *L.lactis* WT, durante quatro dias em substituição à água e Celcoxibe (30mg/Kg) via intraperitoneal. Após 10 dias do último dia de administração dos probióticos, os animais foram transplantados como descrito em Métodos no item 3.8. Todos os transplantes foram realizados de doares F1 (Balb/c x C57BL6) para receptores Balb/c. Após 7 dias, retiramos as bandagens e, a partir do 8º dia, a análise macroscópica foi iniciada até a rejeição do enxerto, determinada pela perda de $\geq$ 70% do tamanho inicial do enxerto no momento da primeira medição.

3.10. Protocolo # 2: Administração oral de aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe.

Camundongos receptores de transplante receberam 50µg de extrato de proteínas, que contém aloantígenos do doador, diluído em 100µl de PBS, via gavagem e, em substituição à água, foi oferecida a quantidade de 5 ml/animal de *L.lactis* Hsp65ou *L.lactis* WT, durante quatro dias. Após 10 dias da última administração dos aloantígenos e dos probióticos, foi realizado o transplante de pele semialogeneico como descrito anteriormente. Todos os animais receberam seis doses de 30 mg/kg de celecoxibe em dias alternados, a partir do dia do transplante (Figura 3).

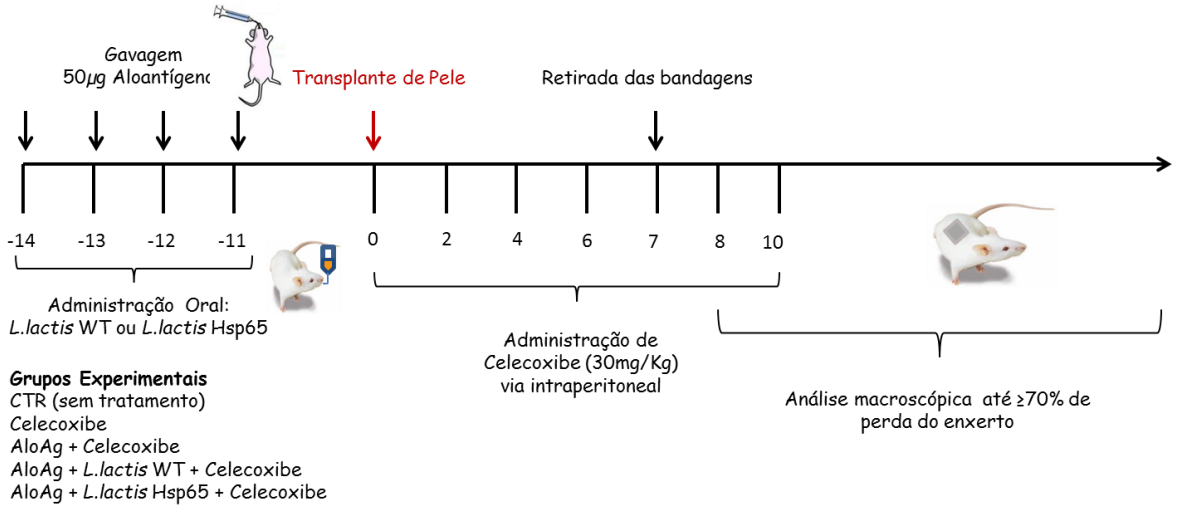


Figura 3. Protocolo # 2: Administração oral de aloantígenos e *L.lactis* HSP65 ou *L.lactis* WT com celecoxibe. CTR: animais que receberam apenas meio de cultura; Celecoxibe: animais que receberam meio de cultura e celecoxibe; AloAg + Celecoxibe: animais que receberam aloantígenos via gavagem e celecoxibe; AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe: animais que receberam *L.lactis* WT em substituição à água, aloantígenos via gavagem e celecoxibe, durante quatro dias; AloAg + *L.lacits* Hsp65 + Celecoxibe: animais que receberam *L.lactis* Hsp65 em substituição à água, aloantígenos via gavagem e celcoxibe, durante quatro dias. Após 10 dias do último dia de administração, os animais foram transplantados como descrito em Métodos no item 3.8. Todos os animais receberam enxertos de doadores F1 (Balb/c x C57BL6) e seis doses alternadas de Celcoxibe (30mg/Kg) via intraperitoneal a partir do dia do transplante. Após dia 7, retiramos as bandagens e, a partir do 8º dia, a análise macroscópica foi iniciada até a rejeição do enxerto, determinada pela perda de ≥ 70% do tamanho inicial do enxerto no momento da primeira medição dos enxertos.

3.11. Protocolo # 3: Administração oral com aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico.

Camundongos receptores de transplante receberam 50µg de extrato de proteínas, que contém aloantígenos do doador, diluído em 100µl de PBS, via gavagem e, em substituição à água, foi oferecida a quantidade de 5 ml/animal, *L.lactis* Hsp65ou *L.lactis* WT durante quatro dias (Figura 4). Após 10 dias da última administração dos aloantígenos e dos lactococcus foi realizado o transplante de pele semialogeneico como descrito anteriormente.

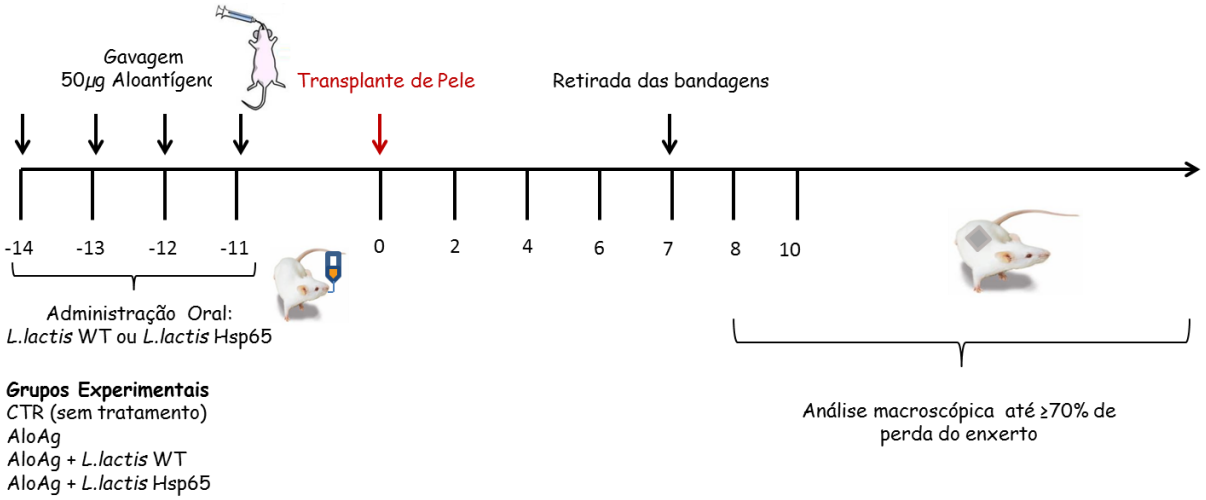


Figura 4. Protocolo # 3 – Administração oral de aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis WT*. CTR: animais que receberam apenas meio de cultura; AloAg: animais que receberam aloantígenos via gavagem; AloAg + *L.lactis* WT: animais que receberam *L.lactis* WT em substituição à água, e aloantígenos via gavagem, durante quatro dias; AloAg + *L.lacits* Hsp65: animais que receberam *L.lactis* Hsp65 em substituição à água, aloantígenos via gavagem, durante quatro dias. Após 10 dias da última administração, os animais foram transplantados como descrito em Métodos no item 3.8. Todos os animais receberam enxertos de doadores F1 (Balb/c x C57BL6). No dia 7, retiramos as bandagens e, a partir do 8º dia, a análise macroscópica foi iniciada até a rejeição do enxerto, determinada pela perda de ≥ 70% do tamanho inicial do enxerto no momento da primeira medição.

3.12. Grupos experimentais

Tabela 1. Grupos Experimentais, número de animais e tratamentos.

Grupos	n	Transplantes	Celecoxibe	*L.lactis* WT	*L.lactis* Hsp65	Aloantígenos
Singeneico	4	Sing	-	-	-	-
CTR	9	Alo	-	-	-	-
Celecoxibe	6	Alo	+	-	-	-
L.lactis WT	7	Alo	-	+	-	-
L.lactis WT + Celecoxibe	6	Alo	+	+	-	-
L.lactis Hsp65	6	Alo	-	-	+	-
L.lactis Hsp65 + Celecoxibe	7	Alo	+	-	+	-
AloAg	3	Alo	-	-	-	+
AloAg + Celecoxibe	7	Alo	+	-	-	+
AloAg + *L.lactis* WT	6	Alo	-	+	-	+
AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe	7	Alo	+	+	-	+
AloAg + *L.lactis* Hsp65	6	Alo	-	-	+	+
AloAg + *L.lactis* Hsp65 + Celecoxibe	7	Alo	+	-	+	+

Sing: transplante singeneico, doador Balb/c e receptor Balb/c; Alo: transplante aloegeneico, doador F1 (Balb/c x C57BL6) e receptor Balb/c; CTR: Controle, transplante alogeneico sem tratamento; AloAg: Aloantígenos.

3.13. Análise macroscópica do enxerto

O enxerto foi avaliado, macroscopicamente, de acordo com os seguintes critérios: (i) Tamanho do enxerto, (ii) mudanças na pigmentação, (iii) aspectos da superfície do enxerto, (iv) aumento da espessura, (v) consistência, (vi) grau de desidratação, (vii) formação de crostas, presença de pelos e (viii) sulcos e formação de cicatriz. As medidas do tamanho do enxerto foram feitas com régua considerando comprimento e a altura. O enxerto foi considerado como rejeitado quando ocorreu perda ≥ 70% do tamanho inicial, associada à presença de um ou mais dos critérios macroscópicos, conforme descritos por nosso grupo (Marrero *et al.*, 2005).

3.14. Eutanásia

Os camundongos submetidos ao transplante foram eutanasiados, após o momento que foi observada perda de ≥ 70% do tamanho inicial do enxerto associada à presença de um ou mais dos critérios macroscópicos. Foi administrado anestésico (Xilasina 0,2% + Ketamina 0,5% diluído em solução fisiológica 0,9%) pela via intraperitoneal após a ausência de sinais, o enxerto foi retirado e acondicionado em formol tamponado 10%, para posteriores análises.

3.15. Análise Histolopatológica

Após determinada a rejeição, os fragmentos dos enxertos foram retirados e, imediatamente fixados em formal tamponado 10% . A seguir, cada fragmento foi imerso em parafina, cortado com 4μ de espessura, corado com hematoxilina-eosina e analisado por microscopia óptica pelo patologista do Departamento de Patologia do Instituto de Coração, FMUSP, quanto à avaliação de rejeição e critérios histopatológicos (Marrero *et al.*, 2005). Cada enxerto foi classificado como:

a) Não rejeição: Ausência de infiltrado inflamatório ou discreto infiltrado, preservação dos folículos pilosos, epiderme e derme com espessura normal, sem evidência de necrose ou fibrose.

b) Rejeição aguda: Proeminente infiltrado inflamatório linfocitário ou misto, com nítida agressão da epiderme e folículos pilosos, necrose de epiderme e folículos pilosos.

c) Rejeição leve: Infiltrado inflamatório discreto, com agressão discreta e focal da camada basal da epiderme e folículos pilosos.

d) Rejeição crônica: Infiltrado inflamatório mononuclear muito discreto, ausência de necrose, fibrose da derme com desaparecimento dos folículos pilosos.

O infiltrado inflamatório foi analisado semi-quantitativamente e o infiltrado inflamatório qualificado em polimorfonucleares ou mononucleares. Medimos a extensão da pele coberta pelo epitélio do tipo doador na maior secção histológica (H & E), com o auxílio de um sistema informatizado de análise de imagem (AxioVision, Zeiss).

3.16. Imunohistoquímica

Os procedimentos de preparo do tecido transplantado e marcação para Foxp3 (Abcam) foram realizados pela empresa Histocell, São Paulo, e Laboratório de Bioquímica e Imunologiae imunopatologia do ICB-UFMG para marcação de IL-17 (BD Pharmingen) e TGF-β (Santa Cruz Biotechnology).

Para as análises de Foxp3, foram feitas em aumento de 400X (mínimo 5 campos). O infiltrado celular foi analisado semi-quantitativamente e classificado em:

1. negativas/raras: não têm células positivas ou são escassas (< de 5 células em todos os campos)

2. +: aproximadamente 30 % ou menos das células positivas
3. ++: coloração positiva de 30 a 50% das células
4. +++: coloração positiva de > 50 a 70 % das células
5. ++++: > 70 % das células positivas

Para as citocinas IL-17 (BD Pharmingen) e TGF-β (Santa Cruz Biotechnology), secções de 4 mm foram cortadas de um bloco representante para cada caso e recolhidos em lâminas revestidas com gelatina. As lâminas foram desparafinadas e reidratadas numa série de álcoois. A peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em peróxido de hidrogénio a 3%. Secções de tecido foram desparafinadas submetida a calor induzido por recuperação de antigénica (banho de água a 98 ° C) com uma solução de recuperação de antigénica (DAKO, SA, Dinamarca, pH 6,0). Em seguida, as lâminas foram incubadas a 4 ° C durante a noite com um anticorpo policlonal IgG de coelho anti TGF-β (1:50, Santa Cruz Biotechnology) ou purificado de rato anti-IL-17 (1:50, BD Pharmingen), seguido pelo anticorpo secundário Histofine Simple Stain MAX PO-Nochirei Biosciences, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram corados com o cromógeno tetrahidrocloreto 3,3-diaminobenzidina (DAB Substrato Sistema, Lab Vision), incubadas por 1 minutos e contrastadas com hematoxilina de Mayer.

