Fernanda Gonçalves Martello

Hsp60 e imunorregulação: estratégias para identificação
de peptídeos imunorreguladores

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Dra. Verônica Coelho

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Martello, Fernanda Gonçalves

Hsp60 e imunorregulação : estratégias para identificação de peptídeos
imunorreguladores / Fernanda Gonçalves Martello. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imonopatologia.

Orientadora: Verônica Coelho.

Descritores: 1.Chaperonina 60 2.Peptídeos 3.Imunorregulação 4.Expressão gênica

USP/FM/SBD-465/09

Fernanda Gonçalves Martello

Hsp60 e imunorregulação: estratégias para identificação
de peptídeos imunorreguladores

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Verônica Coelho

São Paulo
2009

Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, sempre presentes nos momentos
mais importantes da minha vida...

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente por todos vocês que, de alguma forma, participaram dessa fase importante da minha vida...

Primeiramente, agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos da minha vida. Tenho certeza de que muito do que sou e conquistei, até hoje, devo a vocês. Muito obrigada por tudo!

À Verônica Coelho, minha orientadora, que foi quem me introduziu à Ciência e à prática de “fazer Ciência”. Muito obrigada pelos incentivos, pelas conversas e discussões, pelo constante apoio e pelo crescimento científico que você me proporcionou;

Ao professor Jorge Kalil, que me recebeu em seu laboratório e proporcionou importantes discussões em suas reuniões com os alunos. Obrigada pelas sugestões, pelo incentivo e pela convivência;

Aos demais professores do laboratório, pelas importantes sugestões ao meu trabalho;

A todos os doadores sadios voluntários participantes do projeto, que foram fundamentais para a realização de todo o trabalho;

À Tânia, secretária da pós-graduação, sempre disposta a ajudar nos momentos necessários;

Aos amigos Sandra Maria, Carolzinha e Hernandez, pela amizade, companheirismo e por estarem sempre dispostos a me ajudar em experimentos que requisitavam domínios técnicos que eu não possuo;

À minha querida amiga Evelyn, que acompanhou a maior parte da minha vida dentro do laboratório de Imunologia. Obrigada pelas conversas, pelos almoços, pelos passeios, pelo apoio nos momentos mais tristes e pela presença nos mais felizes! Obrigada pela sua amizade, minha irmã de coração!

À Ruth, minha amiga querida, que, por todos esses anos, se mostrou muito mais do que uma amiga. Você sempre será a minha mãe de coração! Obrigada por tudo.

À Anninha, minha amiga e parceira de projeto. Agradeço por estar sempre disposta a ajudar em tudo! Obrigada pela sua constante alegria e otimismo, pelo seu companheirismo e, até, por compartilhar frustrações. Obrigada pela sua amizade!

À Rose, pelas conversas, risadas e conselhos. Obrigada por tornar tão mais agradável o dia a dia no laboratório. Obrigada pela sua amizade.

A todos os demais amigos do laboratório, Maisa, Hernandez, Sandra Maria, Amanda, Adalberto, Lin, Pedro, Carol Borba, Carolzinha, Nathy, Paty, Maristela, Vanessa, Carol Luque, Georgia, Ana Cláudia, Malu, Selma, Simoninha, Karen..., pelas conversas, risadas e pela convivência tão divertida e agradável;

Aos funcionários da secretaria do laboratório, Jair, Silvano e Sonia, muito obrigada;

Ao restante da minha família, minha irmã, primos e tios, que sempre me apoiaram e me incentivaram durante toda a trajetória do mestrado;

Ao meu namorado Alex, pelo amor, companheirismo e pelo constante apoio. Obrigada por aturar os momentos de estresse e mau humor. Obrigada por me proporcionar tantos momentos alegres e divertidos, que tornaram tão mais fácil a passagem por esse período de conclusão do mestrado. Obrigada por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos! Muito obrigada!

A Deus, por iluminar os meus caminhos e por trazer sempre muita coragem e otimismo em todos os momentos da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Desenho Experimental	30
3.2 Sujeitos de pesquisa	31
3.3 Hsp60	31
3.4 Produção dos peptídeos da Hsp60.....	31
3.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios	32
3.6 Cultura de células mononucleares do sangue com antígenos.....	33
3.7 Obtenção de células T	34
3.8 Determinação da pureza das células T por Facs.....	35
3.9 Análise da expressão de fatores de transcrição por RT-PCR quantitativo (real time PCR)	36
3.9.1 Extração de RNA	36
3.9.2 Quantificação de RNA	36
3.9.3 Transcrição reversa para a obtenção de cDNA.....	37
3.9.4 PCR em tempo real (RT-PCR).....	37
3.9.5 Desenho e padronização dos iniciadores	39
3.9.6 Especificidade e adequação dos iniciadores	39
3.9.7 Critérios de Validação.....	40

3.9.8 Classificação das alterações gênicas	41
3.10 Ensaaios funcionais	42
3.10.1 Detecção de citocinas no sobrenadante das culturas.....	42
3.10.2 Testes de supressão de proliferação	43
3.11 Tipificação de <i>HLA- DR</i> por PCR-SSO	46
3.12 Análise estatística dos dados.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1 Perfil global do efeito da Hsp60 e peptídeos na expressão gênica de moléculas imunológicas reguladoras e pró-inflamatórias (painel REGULA x INFLAMA)	50
4.2 Perfil individual do efeito da Hsp60 e peptídeos na expressão gênica de moléculas REGULA x INFLAMA.....	63
4.3 Análise geral dos peptídeos em relação ao efeito REGULA x INFLAMA ..	70
4.4 Perfil de citocinas induzidas por peptídeos da Hsp60 em PBMC	74
4.5 Relação entre a produção de citocinas e a expressão gênica de moléculas relacionadas	79
4.6 Efeito dos peptídeos N2, N6 e N7 na expressão gênica de moléculas REGULA x INFLAMA em linfócitos T purificados.....	81
4.7 Efeito supressor de peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3 e na resposta alogênica	84
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÕES	117
7. ANEXOS	119
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

APÊNDICES..... 145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de modificações de expressão de Foxp3 induzido pelos estímulos da Hsp60.....	53
Figura 2. Perfil de modificações de expressão de GATA-3 induzido pelos estímulos da Hsp60.....	54
Figura 3. Perfil de modificações de expressão de T-bet induzido pelos estímulos da Hsp60.....	56
Figura 4. Perfil de modificações de expressão de ROR γ t induzido pelos estímulos da Hsp60.....	57
Figura 5. Perfil de modificações de expressão de IL-10 induzido pelos estímulos da Hsp60.....	58
Figura 6. Perfil de modificações de expressão de TGF- β induzido pelos estímulos da Hsp60.....	59
Figura 7. Perfil de modificações de expressão de IFN- γ induzido pelos estímulos da Hsp60.....	60
Figura 8. Perfil de modificações de expressão de IDO induzido pelos estímulos da Hsp60.....	61
Figura 9. Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de condições sem modificação induzidas pela Hsp60 e peptídeos das diferentes regiões	70
Figura 10. Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de condições sem modificação induzidas pelos peptídeos da região N-terminal da Hsp60.....	71
Figura 11. Produção de IFN- γ por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60.....	74
Figura 12. Produção de IL-10 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60.....	75

Figura 13. Produção de TNF- α por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60.....	76
Figura 14. Produção de IL-5 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. 77	
Figura 15. Produção de IL-4 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. 77	
Figura 16. Produção de IL-2 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. 78	
Figura 17. Efeito de peptídeos da Hsp60 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3.....	84
Figura 18. Exemplo de inibição da proliferação induzida por α CD3.	85
Figura 19. Efeito do peptídeo N2 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3: curva dose/ resposta.	86
Figura 20. Efeito do peptídeo N3 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3: curva dose/ resposta	87
Figura 21. Efeito do peptídeo N7 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3: curva dose/ resposta	87
Figura 22. Efeito de peptídeos da Hsp60 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo da MLR	88
Figura 23. Curva de dissociação	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos peptídeos da Hsp60 estudados	32
Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real	40
Tabela 3. Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos estímulos da Hsp60: análise individual	66
Tabela 4. Balanço do efeito REGULA/INFLAMA induzido pelos estímulos da Hsp60.....	73
Tabela 5. Razão IL-10/IFN- γ e IFN- γ /IL10 para os peptídeos da Hsp60.....	78
Tabela 6. Comparação entre a expressão gênica e proteína relacionada	80
Tabela 7. Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos peptídeos N2, N6 e N7: comparação PBMC vs linfócitos T purificados	83
Tabela 8. Efeito inibidor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3.....	84
Tabela 9. Efeito inibidor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3: curva dose/ resposta.....	86
Tabela 10. Efeito inibidor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por MLR.....	88
Tabela 11. Balanço global dos resultados com os principais peptídeos da Hsp60.....	89
Tabela 12. Produção de citocinas basal e induzida pelos peptídeos da Hsp60	123
Tabela 13. Efeito supressor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3.....	125
Tabela 14. Efeito supressor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α -CD3: curva dose/resposta	126

Tabela 15. Efeito supressor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida pela MLR (reação linfocitária mista)..... 127

Tabela 16. Relação entre as moléculas HLA-DR e o predomínio de modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA 130

LISTA DE ABREVIATURAS

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

IL: interleucina

STAT: fator transdutor de sinal e ativador transcrição

Treg: célula T reguladora

Tr1: célula reguladora do tipo 1

Teff: célula T efetora

Th1: célula T auxiliar do tipo 1

Th2: célula T auxiliar do tipo 2

APC: célula apresentadora de antígenos

Hsp: proteína de choque térmico

LPS: lipopolissacarídeo

TLR: receptor do tipo toll

PBMC: células mononucleares de sangue periférico

LT: linfócitos T

RNA: ácido ribonucleico

mRNA: RNA mensageiro

DNA: ácido desoxirribonucleico

cDNA: DNA complementar

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

QR: quantificação relativa

Kb: kilobase

M: molar

ml: mililitro

µg: micrograma

pg: picograma

μl: microlitro

CB: controle basal

CN: controle negativo

MLR: reação linfocitária mista

N: peptídeos derivados da região N-terminal da Hsp60

I: peptídeos derivados da região intermediária da Hsp60

C: peptídeos derivados da região C-terminal da Hsp60

IND: indivíduo

αCD3: anticorpo anti-CD3

RESUMO

As proteínas de choque térmico (Hsp) apresentam importantes funções homeostáticas e podem induzir respostas imunológicas tanto inflamatórias como reguladoras. Por essas propriedades, as Hsp e seus peptídeos têm grande potencial como agentes imunomoduladores. Neste estudo, o nosso objetivo foi identificar peptídeos da Hsp60 com potencial imunorregulador, a partir da análise de sua capacidade de modificar, *in vitro* a expressão de genes imunorreguladores (REGULA) ou inflamatórios (INFLAMA) em células mononucleares do sangue de indivíduos saudáveis. A análise desse painel REGULA/INFLAMA nos mostrou que os principais peptídeos potencialmente imunorreguladores estão presentes na região N-terminal da Hsp60. Selecionamos os 3 peptídeos que mostraram as maiores razões REGULA/INFLAMA (N2, N6 e N7) para serem testados nos demais experimentos. A análise das citocinas induzidas pelos peptídeos nos mostrou que existe correspondência entre a presença do RNA mensageiro e a proteína produzida e, o peptídeo N7 induziu uma alta razão IL-10/IFN- γ . Os peptídeos selecionados interagiram diretamente com linfócitos T purificados, o que mostra que a atividade dos peptídeos da Hsp60 independe de APC. Apesar de diferenças entre o efeito na população celular heterogênea de PBMC e na mais homogênea de linfócitos T, os peptídeos da Hsp60 induziram um predomínio de modificações REGULA com indução sustentada de Foxp3 e GATA-3. Os peptídeos selecionados, N2, N6 e N7, foram capazes de inibir a resposta proliferativa alogeneica (maior inibição: peptídeo N7 – 60,53%) e induzida pelo anticorpo anti-CD3 (maior inibição: peptídeo N2 – 31,01%). A partir desses resultados, concluímos que o nosso painel de expressão gênica REGULA/INFLAMA foi adequado para identificar peptídeos da Hsp60 predominantemente reguladores. Dentre os possíveis mecanismos supressores desses peptídeos, apontamos a ação das citocinas reguladoras IL-10, TGF- β , a inibição de fatores de transcrição próinflamatórios como T-bet e ROR γ t, e a geração de células T reguladoras. O próximo passo, já em andamento no nosso laboratório, será testar esses peptídeos em modelos de transplante e doenças autoimunes visando, no futuro, o seu uso em aplicações terapêuticas na clínica.

Descritores: Chaperonina 60, peptídeos, imunorregulação, expressão gênica

SUMMARY

Heat shock proteins (HSPs) have dual immunologic functional activity inducing both proinflammatory and regulatory responses. These properties place HSPs and their peptides as molecules displaying great potential as immunomodulatory agents. In this study, our goal was to identify potential immunoregulatory Hsp60 peptides, analyzing their capacity to modify the expression of immunoregulatory (REG) or proinflammatory (INFLAMMA) genes in PBMC of healthy individuals. The REG/INFLAMMA gene panel analysis showed that most peptides displaying an immunoregulatory profile belong to the Hsp60 N-terminal region. We selected 3 peptides that showed the highest REG/INFLAMMA ratio (N2, N6 and N7) for functional studies. Cytokine analysis showed good correspondence between messenger RNA and protein production induced by the peptides, and N7 peptide induced high IL-10/IFN- γ ratio. The selected peptides also interacted directly with purified T lymphocytes, indicating an APC-independent activity for Hsp60 peptides. Despite differences between the effect on PBMC and on purified lymphocytes, Hsp60 peptides induced predominantly REG type of gene expression modifications, with the induction of Foxp3 and GATA-3. The selected peptides, N2, N6 and N7, were capable of inhibiting allogeneic proliferation (highest inhibition: N7 peptide – 60,53%) and the proliferation induced by anti-CD3 antibody (highest inhibition: N7 peptide – 31,01%). We concluded that our REG/INFLAMMA gene expression panel was appropriate to identify regulatory Hsp60 peptides. Among their possible suppressive mechanisms, we can point out the action of the regulatory cytokines IL-10 and TGF- β , the inhibition of proinflammatory transcription factors T-bet and ROR γ t and the generation of regulatory T cells. The next step, ongoing in our lab, is to test these peptides in experimental models of allotransplantation and autoimmune diseases, aiming at future therapeutic applications in the clinic.

Descriptors: Chaperonin 60, peptides, immunoregulation, gene expression

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, a palavra imunidade se refere à proteção contra agentes infecciosos e, as células e demais componentes envolvidos na resposta protetora constituem o sistema imune (Abbas *et al.*, 2005). O sistema imune é considerado, hoje, um sistema de homeostase importante, não apenas no combate a agentes infecciosos, mas também na recuperação e cicatrização de tecidos danificados e na vigilância imunológica, atividade importante no controle da expansão de células malformadas ou mutadas, potencialmente tumorais. O sistema imune atua em um delicado equilíbrio entre a tolerância dirigida aos tecidos próprios e a imunidade dirigida a patógenos. Qualquer alteração que leve a uma deficiência na atividade do sistema imune (imunodeficiência) ou a uma atividade excessiva e descontrolada (autoimunidade ou alergias) resulta em desequilíbrio e doenças (revisado por Kyewski e Klein, 2006).

Para fins de estudo, as respostas imunes são classificadas em duas categorias: inata e adaptativa. A imunidade inata é mediada principalmente pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês, *pattern recognition receptors*), que são importantes principalmente no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) e por células sem especificidade antigênica, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos e células NK (do inglês, “*natural killer*” ou “matadoras naturais”). Já a imunidade adaptativa é mediada pelo reconhecimento específico de antígenos pelos linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, e B (Marsh *et al.*, 2002). A

imunidade adaptativa permanece como fundamental na eliminação dos patógenos, principalmente devido à capacidade de gerar células de memória que respondem rapidamente no caso de um segundo contato com o antígeno.

Os linfócitos T e B exibem uma grande diversidade de receptores de antígenos que auxiliam no reconhecimento de uma grande variedade de epitopos. Tal diversidade é gerada a partir de rearranjos aleatórios dos segmentos dos genes que codificam os seus receptores específicos durante a sua diferenciação no timo e na medula óssea, respectivamente (revisado por Mathis e Benoist, 2004). Esse processo aleatório permite a geração de linfócitos que também reconhecem componentes do próprio organismo. Apesar da presença desses linfócitos autorreativos, o sistema imune possui a capacidade de manter um estado de equilíbrio. Os mecanismos celulares e moleculares que controlam a habilidade de gerar uma resposta protetora contra antígenos estranhos derivados de patógenos e, ao mesmo tempo, que evitam uma resposta patológica a tecidos próprios, permanecem objetos de muitas investigações.

O sistema imune apresenta a importante propriedade de contribuir para a homeostase do organismo, sendo capaz de interagir de uma forma não inflamatória ou agressiva com os componentes celulares e moleculares dos tecidos próprios, mantendo um estado chamado de “tolerância imunológica ao próprio”. Tal propriedade é garantida por meio de diversos mecanismos denominados centrais e periféricos. Os mecanismos centrais de tolerância ao próprio, mediados por linfócitos T, ocorrem no timo e

envolvem a seleção negativa (deleção) de timócitos autorreativos que se ligam com grande avides aos antígenos próprios encontrados no timo. O fator de transcrição AIRE (do inglês, *autoimmune regulator* ou regulador de autoimunidade) atua nas células epiteliais medulares do timo (MECs, do inglês, *medullary epithelial cells*) induzindo-as a transcrever um grande número de genes codificadores de proteínas consideradas tecido-específicas. Esse processo garante a expressão de variados antígenos próprios tecido-específicos no interior do timo e a deleção de diversos linfócitos T autorreativos. Ocorre também a seleção positiva de outros linfócitos T que reconhecem esses antígenos com uma menor avides (Anderson *et al.*, 2005). Assim, tal depleção não é total, de forma que células autorreativas escapam para a periferia (Mathis e Benoist, 2004). Esse processo de deleção parcial leva-nos a pensar sobre a possível importância da interação, e não apenas deleção, de células autorreativas com os antígenos próprios no timo para a manutenção da tolerância imunológica. Em diversos estudos foi comprovado que linfócitos T autorreativos escapam do processo de deleção clonal no timo, quando a apresentação do epitopo pelo complexo MHC é baixa, por um processo denominado *tuning* (Anderton e Wraith, 2002). Parece, portanto, importante a existência de outros mecanismos que evitam o desenvolvimento de doenças autoimunes.

Os mecanismos de tolerância periférica envolvem eventos que podem ocorrer simultaneamente ou não. Alguns exemplos de mecanismos são: anergia, que consiste na incapacidade de proliferação devido à falta de sinais coestimulatórios, como aqueles mediados pelas moléculas da família

B7, após o encontro do antígeno, ou ativação excessiva do sinal supressor pela molécula CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen – 4*) (Anderton *et al.*, 2001); "morte do linfócito por negligência" que ocorre quando os linfócitos são privados de estímulo de sobrevivência, como coestimuladores e citocinas, ou ainda por perda da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Van Parijs *et al.*, 1996); ignorância da célula T, quando o linfócito não encontra o antígeno ligante (Miller *et al.*, 1993); morte do linfócito por apoptose pela ligação da molécula Fas ao seu ligante, importante para controlar a intensidade da resposta imune, e indução de células T reguladoras.

As células T com atividade reguladora começaram a ser estudadas por volta da década de 70, quando pesquisadores buscavam identificar marcadores relacionados à atividade supressora da resposta imune. Essas células foram inicialmente denominadas "células supressoras". Porém, o seu estudo caiu em descrédito durante a década de 80 devido à dificuldade de caracterizá-las com precisão, retornando nos anos 90. Atualmente, utiliza-se o termo "célula reguladora" e, de todos os tipos celulares com atividade supressora já descritos, como Th2, Tr1, CD8⁺CD28⁻, NKT (do inglês, *natural killers T cells*), células T $\gamma\delta$ e linfócitos T CD4⁺CD25⁺ (Jonuleit e Schmitt, 2003), os últimos constituem a população mais profundamente caracterizada, tendo sido mostrada exercendo importante supressão em uma diversidade de respostas imunes. As células T reguladoras naturais CD4⁺CD25⁺ foram primeiramente descritas após a observação de um grupo de células T que atuavam na inibição da proliferação de outras células T,

pela secreção de TGF- β (fator de crescimento transformador β , do inglês, *Transforming Growth Factor β*) (Sakaguchi *et al.*, 1995). As células T CD4⁺CD25⁺ são, em sua maioria, produzidas naturalmente pelo timo como uma subpopulação de células T madura e distinta que persiste na periferia com função reguladora estável. Porém, essas células também podem ser geradas na periferia, após estimulação imunológica (revisado por Sakaguchi, 2004). A identificação de condições e fatores, capazes de induzir essas células Tregs na periferia, pode ser útil para o uso em contextos clínicos nos quais a sua ação supressora é deficiente ou precisa ser suplementada, como em condições de autoimunidade patológica ou na resposta agressiva ao aloenxerto.

As células T supressoras CD4⁺CD25⁺ ou Tregs naturais têm papel ativo no estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica a tecidos próprios e no controle negativo de várias respostas imunes a antígenos exógenos. A sua deficiência congênita leva a doenças autoimunes graves e alergias (Gambineri *et al.*, 2003). Dessa forma, a sua existência como uma população fenotipicamente distinta as torna um relevante alvo para a descoberta de estratégias visando o tratamento ou a prevenção de doenças imunológicas e o controle de distúrbios patológicos da resposta imune. Como exemplo, podemos citar que as células T CD4⁺CD25⁺ de pacientes acometidos por doenças autoimunes, como tireoidite e psoríase, apresentaram menor capacidade imunorreguladora ao serem comparadas a células de indivíduos saudáveis. Já foi observado também que, apesar das células Tregs estarem presentes na mesma frequência em indivíduos saudáveis

e em pacientes com esclerose múltipla, nos pacientes, as Tregs apresentaram menor atividade supressora (Fehérvári e Sakaguchi, 2004). Em outro trabalho, mostrou-se que a cotransferência de células T $CD4^+CD25^+$ previniu o desenvolvimento de doenças autoimunes induzidas experimentalmente (Read *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 1995; Salomon *et al.*, 2000). Esses estudos ressaltam a importância desse tipo celular no controle da autoimunidade patológica. Em outro trabalho recente, foi mostrado que o desenvolvimento de gastrite autoimune, em animais que passaram por timectomia neonatal, não é devido à ausência de células Tregs, mas ao aumento da população de células T efectoras e, esses animais apresentaram frequência normal de células Treg (Monteiro *et al.*, 2008).

A doença humana IPEX (do inglês, *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) é uma síndrome de imunodeficiência ligada ao cromossomo X associada a doenças autoimunes em múltiplos órgãos, dermatite atópica e infecções fatais (Gambineri *et al.*, 2003). A linhagem de camundongo “*Scurfy*” exibe uma linfoproliferação fatal ligada ao cromossomo X, caracterizada pelo acometimento de múltiplos órgãos, muito similar à doença humana IPEX. O gene cuja deficiência causa esta doença, o *FOXP3* (do inglês, *Forkhead Box P3*), codifica uma família de proteínas relacionadas à repressão de transcrição, denominada escurfina (Brunkow *et al.*, 2001). As grandes similaridades observadas na mutação no *FOXP3* e na depleção de células Tregs levou diversos grupos a investigar a relação existente entre o gene e o desenvolvimento e funções das células Tregs. Em experimentos realizados em modelos animais mostrou-se que o

RNA mensageiro do *FOXP3* e a proteína escurfina são especificamente expressos em células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ (Khattari *et al.*, 2003). Além disso, através de um estudo com camundongos machos hemizigotos *FOXP3*⁻, Fontenot *et al.* (2003) mostraram que a falta do gene *FOXP3* provoca ausência de células T reguladoras $CD4^+CD25^+$. Nesse mesmo estudo, foi também mostrado que a transferência de células $CD4^+CD25^+$ retiradas de um animal sadio resgatou a deficiência em *FOXP3* e, ainda, a expressão ectópica do gene conferiu função supressora a células $CD4^+CD25^-$, previamente sem atividade supressora.

As células Tregs parecem ser capazes de suprimir uma grande variedade de células da resposta imune inata e adaptativa (Maloy *et al.*, 2003, Cederbom *et al.*, 2000) e, os mecanismos de supressão requerem contato celular ou podem ser mediados por fatores solúveis, uma vez que, em experimentos, *in vivo*, foi demonstrada a importância das citocinas IL-10 e TGF- β (Fehérvári e Sakaguchi, 2004). As células Tregs podem também ser geradas na periferia (Kawahata *et al.*, 2002). Neste trabalho, foi mostrado que o seu desenvolvimento pode ocorrer sob condições de ativação específicas e, isso pode ser medido pela expressão de *FOXP3* e pela ação supressora.

Bettelli *et al.* (2005) observaram que o *FOXP3* está também associado aos fatores de transcrição NFAT (Fator nuclear de ativação de células T, do inglês, *Nuclear factor of activated T-cells*) e NF- κ B (fator nuclear kappa B, do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*), de forma que bloqueia as suas habilidades de induzir a expressão endógena de genes alvo,

inclusive genes chave de citocinas. Neste estudo, foi mostrado que células T retiradas do animal *Scurfy* apresentam um grande aumento na atividade desses fatores de transcrição em relação ao animal selvagem e, o acréscimo de FOXP3 mostrou baixar tal atividade a níveis fisiológicos. Além disso, os mesmos pesquisadores observaram que o FOXP3 atua na supressão das funções efectoras de células T autorreativas e de células T auxiliares. Portanto, o FOXP3 atua, não somente no desenvolvimento de células Tregs, mas parece ter um papel importante na regulação da resposta de células T efectoras (Teff).

O FOXP3 é, então, um importante fator de transcrição, indispensável para a geração das células Tregs naturais. Mais recentemente, foi constatado que é necessária expressão alta e contínua de FOXP3 para a manutenção do fenótipo e função reguladora (Wan e Flavell, 2007). Além disso, em outro estudo mostrou-se que células FOXP3⁺ naturais de camundongos apresentam a capacidade de diminuir a expressão de FOXP3 e se diferenciar em células efectoras produtoras de IL-17 (Th17) sob a influência de IL-6 e TGF- β autócrino (Yang *et al.*, 2008). A partir desses dados, Komatsu *et al.* (2009) realizaram um estudo no qual foi mostrada a existência de duas populações de células T reguladoras FOXP3⁺ naturais, sendo uma linhagem de células Tregs comprometida e a outra, uma população menor que retém plasticidade e pode perder o fenótipo regulador, assumindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Assim, citocinas proinflamatórias, como a IL-6, podem apresentar um papel importante na perda das características de Tregs por essa população plástica descrita por

Komatsu *et al.* (2009). Salientamos a necessidade de cautela ao relacionar diretamente o aumento da expressão de FOXP3 à presença de células Tregs com atividade supressora.