3.17. Análise estatística

A análise estatística da sobrevida dos enxertos foi feita pelo método descrito por de Kaplan e P. Meier (E. L. Kaplan, 1958). Construímos uma curva de sobrevida do enxerto em função da mediana de tempo de perda para cada grupo. A significância entre os grupos foi determinada usando o método de LogRank (Peto *et al.*, 1976). Para as comparações das análises de IHQ usamos teste t.

4. Resultados

Para avaliar os efeitos imunorreguladores da Hsp65 e dos probiótiocos *L.lactis*, usando diferentes protocolos na indução de tolerância oral, analisamos a sobrevida de aloenxertos de pele em camundongos transplantados (Figura 5). Consideramos os experimentos válidos, quando os animais controles singeneicos (Figura 5 A) tiveram seus enxertos fixados.

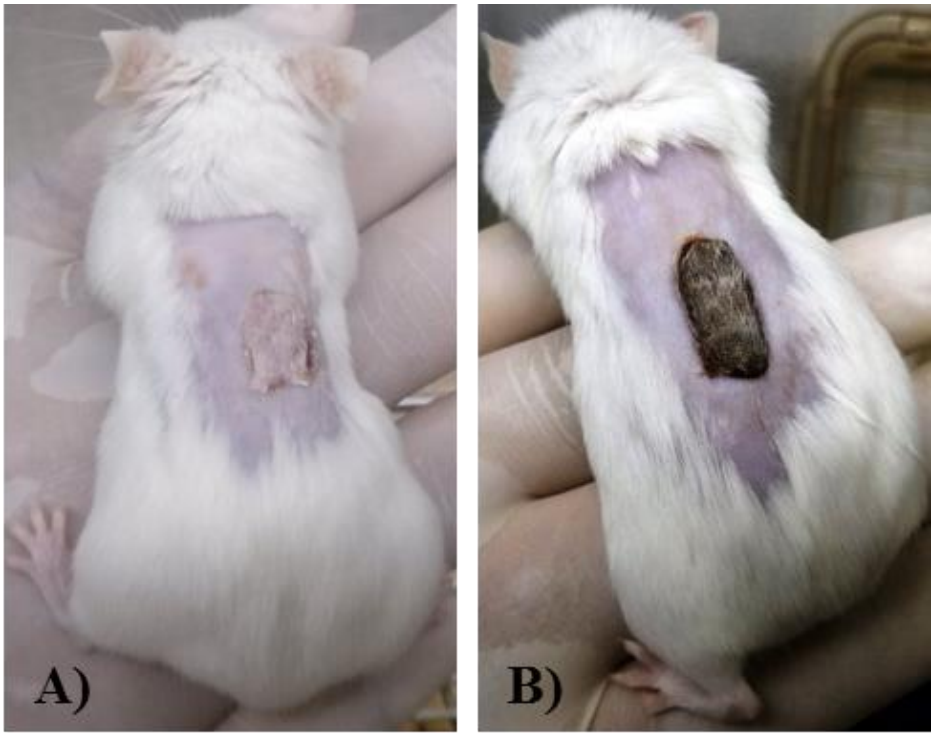
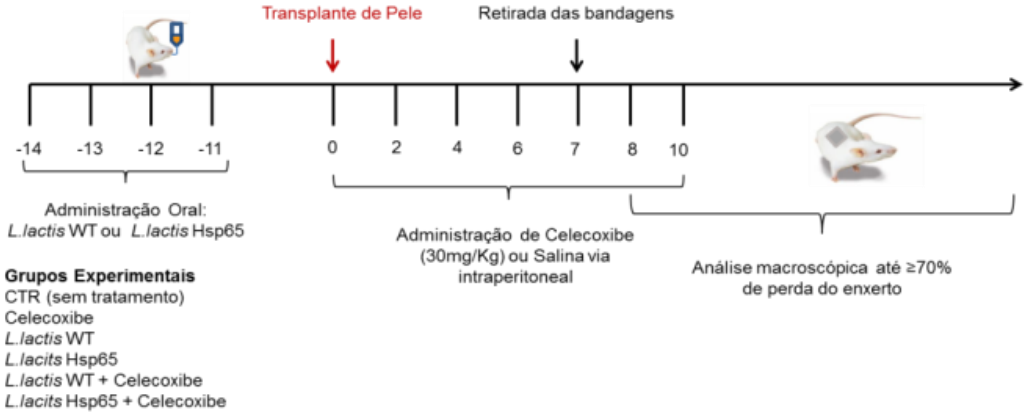


Figura 5. Figuras representativas dos transplantes de pele singeneico e semialogeneico. A) Enxerto de pele de camundongo doador Balb/c em camundongo receptor Balb/c, 8 dias pós transplante. B) Enxerto de pele de camundongo doador F1(C57BL/6 xBalb/c) em camundongo receptor Balb/c, 10 dias pós transplante.

4.1. Protocolo # 1: Administração oral *L.lactis* Hsp65 e *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com ou sem celecoxibe.



As análises macroscópicas dos enxertos dos animais, no protocolo #1, foram semelhantes (Tabela 2) em, praticamente, todos os tempos em todos os grupos, com exceção dos animais com transplante singeneicos que apresentaram boa fixação com crescimento de pelos e coloração roseada (Figura 5 A).

Tabela 2. Análise macroscópica dos aloenxertos de pele. Protocolo #1 administração de *L.lactis* Hsp65, *L.lactis* Selvagem com e sem celecoxibe.

	CTR (n=9)	L.Lactis Selvagem (n=7)	L.Lactis HSP65 (n=6)	Celecoxibe (n=6)	L.Lactis Selvagem + Celecoxibe (n=6)	L.Lactis HSP65 + Celecoxibe (n=7)
pigmentação	1 (3/9); 2 (6/9)	1 (5/7); 2 (2/7)	1 (4/6); 2 (2/6)	1 (3/6); 2 (3/6)	1 (4/6); 2 (2/6)	1 (3/7); 2 (4/7)
superfície	1 (9/9)	1 (7/7)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (6/6)	1(7/7)
espessura	1 (6/9); 2 (3/9)	1 (6/7); 2 (1/7)	1 (5/6); 2 (1/6)	1 (3/6); 2 (3/6)	1 (6/6)	1 (4/7); 2 (3/7)
consistência	1 (9/9)	1 (7/7)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (7/7)
grau de desidratação	1 (8/9); 2 (1/9)	1 (7/7)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (7/7)
crostas e pelos	1 (9/9)	1 (7/7)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (7/7)
sulcos e cicatriz	1 (9/9)	1 (7/7)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (6/6)	1 (7/7)

Grupos: Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante alogenico; *L.lactis* Selvagem, animais que receberam *L.lactis* Selvagem via oral; *L.lactis* Hsp65, animais que receberam *L.lactis* Hsp65 via oral; Celecoxibe, animais que receberam apenas celecoxibe via i.p. ; *L.lactis* Selvagem + celecoxibe, animais que receberam *L.lactis* Selvagem via oral e celecoxibe i.p.; *L.lactis* Hsp65, animais que receberam *L.lactis* Hsp65 via oral e clecoxibe i.p. Pigmentação: - 1 normal, 2 escuro, 3 branca, 4 amarela; Superfície: 1 normal, 2 enrugada, 3 lisa brilhante; Espessura: 1 normal, 2 aumentada; Consistência: 1 normal; 2 duro; Desidratação Edema: 1 ñ apresente; 2 apresente; Crostas e Pelos: ñ apresenta; 2 apresenta; Sulcos e cicatriz: 1 ñ apresenta; 2 apresenta.

Previamente ao início dos protocolos, determinamos a melhor dose de inibidor de Cox-2 que utilizamos em alguns grupos de transplante. A partir da análise da sobrevida, optamos pelo uso da dose de 30mg/Kg, por mostrar maior mediana de sobrevida do enxerto.

Tabela 3. Análise individual do tempo de sobrevida Protocolo # 1

	CTR (n=9)		***L.lactis* WT (n=7)**		***L.lactis* Hsp65 (n=6)**		**Celecoxibe (n=6)**		***L.lactis* WT + Celecoxibe (n=6)**		***L.lactis* Hsp65+ Celecoxibe (n=7)**	
	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição
	1	10	1	11	1	10	1	13	1	10	1	13
	2	11	2	12	2	11	2	13	2	11	2	14
	3	11	3	12	3	11	3	14	3	13	3	14
	4	13	4	14	4	13	4	14	4	14	4	14
	5	14	5	14	5	14	5	8	5	14	5	14
	6	12	6	14	6	14	6	12	6	14	6	14
	7	12	7	22	....	....	....	....	....	....	7	14
	8	15	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
	9	18	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
Média		12,9		14,1		12,2		12,3		13		14
Desv. Padrão		2,5		3,7		1,7		2,3		1,8		0,4
Mediana		**12**		**14**		**12**		**13**		**13,5**		**14**
Inter. Conf.		1,6		2,7		1,4		1,8		1,4		0,3

Tempo de sobrevida individual do Protocolo # 1. Todos os transplantes foram realizados com aloenxertos de pele de doadores F1 (C57BL/6 x Balb/c) em animais receptores Balb/c, após protocolo # 1 descrito em métodos. Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante alogenico; *L.lacits* Hsp65: animais que receberam apenas *L.lactis* Hsp65 durante quatro dias em substituição à água; *L.lactis* WT: animais que receberam apenas *L.lactis* WT durante quatro dias em substituição à água; Celecoxibe: animais que receberam apenas meio de cultura em substituição à água, e 30mg/Kg de celcoxibe via intraperitoneal; *L.lacits* Hsp65 + Celecoxibe: animais que receberam *L.lactis* Hsp65 durante quatro dias em substituição à água e 30mg/Kg de Celcoxibe via intraperitoneal; *L.lactis* WT + Celecoxibe animais que receberam *L.lactis* WT durante quatro dias em substituição à água e 30mg/Kg de Celcoxibe via intraperitoneal.

Não conseguimos induzir tolerância, nem mesmo aumento de sobrevida nos tratamentos do protocolo # 1 (Figura 6). A administração de lactococcus que expressa Hsp65 não influenciou na sobrevida dos aloenxertos em comparação com o grupo não tratado (p=0,5). Nem mesmo quando comparamos o grupo que recebeu anti-inflamatório e *L.lactis* Hsp65 (*L.lactis* Hsp65+Celecoxibe) com o grupo não tratado, observamos diferenças significativas (p=0,3). Os tempos de sobrevida e, as medianas, individuais podem ser observadas na Tabela 3.

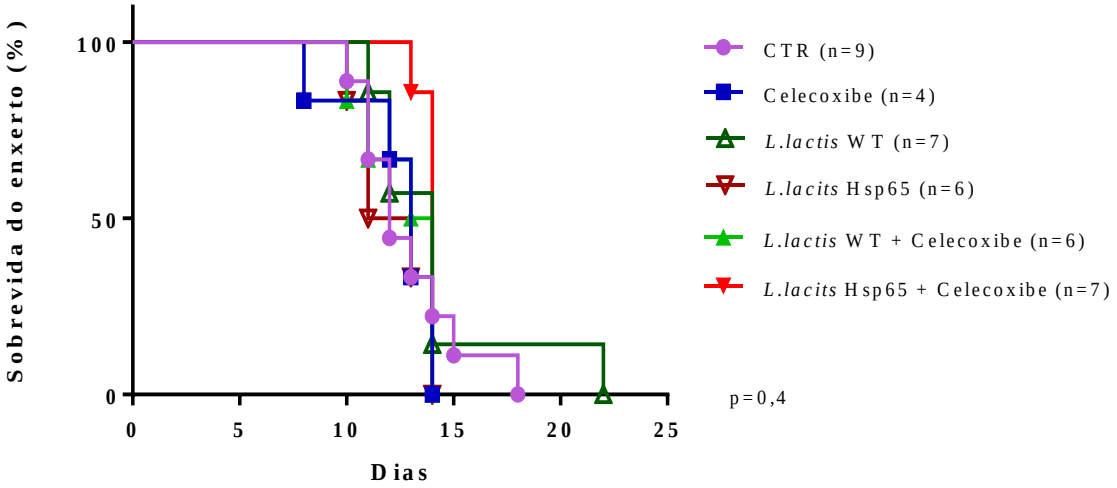


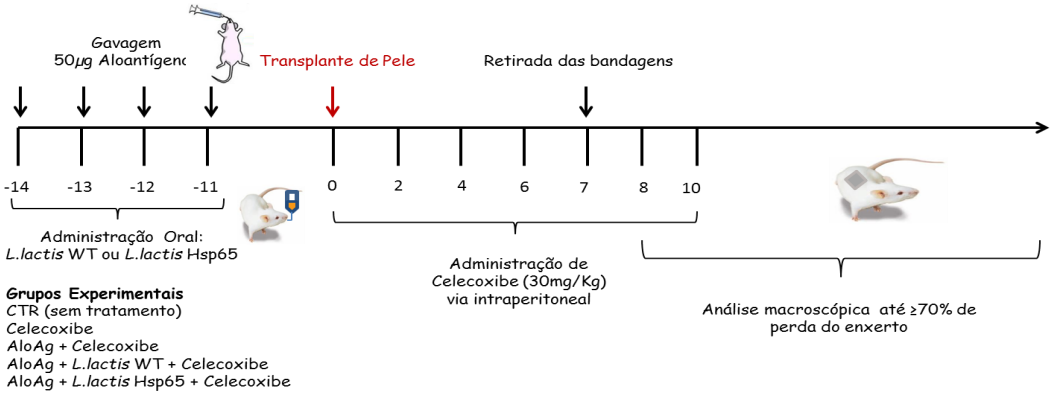
Figura 6. Curva de sobrevida Protocolo # 1 Administração oral *L.lactis* Hsp65 e *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com ou sem celecoxibe. Análise dos tempos de sobrevida dos transplantes de pele semialogeneico. Todos os transplantes de pele foram realizados com enxertos de doadores de pele da cauda de F1 (C57BL/6 x Balb/c) no dorso de receptores Balb/c. Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante alogenico; *L.lacits* Hsp65: animais que receberam apenas *L.lactis* Hsp65 durante quatro dias em substituição à água; *L.lactis* WT: animais que receberam apenas *L.lactis* WT durante quatro dias em substituição à água; Celecoxibe: animais que receberam apenas meio de cultura em substituição à água, e 30mg/Kg de celcoxibe via intraperitoneal; *L.lacits* Hsp65 + Celecoxibe: animais que receberam *L.lactis* Hsp65 durante quatro dias, em substituição à água e 30mg/Kg de Celcoxibe via intraperitoneal; *L.lactis* WT + Celecoxibe animais que receberam *L.lactis* WT durante quatro dias em substituição à água e 30mg/Kg de Celcoxibe via intraperitoneal. Análise estatística - Log-rank (Mantel-Cox) considerando-se diferença significativa p<0,05.

Também não observamos diferenças quando comparamos as medianas de sobrevidas (Tabela 2) dos grupos tratados com os *Lactococcus selvagem* (*L.lactis* WT) com o grupo não tratado (p=0,3). Também não houve diferenças significativas quando comparamos o grupo que recebeu anti-inflamatório e *L.lactis* selvagem (*L.lactis* WT+Celecoxibe) com o grupo não tratado (p=0,8).

4.2. Protocolo # 2: Administração oral com aloantígenos do doador e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe.

Para observar o impacto da adição de aloantígenos ao protocolo de indução de tolerância oral, combinamos a administração de aloantígenos do doador com *L. lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT com a administração intraperitoneal de 30mg/kg de celecoxibe. Analisamos as características macroscópicas e a sobrevida de aloenxertos de pele após

transplante de pele semialogeneico, como descrito. Determinamos a sobrevida dos enxertos por análise macroscópica, e a perda total ou até ≥ 70% do tamanho inicial.



As análises macroscópicas no protocolo #2 dos enxertos dos animais foram semelhantes (Tabela 5) em, praticamente, todos os tempos em todos os grupos, com exceção dos animais com transplante singeneicos, que apresentaram boa fixação com crescimento de pelos e coloração roseada (Figura 5A).

Tabela 4. Análise Macroscópica de aloenxertos de pele. Protocolo #2 administração de aloantígenos do doador e *L.lactis* Hsp ou *L.lactis* Selvagem com celecoxibe.

	Celecoxibe (n=6)	AloAg + Celecoxibe (n=7)	AloAg + L.Lactis Selvagem + Celecoxibe (n=7)	AloAg + L.Lactis HSP65 + Celecoxibe (n=7)
pigmentação	1 (3/6); 2 (3/6)	2 (4/6); 2 (2/6)	2 (3/6); 2 (3/6)	1 (3/7); 2 (4/7)
superfície	1 (6/6)	1 (7/7)	1 (7/7)	1 (7/7)
espessura	1 (3/6); 2 (3/6)	1 (5/7); 2 (2/7)	1(4/7); 2 (3/7)	1 (4/7); 2 (3/7)
consistência	1 (6/6)	1 (7/7)	1 (7/7)	1 (7/7)
desidratação	1 (6/6)	1 (7/7)	1 (7/7)	1 (7/7)
crostas e pelos	1 (6/6)	1 (7/7)	1 (7/7)	1 (7/7)
sulcos e cicatriz	1 (6/6)	1 (7/7)	1 (7/7)	1 (7/7)

Grupos: Celecoxibe- animais que receberam apenas celecoxive i.p.; AloAg: aloantígenos, animais que receberam aloantígenos via oral e celecoxibe; AloAg+*L.lactis* Selvagem: animais que receberam aloantigenos e *L.lactis* Selvagem via oral e celecoxibe i.p.; AloAg+*L.lactis* Hsp65: animais que receberam aloantigenos e *L.lactis* Hsp65 via oral e clecoxibe i.p.. Pigmentação: - 1 normal, 2 escuro, 3 branca, 4 amarela; Superfície: 1 normal, 2 enrugada, 3 lisa brilhante; Espessura: 1 normal, 2 aumentada; Consistência: 1 normal; 2 duro; Desidratação: 1 ñ apresente; 2 apresente; Crostas e pelos: ñ apresenta; 2 apresenta; Sulcos e cicatriz: 1 ñ apresenta; 2 apresenta.

Apesar de não termos conseguido induzir tolerância, observamos diferenças significativas na análise de sobrevida do protocolo #2 do enxerto, onde administramos de

aloantígenos, pro-biótiocos e anti-inflamatório (p=0,005) (Figura 8). Os tempos de sobrevida e, as medianas, individuais podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5. Análise individual do tempo de sobrevida. Protocolo # 2 administração oral com aloantígenos do doador e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe.

	CTR (n=9)		**Celecoxibe (n=7)**		**AloAg + Celecoxibe (n=7)**		**AloAg + *L.lactis* WT+ Celecoxibe (n=7)**		**AloAg + *L.lactis* Hsp65+ Celecoxibe (n=7)**	
	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição
	1	10	1	13	1	10	1	14	1	8
	2	11	2	13	2	13	2	18	2	8
	3	11	3	14	3	13	3	19	3	9
	4	13	4	14	4	19	4	23	4	19
	5	14	5	8	5	14	5	21	5	15
	6	12	6	12	6	15	6	21	6	21
	7	12	....	....	7	15	7	21	7	22
	8	15	....	....	....	....	....	....	....	....
	9	18	....	....	....	....	....	....	....	....
Média		12,9		12,3		14,1		19,6		14,6
Desv. Padrão		2,5		2,3		2,7		2,9		6,2
Mediana		**12**		**13**		**14**		**21**		**15**

Todos os transplantes foram realizados com aloenxertos de pele de doadores F1 (C57BL/6 x Balb/c) em animais receptores Balb/c, após protocolo # 2 descrito em métodos. Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante alogenico; Celecoxibe: animais que receberam apenas meio de cultura em substituição à água, e 30mg/Kg de celcoxibe via intraperitoneal; AloAg + *L.lacits* Hsp65 + Celecoxibe: animais que receberam aloantígenos, via gavagem, *L.lactis* Hsp65, em substituição à água, durante quatro dias e 30mg/Kg de Celcoxibe via intraperitoneal; AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe animais que receberam aloantígenos, via gavagem, *L.lactis* WT durante quatro dias em substituição à água e 30mg/Kg de Celcoxibe via intraperitoneal.

Entretanto, a administração de aloantígenos associada ao lactococcus que expressa Hsp65 junto com anti-inflamatório, não influenciou na sobrevida dos aloenxertos em comparação com o grupo não tratado (p=0,1).

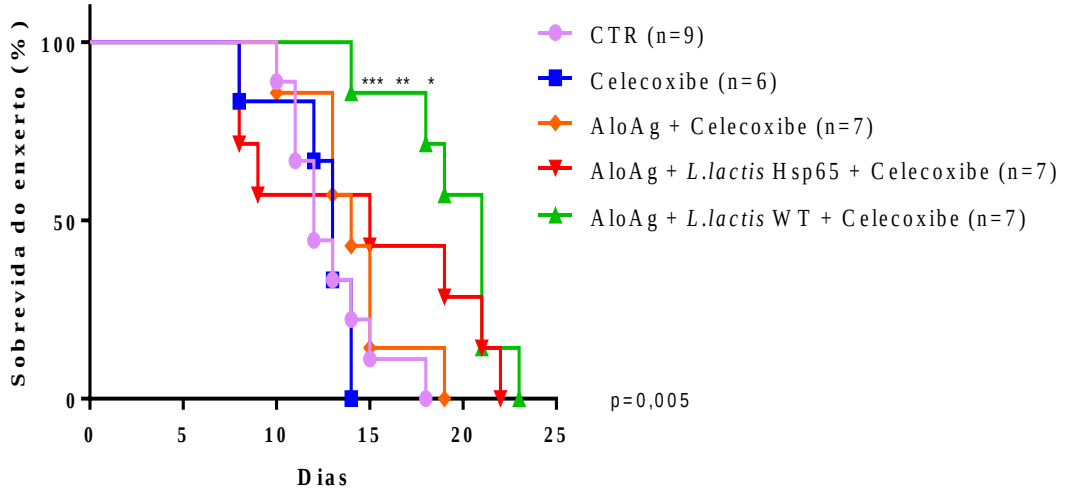


Figura 7. Curva de sobrevida Protocolo # 2 Administração oral com aloantígenos e *L.lactis* HSP65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico com celecoxibe. Análise dos tempos de sobrevida dos transplantes de pele semialogeneico. Todos os transplantes de pele foram realizados a partir de doadores de pele de cauda F1 (C57BL/6 x Balb/c) em receptores no dorso Balb/c. Com exceção do grupo não tratado todos os animais receberam 6 doses alternadas de celcoxibe 30mg/Kg a partir do dia 0 do transplante. Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante aloegenico; Celecoxibe: animais que receberam meio de cultura em substituição à água, e 30mg/Kg de celecoxibe via intraperitoneal; AloAg: animais que receberam meio de cultura e aloantígenos via gavagem durante quatro dias; AloAg+ *L.lacits* Hsp65 + Celecoxibe: animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* Hsp65, em substituição à água, durante quatro dias; AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* WT, em substituição à água, durante quatro dias. Análise estatística - Log-rank (Mantel-Cox) considerando-se diferença significativa $p<0,05$. CTR x AloAg + *L.lactis* WT *** p=0,0008; Celecoxibe x AloAg + *L.lactis* WT * p=0,04; AloAg + Celcoxibe x AloAg + *L.lactis* WT **p=0,006.

Nossas análises da mediana de sobrevida do enxerto, do grupo que recebeu aloantígenos em combinação com *L.lactis* WT mais a administração de celecoxibe (AloAg + L.lactis WT + Celecoxibe, mediana se sobrevida 21 dias), mostraram maior sobrevida do enxerto em comparação com o grupo não tratado (CTR, mediana de sobrevida 12 dias) (p=0,008) (Figura 8). Também observamos diferenças significativas quando comparamos a sobrevida desse mesmo grupo (AloAg + L.lactis WT + Celecoxibe, mediana de sobrevida de 21 dias) com aquele que recebeu apenas Celecoxibe (mediana de sobrevida 13 dias) p=0,04 e, com aquele grupo que recebeu aloantígenos e anti-inflamatório (AloAg + Celcoxibe, mediana de sobrevida 14 dias) p=0,006 (Figura 8).

4.3. Protocolo # 3: Administração oral com aloantígenos do doador e *L.lactis* Hps65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico.

Neste protocolo, observamos o impacto da adição de aloantígenos no protocolo de indução de tolerância oral, combinado a administração de aloantígenos com *L. lactis* Hsp65 ou *L.lactis* WT, na ausência do inibidor de celecoxibe. Para tanto, analisamos as características macroscópicas e a sobrevida de aloenxertos de pele após transplante de pele semialogeneico. Determinamos a sobrevida dos enxertos por análise macroscópica, e a perda total ou até ≥ 70% do tamanho inicial.

Tabela 6. Análise macroscópica de aloenxertos de pele. Protocolo #3 administração de aloantígenos e *L.lactis* Hsp65 ou *L.lactis* Selvagem.

	CTR (n=9)	AloAg (n=3)	AloAg + L.Lactis Selvagem (n=6)	AloAg + L.Lactis HSP65 (n=6)
pigmentação	1 (3/9); 2 (6/9)	2 (3/3)	2 (4/7); 2 (3/7)	1 (3/7); 2 (4/7)
superfície	1 (9/9)	1 (3/3)	1 (7/7)	1 (7/7)
espessura	1 (6/9); 2 (3/9)	1 (3/3)	2 (4/7); 2 (3/7)	1 (4/7); 2 (3/7)
consistência	1 (9/9)	2(2/3)	1 (7/7)	1 (7/7)
desidratação	1 (8/9); 2 (1/9)	1 (3/3)	1 (7/7)	1 (7/7)
crostas e pelos	1 (9/9)	1 (3/3)	1 (7/7)	1 (7/7)
sulcos e cicatriz	1 (9/9)	1 (3/3)	1 (7/7)	1 (7/7)

Grupos: Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante aloegenico; AloAg: aloantígenos, animais que receberam aloantígenos via oral; AloAg+*L.lactis* Selvagem: animais que receberam aloantigenos e *L.lactis* Selvagem via oral; AloAg+*L.lactis* Hsp65: animais que receberam aloantigenos e *L.lactis* Hsp65 via oral. Pigmentação: - 1 normal, 2 escuro, 3 branca, 4 amarela; Superfície: 1 normal, 2 enrugada, 3 lisa brilhante; Espessura: 1 normal, 2 aumentada; Consistência: 1 normal; 2 duro; Desidratação: 1 ñ apresente; 2 apresente; Crostas, presença de pelos: ñ apresenta; 2 apresenta; Sulcos e cicatriz: 1 ñ apresenta; 2 apresenta.