Inicialmente, acreditava-se que a expressão de FOXP3 ocorria exclusivamente em células Tregs naturais. Entretanto, hoje é sabido que outros tipos celulares, como células Tr1 (do inglês, *type 1 regulatory T cells*) podem expressar FOXP3 e, mesmo as células T efetoras também podem expressar FOXP3 de forma transitória após ativação via TCR (Mantel *et al.*, 2006). A atividade de FOXP3, neste contexto, é pouco compreendida e é muito provável que não esteja relacionada com atividade supressora. Passerini *et al.* (2008) verificaram que a expressão de FOXP3 está diretamente relacionada à ativação do STAT5 (fator transdutor de sinal e ativador da transcrição 5, do inglês, *signal transducer and activator of transcription 5*) e, tal ativação mostrou ser importante para sustentar a expressão de FOXP3 tanto em Teff como Tregs. A expressão alta e estável desse fator de transcrição já mostrou estar relacionada à indução de atividade supressora em células previamente com atividade efetora e, adicionalmente, a expressão ectópica e estável de FOXP3, induzida por um vetor viral, foi capaz de converter células Teff em Tregs (Allan *et al.*, 2008). A partir da análise desses dados da literatura pode-se sugerir que os mesmos mecanismos sejam responsáveis pela estabilidade da expressão de FOXP3 em ambos tipos celulares, Tregs e Teff. Tal evento pode ser iniciado por citocinas que sinalizam por STAT5, como IL-2, IL-7 e IL-15. Porém, a

expressão transitória desse fator de transcrição após ativação celular continua sendo muito pouco compreendida.

Outros tipos de células reguladoras já mostraram grande importância na tolerância periférica como, por exemplo, as células Tr1 produtoras de IL-10 as quais são geradas na periferia, após o seu encontro com o antígeno, na presença dessa citocina (Levings *et al.*, 2005a). Esse tipo celular não apresenta expressão constitutiva de FOXP3, mas pode ter sua expressão induzida após ativação, atingindo o nível observado nas células Teff ativadas, que expressam esse fator de transcrição temporariamente (Levings *et al.*, 2005b). Porém, as células Tr1 parecem suprimir as respostas inflamatórias de células Teff independentemente da expressão de FOXP3, o que foi sugerido em um estudo com pacientes transplantados, em estado de tolerância (revisado por Roncarolo e Gregori, 2008). Nesse trabalho, células Tr1 FOXP3⁻ foram isoladas dos pacientes e, a sua atividade supressora foi atribuída à secreção de grandes quantidades de IL-10. Além disso, dados desse mesmo grupo permitiram verificar que as células Tr1 podem se diferenciar, *in vitro*, a partir de células T de pacientes acometidos por IPEX, que não apresentam FOXP3, o que evidencia a sua capacidade de suprimir, *in vitro*, respostas de células T, independentemente da presença desse fator de transcrição (revisado por Roncarolo e Gregori, 2008). Entretanto, foi mostrado por outro grupo que o silenciamento da expressão de FOXP3 resulta em um deslocamento de Tr1 para um fenótipo semelhante a Th2, com perda de atividade supressora *in vitro* (Veldman *et al.*, 2006). Esses resultados se contrapõem ao do grupo anterior, e apontam a possível

necessidade de FOXP3 para a atividade supressora Tr1, *in vitro*. Analisando todos esses dados da literatura, verificamos que aumentos da expressão de IL-10 podem estar diretamente relacionadas à atividade das células Tr1. Assim, mesmo na ausência de indução de FOXP3, um aumento da expressão da IL-10 pode constituir um indício de resposta reguladora.

Sabe-se que a diferenciação em células Tregs ocorre na presença de TGF- β , a partir da ativação do fator de transcrição FOXP3 (Chen *et al.*, 2003). A ativação de células T CD4⁺ *naïve* desencadeia a ativação de fatores de transcrição que direcionam o comprometimento de linhagem celular. Na presença de citocinas como IL-12 e IFN- γ ocorre a ativação do fator de transcrição T-bet e a inativação de GATA-3, levando à diferenciação de linfócitos Th1 (Usui *et al.*, 2006). Na presença de IL-4, ocorre o inverso e a diferenciação de linfócitos Th2 (Nasta *et al.*, 2006). Além desses três tipos de populações de células T, pode ocorrer também a diferenciação em Th17, na presença de citocinas como TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-21 (Leonard *et al.*, 2005).

A diferenciação Th1 envolve não somente a ativação de T-bet, mas também do STAT4 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 4* ou transdutor de sinal e ativador de transcrição 4). Esse fator de transcrição foi recentemente relacionado à manutenção das células Th17, o que foi estudado em um contexto de inflamação alérgica de vias aéreas (Furuta *et al.*, 2008). Wei *et al.* (2007) mostraram que as citocinas polarizadoras Th1/Th2 interferem na indução periférica de células T reguladoras FOXP3⁺. Neste trabalho, foi mostrado que tal evento parece

estar diretamente relacionado com a ativação dos fatores T-bet e GATA-3, uma vez que a ativação de qualquer dos dois levava à perda do potencial de diferenciação em Tregs FOXP3⁺ na periferia.

As células Th17 apresentam um papel importante na defesa contra patógenos extracelulares e estão envolvidas na patogênese de doenças autoimunes graves em diversos modelos animais (Weaver *et al.*, 2007). O comprometimento celular em Th17 se opõe ao desenvolvimento células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺, mas ambos ocorrem na presença de TGF- β . O TGF- β sozinho ativa o fator de transcrição FOXP3 e culmina na diferenciação em Tregs. Quando, além de TGF- β , existem no meio citocinas como IL-6, IL-21 e IL-23, ocorre a ativação do fator ROR γ t relacionado à diferenciação em Th17 (revisado por Bettelli *et al.*, 2007). Há um estudo no qual foi mostrado que a expressão induzida de FOXP3 suprime a expressão de IL-17A em células de uma linhagem tumoral e esse evento foi posteriormente relacionado à descoberta de que o FOXP3 interage fisicamente com o ROR γ t, suprimindo a sua atividade sobre a indução de expressão de IL-17A (Ichiyama *et al.*, 2008). Entretanto, também existem dados mostrando que na presença de sinais de citocinas próinflamatórias, como IL-6, a função do FOXP3 é inibida e ocorre a indução da via de diferenciação Th17 (Ziegler *et al.*, 2009). Além disso, em outro estudo recente, foi descrita uma população de células Tregs FOXP3⁺, que expressa ROR γ t e produz de IL-17, sem perda da atividade supressora (Voo *et al.*, 2009). Todos esses dados nos mostram que, para uma abordagem

terapêutica com Tregs, deve-se considerar a possível interferência da via Th17.

A importância da IL-21 na diferenciação Th17 é um achado muito recente (Zhou *et al.*, 2007). Foi proposto que a IL-6, IL-21 e IL-23 teriam papéis sequenciais na diferenciação das células Th17 de forma que a IL-23 estaria mais relacionada com a manutenção desse tipo celular na periferia (Volpe *et al.*, 2008). A IL-23 pode também atuar no controle negativo da indução de células Tregs, mas os mecanismos de ação para tal ainda não foram esclarecidos (Izcue *et al.*, 2008).

Em outro trabalho é apontada a importância do ácido retinóico, um metabólito da vitamina A, na regulação das respostas imunes dependentes de TGF- β , de forma que tal substância teria um importante papel no equilíbrio entre as respostas imunes inflamatórias e antiinflamatórias (Mucida *et al.*, 2007). O ácido retinóico atua inibindo a indução de células Th17 por IL-6 e, ao mesmo tempo, promovendo a diferenciação de células Tregs (Mucida *et al.*, 2007).

Outra molécula importante para a regulação do sistema imune é a enzima de degradação do triptofano IDO (do inglês, *indoleamine 2,3-dioxygenase*) que pode atuar como um potente fator de imunossupressão e indução de tolerância em determinadas circunstâncias. Essa enzima foi descrita como expressa por células dendríticas (Hwu *et al.*, 2000) e já se sabe que outros tipos celulares, como células epiteliais do pulmão (Hayashi *et al.*, 2001) e intestino (Barcelo-Batllori *et al.*, 2002), também expressam IDO. Já foi mostrado que a IDO endógena é um dos fatores que atuam no

auxílio da manutenção da tolerância materno-fetal (Munn *et al.*, 1998), além de regular negativamente o processo inflamatório de diversas doenças autoimunes experimentais (Grohmann *et al.*, 2003; Kwidzinski *et al.*, 2005). Porém, vale destacar que o camundongo mutante para o gene codificador da enzima IDO não desenvolve autoimunidade patológica espontânea, mostrando que sua ação não é imprescindível no controle da tolerância ao próprio (Grohmann *et al.*, 2003). Uyttenhove *et al.* (2003) mostraram que a expressão aumentada da IDO pode ser altamente imunossupressora, de forma que células tumorais murinas com alta expressão dessa enzima adquiriram a habilidade de crescer e levar o hospedeiro à morte, mesmo utilizando animal previamente imunizado e resistente ao tumor. Em diversos outros estudos foi descrita a participação da IDO na manutenção da tolerância encontrada no microambiente tumoral (Uyttenhove *et al.*, 2003; Munn *et al.*, 2004; revisado por Katz *et al.*, 2008). A sua expressão foi mostrada tanto nos linfonodos drenantes como no próprio tumor, de forma que o aumento de sua expressão estava sempre relacionado à piora do quadro de câncer (Okamoto *et al.*, 2005).

Como consequência da resposta inflamatória, em tecidos funcionalmente normais, ocorre o aumento da expressão da IDO. Sabe-se que um dos mecanismos para a sua indução é pelo aumento da produção de IFN- γ (Koide e Yoshida, 1994), uma citocina classicamente inflamatória, mas também existem outras vias de indução da enzima, independentes desta citocina (Jung *et al.*, 2007). As relações observadas entre a inflamação e o aumento de expressão de IDO mostram que alterações bioquímicas

provocadas por sua atividade devem, de alguma forma, afetar funções moleculares e celulares envolvidas no processo inflamatório. Existe uma hipótese, sobre o mecanismo envolvido na atividade da IDO sobre as células T, denominada “hipótese de depleção do triptofano”. Nesta hipótese sugere-se que a IDO atuaria na redução do acesso ao triptofano livre, o que, por sua vez, resultaria na inibição da atuação das células T e/ou na diminuição da viabilidade dessas células após ativação imune (Mellor, 2005). Outra hipótese é que metabólitos produzidos pela IDO, juntamente com aqueles produzidos pelas APCs, atuariam inibindo a proliferação de células T, promovendo morte celular e exercendo diferentes efeitos na resposta de células T auxiliares por alteração no equilíbrio Th1/Th2 (Terness *et al.*, 2005). O bloqueio da IDO já mostrou estar relacionado à piora do processo inflamatório e, isso ressalta a sua importância na regulação da resposta imune em um organismo sadio (Munn, 2006).

Recentemente, Sharma *et al.* (2007) mostraram que a IDO pode apresentar um papel importante na ação supressora de células Tregs ativadas por células dendríticas plasmocitóides que expressam a enzima. Nesse contexto, a presença de IDO seria importante apenas no momento da ativação e diferenciação das células Tregs, uma vez que a transferência dessas células, após ativação, para um animal IDO-KO, não afetou a sua capacidade de suprimir a proliferação de células Teff.

Apesar da existência de diversos mecanismos de tolerância ao próprio, a autoimunidade patológica, caracterizada pelas doenças autoimunes, é uma realidade já muito estudada por diversos pesquisadores.

Tal distúrbio do sistema imune resulta de uma falha ou interrupção dos mecanismos responsáveis pela manutenção da tolerância em linfócitos B, T ou ambos. Cabe salientar que todos os indivíduos apresentam potencial para o desenvolvimento de doenças autoimunes, já que todos possuem um repertório de células autorreativas circulantes, potencialmente patológicas. Dentre os fatores envolvidos nessa perda da tolerância ao próprio, podem ser mencionados a susceptibilidade genética e os fatores ambientais, como as infecções, por meio do mimetismo molecular, e a reatividade cruzada de células com atividade inflamatória, capazes de reconhecer simultaneamente antígenos de microorganismos e antígenos próprios (Abbas *et al.*, 2005).

O mimetismo molecular ocorre quando a resposta dirigida a antígenos de microorganismos provoca a ativação de linfócitos T autorreativos com atividade pró-inflamatória. Isso pode ocorrer quando existe identidade de sequência estrutural ou conformacional entre o autoantígeno e peptídeos do patógeno. Diversos pesquisadores estudam a sua importância em contextos de autoimunidade patológica e, em nosso laboratório, o mimetismo molecular é estudado no contexto da doença reumática cardíaca, em relação à proteína M do estreptococos e o tecido cardíaco (Guilherme *et al.*, 1995) e na cardiomiopatia chagásica, em relação ao antígeno imunodominante B13 do *Trypanosoma cruzi* e a miosina do tecido cardíaco (Cunha-Neto *et al.*, 1996). No entanto, cabe ressaltar que a reatividade cruzada também é a base do funcionamento do sistema imune e, o mimetismo molecular não é necessário e suficiente para desencadear a doença autoimune. Certamente, outros fatores devem atuar em conjunto.

É possível compreender o surgimento de eventos relacionados à autoimunidade patológica ao pensarmos na seleção clonal, mencionada anteriormente, e na perda de tolerância ao próprio, uma vez que todos indivíduos sadios apresentam células autorreativas presentes na periferia. Porém, como podemos explicar a presença de células T autorreativas, com média ou alta avides pelo antígeno, em indivíduos sadios, como foi mostrado por Danke *et al.* (2004)?