As análises macroscópicas dos enxertos dos animais, no protocolo #3, foram semelhantes (Tabela 7) em, praticamente, todos os tempos em todos os grupos, com exceção dos animais com transplante singeneico, que apresentaram boa fixação com crescimento de pelos e coloração roseada (Figura 5A).

A análise global do protocolo #3 mostrou que não houve diferença significativa das sobrevidas dos enxertos (p=0,05) (Figura 9). Os tempos de sobrevida e as medianas individuais podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7. Análise individual do tempo de sobrevida Protocolo # 3 administração oral com aloantígenos do doador e *L.lactis* HSP65 ou *L.lactis* WT: transplante de pele semialogeneico

	CTR (n=9)		**AloAg (n=3)**		**AloAg + *L.lactis* WT (n=6)**		**AloAg + *L.lactis* Hsp65 (n=6)**	
	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição	Animal nº	Dia da Rejeição
	1	10	1	9	1	11	1	10
	2	11	2	20	2	15	2	11
	3	11	3	22	3	15	3	12
	4	13	....	....	4	21	4	15
	5	14	....	....	5	21	5	16
	6	12	....	....	6	21	6	18
	7	12	....	....	....	....	....	....
	8	15	....	....	....	....	....	....
	9	18	....	....	....	....	....	....
Média		12,9		17		17,3		13,7
Desv. Padrão		2,5		7		4,3		3,1
Mediana		**12**		**20**		**18**		**13,5**
Inter. Conf.		1,6		7,9		3,4		2,5

Todos os transplantes foram realizados com aloenxertos de pele de doadores F1 (C57BL/6 x Balb/c) em animais receptores Balb/c, após protocolo # 3 descrito em métodos. Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante alogenico; AloAg: animais que receberam aloantígenos, via gavagem durante quatro dias; AloAg + *L.lacits* Hsp65: animais que receberam aloantígenos, via gavagem, *L.lactis* Hsp65, em substituição à água, durante quatro dias; AloAg + *L.lactis* WT: animais que receberam aloantígenos, via gavagem, *L.lactis* WT durante quatro dias em substituição à água.

Apesar de não termos conseguido induzir tolerância com este protocolo, também observamos um aumento significativo de sobrevida do enxerto, do grupo que recebeu aloantígenos em combinação com *L.lactis* WT, com mediana de sobrevida de 18 dias, em comparação com o grupo não tratado (CTR) que teve mediana de sobrevida de 12 dias (p=0,01) (Figura 9).

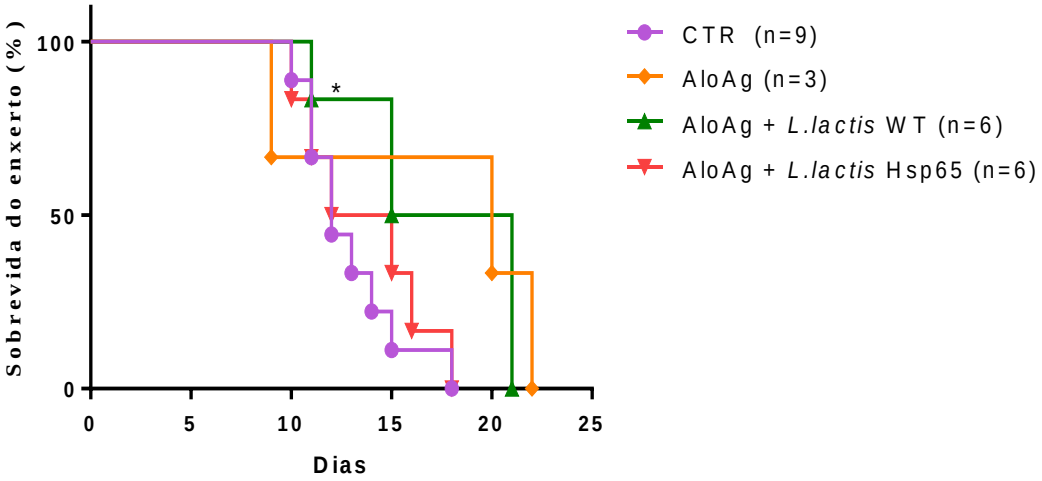


Figura 8. Curva de sobrevida Protocolo # 3. Análise dos tempos de sobrevida dos transplantes de pele semialogeneico. Todos os transplantes de pele foram realizados a partir de doadores de pele de cauda F1 (C57BL/6 x Balb/c) em receptores no dorso Balb/c. Ctr: controle, animais sem tratamente e transplante aloegenico; AloAg: animais que receberam meio de cultura e aloantígenos via gavagem durante quatro dias; AloAg+ *L.lacits* Hsp65: animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* Hsp65, em substituição à água, durante quatro dias; AloAg + *L.lactis* WT animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* WT, em substituição à água, durante quatro dias. Análise estatística - Log-rank (Mantel-Cox) considerando-se diferença significativa p<0,05. CTR x AloAg + *L.lactis* WT (* p=0,01).

4.4. Análise histopatológica – Hematoxilina& Eosina

Nossas análises histopatológicas confirmaram a rejeição de todos os enxertos analisados, que foi classificada, em sua maioria, como rejeição aguda em processo de cronificação (Tabela 8), com necrose, moderada à extensa, com deposição fibrina, infiltrado inflamatório discreto à moderado sendo, em sua maioria misto (polimórfico e mononuclear) (Figura 9; Tabela8). Não encontramos diferenças quanto à inflamação intra-epitélio, inflamação da derme subjacente do epitélio do tecido doado, inflamação derme geral e presença grau de necrose/ulcera (Tabela 8).

Tabela 8. Análises histopatológicas dos grupos que tiveram aumento de sobrevida.

	nº	Tempo de Sobrevida (dias)	Diagnóstico	Extensão de epitélio preservado da pele doada (μm)	Inflamação intra-epitélio doado		Inflamação derme subjacente epitélio doado		Inflamação derme geral		Extensão necrose/úlcera
					Grau	Tipo celular	Grau	Tipo celular	Grau	Tipo celular	
CTR	6	12	RA Cron.	577,93	discreta	mononuclear	discreta	mista - mononucleares e neutrofilos; reação macrofágica fagocitária tipo corpo estranho	intensa	mista com predomínio de neutrófilos	extensa
	7	12	RA Cron.	1.114,76	moderada	mononuclear	discreta	mista - mononucleares e neutrofilos; reação macrofágica fagocitária tipo corpo estranho	intensa	mista com predomínio de neutrófilos; presença de fibrina	extensa
	8	15	RA Cron.	5.469,76	discreta	mononuclear	discreta	mononuclear - reação macrofágica fagocitária tipo corpo estranho	discreta	mista - com predomínio de mononucleares	extensa
	9	18	RC	1.830,87	discreta	mononuclear	discreta	mononuclear	discreta	mononuclear	focal (crosta isolada)
AloAg + L.Lactis Selvagem	1	11	RA adnt. Cron.	5.105,69	moderado	mononuclear	discreta	mista - mononucleares e neutrofilos; reação macrofágica fagocitária tipo corpo estranho	discreta	misto, com mononucleares e neutrófilos	moderada
	4	21	RA Cron.	3.735,85	discreta	mononuclear	discreta	mista - mononucleares e neutrofilos; reação macrofágica fagocitária tipo corpo estranho	discreta	misto - mononucleares e neutrófilos	extensa
	5	21	RA adnt. Cron.	5.310,28	moderado	mononuclear	discreta	mista - mononucleares e alguns neutrófilos	discreta	mista - mononucleares e alguns neutrófilos	focal
	2	15	RA Cron.	5.759,85	moderado	misto, com neutrófilos focalmente	moderado	misto - mononucleres e alguns neutrófilos; presença de fibrina	moderado	misto - mononucleres e alguns neutrófilos; presença de fibrina	moderada
	3	15	RA Cron.	3.529,33	moderado	mononuclear	moderado	misto -mononucleres e alguns neutrófilos	moderado	misto - com mononucleres e alguns neutrófilos	extensa
	6	21	RA Cron.	4.841,57	moderado	mononuclear	moderado	misto - mononucleres e alguns neutrófilos	moderado	misto - com mononucleres e alguns neutrófilos	focal
AloAg + L.Lactis Selvagem + Celecoxibe	5	21	RA Cron.	3.970,82	discreta	mononuclear	discreta	mononuclear - reação macrofágica fagocitária tipo corpo estranho	discreta	predomínio mononucleares - plasmócitos e grupos de neutrófilos	extensa
	6	21	RA Cron.	4.685,62	discreta	mononuclear	discreta	mista - mononucleares / neutrófilos	moderada	mista - mononucleares e neutrófilos	extensa
	7	21	RA Cron./RC	2.766,68	discreta	mononuclear	discreta	mononuclear	discreta	mononuclear	focal

RA = rejeição aguda; RC = rejeição crônica; NA = não avaliável; RA adnt.= rejeição aguda adiantada; RA Cron= rejeição aguda em cronificação

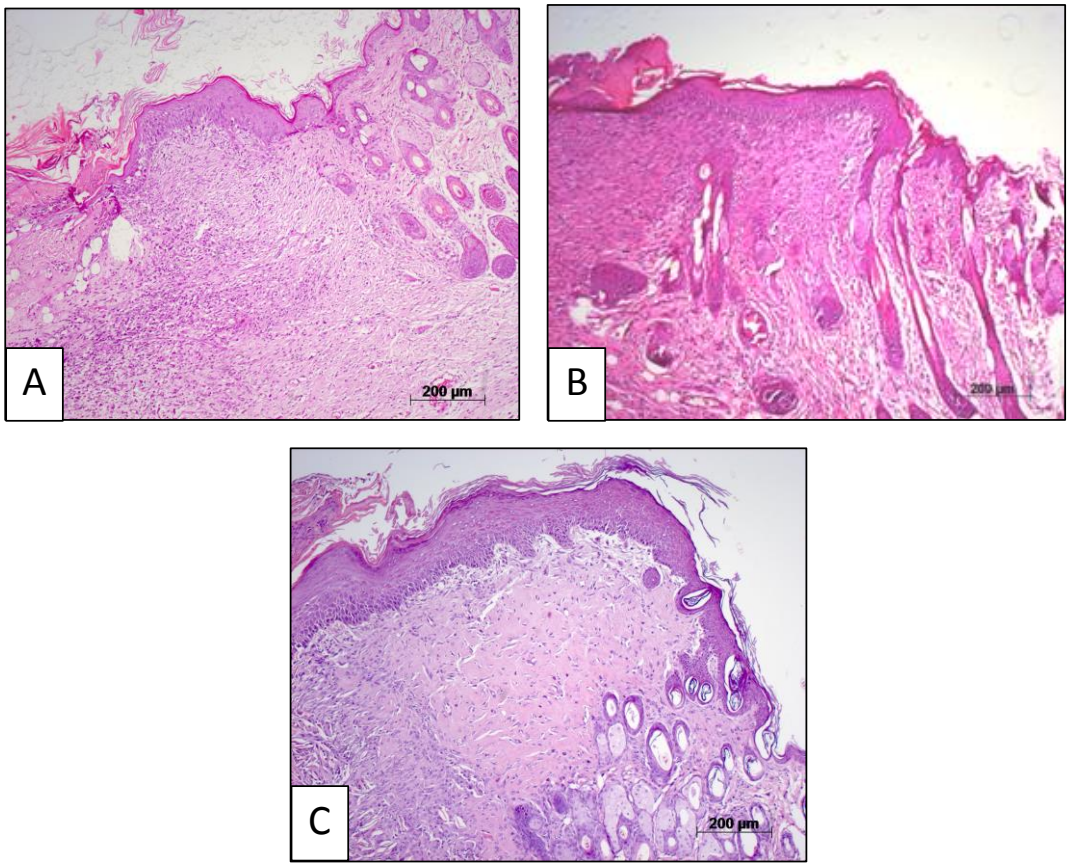


Figura 9. Análise histopatológica de enxertos de pele. A) HE do Grupo controle, animais que receberam apenas meio de cultura, mostrando epitélio doado e área ulcerada rejeição tipo aguda em cronificação; B, HE do grupo AloAg+ *L.lactis* WT, animais que receberam aloantígenos e *L.lactis* WT, mostrando epitélio tipo doado e receptor rejeição tipo aguda em cronificação. C, HE do grupo AloAg+ *L.lactis* WT+Celecoxibe, animais que receberam aloantígenos e *L.lactis* WT e seis doses de celecoxibe, mostrando epitélio doado e rejeição do tipo aguda em cronificação.