Algumas proteínas próprias exibem alto reconhecimento pelo sistema imune inclusive em indivíduos sadios. As Hsps (do inglês, *heat shock proteins* ou proteínas de choque térmico) são uma família dessas proteínas. Sabe-se que tais proteínas são muito imunogênicas e o seu reconhecimento já foi relacionado ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Gupta, 1995). Tal observação gerou a seguinte pergunta: uma vez que a imunidade a moléculas da Hsp60 pode estar envolvida em doenças autoimunes, como a imunidade natural a esses antígenos também existe em indivíduos sadios? A partir da observação de que existem diversos antígenos próprios reconhecidos pelo sistema imune de indivíduos sadios, Cohen e Young (1991) elaboraram a teoria do “homúnculo imunológico”, na qual propõem a existência de determinados autoantígenos dominantes cujo reconhecimento seria importante para a própria manutenção da homeostase do organismo. A dominância de poucos antígenos selecionados faria com que o sistema imune “ignorasse” a presença de muitas outras moléculas próprias competidoras, desenvolvendo tolerância a esses antígenos “recessivos” passivamente. As proteínas de choque térmico seriam, então, um desses

antígenos dominantes, o que, dentro da teoria do “homúnculo imunológico”, explicaria o seu alto reconhecimento em indivíduos saudáveis.

As Hsps são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas nas células de todos os eucariotos e procariotos. São proteínas altamente conservadas durante a evolução. As Hsps são assim chamadas por terem sido descritas, primeiramente, a partir de genes que se alteravam em resposta ao aumento da temperatura durante a incubação de larvas de *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1964).

Além de apresentarem um importante papel como chaperonas, essas proteínas são expressas em células expostas a estresse, como aumento de temperatura, deficiência nutricional, exposição a mediadores da inflamação, estresse oxidativo, tratamento com drogas antiinflamatórias e infecção viral (Morimoto *et al.*, 1998). As Hsps são classificadas, de acordo com o peso molecular, nas seguintes famílias principais: Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100, além do grupo das Hsp pequenas (Van Eden *et al.*, 2005).

As Hsps são principalmente encontradas no citosol, já que elas não contêm sequências requeridas para a expressão na superfície celular. Porém, em muitos estudos já se mostrou que moléculas de Hsps podem aparecer na superfície de células normais e transformadas (Hirsh *et al.*, 2006; Ferrarini *et al.*, 1992) ou ainda podem ser externalizadas por células durante a transformação apoptótica (Didelot *et al.*, 2006). As funções das Hsps na superfície celular são pouco entendidas e, sugere-se que possam servir como marcadores de superfície envolvidos na comunicação intercelular ou, ainda, atuar na estabilização da membrana plasmática

quando danificada por toxinas ou metabólitos de estresse gerados em resposta a infecções ou inflamações (revisado por Hirsh e Junger, 2008). Grandes quantidades de Hsp60 na superfície celular podem servir como sinal de perigo para o sistema imune, levando à ativação e maturação de células dendríticas e à geração de resposta T anti-tumoral (Feng *et al.*, 2002). A Hsp60 pode ainda ser encontrada no meio extracelular, na forma solúvel, como resultado da morte celular e extravasamento do seu conteúdo citosólico. Sabe-se também que a Hsp60 humana pode desencadear apoptose por meio da ativação da cascata da caspase, através da associação entre o complexo Hsp60/Hsp10 e a pro-caspase-3 dentro da mitocôndria, resultando na liberação da Hsp60 no citoplasma (Samali *et al.*, 1999). Discute-se que existem outros mecanismos para a sua secreção, mas ainda são pouco compreendidos (Gupta *et al.*, 2007).

Em muitos estudos, ao longo dos anos, tem sido mostrada a Hsp60 como potente ativador do sistema imune, seja por sua capacidade de indução da produção de citocinas próinflamatórias por monócitos, macrófagos e células dendríticas, ou pela capacidade de induzir aumento da expressão de moléculas coestimuladoras (Flohe *et al.*, 2003). Já foi sugerido que a indução de citocinas pró-inflamatórias pela Hsp60 e Hsp70 possa contribuir com a patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamações crônicas, como diabetes tipo 1, aterosclerose e artrite crônica juvenil (Pockley, 2003). Foi proposto que essas proteínas de choque térmico possam servir como um “sinal de perigo” para a resposta imune inata no local e onde ocorreu o dano tecidual (Chen *et al.*, 1999).

Flohe *et al.* (2003) observaram que a Hsp60 possui a capacidade de induzir a secreção de TNF- α e óxido nítrico por macrófagos humanos, assim como IL-12 e IL-15, além de provocar aumento das moléculas coestimuladoras CD86 e CD40, como descrito em uma linhagem de macrófagos murinos. Nesse mesmo trabalho, foi observado aumento da maturação de células dendríticas imaturas e da capacidade de apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs). Em outro trabalho, mostrou-se que a Hsp60 é capaz de se ligar especificamente a neutrófilos humanos e murinos, aumentando a sua atividade fagocítica e sensibilizando-os para estímulo de suas funções efectoras por um estímulo secundário (Osterloh *et al.*, 2009).

Além disso, em outros estudos já foi mostrado que a Hsp60 interage com monócitos, macrófagos e células dendríticas e que induz a secreção de IL-6 (Kol *et al.*, 2000). Esse estudo não é muito recente, mas certamente não foi dada a devida importância ao dado encontrado, já que, no período em que o trabalho foi desenvolvido, não era conhecida a população celular Th17, assim como a sua importância para respostas imunes inflamatórias. Cabe lembrar que a IL-6 está diretamente relacionada com o desenvolvimento das células Th17 e que esse tipo celular parece estar envolvido na patogênese em diversos modelos de doenças autoimunes graves (revisado por Basso *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que, inicialmente, os estudos não davam grande importância à contaminação da Hsp60 recombinante por LPS (lipopolissacarídeo) proveniente das bactérias usadas para a produção de

proteínas recombinantes. Atualmente, sabe-se que a Hsp60 apresenta, em sua forma tridimensional, espaços onde o LPS pode se ligar intimamente, tornando o processo purificação da proteína muito difícil (Habich *et al.*, 2005). Não se sabe ao certo o nível de contaminação considerado aceitável para a validação de resultados experimentais relacionados aos efeitos causados pela Hsp60 (Tsan e Gao, 2004). Portanto, ainda é necessário ter muita cautela ao considerar dados que possam ser decorrentes de tal contaminação.

Já foi mostrado também que membros da super família da Hsp70, como a própria Hsp70, Hsp110 e gp170, apresentam potencial para o uso em abordagens relacionadas ao tratamento de câncer, pelas habilidades de chaperona dessas proteínas, que agem nos antígenos tumorais intracelulares favorecendo, assim, a sua apresentação cruzada para APCs (Park *et al.*, 2006).

Em contrapartida, ao longo dos anos, tem havido um acúmulo de dados nos quais é sugerido que a reatividade de células T específicas para Hsp próprias ter um papel na manutenção da tolerância ao próprio nos indivíduos saudáveis. Foi mostrado que a mesma proteína tem aparente papel na regulação da inflamação em modelos de diabetes tipo 1 (Abulafia-Lapid *et al.*, 2003) e artrite (Prakken *et al.*, 2003). Em um trabalho anterior do nosso grupo foi observado que as proteínas Hsp60 e Hsp70 induzem baixa frequência de produção de IFN- γ e IL-4 por células mononucleares periféricas de indivíduos transplantados renais (Granja, 2000). Nesse estudo mostrou-se que a reatividade proliferativa *in vitro* a essas duas proteínas de

choque térmico estava associada com o processo de rejeição e, em contraste, a resposta à Hsp60, com produção de IL-4, foi também associada com a ausência de rejeição. Esses dados sugerem a existência de populações autorreativas à Hsp60 pró-inflamatórias e imunorreguladoras (Granja *et al.*, 2004).

Zanin-Zhorov *et al.* (2003 e 2005a) mostraram que o tratamento com Hsp60 humana parece induzir *in vitro* a adesão de células T humanas à fibronectina, além de diminuir a secreção de IFN- γ e TNF- α e aumentar a de IL-10 por células T humanas ativadas *in vitro*. Os mesmos pesquisadores mostraram, em modelo murino, que o tratamento com Hsp60 foi também capaz de inibir a migração de células T e sua ação na inflamação. O receptor TLR 2 (do inglês, *toll-like receptor*) mostrou importante participação nessa ativação. Zanin-Zhorov *et al.* (2005b) mostraram que o tratamento com Hsp60 humana inibe T-bet e aumenta a expressão de GATA-3 em células T humanas via TLR 2, mostrando que a Hsp60 pode provocar um desvio Th2, via resposta inata.

Cohen-Sfady *et al.* (2005) estudando a ação da Hsp60 humana em células B, observaram que a proteína solúvel é capaz de induzir a sua proliferação e o aumento de MHCII e de moléculas coestimuladoras e de ativação, como CD86, CD40 e CD69, mostrando, assim, efeito potencialmente inflamatório. No entanto, neste mesmo estudo foi também observado um potencial efeito imunorregulador da Hsp60 sobre essas células, evidenciado pela indução da secreção de quantidades significativas de IL-10 e IL-6. Em outro trabalho, foi mostrado que a Hsp60 protege as

células B de apoptose espontânea e induzida e, esse efeito foi atribuído ao aumento da expressão de moléculas anti-apoptóticas e à diminuição da ativação de caspases (Cohen-Sfady *et al.*, 2009). Diferentemente das células T, a ativação de células B pela Hsp60 mostrou-se associada ao TLR 4, dependentemente do adaptador MyD88 (Cohen-Sfady *et al.*, 2005).

Além desses achados, a Hsp60 já foi relacionada ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, de forma que a sua expressão estava aumentada em casos de câncer de mama (Bini, *et al.*, 1997), de intestino grosso (Cappello *et al.*, 2005b), brônquios (Cappello *et al.*, 2005a), ovário (Schneidér *et al.*, 1999), próstata (Cappello *et al.*, 2003) e câncer cervical (Hwang *et al.*, 2009). Nesse contexto, a Hsp60 poderia contribuir nos mecanismos de evasão que levam à progressão da doença.

Considerando-se que o reconhecimento de antígenos é direcionado a regiões ou epitopos de uma proteína, em estudos mais atuais procurou-se mapear regiões da Hsp60 potencialmente mais importantes no reconhecimento relacionado à sua atividade reguladora. O peptídeo p277 é composto por vinte e quatro aminoácidos da sequência da Hsp60 humana, apresentando dois resíduos de cisteína da sequência nativa substituídos por valinas (Elias e Cohen, 1994). Raz *et al.* (2001) mostraram, em um estudo randomizado duplo-cego de fase 2, que a administração do p277 levou a melhoras importantes no estado clínico de pacientes diabéticos, que tiveram necessidade de menores quantidades de insulina do que o grupo placebo. Esse peptídeo também já está sendo utilizado em um estudo de fase 3, mostrando resultados promissores (Huurman *et al.*, 2008). Além disso, em

outro estudo no qual foi adotada outra abordagem, mostrou-se que a aplicação de subunidades contendo repetições em tandem do peptídeo p277 pode ser eficaz em vacinas contra diabetes autoimune em camundongo NOD (Jin *et al.*, 2008).

Nussbaum *et al.* (2006) mostraram que o p277 é capaz de ativar a adesão de célula T humanas à fibronectina, sendo tal evento dependente de $\beta 1$ integrinas e TLR 2. Os mesmos pesquisadores também observaram o peptídeo atuando na inibição de quimiotaxia de células de camundongo *in vitro*, além de diminuir mortalidade por diabetes. O recrutamento de células T do sangue para um órgão alvo requer ambos, adesão e quimiotaxia. Apenas um desses eventos não basta, de forma que a habilidade do p277 de inibir quimiotaxia consiste em uma explicação razoável para a inibição da transferência de diabetes observada em modelo animal após a adição do peptídeo solúvel. Cabe salientar que a adesão e a quimiotaxia de células T são eventos críticos para o desenvolvimento de doenças autoimunes em animais e humanos. Embora a Hsp60 já tenha se mostrado capaz de ativar macrófagos via TLR 4, tal ativação não foi observada com o uso do p277.

O nosso grupo vem estudando um conjunto de 18 peptídeos da Hsp60, que cobrem aproximadamente 50% de sua extensão. Nossos estudos permitiram o mapeamento de peptídeos da Hsp60 capazes de induzir uma alta frequência de células mononucleares periféricas humanas produtoras de IL-10, partindo da hipótese de que células reativas à Hsp60 podem participar da regulação negativa da resposta alogeneica. Tais peptídeos estão contidos na região N-terminal (peptídeo N3 e N4) e na

região C-terminal (C4). Um peptídeo contido na região intermediária da proteína (I9) também induziu uma produção de IL-10 significativamente maior nas células de indivíduos transplantados renais, obtidas no pós-transplante, quando comparados aos indivíduos saudáveis (Caldas, 2005). Além disso, mais recentemente, foi observado que um peptídeo da região N-terminal da Hsp60 (N7) induziu alterações de expressão gênica predominantemente imunorreguladoras em linfócitos T, via a sua ação em células dendríticas imaturas (Socorro-Silva, 2007). Não se sabe ainda se os peptídeos interagem com receptores da resposta inata, da adaptativa, ou com ambos.

Em outro trabalho foi investigado o efeito da proteína em células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. Foi observado que a depleção desse tipo celular abrandava os efeitos inibitórios provocados pela presença da Hsp60 e, quando tratadas com a proteína, as células Tregs regulam a secreção de citocinas por células T CD8⁺ e induzem a secreção de IL-10 por células CD4⁺CD25⁺ (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006). Investigando também o efeito direto da Hsp60 em células CD4⁺CD25⁺, foi observado um aumento da secreção de IL-10 e TGF- β . O efeito da Hsp60 nas células T reguladoras, da mesma forma que em células T, mostrou-se associado à sinalização por TLR 2 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006).