Apesar de não termos conseguido fazer cortes seriados do enxerto para nossas análises, observamos maior quantidade de epitélio preservado no enxerto nos animais do grupo AloAg + *L.lactis* WT, em comparação com o grupo não tratado (p=0,02) (Figura 10). Mas não observamos diferenças significativas quando comparamos o grupo AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe com o controle, nem com o grupo AloAg + *L.lactis* WT (Figura 10; Tabela8)

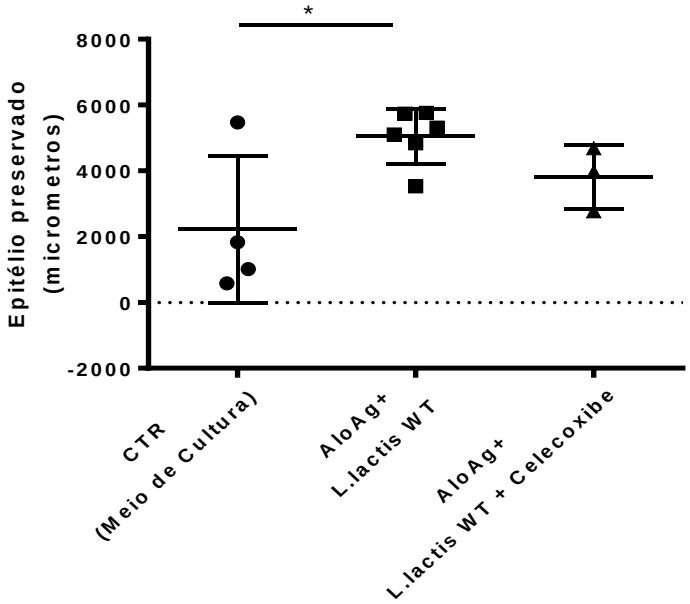


Figura 10. Análise histopatológica quantitativa do tecido doado. Análise quantitativa do tecido doado dos enxertos pele semialogeneico. Todos os transplantes de pele foram realizados a partir de doadores de pele de cauda F1 (C57BL/6 x Balb/c) em receptores no dorso Balb/c. CTR: animais que receberam apenas meio de cultura e transplante alogeneico; AloAg + *L.lactis* WT animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* WT, em substituição à água, durante quatro dias; AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe: animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* WT em substituição à água, durante quatro dias e, seis doses de celecoxibe em dias alternados a partir do dia do transplante. Análise estatística – Teste t, considerando-se diferença significativa $p<0,05$. CTR x AloAg + *L.lactis* WT * $p=0,02$.

4.5. Análise imunopatológica – Imunohistoquímica

Com o objetivo de determinar potenciais mecanismos envolvidos a maior sobrevida dos enxertos após a administração de probióticos e aloantígenos, fizemos análises expressão de Foxp3, IL-17 e TGF-β, por imunohistoquímica, nos enxertos, após determinada a rejeição.

Tabela 9. Avaliação dos aloenxertos por imunohistoquimica de Foxp3, IL-17 e TGF-β

	nº	Tempo de Sobrevida (dias)	Foxp3	TGF-β	IL-17
CTR (n=4)	16	12	neg	rara/+	rara/+
	17	12	neg	rara/+	rara/+
	18	15	neg	++	rara/+
	19	18	neg	rara/+	rara/+
AloAg + *L.Lactis* Selvagem (n=4)	23	11	neg	++	rara/+
	24	21	neg	+	rara/+
	26	15	rara/<5	++	++
	27	15	rara/<5	+	rara/+
AloAg + *L.Lactis* Selvagem + Celecoxibe (n=4)	9	21	rara/+	+++	rara/+
	10	21	nv	rara/+	rara/+
	11	21	nv	rara/+	rara/+

O infiltrado celular foi analisado semi-quantitativamente e classificado como neg: negativas/raras, não têm células positivas ou são escassas (< de 5 células em todos campos); +: aproximadamente 30 % ou menos das células positivas; ++: coloração positiva de 30 a 50% das células; +++: coloração positiva de > 50 a 70 % das células; ++++: > 70 % das células positivas. NV amostra não válida para avaliação. Todos os campos foram analisados com aumento de 400X (mínimo 5 campos).

A expressão de Foxp3 nos enxertos foi rara ou negativa nos grupos que tiveram aumento de sobrevida e negativas no grupo controle não tratado (Tabela 9). Nas análises de IL-17, observamos, em sua maioria, ausência ou raras células positivas, tanto dos grupos que tiveram maior sobrevida, quanto, no grupo controle (Tabela 9).

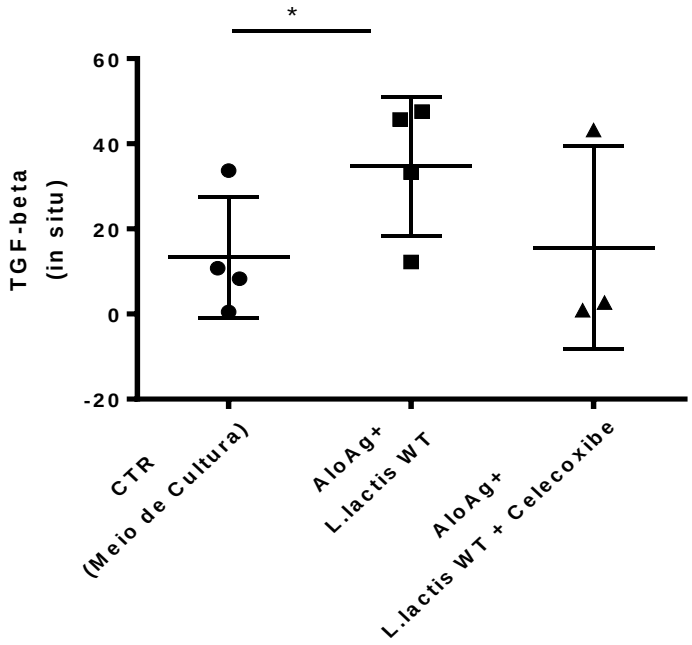


Figura 11. Análise Quantitativa de TGF-beta. Análise quantitativa de TGF-beta dos aloenxertos pele. Todos os transplantes de pele foram realizados a partir de doadores de pele de cauda F1 (C57BL/6 x Balb/c) em receptores no dorso Balb/c. CTR: animais que receberam apenas meio de cultura; AloAg + *L.lactis* WT animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* WT, em substituição à água, durante quatro dias; AloAg + *L.lactis* WT + Celecoxibe: animais que receberam aloantígenos via gavagem e *L.lactis* WT em substituição à água, durante quatro dias e, seis doses de celecoxibe em dias alternados a partir do dia do transplante. Programa Image J, análise estatística – Teste t considerando-se diferença significativa p<0,05. CTR x AloAg + *L.lactis* WT * p=0,04.

Nos enxertos dos animais que receberam aloantígenos e *L.lactis* Selvagem observamos maior expressão de TGF-β em comparação com o grupo controle (p=0,04) (Figura 11).

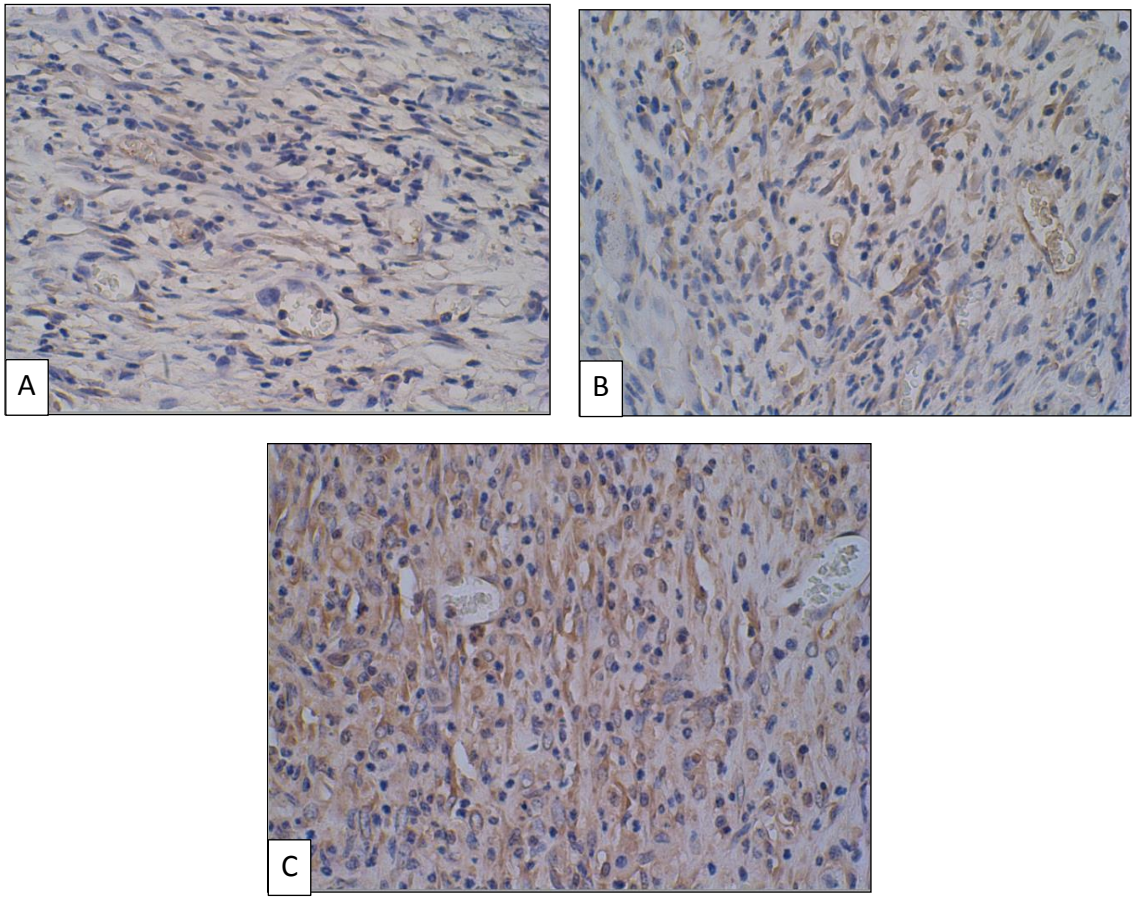


Figura 12. Análise Imunohistoquímica de expressão de TGF-beta. A) Grupo controle, animais que receberam apenas meio de cultura; B) Grupo AloAg+ *L.lactis* WT, animais que receberam aloantígenos e *L.lactis* WT; C) AloAg+ *L.lactis* WT+Celecoxibe, animais que receberam aloantígenos e *L.lactis* WT e seis doses de celecoxibe.

5. Discussão

Nós testamos se a atividade potencialmente imunorreguladora da Hsp65, expressa pelo probiótico *Lactococcus lactis,* e a exposição a aloantígenos do doador, pela mucosa oral, atuam sinergicamente induzindo aumento da sobrevida, ou tolerância ao aloenxerto, no transplante de pele murino. Em nossos protocolos, o potencial imunorregulador da Hsp65 expressa pelo *Lactococcus lactis* não foi capaz de induzir tolerância, nem mesmo aumento de sobrevida dos aloenxertos, nos diferentes protocolos, refutando nossa hipótese.

Considerando que as Hsp65/60 participam tanto em respostas pró-inflamatórias (Binder, 2014) quanto respostas imunorreguladoras (Coelho e Faria, 2011), é possível que, o contexto intensamente inflamatório no início do transplante, possa ter impactado na atividade da Hsp65, e o seu potencial pró-inflamatório tenha superado o potencial imunorregulador. A participação das Hsps na ativação de respostas pró-inflamatórias, principalmente em repostas inatas, é bem descrita (Wallin *et al.*, 2002), induzindo a produção de diferentes citocinas, como TNF-α, IL-6 e IL-8 pela Hsp65 de *M. leprae* (Friedland *et al.*, 1993), TNF-α e IL-1-β por monócitos e via ativação CD14, pela Hsp65 de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 1993), e TNF-α e IL-1-β por macrófagos derivados de monócitos ativados pela Hsp65 de *M. bovis* (Peetermans *et al.*, 1994). Também já foi observado, em modelo de isquemia, que a Hsp60 endógena pode exercer atividade pró-inflamatória em cardiomiócitos, aumentando a expressão de TLR e ativando as vias TLR4 MyD88-p-38/NF-κB e TLR2/4 MyD88-JNK/NF-κB (Tian *et al.*, 2013) aumentando, assim, a inflamação. Porém, não podemos deixar de mencionar, uma questão muito relevante sobre os ensaios, *in vitro*, nos quais utilizou-se Hsp recombinante produzida em bactérias, e observou-se atividade pró-inflamatória. A

presença de endotoxinas contaminantes pode ser responsável, pelo menos em parte, pela a indução de moléculas com atividade inflamatória. Assim, mesmo com o uso de estratégias para remoção significativa de endotoxinas, a pequena quantidade que permanece pode ser responsável pelas observações do perfil inflamatório. Levando isso em conta, esses resultados devem ser considerados com reservas. Por outro lado, também já foi observado que a ativação do receptor de resposta inata TLR-2, pela Hsp60, pode aumentar a atividade reguladora de células Treg $CD4^{+}CD25^{+}$ (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006) (Zanini-Zhorov A 2006) e induzir atividade imunorreguladora em diferentes contextos inflamatórios. O contexto inflamatório parece ser necessário para ativar de mecanismos imunorreguladores da Hsp60. Ainda não conseguimos definir se a Hsp65, em nosso estudo, induziu um perfil pró-inflamatório ou, se até conseguiu induzir mecanismos imunorreguladores, mas insuficientes para aumentar a sobrevida do aloenxerto.

Não obstante, devemos também discutir a possibilidade de a Hsp65 ter até induzido/amplificado uma resposta imune pró-inflamatória, em nossos protocolos, uma vez que a Hsp usada é de origem microbiana e, dependendo do contexto, a sua atividade pode ser dominantemente pró-inflamatória (Peetermans *et al.*, 1994). Já é bem conhecido que as Hsps microbianas são alvo de reconhecimento de células T (Lamb *et al.*, 1989; Oswald-Richter *et al.*, 2010), podendo ser utilizadas como carreadores de moléculas (Lussow *et al.*, 1991) e imunógenos em vacinas (Barrios *et al.*, 1992). Também já foi observada a participação de células T com reatividade específica às Hsp microbianas, no desenvolvimento de processos inflamatórios e doenças autoimunes (Van Eden *et al.*, 1989; Rha *et al.*, 2002), sugerindo que a resposta imune às Hsp de patógenos possam ter um papel na sua fisiopatologia.

Entretanto, também há dados na literatura mostrando que a Hsp65 *M.leprae* pode estimular a indução de mecanismos imunorreguladores (Rha *et al.*, 2002). Diferentemente de outras Hsps microbianas (*Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylor*i, bacilo de Calmette-Gue'rin, e *Mycobacterium tuberculosis*), a Hsp65 de *M.leprae* foi capaz de impedir o desenvolvimento de inflamação alérgica de vias aéreas, evitando a hiperresponsividade das vias aéreas, após a sua exposição via mucosa nasal (Rha *et al.*, 2002). Outro dado mostra, também, que a Hsp65 de *M. leprae* foi importante na diminuição do processo inflamatório na aterosclerose, ocorrendo diminuição da placa aórtica e aumento da produção de IL-10 (Maron *et al.*, 2002), sugerindo a ativação de mecanismos imunorreguladores. Atividade imunorreguladora semelhante foi também observada com a administração de Hsp65 de *M. Tuberculosis*, na aterosclerose, ocorrendo diminuição das lesões de aterosclerose e, aumento da produção de IL-4, além da supressão de proliferação, *in vitro*, em reação mista linfocitária com células dos animais tratados com Hsp65 de *M. Tuberculosis* (Harats *et al.*, 2002). Em conjunto, esses dados se contrapõem aos nossos, uma vez que mostram que, mesmo sendo de origem bacteriana, a Hsp65 promoveu indução de atividade imunorreguladora.

Assim, podemos concluir que, em nossos protocolos, a Hsp65 de *M. leprae* não foi potente o suficiente na indução de mecanismos imunorreguladores, que pudessem controlar a inflamação do transplante semialogeneico. Vale também destacar que, essa mesma cepa de *L.lactis* produtora de Hsp65 foi bem sucedida em induzir a supressão de encefalomielite autoimune experimental (EAE), ocorrendo a indução de células $TCD4^{+}Foxp3^{+}$ e $TCD4^{+}LAP^{+}$, produção de IL-10 e supressão de IL-17 (Rezende *et al.*, 2013). É possível que, apesar do efeito benéfico da cepa *L.lactis*, a presença da Hsp65, no contexto de transplante, tenha estimulado uma resposta mais inflamatória atuando

negativamente no efeito benéfico observado nos protocolos com *L.lactis* selvagem, sem a Hsp65, como discutiremos abaixo.

Em contraste com os nossos resultados obtidos nos protocolos com administração de *L.lactis* Hsp65, observamos um aumento significativo da sobrevida dos enxertos, após a administração do *L.lactis* selvagem, em combinação com a exposição a aloantígenos do doador, via mucosa oral. Uma interpretação plausível é que a manipulação da microbiota, por meio da administração do probiótico *L.lactis*, tenha induzido mecanismos imunorreguladores e que, a presença de antígenos do doador tenha direcionado a indução de células com perfil imunorregulador, especificamente aos antígenos do doador. Não obstante, não encontramos presença expressiva de células FOXP3+ nas peles transplantadas neste grupo que teve aumento de sobrevida do aloenxerto. Aliás, a expressão de FOXP3 foi, em geral, muito baixa ou ausente, nos diferentes grupos submetidos a algum protocolo, e ausente no grupo controle, que não recebeu qualquer tratamento. Apesar desses dados, não podemos afastar a possibilidade de células Treg terem participação nos mecanismos envolvidos na maior sobrevida do enxerto, atuando no controle da resposta inflamatória dirigida ao enxerto, não diretamente no enxerto, mas nos linfonodos, e mesmo a participação de outros subtipos de células Treg, como as $CD4^{+}LAP^{+}$, como observado no modelo de EAE, citado anteriormente (Rezende *et al.*, 2013).

Em nossos experimentos, a expressão de TGF-β no enxerto foi maior no grupo que teve maior sobrevida e que recebeu *L.lactis* selvagem e aloantígenos. Esses dados sugerem que o TGF-β esteja envolvido no efeito benéfico da maior sobrevida do enxerto, uma vez que sua atividade imunorreguladora tem sido bem documentada e seus efeitos imunorreguladores mostraram-se importantes em diferentes contextos, como na

supressão de colite (Oida *et al.*, 2003) e supressão de EAE (Chen *et al.*, 2009). Por outro lado, também é conhecido que, dependo do contexto o TGF-β pode exercer atividade pró inflamatória, induzindo células do tipo Th17 (Veldhoen *et al.*, 2006) na presença de citocinas inflamatórias como a IL-6 (Bettelli *et al.*, 2006), como atividade imunorregulador, induzindo células Treg Foxp3$^+$ (Weiner, 2001; Chen *et al.*, 2003).

Vale destacar que a atividade imunorreguladora do TGF-β pode ocorrer por mecanismos dependentes ou independentes de Foxp3$^+$ (Gavin *et al.*, 2007). Uma das vias tolerogênicas do TGF-β, independente de FOXP3, é a indução de CD73 (Deaglio *et al.*, 2007), uma ectonucleotidase ATP em ADP, gerando, posteriormente, a produção de adenosina que tem atividade imunorreguladora (Klein e Bopp, 2016). Também vale destacar que há subpopulações de células Treg que expressam CD73 e exercem atividade imunorreguladora por esta via (Kobie *et al.*, 2006). Nós não analisamos a expressão de CD73. No entanto, analisamos a expressão de Foxp3$^+$ e, praticamente, não encontramos positividade nos enxertos dos animais que tiveram maior sobrevida. Uma outra possibilidade que podemos discutir é que, a ação de citocinas inflamatórias como IFN-γ tenha inibido a capacidade do TGF-β de induzir Treg, como discrito na literatura (Takaki *et al.*, 2008).

Outra atividade importante do TGF-β é a sua capacidade de promover cicatrização (Costa *et al.*, 2016). Nesse sentido nossos resultados mostram que, o grupo tratado com *L.lactis* selvagem e aloantígenos, que teve aumento de sobrevida, também apresentou maior preservação da área de epitélio do enxerto. Apesar do nosso protocolo não ter sido desenhado para uma avalição mais precisa da cicatrização, não podemos afastar a possibilidade do *L.lactis* selvagem ter tido um efeito benéfico nesse sentido.

Praticamente, não encontramos expressão de IL-17 nos enxertos dos diferentes grupos experimentais, tratados ou não tratados. Isso nos leva a pensar que, em nosso modelo, a IL-17 não esteja envolvida nos mecanismos de rejeição, pelo menos npo momento em que analisamos os enxertos, por ocasião do diagnóstico macroscópico de rejeição. É possível que, em nosso modelo, IFNg tenha tido papel mais importante; mas também não analisamos a sua expressão. Não obstante, IL-17 tem sido implicada com a rejeição de enxerto, em diferentes contextos (Van Kooten *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 2011), como e no transplante renal (Van Kooten *et al.*, 1998). Em modelo experimental de transplante cardíaco, a IL-17 seja produzida neutrófilos, logo após o transplante, ou por células do tipo Th17, foi implicada na rejeição do aloenxerto (Min *et al.*, 2009).

Diferentes trabalhos vêm destacando a importância da microbiota na formação do tecido linfoide intestinal (Hoshi *et al.*, 1992) e no estado e saúde e doença (Round e Mazmanian, 2009). Dados na literatura mostram, por exemplo, que ratos criados em condições *germ-free* têm menos órgãos linfoides organizados, no intestino, do que em ratos mantidos em condições convencionais (Hoshi *et al.*, 1992). Além disso, a microbiota tem um papel importante promovendo a indução de respostas inatas, no intestino (Clarke *et al.*, 2010), indicando também ter participação na indução tanto de respostas pró-inflamatórias, gerando, por exemplo, células Th17 (Ivanov *et al.*, 2009) quanto de respostas imunorreguladoras, gerando células Treg (Ivanov *et al.*, 2009; Round e Mazmanian, 2010). O uso de probióticos na modulação da microbiota humana e de animais experimentais tem mostrado efeitos benéficos em diferentes contextos (Isolauri *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2014) como, na doença de Crohn (Malin *et al.*, 1996) e na alergia intestinal (Majamaa e Isolauri, 1997). Em conjunto, esses dados da literatura mostram a importância da microbiota tanto na formação do sistema imune quanto na

indução de respostas imunes, e benefícios no uso de probiótiocos em diferentes contextos de desequilíbrio da homeostase.

Em concordância com os efeitos benéficos que observamos com o *L.lactis* selvagem, utilizando-se esta mesma cepa, por via oral, também foram observados efeitos benéficos no modelo GVHD (Mercadante *et al.*, 2014). No modelo de GVHD, a administração do *L.lactis* selvagem e aloantígenos do receptor (F1, Balbc x C57Bl6) para o doador (C57Bl6), induziu células B LAP^+ com perfil regulador, no doador, determinantes para indução de células T reguladoras, no receptor pós-transplante, e com efeito supressor dependente de IL-10, (Mercadante *et al.*, 2014). Apesar de ainda não ter sido possível explorar, mais profundamente, os mecanismos envolvidos na maior sobrevida dos aloenxertos, em nosso trabalho, com base na literatura pensamos que a indução de células Treg, e mesmo Breg, diretamente na mucosa intestinal possam ter um papel relevante, controlando o processo inflamatório e a agressão contra o aloenxerto, mesmo que parcialmente, atuando seja nos linfonodos, seja também no microambiente do enxerto.

Uma questão a ser levantada para discussão diz respeito à composição da microbiota e o seu impacto na indução de mecanismos imunorreguladores. Em nossos experimentos, utilizamos animais livres de patógenos específicos, SPF (do inglês *Specific Pathogen Free*) e que foram mantidos em condições de esterilidade. Como mencionado, já é bem estabelecida, na literatura, a importância da microbiota na formação do sistema imune e indução de respostas tanto inflamatórias (Ivanov *et al.*, 2009) como imunorreguladoras (Round e Mazmanian, 2009). Em estudo de indução de tolerância oral à β-lactoglobulina bovina, foi observado que as respostas humorais e

celulares foram melhores em animais com a microbiota convencional, em comparação com animais livres de patógenos ou monocolonizados (Prioult *et al.*, 2003).

Em condições semelhantes de administração de probióticos, mas em animais com uma microbiota convencional, com manutenção em gaiolas abertas, a utilização das mesmas cepas utilizadas em nosso trabalho, em modelo de EAE (Rezende *et al.*, 2013), quanto de outro probiótico, em modelo de colite (Luerce *et al.*, 2014), foi bem sucedida na indução de imunorregulação e no controle do processo patológico. Podemos levantar a possibilidade de que, nossos protocolos poderiam ter tido mais sucesso se, os animais utilizados tivessem uma microbiota convencional e não controlada, talvez, favorecendo a indução de mecanismos imunorreguladores. Nesse sentido, com o aprimoramento de nossos protocolos para indução de tolerância imunológica, no transplante, pretendemos também testar se a utilização de animais convencionais e, portanto, mudança da microbiota, trará efeito benéfico em relação à maior sobrevida do enxerto.

Uma questão interessante a ser discutida é a respeito do papel dos aloantígenos na indução de mecanismos imunorreguladores. Em nossos experimentos, apenas a administração do *L.lactis* não foi o suficiente para influenciar positivamente na sobrevida do enxerto; só quando administrado em conjunto com os aloantígenos, observamos um efeito benéfico. Sabemos que a exposição de antígenos, via mucosa oral, pode induzir tolerância imunológica, mediante posterior desafio com o mesmo antígeno, em vários contextos inflamatórios (Weiner *et al.*, 2011), como, por exemplo, induzindo supressão na EAE com aumento da produção das citocinas imunorreguladoras, TGF-β e IL10, após a administração oral de OVA (Faria *et al.*, 2003). Acreditamos que a apresentação do contexto antigênico alogeneico, ao sistema imune, no momento de mobilização de mecanismos imunorreguladores, tenha

favorecido o direcionamento da imunorregulação dirigida aos mesmos antígenos alogeneicos que foram encontrados, posteriormente, no transplante.

Nesse sentido, vale destacar a crescente importância dada à maior eficácia de células T reguladoras com reatividade dirigida a antígenos relevantes no contexto fisiopatológico em questão. Assim, além da já bem estabelecida importância das células Treg na manutenção da homeostase (Wing e Sakaguchi, 2010), as Treg antígeno-específicas ganham destaque e têm sido almejadas em estratégias de tradução para a clínica em terapia celular, inclusive as células T aloespecíficas, com perfil regulador (Long e Wood, 2007). Por exemplo, as células T reguladoras alorreativas mostraram-se importantes na imunossupressão, em modelo de transplante de pele (Moore *et al.*, 2015), assim como na prevenção de GVHD (Sela *et al.*, 2011). Assim, acreditamos que a administração dos aloantígenos, em conjunto com o probiótico *L.lactis* selvagem, tenha sido importante para o efeito benéfico observado, provavelmente, ocorrendo a indução de células Treg aloespecíficas que tiveram atividade imunorreguladora direcionada ao aloenxerto, mesmo que não tenha sido suficiente para induzir tolerância.