A observação de que proteínas de estresse, como as Hsps 60 e 70, estão presentes na circulação periférica de indivíduos saudáveis em níveis suficientes para desencadear respostas inflamatórias *in vitro* (>1000ng/ml) é algo que deve ser considerado para uma reavaliação de suas propriedades

inflamatórias (revisado por Pockley *et al.*, 2008). Sabe-se que a Hsp60 pode atuar em diversos contextos da resposta imune, podendo tanto participar de processos inflamatórios como de processos de regulação da resposta inflamatória agressiva aos tecidos (Coelho *et al.*, 2008). Essas proteínas podem interagir com diversos receptores de superfície, como CD14, CD40 e TLRs. Sabendo que alguns desses receptores também são ligantes de endotoxinas bacterianas, como LPS de *E.coli*, alguns grupos sugeriram que as atividades inflamatórias dessas proteínas poderiam ser resultado de efeitos do LPS ou de outras moléculas associadas a elas (Tsan e Gao, 2004).

Outros receptores de membrana já foram apontados como candidatos para participantes da internalização das Hsps 60 e 70, como membros da família dos receptores *scavenger*, como o LOX-1 (do inglês, *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1*) (Thériault *et al.*, 2006), e o receptor de lipoproteína de baixa densidade, CD91 (Thériault *et al.*, 2005). A habilidade de ativar essa grande variedade de receptores pode ser uma explicação para as diferentes respostas imunes provocadas pelas Hsps. Alguns autores apontam que a ativação de células autorreativas, de baixa afinidade pelo antígeno, pela Hsp60 endógena, ocorreria por interação com APCs na ausência de sinais inflamatórios, deslocando a resposta para o lado da regulação. Sabe-se que a Hsp60 humana ativa células T *naïve* de sangue periférico (CD45RA+RO-), enquanto que peptídeos bacterianos ativam células T de memória (CD45RA-RO+). Foi observado que a Hsp60 bacteriana é capaz de ativar as duas populações celulares (Ramage *et al.*,

1999). É provável que esse evento ocorra devido à grande similaridade molecular entre a Hsp60 humana e a bacteriana, uma vez que a Hsp60 é muito conservada filogeneticamente. Porém, a proteína de origem bacteriana apresenta alguma particularidade que induz o sistema imune humano a reconhecê-la também como antígeno exógeno, ativando as células de memória.

Como já foi mostrado por diversos estudos, as células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ interagem e respondem à Hsp60 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006). Porém, os mecanismos envolvidos nesse evento permanecem pouco elucidados. Acreditamos que a autorreatividade à Hsp60 apresente papel importante na regulação do sistema imune e, que sua ação possa envolver diversas vias de regulação, não apenas pela indução da secreção de citocinas potencialmente imunorreguladoras, por diversos tipos celulares, mas também pelo aumento da expressão de fatores de transcrição relacionados à atividade Th2 (GATA-3) e de células T reguladoras (FOXP3), ou ainda aumentando a produção de enzimas com ação imunossupressora (IDO). Além disso, é provável que as diferentes respostas à Hsp60 sejam decorrentes do reconhecimento diferencial de suas regiões pelo sistema imune e da sua interação com múltiplos receptores de superfície celular. Acreditamos que diferentes peptídeos derivados da Hsp60 possam ter um efeito dominante no direcionamento da resposta imune seja para a regulação, seja para induzir ou amplificar um processo inflamatório. A partir da análise de um painel mais amplo da expressão gênica induzida pelos peptídeos da Hsp60, esperamos escolher, com maior conhecimento,

candidatos para estudos mais aprofundados visando o desenvolvimento de novos protocolos para o tratamento de doenças autoimunes e para a indução de tolerância a aloenxertos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar peptídeos da Hsp60 com potencial imunorregulador e sugerir mecanismos para tal atividade imunorreguladora. A partir desses resultados, poderemos selecionar peptídeos candidatos para o uso em novos protocolos para indução de tolerância imunológica, no futuro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o perfil de modificações da expressão gênica, de moléculas relacionadas à imunorregulação e à inflamação, induzido pela Hsp60 e 18 peptídeos derivados, em PBMC de indivíduos saudáveis.
2. Verificar a expressão protéica de citocinas induzidas pelos peptídeos da Hsp60
3. Determinar se há um efeito diferencial de peptídeos da Hsp60 selecionados na expressão gênica de moléculas da atividade imunológica diretamente em populações purificadas de linfócitos T.
4. Testar a capacidade supressora, *in vitro*, de peptídeos selecionados, sobre a resposta proliferativa de células do sangue periférico.

3. METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

3.2 Sujeitos de pesquisa

Foram utilizadas células mononucleares periféricas de 16 indivíduos adultos saudáveis, de ambos os sexos, com aprovação do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP, CAPEPesq (aprovação CAPEPesq nº 0441/07 – Apêndice A). A coleta de sangue desses indivíduos foi realizada mediante a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B).

3.3 Hsp60

Para todos os experimentos realizados foi utilizada Hsp60 humana comercial com baixa endotoxina (Assay Designs - Stressgen, MI, USA).

3.4 Produção dos peptídeos da Hsp60

Os peptídeos foram sintetizados, em nosso laboratório, a partir da sequência de aminoácidos da Hsp60 humana (Jindal *et al.*, 1989) segundo o método Fmoc (Fluorenilmetiloxycarbonil) de síntese em fase sólida em sintetizador múltiplo (Shimadzu, modelo PSSM-8, Japão). Os peptídeos sintetizados foram: N2, N3, N4, N6, N7, N10 (região N-terminal), I2, I4, I5, I6, I8, I9 (região Intermediária), p277, C3, C4, C8, C9 e C10 (região C-terminal) (Tabela 1). Cada peptídeo foi analisado por RP-HPLC semi preparativo, usando-se uma coluna C-18, e caracterizado por espectrometria de massa (MALDI-TOF, Micromass/TofSpec SE, Inglaterra). Foram utilizados peptídeos com pureza $\geq 85\%$.

Tabela 1. Sequências dos peptídeos da Hsp60 estudados

Peptídeo*	Nº de resíduos aa	Sequência
Região		
N-terminal		
N2 (16-35)	20	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD
N3 (31-50)	20	KFGADARALMLQGVDLLADA
N4 (46-65)	20	LLADAVAVTMGPKGRTVIIIE
N6 (76-95)	20	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
N7 (87-110)	24	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
N10 (136-155)	20	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL
Intermediária		
I2 (223-242)	20	YISPYFINTSKGQKCEFQDA
I4 (269-289)	21	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN
I5 (285-307)	23	TLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGD
I6 (321-340)	20	GGAVFGEEGLTLNLEDVQPH
I8 (353-352)	20	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ
I9 (372-391)	20	QEIEQLDVTTSEYEKEKLN
C-terminal		
C3 (449-468)	24	PALDSLTPANEDQKIGIEII
C4 (464-483)	20	GIEIIRTLKIPAMTIKNA
C8 (521-544)	20	PTKVVRTALLDAAGVASLLTTAE
C9 (539-558)	23	LTAEVVTTEIPKEEKDPGM
C10 (554-573)	20	KDPGMGAMGGMGGMGGMGMF
P277 (437-460)	20	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED

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

3.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios

As células mononucleares foram isoladas de indivíduos adultos sadios a partir de 80 ml de sangue obtidos através de punção venosa em tubos *Vacutainer* heparinizados (Liquemine, La Roche, Basiléia, Suíça).

As amostras de sangue heparinizado foram diluídas 1:2 em solução salina isotônica e separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade

1.077g/l, Ficoll: Pharmacia Biotech, Sweden e Hypaque: Urografina 370, Schering, Brasil). Após a centrifugação a 800g por 30 minutos, o anel de células mononucleares foi coletado, ressuspensão com salina e centrifugado a 300g por 8 minutos. As células foram lavadas 2 vezes com salina e o botão celular ressuspensão em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de soro humano normal inativado, suplementado com 2 mM L-Glutamina, 10 mM Hepes, 0,1 ng/ml de Perflacin (Rhodia, SP-Brasil), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA (DMEM completo). A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.6 Cultura de células mononucleares do sangue com antígenos

Células mononucleares foram plaqueadas na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço em placa de 24 poços (Falcon, Beckton Dickinson) em 1ml de meio DEMEM completo com 10% de SHNi, e mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C. Os estímulos (Hsp60 e seus peptídeos) foram acrescidos na concentração de 10µg/ml e foram preparados 2 poços por condição, somando um total de 3×10^6 células por condição.

A análise da expressão de FOXP3 foi feita com 8 dias de cultura visando identificar a sua expressão persistente em células Tregs. Para a análise de expressão dos demais genes estudados, foram realizados experimentos de cinética. Para isso foram preparadas culturas de PBMC com o estímulo do peptídeo N3 da Hsp60 e as células foram retiradas em

intervalos de 24 horas, até completar 72 horas. Foi também separada uma amostra no período zero (“*ex vivo*”) para a extração do RNA e futuras análises.

Foram adotados, então, dois tempos para a retirada das culturas de PBMC: 72 horas e 8 dias (apenas para Foxp3). Após esse tempo de cultura, as placas foram centrifugadas a 800g por 10 minutos a 10°C e o sedimento foi utilizado para a extração de RNA e avaliação da expressão de mRNA.

3.7 Obtenção de células T

As células T foram purificadas a partir das PBMC por processo de seleção negativa com contas imunomagnéticas (Pan T cell isolation Kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha) de acordo as instruções do fabricante.

Essas células foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com biotina) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-biotina conjugados às contas). Para a marcação primária usamos 30µl do coquetel de anticorpos para cada 10^7 células e para a marcação secundária usamos 40µl de anticorpos para cada 10^7 células. Entre as duas etapas de marcação não foi feita qualquer lavagem das células.

Em seguida, as PBMC em suspensão foram aplicadas em uma coluna MACS, submetida a um campo magnético para purificação das células T por seleção negativa. Esse processo permitiu a passagem das células T através da coluna e retenção dos outros tipos celulares na mesma.

A pureza dos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo em citômetro FACScalibur (Becton & Dickinson) e a análise dos dados foi feita através do programa CELLQUEST.

3.8 Determinação da pureza das células T por Facs

Para a verificação da pureza da população de linfócitos T utilizamos o marcador de superfície CD3, marcado com o fluorocromo PE (Becton & Dickinson, San Diego, CA, EUA). A viabilidade de todas as células analisadas foi realizada através de Iodeto de Propidium (PI).

Para a realização dos experimentos de FACS, $2,5 \times 10^5$ células/condição foram ressuspensas em 100µl tampão FACS (PBS com 2% de FCS), por poço de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U (Corning, NY, EUA). Em seguida, as células foram centrifugadas a 500g por 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante desprezado por inversão. Toda a reação de imunofluorescência foi realizada em banho de gelo e ao abrigo da luz. Após a lavagem, adicionamos 25 µl dos anticorpos monoclonais, previamente titulados, ao sedimento celular, para a detecção dos marcadores de superfície celular selecionados. As placas foram incubadas a 4°C por 30 minutos em banho de gelo e no escuro. Terminada a reação, as células foram lavadas três vezes com tampão FACS por centrifugação a 500g por 5 minutos, a 4°C, e ressuspensas em 300µl de tampão FACS. Foram adquiridas 10000 eventos na região de linfócitos T em um citômetro FACScalibur (B&D, CA, EUA). A análise dos dados foi feita através do programa CELLQUEST^R.

3.9 Análise da expressão de fatores de transcrição por RT-PCR em tempo real

3.9.1 Extração de RNA

O RNA foi extraído das células cultivadas na presença das Hsp60 e seus peptídeos com Trizol®, clorofórmio e ácido propílico, segundo protocolo já estabelecido no laboratório. A quantificação do RNA foi feita por espectrofotômetro, a 260nm, e a integridade do RNA total foi confirmada após eletroforese em mini-gel analítico de agarose a 0,8%, no qual as amostras apresentaram os RNAs ribossômico, 28S e 18S, preservados.

3.9.2 Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, Fullerton, CA, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão maiores que 1,7. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a densidade ótica (DO) igual a 1 corresponde a 40 μ g de RNA / ml no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook e Russel, 2001).

Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,2%, RNase free, para a visualização da integridade das amostras, observando as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA. Como marcador de massa

moléculas usou-se o High DNA Mass ladder (Invitrogen, CA, USA). As amostras com RNA degradado foram descartadas e recoletadas.

3.9.3 Transcrição reversa para a obtenção de cDNA

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com 3µg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foram adicionados ao RNA 1µl de oligo dT (500 µg/ml), 1µl de dNTP (2,5mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, resultando em uma concentração final de 10mM) e água DEPC q.s.p. 20µl. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (MJ research, Inc., Watertown, MA, USA). Em seguida, foram adicionados ao tubo de reação 4µl de tampão de transcrição 5x, 2µl de DTT 0,1M e 1µl de inibidor de RNase (40U/µl) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram, então, colocadas em termociclador a 42°C por 2 minutos; nessa etapa fez-se uma pausa para a adição da enzima transcriptase reversa (200U/µl). Após essa pausa a reação continuou a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos.

3.9.4 PCR em tempo real (RT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando-se o reagente “SYBR-Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de

15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn+ - Rn-$), onde $Rn+$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e $Rn-$ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre o acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn , que é uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de iniciadores. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o *threshold* corresponde ao Ct (*cycle threshold*) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA do gene estudado presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak & Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001) e utilizando-se como gene de referência o GAPDH (D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase). Consideramos aumento e diminuição de expressão gênica em relação à condição sem estímulo os valores de QR >2 ou QR <0,5, respectivamente.

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

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

3.9.5 Desenho e padronização dos iniciadores

Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação foram desenhados utilizando-se o programa *Primer Express* (Applied Biosystems, USA). O tamanho dos iniciadores variou de 18 a 25 bases, a temperatura de anelamento de 59-61 °C e o conteúdo de GC de 40-60%. O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 86 a 119pb e 75-85°C de T_m (temperatura de anelamento).

A concentração de uso de cada par de sequências de iniciadores foi padronizada em reações de RT-PCR em tempo real, utilizando-se as amostras de PBMC de indivíduos saudáveis testadas nas concentrações de 100nM, 200nM e 300nM, para cada par de iniciadores. Após as reações de RT-PCR em tempo real foi observado o valor de Ct de cada reação em cada concentração de iniciadores e escolheu-se a concentração que apresentava o menor valor de Ct. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é quantidade de mRNA presente na amostra. Dessa forma, a concentração de uso de cada iniciador foi escolhida baseando-se no valor de Ct, de forma que a concentração de cada par de “iniciadores” não fosse um fator limitante da reação.

3.9.6 Especificidade e adequação dos iniciadores

A especificidade dos “iniciadores” desenhados, utilizando-se o programa *Primer Express*, foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1

minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio que mantêm as duplas fitas unidas se rompem (devido ao aumento de temperatura), o *SYBR-Green* é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura, significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento (T_m) do produto de amplificação (*amplicon*). As curvas de dissociação constam no anexo 1.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	TGGTCTCCTCTGACTTCAACA	AGCCAAATTCGTTGTCATACC
Foxp3	GTGGGCCTGCATGGCAC	GAGAAGGGCAGGGCACAAT
IL-10	AATCGATGACAGCGCCGTAG	CCAAGCTGAGAACCAAGACCC
TGF- β	GGTGGAACCCACAACGAAAT	TCTCGGAGCTCTGATGTGTTGA
IDO	GGCAACCCCCAGCTATCAGA	CAGGGAGACCAGAGCTTTCACA
GATA-3	AGCACAGAAGGCAGGGAGTGT	TGATAGAGCCCGCAGGCG
T-BET	GGATGCGCCAGGAAGTTTCA	GACTGGAGCACAAATCATCTGGG
ROR γ t	TGAGAAGGACAGGGAGCCAA	CCACAGATTTTGAAGGGATCA
IFN- γ	GTGTGGAGACCATCAAGGAAGACA	TTGGACATTCAAGTCAGTTACC

3.9.7 Critérios de Validação

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: **(i)** presença de controles brancos (Mix dos iniciadores e SYBR-Green sem cDNA) adequados, sem amplificação, **(ii)** curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, e com o seu início de aumento antes de Ct de 30, **(iii)** curva de dissociação adequada com pico único, **(iv)** ocorrência de

amplificação do gene de interesse com Ct de até 35, (**v**) triplicatas do ensaio com diferenças entre elas < 1 Ct. Nos casos em que uma das triplicatas não atendeu os critérios de validação, ela foi excluída e as análises realizadas com as médias dos outros dois Cts, desde que dentro dos critérios de validação.

3.9.8 Classificação das alterações gênicas

Para facilitar a análise das modificações gênicas, classificamos os genes analisados em predominantemente imunorreguladores (FOXP3, GATA-3, IL-10, TGF β e IDO), e em predominantemente pró-inflamatórios (Tbet, IFN γ e ROR γ t). Em seguida, de acordo com o valor da quantificação relativa (QR >2 expressão relativa aumentada ou QR $<0,5$ expressão relativa diminuída) classificamos as modificações de expressão gênica como sendo REGULA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente imunorreguladoras ou diminuição da expressão de moléculas pró-inflamatórias) e INFLAMA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente pró-inflamatórias ou diminuição da expressão de moléculas imunorreguladoras). Também classificamos qualitativamente as alterações de expressão gênica quando não pudemos calcular a QR (amostra ou controle com valor médio de Ct >35 ou indetectável). As alterações qualitativas foram classificadas como indução não quantificada (quando na amostra com estímulo o valor médio de Ct foi menor que 35 ciclos e, no controle sem estímulo, maior ou indetectável) ou inibição não

quantificada (quando na amostra o valor médio de Ct foi maior que 35 ciclos ou indetectável e, no controle, menor que 35 ciclos).

3.10 Ensaios funcionais

3.10.1 Detecção de citocinas no sobrenadante das culturas

Foi realizada a análise do perfil das citocinas nos sobrenadantes de cultura para comparação com os dados encontrados nas reações de PCR em tempo real. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados após o término de cada experimento, congelados a -80°C e mantidos a essa temperatura até o momento do ensaio de detecção de citocinas. Dosamos IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ por CBA (do inglês, *Cytometric Beads Array*, Pharmingen, San Diego, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O CBA consiste em um imunoensaio com beads conjugadas com anticorpos de alta afinidade que podem capturar especificamente antígenos solúveis. O antígeno capturado é evidenciado com anticorpos fluorescentes de detecção específicos para cada citocina. Através da aquisição e análise utilizando-se o citômetro de fluxo, podemos distinguir as beads baseadas no tamanho, granulosidade e fluorescência.

Para se obter o valor referente à quantidade de citocina induzida pelo estímulo, o valor da quantidade de citocina induzida pelas células mononucleares sozinhas (controle basal sem peptídeo - CB) foi descontado daquele produzido pelas células incubadas com os peptídeos. O limite de detecção da técnica foi de 2,5pg/ml. Todos os valores do controle basal menores que 2,5pg/ml foram arredondados para 2,4pg/ml que é o maior

valor abaixo do limite de detecção e, este valor foi usado para o cálculo da quantidade de citocina induzida pelo estímulo.

3.10.2 Testes de supressão de proliferação

a) Teste de supressão de proliferação frente a estímulo policlonal com o anticorpo anti-CD3

- Marcação da células respondedoras com CFSE (Succinil Ester, Molecular Probes, Eugene, OR)

Para a realização dos ensaios de supressão, as células foram inicialmente marcadas com CFSE 1,25 mM, na concentração de 20×10^6 células por ml. Para tal, as células foram incubadas com o CFSE a 37°C por 10 minutos, agitando-se bem a cada 3 minutos. Após esse procedimento, fez-se o bloqueio do processo, pela adição de 5 vezes do volume presente no tubo, de meio de cultura gelado contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram mantidas em gelo por 5 minutos. Todos esses procedimentos foram realizados no escuro, para impedir a perda de fluorescência do CFSE. Após a marcação das células respondedoras, essas foram lavadas por 3 vezes com meio de cultura para, então, serem utilizadas nos ensaios de supressão de proliferação.

- Ensaios de supressão

Realizamos ensaios de proliferação para testar a capacidade supressora dos peptídeos selecionados (N2, N6 e N7), em PBMC. Esses ensaios foram realizados em placas de 24 poços, utilizando-se $1,5 \times 10^6$

células por poço, previamente marcadas com CFSE. Os peptídeos foram adicionados na concentração de 10µg/ml e mantidos por 24h antes da adição do estímulo do anti-CD3. Como controle positivo de proliferação foram utilizadas células estimuladas com anti-CD3 na concentração de 1µg/ml na ausência de peptídeo e, para controle basal foram utilizadas células na ausência de qualquer estímulo. Foram feitas duplicatas de cada condição experimental.

Após o tempo de 5 dias de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as células foram retiradas da cultura e lavadas 3 vezes com tampão FACS (PBS com 2% de FCS) por centrifugação a 800g por 5 minutos a 4°C, e ressuspensas em 400µl de tampão FACS. Em seguida, foi feita a aquisição em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, NJ, EUA). Um total de 10000 células foram adquiridas na região de linfócitos. A análise e compensação foi realizada no software FloJo 8.7.4. (Tree Star inc.).

No ensaio de proliferação com CFSE, todas as células respondedoras, antes do estímulo, estão marcadas com CFSE e apresentam intensidade de fluorescência (FL1) por volta de 10³ (MFI - 224). Quando as células proliferam, elas perdem intensidade de fluorescência, ocorrendo um deslocamento para a esquerda da população marcada em FL1. O cálculo da percentagem de células que proliferaram é feito dentro da região em FL1, à esquerda do centro, tomando como ponto de corte a marcação das células sem qualquer estímulo.

O efeito supressor dos peptídeos sobre a proliferação induzida pelo anticorpo anti-CD3 foi calculado em percentagem. O cálculo foi realizado a

partir da percentagem de proliferação obtida apenas com o anti-CD3, para cada experimento, comparando-se ao valor obtido na presença do peptídeo da Hsp60. A partir destes valores foi feito o cálculo da percentagem de inibição da proliferação.

Foram também realizados experimentos de supressão com diferentes concentrações dos peptídeos N2, N3 e N7. Para tal foram usadas as concentrações de 0,1 – 1 – 10 – 25µg/ml. Os demais procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente.

b) Teste de supressão de proliferação frente a estímulo alogeneico (reação linfocitária mista - MLR)

Para esses ensaios foram utilizadas células (PBMC) provenientes de dois indivíduos com moléculas HLA-DR distintas. As duas populações celulares foram acrescentadas na mesma concentração, $1,5 \times 10^6$ células por poço. Apenas as células respondedoras foram marcadas previamente com CFSE (Succinil Ester, Molecular Probes, Eugene, OR) como descrito anteriormente. As células estimuladoras foram irradiadas a 5000 rad. Os peptídeos (N2, N6 e N7) foram acrescentados às culturas na concentração de 10µg/ml. As células foram mantidas em cultura por 5 dias, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram retiradas da cultura e lavadas 3 vezes com tampão FACS (PBS com 2% de FCS) por centrifugação a 800g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 400µl de tampão FACS. Em seguida, foi feita a aquisição em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, NJ, EUA). Um total de 10000 células

foram adquiridas na região de linfócitos. A análise e compensação foi realizada no software FloJo 8.7.4. (Tree Star inc.).

O efeito supressor dos peptídeos sobre a proliferação induzida pela MLR foi calculado em percentagem. O cálculo foi realizado a partir da percentagem de proliferação obtida apenas com a MLR, para cada experimento, comparando-se ao valor obtido na presença do peptídeo da Hsp60. A partir destes valores foi feito o cálculo da percentagem de inibição da proliferação

3.11 Tipificação de *HLA- DR* por PCR-SSO

A tipificação do HLA-DR foi realizada pela técnica de PCR-SSO (reação de polimerização em cadeia utilizando oligonucleotídeos sequência-específicos), de acordo com as especificações do fabricante (Dynal –Reli™ SSODRB1- Invitrogen). É considerado um método de média resolução, pois não permite, na maioria dos casos, a definição de um alelo específico, mas sim de grupos de alelos, que correspondem, de modo geral, às especificidades sorológicas. Trata-se de um PCR-SSO reverso, pois apresenta os oligonucleotídeos imobilizados em membranas de nylon (fitas). Composta de três etapas, a primeira etapa constitui uma reação de amplificação (PCR) utilizando um par de iniciadores biotinilados específicos para o exon 2 onde se localizam a maior parte dos polimorfismos do gene HLA-DR. A segunda etapa é a de hibridização do produto de PCR, com sondas específicas para o alelo ou grupo de alelos, seguidas de revelação da fita.

Primeira etapa: reação de amplificação (PCR)

Foi realizada em tubos de 0,2 ml, composta de: 15 μ l de uma solução contendo 200 ng de DNA, 15 μ l de $MgCl_2$ e 30 μ l de "master-mix" contendo os iniciadores marcados com biotina, dNTPs, tampão e a enzima Taq DNA polimerase. A reação de PCR foi realizada em um termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf), num total de 35 ciclos constituídos de: 15 segundos a 95° C (desnaturação), 45 segundos a 60° C (hibridização do iniciador) e 15 segundos a 72° C (extensão), seguidos de 5 minutos a 72° C. Imediatamente após o término da reação de amplificação, adicionamos 60 μ l de uma solução desnaturante (desnaturação química), para manter as fitas de DNA abertas e possibilitar a hibridização com as sondas específicas.

➤ Segunda etapa: hibridização do produto de PCR

Todas as soluções para a reação de hibridização foram preparadas a partir de soluções-estoque fornecidas pelo fabricante. Para cada indivíduo utilizamos uma fita ("strip"), identificada com número do paciente e colocada, com auxílio de uma pinça, em bandejas plásticas que permitem a hibridização simultânea de oito fitas. Adicionamos um volume de 5 ml de solução de hibridização, previamente aquecido a 50°C, a cada fita. Adicionamos, imediatamente, 70 μ l do produto de PCR (já com a solução desnaturante) a cada fita identificada. Incubamos as bandejas em banho-maria a 50°C, por 30 minutos. Nesta etapa ocorre a ligação (hibridização) do produto amplificado e marcado com avidina com as sondas específicas aderidas às fitas, sendo que as condições de exigência de hibridização

(50°C) asseguram a especificidade da reação.

A solução de hibridização foi então removida e foram realizadas duas lavagens, uma com a solução de lavagem em temperatura ambiente e outra com solução de maior exigência, em banho-maria 50°C, por 15 minutos, sob agitação. Esta lavagem deve ser realizada para que todo o produto não ligado seja removido da fita.

➤ Detecção da reação

Após a incubação e remoção da solução de exigência, adicionamos a solução de conjugado (estreptoavidina/peroxidase): 16 µl de conjugado em 5 ml de solução de lavagem e incubamos novamente à temperatura ambiente, sob agitação. Nesta etapa ocorre a ligação do produto amplificado marcado com biotina, e fixado à fita, com a estreptoavidina presente no conjugado. Removida esta solução, lavamos as fitas por duas vezes, com água Milli-Q estéril, para eliminação do conjugado não ligado. Após a lavagem, incubamos por 10 minutos, à temperatura ambiente, com solução de citrato. Desprezamos essa solução e adicionamos 5 ml de uma solução de substrato (TMB, tetrametilbenzidina) para revelação por cor, etapa na qual as fitas mantidas sob agitação, protegidas da luz, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a reação do conjugado com o substrato para a enzima, formou-se um complexo de cor azul. Interrompemos a reação por lavagens com água Milli-Q estéril e mantivemos as fitas em solução de citrato até a interpretação do teste.

Com auxílio de um gabarito que é sobreposto à fita, composto da

numeração e posição das sondas, registramos em folha de leitura específica as reações positivas identificadas por bandas azuis, para posterior análise e interpretação, por meio de um programa fornecido pelo fabricante.