Outro ponto relevante a ser discutido é sobre o uso de anti-inflamatório em nossos protocolos. Considerando a intensa inflamação inicial causada pelo processo cirúrgico e que o estímulo alogeneico, no transplante de pele, amplifica o processo inflamatório contra o aloenxerto, pensamos em utilizar um anti-inflamatório, com o objetivo de limitar o impacto inflamatório inicial. Escolhemos o celecoxibe, inibidor de ciclooxigenase 2, que atua cascata da síntese de prostaglandina (Vane, 1971), uma vez que, as prostaglandinas são importantes na iniciação de respostas imunes inflamatórias, desencadeando diferentes processos e mecanismos (Kalinski, 2012), como por exemplo,

a indução de angiogenêse (Salcedo *et al.*, 2003) e a diferenciação de populações celulares pró-inflamatórias, como as Th17 (Boniface *et al.*, 2009).

A utilização de inibidores de prostaglandinas foi muito explorada em modelos experimentais e tratamento de câncer (Arun e Goss, 2004; Sandler e Dubinett, 2004; Wulff *et al.*, 2010). Assim, acreditávamos que a sua utilização, em conjunto com os nossos protocolos, poderia minimizar a inflamação local inespecífica pela inibição da síntese de prostaglandina, favorecendo a ação potencialmente imunorreguladora do *L.lactis* Hsp65. Entretanto, diferentemente do que pensávamos, nossos resultados mostram que a utilização do anti-inflamatório não foi potente, o suficiente, de forma a favorecer a sobrevida do aloenxerto. Apesar desse resultado, é possível que o celecoxibe tenha tido alguma ação sinérgica com o efeito benéfico do *L.lactis*, em combinação com aloantígenos, uma vez que, a mediana de sobrevida do grupo que recebeu aloantígenos e *L. lactis*, em conjunto com o celecoxibe, teve significância maior, em relação ao grupo controle, do que aquele com *L.lactis* sem celecoxibe.

Uma questão importante a ser abordada sobre o uso de anti-inflamatório, no transplante, é a dificuldade da sua tradução para a clínica, em especial em relação ao celecoxibe, uma vez que ele possui efeito nefrotóxico (Perazella e Eras, 2000; Woywodt *et al.*, 2001). Assim, considerando que os efeitos adversos da utilização desse anti-inflamatório são grandes e que, o uso de imunossupressores, na clínica, é indispensável, atualmente, não nos parece ser justificável a utilização de um anti-inflamatório. Uma alternativa válida seria explorar a utilização de baixas doses de imunossupressores, em nossos protocolos, pensando em maior potencial de aplicação na clínica.

Em resumo, apesar da administração da Hsp65 expressa pelo *L.lactis* não ter induzido tolerância, nem mesmo influenciar na evolução do aloenxerto de pele,

concluímos que a manipulação da microbiota por meio da administração do probiótico *L.lactis* selvagem foi benéfica. Acreditamos que esta terapia combinada tenha estimulado mecanismos imunorreguladores na mucosa intestinal e, com a administração de aloantígenos, tenha ocorrido indução de células antígeno-específicas com atividade imunorreguladora, capazes de controlar a agressão ao enxerto, mesmo que parcialmente, com a participação de TGF-beta. Nossas perspectivas para a continuidade desta linha de pesquisa envolvem o aprimoramento nos protocolos, com aumento no tempo da exposição dos probióticos e aloantígenos, o uso de animais convencionais e, possivelmente, uso de baixas doses de imunossupressores, pensando na perspectiva de tradução para a clínica.

6. Conclusões

1- O probiótico *L.lactis* que expressa a Hsp65, administrado pela via oral, não foi capaz de induzir tolerância ao aloenxerto de pele, tampouco aumento de sua sobrevida, indicando que, neste contexto e nessas condições, a Hsp65 não induziu a ativação de mecanismos imunorreguladores capazes de controlar a resposta inflamatória dirigida ao aloenxerto.

2- A administração oral de *L.lactis* selvagem, em combinação com a prévia exposição a aloantígenos do doador, induziu um aumento significativo na sobrevida do aloenxerto de pele, indicando que este probiótico induz mecanismos imunorreguladores capazes de controlar, mesmo que parcialmente, a resposta inflamatória dirigida ao aloenxerto. Considerando que o efeito benéfico foi observado apenas com a prévia exposição do receptor a aloantígenos do doador, assim como a maior expressão de TGF beta no enxerto, neste grupo, interpretamos que os efeitos imunorreguladores desencadeados pelo probiótico envolvem o controle da resposta imune inflamatória específica a aloantígenos do doador, com a participação de TGF beta.

3- A utilização do anti-inflamatório, celecoxibe, visando à diminuição do processo inflamatório inespecífico inicial, do transplante, não induziu efeito benéfico significativo, em relação à sobrevida do aloenxerto. Isto indica que os mecanismos de ação deste anti-inflamatório, mesmo que suprimindo

parcialmente a inflamação, não contribuem para a inibição da resposta inflamatória específica a aloantígenos do doador e a agressão ao enxerto.

Anexos

Anexo A

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO
Certificamos que o Protocolo nº. 217 / 2014, relativo ao projeto intitulado " Administração oral combinado de Aloantígenos e probiótico Lactococcus lactis / Lactococcus lactis HSP65 no transplante alogênico de pele", que tem como responsável tatiani uceli maioli, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 03/03/2015. Este certificado espira-se em 03/03/2020.

CERTIFICATE
We hereby certify that the Protocol nº. 217 / 2014, related to the Project entitled "Combined oral administration of alloantigens and probiotic Lactococcus lactis/ Lactococcus lactis HSP65 in allogeneic skin transplantation", under the supervision of tatiani uceli maioli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/03/2015. This certificates expires in 03/03/2020.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 03/03/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo B

MEDICINA
USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **"Terapia combinada: Administração de aloantígenos e L.lactis Hsp65, via oral, no transplante de pele alogenéico murinho"**, protocolo nº **080/15** sob a responsabilidade de **Verônica Porto Carreiro de Vasconcelos Coelho** e **Daniele Vieira Silva**, apresentado pelo Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 15.05.2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/2015
Espécie/linhagem	camundongo
Nº de animais	Material coletado
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Biotério UFMG/Lab. de Bioquímica e Imunologia da UFMG

CEUA-FMUSP, 15 de Maio de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

7. Referencias

ARUN, B.; GOSS, P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. **Semin Oncol,** v. 31, n. 2 Suppl 7, p. 22-9, Apr 2004. ISSN 0093-7754.

ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nat Med,** v. 6, n. 4, p. 435-42, Apr 2000. ISSN 1078-8956.

BARRIOS, C. et al. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guérin priming. **Eur J Immunol,** v. 22, n. 6, p. 1365-72, Jun 1992. ISSN 0014-2980.

BENNETT, W. M. et al. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. **Nephrol Dial Transplant,** v. 9 Suppl 4, p. 141-5, 1994. ISSN 0931-0509.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. et al. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. **Microb Cell Fact,** v. 10 Suppl 1, p. S4, Aug 2011. ISSN 1475-2859.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature,** v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 2006. ISSN 1476-4687.

BILLINGHAM, R. E.; MEDAWAR, P. B. Desensitization to skin homografts by injections of donor skin extracts. **Ann Surg,** v. 137, n. 4, p. 444-9, Apr 1953. ISSN 0003-4932.

BILLINGTON, W. D. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. **J Reprod Immunol,** v. 60, n. 1, p. 1-11, Oct 2003. ISSN 0165-0378.

BINDER, R. J. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. **J Immunol,** v. 193, n. 12, p. 5765-71, Dec 2014. ISSN 1550-6606.

BIRK, O. S. et al. NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. **J Autoimmun,** v. 9, n. 2, p. 159-66, Apr 1996. ISSN 0896-8411.

_____. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 9, p. 5159-63, Apr 1999. ISSN 0027-8424.

BONIFACE, K. et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. **J Exp Med,** v. 206, n. 3, p. 535-48, Mar 2009. ISSN 1540-9538.

BOUNEAUD, C.; KOURILSKY, P.; BOUSSO, P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. **Immunity,** v. 13, n. 6, p. 829-40, Dec 2000. ISSN 1074-7613.

CAI, J.; TERASAKI, P. I. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. **Hum Immunol,** v. 66, n. 4, p. 334-42, Apr 2005. ISSN 0198-8859.

CALDAS, C. et al. T-cell response to self HSP60 peptides in renal transplant recipients: a regulatory role? **Transplant Proc,** v. 36, n. 4, p. 833-5, May 2004. ISSN 0041-1345.

CARAMALHO, Í. et al. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. **Front Immunol,** v. 6, p. 395, 2015. ISSN 1664-3224.

CHEN, M. L. et al. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. **Eur J Immunol,** v. 39, n. 12, p. 3423-35, Dec 2009. ISSN 1521-4141.

CHEN, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J Exp Med,** v. 198, n. 12, p. 1875-86, Dec 2003. ISSN 0022-1007.

_____. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. **J Immunol,** v. 162, n. 6, p. 3212-9, Mar 1999. ISSN 0022-1767. D

CHEN, Y. et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. **Nature,** v. 376, n. 6536, p. 177-80, Jul 1995. ISSN 0028-0836.

_____. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science,** v. 265, n. 5176, p. 1237-40, Aug 1994. ISSN 0036-8075. D

CLARKE, T. B. et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. **Nat Med,** v. 16, n. 2, p. 228-31, Feb 2010. ISSN 1546-170X.

COELHO, V.; FARIA, A. M. HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. **Front Immunol,** v. 2, p. 97, 2011. ISSN 1664-3224.

COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. **Immunol Today,** v. 12, n. 4, p. 105-10, Apr 1991. ISSN 0167-5699.

COSMI, L. et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. **Blood,** v. 102, n. 12, p. 4107-14, Dec 2003. ISSN 0006-4971.

COSTA, R. A. et al. Systemic effects of oral tolerance reduce the cutaneous scarring. **Immunobiology,** v. 221, n. 3, p. 475-85, Mar 2016. ISSN 1878-3279.

DANKE, N. A. et al. Autoreactive T cells in healthy individuals. **J Immunol,** v. 172, n. 10, p. 5967-72, May 2004. ISSN 0022-1767.

DE AZEVEDO, M. S. et al. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in Lactococcus lactis. **Genet Mol Res,** v. 11, n. 2, p. 1146-57, 2012. ISSN 1676-5680.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J Exp Med,** v. 204, n. 6, p. 1257-65, Jun 2007. ISSN 0022-1007.

E. L. KAPLAN, A. P. M. Nonparametric Estimation From Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association,** v. 53, n. No. 282, p. 457-481, 1958.

FARIA, A. M. et al. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Autoimmun,** v. 20, n. 2, p. 135-45, Mar 2003. ISSN 0896-8411.

FLOHÉ, 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. 2340-8, Mar 2003. ISSN 0022-1767.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol,** v. 4, n. 4, p. 330-6, Apr 2003. ISSN 1529-2908.

FRIEDLAND, J. S. et al. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. **Clin Exp Immunol,** v. 91, n. 1, p. 58-62, Jan 1993. ISSN 0009-9104.

FRIEDMAN, A.; WEINER, H. L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 91, n. 14, p. 6688-92, Jul 1994. ISSN 0027-8424.

GAVIN, M. A. et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. **Nature,** v. 445, n. 7129, p. 771-5, Feb 2007. ISSN 1476-4687.

GRANJA, C. et al. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. **Hum Immunol,** v. 65, n. 2, p. 124-34, Feb 2004. ISSN 0198-8859.

GUEMBES, A. P. S. **Mapeamento de peptídeos da proteína de choquetérmico 60 potencialmente imunorreguladores no modelo murino.** 2010. 153 (Mestrado). Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de SãoPaulo, São Paulo.

HAMADA, H. et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. **J Immunol,** v. 168, n. 1, p. 57-64, Jan 2002. ISSN 0022-1767.

HARATS, D. et al. Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates Mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions. **J Am Coll Cardiol,** v. 40, n. 7, p. 1333-8, Oct 2002. ISSN 0735-1097.

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. 123-41, Mar 2010. ISSN 1466-1268.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annu Rev Biochem,** v. 62, p. 349-84, 1993. ISSN 0066-4154.

HERRERA, O. B. et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. **J Immunol,** v. 173, n. 8, p. 4828-37, Oct 2004. ISSN 0022-1767.

HOSHI, H. et al. Lymph follicles and germinal centers in popliteal lymph nodes and other lymphoid tissues of germ-free and conventional rats. **Tohoku J Exp Med,** v. 166, n. 3, p. 297-307, Mar 1992. ISSN 0040-8727.

ISHIDO, N. et al. Induction of donor-specific hyporesponsiveness and prolongation of cardiac allograft survival by jejunal administration of donor splenocytes. **Transplantation,** v. 68, n. 9, p. 1377-82, Nov 1999. ISSN 0041-1337.

ISOLAURI, E.; KIRJAVAINEN, P. V.; SALMINEN, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? **Gut,** v. 50 Suppl 3, p. III54-9, May 2002. ISSN 0017-5749.

ITOH, S. et al. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. **Circulation,** v. 124, n. 11 Suppl, p. S187-96, Sep 2011. ISSN 1524-4539.

_____. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. **J Clin Immunol,** v. 30, n. 2, p. 235-40, Mar 2010. ISSN 1573-2592.

IVANOV, I. I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell,** v. 139, n. 3, p. 485-98, Oct 2009. ISSN 1097-4172.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J Immunol,** v. 188, n. 1, p. 21-8, Jan 2012. ISSN 1550-6606.

KLEIN, L. et al. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nat Rev Immunol,** v. 14, n. 6, p. 377-91, Jun 2014. ISSN 1474-1741.

KNOECHEL, B. et al. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. **J Immunol,** v. 176, n. 11, p. 6473-83, Jun 2006. ISSN 0022-1767.