3.12 Análise estatística dos dados.

Para a análise dos resultados, utilizamos o teste ANOVA Kruskal-Wallis e as análises estatísticas foram feitas com o programa Prism 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Perfil global do efeito da Hsp60 e peptídeos na expressão gênica de moléculas imunológicas reguladoras e pró-inflamatórias (painel REGULA x INFLAMA)

Primeiramente, fizemos uma análise conjunta dos dados obtidos nas análises dos 14 experimentos dos ensaios de PCR em tempo real, (PBMC de 14 indivíduos), buscando padrões de alteração de expressão gênica em relação aos genes predominantemente reguladores (FOXP3, GATA-3, TGF- β , IL-10 e IDO) e inflamatórios (T-bet, IFN- γ e ROR- γ t) estudados, induzidos pela Hsp60 e 18 peptídeos derivados.

As células mononucleares do sangue (PBMC) de todos os indivíduos estudados tiveram mudança de expressão gênica frente aos estímulos da Hsp60. Todos os peptídeos utilizados foram capazes de induzir alterações de expressão gênica nas PBMC de ao menos um dos indivíduos, em ao menos um dos genes estudados. Além disso, considerando todos os genes analisados, as células mononucleares dos 14 indivíduos responderam a quase todos os peptídeos. O peptídeo C4 foi o peptídeo que induziu o maior número de modificações de expressão gênica (64 de 105 condições – 60,9%), enquanto que o peptídeo N4 induziu o menor número (32 de 105 condições – 30,4%).

Observamos também que um mesmo peptídeo pôde provocar não apenas diferentes tipos de alteração de expressão gênica nos diferentes indivíduos, REGULA (aumento da expressão gênica de moléculas predominantemente reguladoras ou diminuição das predominantemente

inflamatórias) ou INFLAMA (aumento da expressão gênica de moléculas predominantemente inflamatórias ou diminuição das predominantemente reguladoras), como também diferentes intensidades de aumentos e/ou diminuições da expressão dos genes estudados. Por exemplo, alguns peptídeos, como N4, C4 e p277, foram capazes de induzir aumentos muito intensos da expressão de FOXP3, atingindo valores de expressão relativa (QR) iguais a 127, 171 e 431, respectivamente (Tabela 3). Por outro lado, o peptídeo N2, apesar de provocar uma maior frequência de alterações REGULA (em 31,4% do total de condições para o peptídeo), essas foram de menor intensidade (Tabela 3). Como podemos observar, houve variação de efeito da Hsp60 e de seus peptídeos nos indivíduos, no entanto, identificamos alguns perfis mais dominantes como detalharemos mais adiante.

O que nos chamou mais a atenção na análise da expressão de **FOXP3** foi a ocorrência de modificações distintas nos diferentes momentos estudados (72h e 8 dias). Todos os peptídeos foram capazes de induzir a expressão precoce (72h) de FOXP3 (QR de 2 a 465). Considerando-se todos os experimentos, a Hsp60 e os peptídeos da região C-terminal mostraram menor frequência de indução precoce de FOXP3 (em 14,3% e 21,4% respectivamente) além de menores valores de QR (2,1 até 9,1, com exceção de um valor mais alto para o C3 – 211,1) quando comparados aos observados para os peptídeos da região intermediária (valor máximo de QR igual a 392). Em contraste, a Hsp60 e os peptídeos N2, N4, N6, N7 e N10 (região N-terminal) tiveram as maiores frequências de indução tardia da

expressão de FOXP3 (8 dias), sendo a frequência mínima de 23,1% (N4 e N6) e máxima de 46,1% (N7 e Hsp60). É interessante ressaltar que a Hsp60 inteira induziu a expressão precoce em apenas 2 experimentos (14,3%), mas mostrou 6 induções tardias (46,1%) (Figura 1).

Notamos também que todos os peptídeos da região intermediária, exceto o I9, diminuíram a expressão tardia de FOXP3, o que foi também observado principalmente na análise dos peptídeos C4, C9, C10 e p277. Esse evento foi pouco frequente para os peptídeos da região N-terminal. Considerando todas as condições, no período de 8 dias, a frequência de indução/aumentos de expressão de FOXP3 foi de 23,1% e, de inibições, foi de 27,9%.

Figura 1. Perfil de modificações de expressão de *Foxp3* induzido pelos estímulos da *Hsp60*. Os dois gráficos mostram os valores de quantificação relativa (Q.R) obtidos nas análises dos experimentos. No gráfico **A** mostramos os valores encontrados nas culturas de 72 horas e, em **B** constam os valores obtidos das culturas de 8 dias. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da *Hsp60*, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n= 10-14 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

Considerando todos os estímulos e todos os experimentos, o gene codificante de **GATA-3** mostrou maior frequência de inibições de sua expressão (32,7% do total de condições) do que aumentos (13,1% do total de condições). A Hsp60 e todos os peptídeos, exceto C8, C10 e p277, foram capazes de induzir um aumento de expressão de GATA-3 em ao menos 1 dos experimentos. Inibições da expressão de GATA-3 foram observadas para todos os estímulos, com exceção para o peptídeo N4, sendo mais frequentes para os peptídeos das regiões intermediária, principalmente I5, I6 e I9 (respectivamente 7, 7 e 6 inibições de 14 experimentos) e C-terminal, principalmente C4, C8, C9 e p277 (10, 6, 7 e 7 inibições, respectivamente) (Figura 2).

Figura 2. Perfil de modificações de expressão de GATA-3 induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n=13-14 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

A análise da expressão gênica do fator de transcrição **T-bet** nos mostrou que os peptídeos da Hsp60 induziram mais frequentemente diminuições de sua expressão (35,6%, considerando todos os estímulos e todos os experimentos) do que aumentos (25,9%). As induções de expressão foram de intensidade mais baixa, com exceção do indivíduo 12, para o qual obtivemos valores mais altos de QR, chegando ao valor máximo de 36,3 para o peptídeo I6. Todos os estímulos foram capazes de induzir aumento da expressão de T-bet em ao menos um dos experimentos. As inibições foram mais frequentemente observadas para os peptídeos N6 e I8 (6 de 13 experimentos), I4 (5 de 11), I2 (6 de 12), I5 (5 de 12), C8 (6 de 13), I9 (5 de 13) e C10 (6 de 11) (Figura 3). O N6 aumentou a expressão de T-bet em apenas um experimento (IND 10), com QR igual a 2,0. Além disso, ocorreram casos de induções e inibições da expressão desse gene, não quantificadas devido a valores de $Ct \geq 35$ (seja na condição de cultura sem antígeno, seja na condição com antígeno) e, portanto, não mostradas no gráfico. Casos de inibição não quantificada foram observados para os indivíduos 01 (I4 e C3), 09 (C10 e p277) e 10 (N10) e casos de indução não quantificada para o indivíduo 02 (I2, C3, C4 e p277).

Figura 3. Perfil de modificações de expressão de *T-bet* induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n=12-13 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

Todos os estímulos da Hsp60 foram capazes de induzir aumentos e diminuições da expressão do fator de transcrição **ROR γ t**, sendo a frequência total de aumentos de expressão igual a 27,5% e, a frequência total de diminuições de expressão foi de 28,3%. As maiores frequências de aumentos de expressão foram encontradas para os peptídeos N10 (7 de 13 experimentos) e I8 (5 de 13 experimentos). As maiores frequências de diminuição de expressão de ROR γ t foram observadas para os peptídeos N7 (5 de 13 experimentos) e C10 (6 de 13 experimentos) (Figura 4). Foram também observadas inibições de expressão não quantificadas para esse

gene, decorrentes de valores indetectáveis de Ct para alguns peptídeos, como N6, I4 e C3 para o indivíduo 01, I4 para o indivíduo 04, p277 para o indivíduo 06, e N3 para o indivíduo 09.

Figura 4. Perfil de modificações de expressão de *RORγt* induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n=12-13 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

Os peptídeos estudados induziram alterações de expressão do gene da **IL-10** bem diversificadas e, considerando todas as condições, a frequência de aumentos de expressão da IL-10 foi de 30,5% e, a de inibições foi de 22,1%. Todos os peptídeos induziram aumento de sua expressão em ao menos um dos experimentos e, em alguns casos tal aumento foi de grande intensidade, chegando a valores de QR altos para I2 (545,3), I4 (237,2) e C3 (247,1). As maiores frequências de aumentos de expressão desse gene

foram observadas para a Hsp60 (8 de 13) e para os peptídeos N6 (7 de 14), N7 e I6 (6 de 14 para ambos). Eventos de inibição de expressão foram observados também para todos os estímulos, mas foram mais intensos e frequentes com os peptídeos da região C-terminal (28,6% de inibições, QR até 0,02) e intermediária (26,2% de inibições, QR até 0,003) (Figura 5).

Figura 5. Perfil de modificações de expressão de *IL-10* induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n=13-14 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

Em relação ao **TGF- β** , todos os peptídeos induziram aumento de sua expressão em ao menos um dos experimentos e a maior frequência foi observada para o peptídeo N2 (8 de 13 experimentos). Considerando todas

as condições, a frequência de aumentos de expressão desse gene foi de 18,2% e, a de inibições foi de 27,9%. As diminuições de expressão desse gene foram mais frequentes para os peptídeos da região C-terminal, com destaque ao peptídeo C4, que diminuiu a expressão em 6 de 13 experimentos (Figura 6). Eventos de modificações de expressão gênica não quantificadas também foram observados para o gene de $TGF-\beta$, sendo observadas inibições para o indivíduos 01 (I2, I4 e C3), e uma indução para o indivíduo 2 (p277).

Figura 6. Perfil de modificações de expressão de $TGF-\beta$, induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R.) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular) N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n=12-13 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos

Os estímulos utilizados nos experimentos induziram modificações diversas no gene de $IFN-\gamma$. Considerando todas as condições, a frequência de aumentos de expressão desse gene foi de 20,2% e, a de inibições foi de

27,9%. Com exceção do peptídeo N7, todos os estímulos induziram a sua expressão em ao menos um experimento. A maior frequência de indução foi observada para os peptídeos N2, I6 e C10 (5 de 13 experimentos). A intensidade de indução de IFN- γ foi menor e, os maiores valores de QR foram obtidos para os peptídeos I2 (12,4), N4 (9,2), C8 (8,9), I6 (8,6) e I8 (8,3). Eventos de diminuição de expressão de IFN- γ foram também observados com os peptídeos de todas as regiões da proteína, sendo esses mais frequentes para os peptídeos N6 e p277 (em 6 de 13 experimentos para ambos) (Figura 7). Foi também observado um evento de inibição não quantificada da expressão desse gene (peptídeo I2 para o indivíduo 01).

Figura 7. Perfil de modificações de expressão de IFN- γ , induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R.) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R. foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n= 12-13 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

Todos os estímulos utilizados no estudo foram capazes de induzir a expressão de **IDO** e, a frequência total de aumentos de expressão de IDO foi de 28,5% e, a de diminuições de expressão foi de 32,5%. Observamos um valor alto de QR na presença do peptídeo C4, próximo a 460. Com esse mesmo peptídeo foi observada a maior frequência de aumento de expressão (6 de 12, sendo uma não quantificada e não consta no gráfico), seguida pelos peptídeos N2, C3 e C8 (5 de 12) e I8 e I9 (4 de 12). A maior frequência de inibições da expressão de IDO foi observada para os peptídeos da região intermediária da Hsp60 (45,2%, considerando todos os peptídeos da região intermediária e todos os experimentos) (Figura 8).

Figura 8. Perfil de modificações de expressão de IDO, induzido pelos estímulos da Hsp60. O gráfico mostra os valores de quantificação relativa (Q.R) obtidos nas análises dos experimentos a partir dos valores encontrados nas culturas de 72 horas. O traço horizontal é o valor da mediana para a respectiva condição. Os valores de Q.R foram obtidos a partir da comparação da expressão entre as células estimuladas e as células não estimuladas mantidas nas mesmas condições de cultura, normalizados para a expressão do gene de controle endógeno, GAPDH. Valores abaixo de 0,5 (linha pontilhada inferior) apontam inibição de expressão e valores acima de 2 (linha pontilhada superior), indução de expressão gênica. PHA – fitohemaglutinina (controle positivo de ativação celular), N – peptídeos da região N-terminal da Hsp60, I – peptídeos da região intermediária, C – peptídeos da região C-terminal. n= 10-12 experimentos com PBMC de diferentes indivíduos.

Verificando todos os dados acima, nota-se que os genes codificantes de FOXP3 e IL-10 foram os que sofreram uma maior frequência de aumentos de expressão induzidas pelos peptídeos da Hsp60 e esses foram de maior intensidade em relação aos outros genes estudados. As maiores frequências de diminuições de expressão foram observadas para os genes de IFN- γ , GATA-3, TGF- β , ROR γ t, T-bet e IDO.

Poucos peptídeos foram capazes de provocar aumentos intensos de expressão nos genes analisados, porém, tal evento foi observado para peptídeos de todas as regiões da Hsp60. A indução de expressão tardia de FOXP3 foi intensa (QR>10) em apenas um dos experimentos na presença dos peptídeos N3 (265,8), N4 (127,6), N6 (14,7), I9 (11,7), C4 (171,5) e p277 (121,3). Para o gene da IL-10, os valores mais altos de Q.R foram obtidos para os peptídeos I2 (545,3), I4 (237,2) e C3 (247,1) e, para GATA-3, os peptídeos N3 (22,5), N6 (14,9), I2 (105,9), I4 (70,5) e I6 (28,9). Apenas para um dos indivíduos estudados (IND 12) foi possível detectar aumentos intensos do gene de ROR γ t, sendo os maiores valores de QR observados para os peptídeos I6 (84,2) e C4 (44,0). Já os eventos de inibição de expressão foram mais intensos (QR<0,1) e frequentes para o gene de IFN- γ , principalmente na presença de peptídeos das regiões N-terminal e C-terminal (valores de QR de 0,02 até 0,001). Outros genes apresentaram alguns casos isolados de inibições intensas, como T-bet na presença da Hsp60 (0,03), ROR γ t na presença do N4 (0,02), IL-10 na presença dos peptídeos I2 (0,03), I8 (0,001) e p277 (0,03) e Foxp3, em 8 dias, na presença dos peptídeos I5 e C10 (QR igual a 0,02 em ambos).