KOBIE, J. J. et al. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. **J Immunol,** v. 177, n. 10, p. 6780-6, Nov 2006. ISSN 0022-1767.

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. 13-7, Jan 2000. ISSN 0022-1767.

KORECKA, A.; ARULAMPALAM, V. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator? **J Oral Microbiol,** v. 4, 2012. ISSN 2000-2297.

LAMB, J. R. et al. The mycobacterial GroEL stress protein: a common target of T-cell recognition in infection and autoimmunity. **J Autoimmun,** v. 2 Suppl, p. 93-100, Jun 1989. ISSN 0896-8411.

LECHLER, R. I.; BATCHELOR, J. R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. **J Exp Med,** v. 155, n. 1, p. 31-41, Jan 1982. ISSN 0022-1007.

LEVINGS, M. K.; RONCAROLO, M. G. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. **J Allergy Clin Immunol,** v. 106, n. 1 Pt 2, p. S109-12, Jul 2000. ISSN 0091-6749.

LIU, Z. et al. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. **Int Immunol,** v. 10, n. 6, p. 775-83, Jun 1998. ISSN 0953-8178.

LONG, E. T.; WOOD, K. J. Regulatory T cells--a journey from rodents to the clinic. **Front Biosci,** v. 12, p. 4042-9, 2007. ISSN 1093-9946.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem,** v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258.

LUERCE, T. D. et al. Anti-inflammatory effects of Lactococcus lactis NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. **Gut Pathog,** v. 6, p. 33, 2014. ISSN 1757-4749.

LUNA, E. et al. Treatment with encapsulated Hsp60 peptide (p277) prolongs skin graft survival in a murine model of minor antigen disparity. **Scand J Immunol,** v. 66, n. 1, p. 62-70, Jul 2007. ISSN 0300-9475.

LUSSOW, A. R. et al. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. **Eur J Immunol,** v. 21, n. 10, p. 2297-302, Oct 1991. ISSN 0014-2980.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science,** v. 307, n. 5717, p. 1920-5, Mar 2005. ISSN 1095-9203.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI, E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J Allergy Clin Immunol,** v. 99, n. 2, p. 179-85, Feb 1997. ISSN 0091-6749.

MALIN, M. et al. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG. **Ann Nutr Metab,** v. 40, n. 3, p. 137-45, 1996. ISSN 0250-6807.

MARON, R. et al. Oral administration of insulin to neonates suppresses spontaneous and cyclophosphamide induced diabetes in the NOD mouse. **J Autoimmun,** v. 16, n. 1, p. 21-8, Feb 2001. ISSN 0896-8411.

_____. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation,** v. 106, n. 13, p. 1708-15, Sep 2002. ISSN 1524-4539.

MARRERO, I. et al. Autoreactivity to self H-2Kb peptides in TAP1 mice. Intravenous administration of H-2Kb class I-derived peptides induces long-term survival of grafts from C57BL/6 donors. **Immunology,** v. 115, n. 4, p. 484-94, Aug 2005. ISSN 0019-2805.

MARTELLO, F. G. **Hsp60 e Imunorregulação:Estratégiaspara identificação de peptídeos imunorreguladores**. 2009. (Mestrado). Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de SãoPaulo, São Paulo.

MATZINGER, P.; KAMALA, T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. **Nat Rev Immunol,** v. 11, n. 3, p. 221-30, Mar 2011. ISSN 1474-1741.

MERCADANTE, A. C. et al. Oral combined therapy with probiotics and alloantigen induces B cell-dependent long-lasting specific tolerance. **J Immunol,** v. 192, n. 4, p. 1928-37, Feb 2014. ISSN 1550-6606.

MIN, S. I. et al. Sequential evolution of IL-17 responses in the early period of allograft rejection. **Exp Mol Med,** v. 41, n. 10, p. 707-16, Oct 2009. ISSN 2092-6413.

MIYAZONO, K.; ICHIJO, H.; HELDIN, C. H. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. **Growth Factors,** v. 8, n. 1, p. 11-22, 1993. ISSN 0897-7194.

MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **J Immunol,** v. 176, n. 2, p. 705-10, Jan 2006. ISSN 0022-1767.

MOORE, C. et al. Alloreactive regulatory T cells generated with retinoic acid prevent skin allograft rejection. **Eur J Immunol,** v. 45, n. 2, p. 452-63, Feb 2015. ISSN 1521-4141.

MOSELEY, P. L. Heat shock proteins and the inflammatory response. **Ann N Y Acad Sci,** v. 856, p. 206-13, Sep 1998. ISSN 0077-8923.

NAGAMINE, K. et al. Positional cloning of the APECED gene. **Nat Genet,** v. 17, n. 4, p. 393-8, Dec 1997. ISSN 1061-4036.

NAGLER, A. et al. Induction of oral tolerance in bone marrow transplantation recipients suppresses graft-versus-host disease in a semiallogeneic mouse model. **Bone Marrow Transplant,** v. 32, n. 4, p. 363-9, Aug 2003. ISSN 0268-3369.

_____. Oral tolerization ameliorates liver disorders associated with chronic graft versus host disease in mice. **Hepatology,** v. 31, n. 3, p. 641-8, Mar 2000. ISSN 0270-9139.

NAGLER-ANDERSON, C. et al. Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 83, n. 19, p. 7443-6, Oct 1986. ISSN 0027-8424.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **J Exp Med,** v. 194, n. 5, p. 629-44, Sep 2001. ISSN 0022-1007.

NEURATH, M. F. et al. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. **J Exp Med,** v. 183, n. 6, p. 2605-16, Jun 1996. ISSN 0022-1007.

OIDA, T. et al. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. **J Immunol,** v. 170, n. 5, p. 2516-22, Mar 2003. ISSN 0022-1767.

OSWALD-RICHTER, K. A. et al. Multiple mycobacterial antigens are targets of the adaptive immune response in pulmonary sarcoidosis. **Respir Res,** v. 11, p. 161, 2010. ISSN 1465-993X.

OWEN, R. L. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. **Semin Immunol,** v. 11, n. 3, p. 157-63, Jun 1999. ISSN 1044-5323.

PEETERMANS, W. E. et al. Mycobacterial heat-shock protein 65 induces proinflammatory cytokines but does not activate human mononuclear phagocytes. **Scand J Immunol,** v. 39, n. 6, p. 613-7, Jun 1994. ISSN 0300-9475.

PERAZELLA, M. A.; ERAS, J. Are selective COX-2 inhibitors nephrotoxic? **Am J Kidney Dis,** v. 35, n. 5, p. 937-40, May 2000. ISSN 1523-6838.

PETO, R. et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. I. Introduction and design. **Br J Cancer,** v. 34, n. 6, p. 585-612, Dec 1976. ISSN 0007-0920.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science,** v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 1999. ISSN 0036-8075.

PRIOULT, G.; FLISS, I.; PECQUET, S. Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. **Clin Diagn Lab Immunol,** v. 10, n. 5, p. 787-92, Sep 2003. ISSN 1071-412X.

RAZ, I. et al. Treatment of recent-onset type 1 diabetic patients with DiaPep277: results of a double-blind, placebo-controlled, randomized phase 3 trial. **Diabetes Care,** v. 37, n. 5, p. 1392-400, 2014. ISSN 1935-5548.

RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol,** v. 2, n. 4, p. 361-7, Apr 2001. ISSN 1529-2908.

REZENDE, R. M. et al. Hsp65-producing Lactococcus lactis prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. **J Autoimmun,** v. 40, p. 45-57, Feb 2013. ISSN 1095-9157.

RHA, Y. H. et al. Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. **J Immunol,** v. 169, n. 9, p. 5300-7, Nov 2002. ISSN 0022-1767.

RITOSSA, F. M. BEHAVIOUR OF RNA AND DNA SYNTHESIS AT THE PUFF LEVEL IN SALIVARY GLAND CHROMOSOMES OF DROSOPHILA. **Exp Cell Res,** v. 36, p. 515-23, Dec 1964. ISSN 0014-4827.

ROBERTSON, H. et al. Renal allograft rejection--in situ demonstration of cytotoxic intratubular cells. **Transplantation,** v. 61, n. 10, p. 1546-9, May 1996. ISSN 0041-1337.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol,** v. 9, n. 5, p. 313-23, May 2009. ISSN 1474-1741.

_____. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 107, n. 27, p. 12204-9, Jul 2010. ISSN 1091-6490.

ROUSSEY-KESLER, G. et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. **Am J Transplant,** v. 6, n. 4, p. 736-46, Apr 2006. ISSN 1600-6135.

RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. **Trends Immunol,** v. 28, n. 10, p. 429-36, Oct 2007. ISSN 1471-4906.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol,** v. 22, p. 531-62, 2004. ISSN 0732-0582.

_____. Regulatory T cells. **Springer Semin Immunopathol,** v. 28, n. 1, p. 1-2, Aug 2006. ISSN 0344-4325.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol,** v. 155, n. 3, p. 1151-64, Aug 1995. ISSN 0022-1767.

SALCEDO, R. et al. Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. **Blood,** v. 102, n. 6, p. 1966-77, Sep 2003. ISSN 0006-4971.

SANDLER, A. B.; DUBINETT, S. M. COX-2 inhibition and lung cancer. **Semin Oncol,** v. 31, n. 2 Suppl 7, p. 45-52, Apr 2004. ISSN 0093-7754.

SELA, U. et al. Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. **J Exp Med,** v. 208, n. 12, p. 2489-96, Nov 2011. ISSN 1540-9538.

STAGG, A. J. et al. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. **Gut,** v. 52, n. 10, p. 1522-9, Oct 2003. ISSN 0017-5749.

TAKAKI, H. et al. STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. **J Biol Chem,** v. 283, n. 22, p. 14955-62, May 2008. ISSN 0021-9258.

TAKIMOTO, T. et al. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. **J Immunol,** v. 185, n. 2, p. 842-55, Jul 2010. ISSN 1550-6606.

TANG, X. L.; SMITH, T. R.; KUMAR, V. Specific control of immunity by regulatory CD8 T cells. **Cell Mol Immunol,** v. 2, n. 1, p. 11-9, Feb 2005. ISSN 1672-7681.

THOMSON, A. W.; ROBBINS, P. D. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. **Ann Rheum Dis,** v. 67 Suppl 3, p. iii90-6, Dec 2008. ISSN 1468-2060.

TIAN, J. et al. Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes. **Cardiovasc Res,** v. 98, n. 3, p. 391-401, Jun 2013. ISSN 1755-3245.

VAN EDEN, W. et al. The mycobacterial 65 kD heat-shock protein and autoimmune arthritis. **Rheumatol Int,** v. 9, n. 3-5, p. 187-91, 1989. ISSN 0172-8172.

VAN HOUTEN, N.; BLAKE, S. F. Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction. **J Immunol,** v. 157, n. 4, p. 1337-41, Aug 1996. ISSN 0022-1767.

VAN KOOTEN, C. et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. **J Am Soc Nephrol,** v. 9, n. 8, p. 1526-34, Aug 1998. ISSN 1046-6673.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol,** v. 231, n. 25, p. 232-5, Jun 1971. ISSN 0090-0028.

VELDHOEN, M. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity,** v. 24, n. 2, p. 179-89, Feb 2006. ISSN 1074-7613.

VERRECK, F. A. et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 13, p. 4560-5, Mar 2004. ISSN 0027-8424.

WALLIN, R. P. et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends Immunol,** v. 23, n. 3, p. 130-5, Mar 2002. ISSN 1471-4906.

WALSH, C. J. et al. Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Lett,** v. 588, n. 22, p. 4120-30, Nov 2014. ISSN 1873-3468.

WARRENS, A. N.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I. Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. **Transpl Immunol,** v. 2, n. 2, p. 103-7, Jun 1994. ISSN 0966-3274.

WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. **Microbes Infect,** v. 3, n. 11, p. 947-54, Sep 2001. ISSN 1286-4579.

WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunol Rev,** v. 241, n. 1, p. 241-59, May 2011. ISSN 1600-065X.

WELLS, A. D. et al. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** v. 356, n. 1409, p. 617-23, May 2001. ISSN 0962-8436.

WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat Immunol,** v. 11, n. 1, p. 7-13, Jan 2010. ISSN 1529-2916.

WOYWODT, A. et al. Nephrotoxicity of selective COX-2 inhibitors. **J Rheumatol,** v. 28, n. 9, p. 2133-5, Sep 2001. ISSN 0315-162X.

WULFF, B. C. et al. Celecoxib reduces the effects of acute and chronic UVB exposure in mice treated with therapeutically relevant immunosuppressive drugs. **Int J Cancer,** v. 126, n. 1, p. 11-8, Jan 2010. ISSN 1097-0215.

YAMAZAKI, S.; MORITA, A. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific natural and induced regulatory T cells. **Front Immunol,** v. 4, p. 151, 2013. ISSN 1664-3224.

YASUFUKU, K. et al. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. **Am J Respir Cell Mol Biol,** v. 25, n. 1, p. 26-34, Jul 2001. ISSN 1044-1549.

ZANIN-ZHOROV, A. et al. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **J Clin Invest,** v. 116, n. 7, p. 2022-32, Jul 2006. ISSN 0021-9738.

ZHANG, Y. et al. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by Mycobacterium tuberculosis components. **J Clin Invest,** v. 91, n. 5, p. 2076-83, May 1993. ISSN 0021-9738.

ZHENG, S. G. et al. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. **J Immunol,** v. 172, n. 9, p. 5213-21, May 2004. ISSN 0022-1767.