Até aqui, como principais peptídeos com potencial imunorregulador, destacamos o N7 que apresentou as maiores frequências de aumento de expressão gênica de Foxp3 tardiamente (em 46,1% dos experimentos) e a segunda maior frequência para IL-10 (em 42,9% dos experimentos), além de apresentar a maior frequência de diminuição da expressão de ROR γ t (em 38,5% dos experimentos) e não induzir IFN- γ em nenhum dos experimentos. Destacamos também o N6 que mostrou as maiores frequências de aumento de expressão gênica da IL-10 (em 50% dos experimentos) e de diminuição da expressão de T-bet (em 46,1% dos experimentos). Além disso, o peptídeo N2 foi o maior indutor da expressão de TGF- β (em 61,5% dos experimentos) e o segundo maior indutor de IDO (em 41,7% dos experimentos), sendo o seu maior indutor o C4 (em 50% dos experimentos).

4.2 Perfil individual do efeito da Hsp60 e peptídeos na expressão gênica de moléculas REGULA x INFLAMA

Além da análise por gene, analisamos também cada indivíduo separadamente visando verificar se existe algum padrão individual de interação com a Hsp60 que direcione mais para a um perfil REGULA ou INFLAMA. Cabe lembrar que foram consideradas modificações de expressão tipo REGULA aumentos de expressão gênica de moléculas predominantemente reguladoras (FOXP3, GATA-3, IL-10, TGF- β e IDO) e diminuições de expressão gênica de moléculas predominantemente inflamatórias (T-bet, ROR γ t e IFN- γ). Eventos de diminuições de expressão gênica de moléculas predominantemente reguladoras e aumentos daquelas

predominantemente inflamatórias foram consideradas modificações do tipo INFLAMA.

Apesar de certa diversidade individual do efeito da Hsp60 e seus peptídeos na expressão gênica, observamos um predomínio de alterações do perfil REGULA para os indivíduos 01, 03, 05, 07, 08, 11 e 13 (em 7 de 14 indivíduos). Em contraste, um perfil de modificações de expressão gênica predominantemente INFLAMA foi encontrado para os indivíduos 02, 04, 10 e 12 (em 4 de 14 indivíduos). Os demais indivíduos (06, 09 e 14) mostraram equilíbrio em relação às modificações REGULA/INFLAMALA induzidas nos experimentos (Tabela 3).

As células dos diferentes indivíduos mostraram diferentes padrões de intensidade de resposta. No indivíduo 01 foram observadas induções de expressão muito intensas, chegando a valores muito altos de Q.R. (545,3 para o gene da IL-10). Já para o indivíduo 03, embora também tenha mostrado um perfil induzido pelos peptídeos da Hsp60 predominantemente REGULA, os aumentos de expressão foram, em sua maioria, de menor intensidade (com valor máximo de QR= 25,3 para TGF- β). Já para os indivíduos 03, 07, 10 e 14, ocorreram, com maior frequência, diminuições de expressão gênica (42,1%, 32,2, 27,21% e 55,9% respectivamente, considerando-se todas as condições de cada indivíduos separadamente). É interessante também observar que para os indivíduos 09 e 12 foram muito frequentes os eventos de indução de expressão gênica para a maioria dos genes estudados (em 46,7% e 36,8% das condições, respectivamente),

sendo muito pouco observados eventos de diminuição de expressão (em 13,8% e 14,5% das condições, respectivamente).

Tabela 3. Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos estímulos da Hsp60: análise individual.

IND #	Gene analisado	ESTÍMULOS																		Predomínio REG/INFLAMA	
		N2	N3	N4	N6	N7	N10	I2	I4	I5	I6	I8	I9	C3	C4	C8	C9	C10	p277		Hsp60
IND 01	FOXP3 (8d)	0,7	8,8	127,6	14,7	8,3	1,6	5,2	0,3	0,2	0,6	0,7	0,5	0,6	171,5	1,0	0,3	0,5	431,1	121,3	
	IL-10	3,8	2,2	1,3	3,2	2,9	2,6	545,3	237,2	1,7	1,0	3,1	3,3	247,1	10,0	0,7	5,1	3,1	0,9	4,8	
	TGFβ	5,4	0,3	0,7	0,6	0,5	4,2	▼	▼	4,7	4,9	6,7	5,4	▼	0,8	4,9	1,9	1,7	0,7	12,1	
	GATA3	1,0	0,5	1,1	0,4	0,9	1,0	105,9	70,5	1,4	0,6	1,4	1,3	47,0	1,3	1,1	1,0	1,5	0,9	2,1	
	IDO	1,1	▼	6,7	1,0	0,7	0,1	▼	▼	0,2	0,2	0,6	0,2	▼	461,4	0,2	0,8	1,6	7,6	0,02	
	T-bet	0,8	0,9	7,6	0,1	1,2	0,4	0,3	▼	0,3	1,4	0,5	0,5	▼	14,0	0,4	3,5	8,3	6,7	1,3	
	RORγt	0,6	0,4	0,02	▼	0,1	0,9	0,2	▼	1,1	0,4	0,9	1,4	▼	0,1	0,6	0,05	0,1	0,1	1,4	
	IFN-γ	1,7	0,02	0,003	0,01	0,01	0,3	▼	0,7	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,01	0,2	0,002	0,01	0,01	0,6	
IND 02	FOXP3 (8d)	nr	2,0	2,8	1,5	0,8	nr	0,5	0,8	nr	0,2	nr	nr	0,4	2,1	nr	0,2	0,2	2,3	nr	
	IL-10	2,6	9,8	1,9	2,3	2,1	0,5	0,03	0,4	1,4	3,4	0,00	1,2	0,1	0,1	1,3	0,2	0,6	0,03	4,0	
	TGFβ	4,2	3,2	1,8	2,0	0,9	0,3	0,6	0,5	0,7	1,2	0,8	1,0	1,2	0,4	0,9	1,8	1,7	▲	2,3	
	GATA3	4,2	22,1	7,0	14,9	8,2	0,9	0,4	0,5	0,3	28,9	0,8	0,7	0,7	0,1	1,0	7,0	1,0	0,1	1,6	
	IDO	3,5	1,4	1,7	2,1	2,5	1,2	▲	0,8	0,6	1,0	2,8	8,0	▲	▲	1,7	▲	0,6	▲	0,6	
	T-bet	13,8	0,5	2,0	0,4	0,3	1,6	▲	*	1,5	4,9	0,5	2,1	▲	▲	2,6	*	3,6	▲	1,1	
	RORγt	5,9	1,7	0,7	0,6	0,5	1,3	1,8	1,5	1,2	2,0	2,6	2,3	0,9	1,0	1,0	2,0	2,5	1,5	1,2	
	IFN-γ	7,2	0,9	1,2	0,5	0,6	0,7	1,1	2,1	0,4	2,3	3,6	2,1	1,3	1,4	1,0	3,1	2,0	0,03	3,6	
IND 03	FOXP3 (8d)	4,4	265,8	1,8	2,4	2,3	4,2	1,5	2,2	0,7	1,0	5,9	11,7	1,5	0,7	7,0	1,0	0,7	2,9	10,8	
	IL-10	2,7	1,4	1,2	2,3	3,8	1,2	1,7	2,7	1,0	4,9	2,2	1,8	1,1	4,1	0,3	1,4	0,6	0,7	nr	
	TGFβ	9,5	1,6	0,9	1,8	0,8	25,3	1,9	1,4	19,5	2,7	25,3	9,2	1,9	2,2	14,1	3,2	23,0	1,7	nr	
	GATA3	4,1	1,4	1,8	1,9	1,2	2,0	1,9	1,7	1,5	3,0	2,4	2,3	3,4	2,1	0,7	2,8	1,0	0,7	nr	
	IDO	1,7	1,4	0,6	1,1	1,1	3,1	0,9	0,7	4,1	0,6	4,0	1,8	2,1	3,1	5,7	3,0	4,3	1,5	nr	
	T-bet	0,1	1,3	0,4	0,3	1,3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,7	0,1	0,7	0,3	0,7	nr	
	RORγt	0,3	1,7	0,9	0,4	1,0	15,6	0,5	0,9	2,8	0,3	1,4	0,4	1,0	0,5	3,0	0,6	5,6	1,4	nr	
	IFN-γ	2,3	1,3	0,7	1,7	1,0	3,6	1,3	1,0	2,2	1,1	5,6	0,8	1,1	0,9	2,9	3,2	3,3	0,9	nr	

Os valores mostrados na tabela são os valores de Q.R. (quantificação relativa) para o respectivo gene e peptídeo, comparativos à condição de cultura sem peptídeo ou Hsp60. A cor verde indica aumento de expressão do gene e a cor vermelha indica inibição de expressão. Aumento de expressão gênica: QR≥2; diminuição de expressão gênica: QR≤0,5. A cor cinza ■ indica modificação de expressão gênica com perfil REGULA (aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ) e a cor amarela ■ indica modificação com perfil INFLAMA (diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ). A coluna "predomínio REG/INFLAMA" mostra o perfil predominante de alterações de expressão observado por indivíduo, para cada gene. IND – indivíduo; nr – não realizado; ▼ – inibição de expressão gênica não calculada (valores de Ct detectáveis para o controle sem estímulo e valores de Ct>35, indetectáveis na presença do estímulo); ▲ – indução de expressão gênica não calculada (valores de Ct>35, indetectáveis para o controle sem estímulo e valores de Ct detectáveis na presença do estímulo); * - valor de Q.R não calculado devido aos valores indetectáveis nas 2 condições, sem peptídeo e com peptídeo. N total = 14 indivíduos.

Tabela 3 (continuação). Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos estímulos da Hsp60: análise individual.

IND #	Gene analisado	ESTÍMULOS																			Predomínio REG/INFLAMA
		N2	N3	N4	N6	N7	N10	I2	I4	I5	I6	I8	I9	C3	C4	C8	C9	C10	p277	Hsp60	
IND 04	FOXP3 (8d)	0,9	0,7	1,5	0,5	1,4	1,1	0,6	1,0	0,4	1,7	1,0	1,2	0,9	1,3	0,9	1,8	0,9	1,1	10,9	
	IL-10	0,6	4,9	1,0	2,3	1,1	0,3	0,03	0,4	0,2	3,4	0,3	0,6	0,1	0,1	0,5	0,2	0,2	0,02	3,1	
	TGFβ	4,7	0,8	0,6	0,2	0,6	2,4	0,4	0,2	4,2	0,7	3,1	1,7	0,8	0,4	1,9	0,2	1,9	1,0	0,4	
	GATA3	0,2	0,9	0,7	0,4	0,8	0,3	0,6	0,2	0,1	0,5	0,1	0,3	0,7	0,1	0,3	0,2	0,2	1,3	0,2	
	IDO	0,9	0,8	1,2	0,1	1,2	0,3	0,8	0,2	1,0	0,4	0,3	1,3	0,8	1,1	2,2	0,5	0,2	1,2	3,3	
	T-bet	0,2	1,4	0,6	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,5	1,0	0,2	0,2	0,2	2,0	0,03	
	RORγt	5,6	1,3	0,2	0,4	0,2	2,3	0,3	▼	3,7	0,7	5,4	1,4	0,6	nr	2,3	0,3	2,2	1,5	0,2	
	IFN-γ	1,0	0,9	0,9	0,7	0,6	0,9	0,8	0,5	1,5	0,6	1,6	0,6	0,7	0,7	1,2	0,4	0,9	1,4	0,1	
IND 05	FOXP3 (8d)	2,1	1,6	1,4	1,8	3,0	2,1	0,8	1,1	2,0	1,1	0,6	1,4	3,2	0,6	0,8	1,0	0,1	0,3	1,7	
	IL-10	1,1	0,4	2,3	2,0	2,7	1,2	1,2	1,7	3,1	1,6	1,6	2,0	1,4	2,2	2,1	1,1	1,8	2,7	3,4	
	GATA3	0,9	0,3	0,8	0,9	0,3	0,1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	4,4	
IND 06	FOXP3 (8d)	0,1	0,5	0,4	0,2	0,9	1,6	0,5	0,5	0,02	0,2	0,7	0,4	0,4	0,3	0,4	0,6	0,02	0,3	6,4	
	IL-10	1,0	0,9	0,5	1,0	0,9	0,6	1,6	5,9	1,0	3,5	1,5	0,9	2,7	1,9	3,9	1,1	0,6	3,3	3,1	
	TGFβ	0,9	0,5	0,8	0,9	0,8	0,5	1,0	0,2	0,2	4,3	1,1	0,9	0,5	0,4	0,9	0,7	0,4	0,5	1,0	
	GATA3	1,2	1,4	1,3	1,4	1,3	1,8	2,6	11,0	3,3	8,9	2,5	1,4	1,0	0,7	1,9	5,0	1,6	1,8	3,1	
	IDO	6,2	0,3	2,2	2,7	1,1	1,3	1,8	1,2	0,6	28,6	3,1	2,9	3,4	4,6	3,4	1,9	1,3	1,8	1,4	
	T-bet	0,8	1,2	1,3	0,9	0,8	1,1	1,4	0,2	0,1	4,2	1,1	0,8	0,4	0,4	1,7	0,6	0,5	0,6	0,6	
	RORγt	2,5	3,6	1,5	2,2	2,8	3,0	1,7	0,6	0,5	15,7	3,0	2,3	0,9	1,6	2,4	2,7	1,2	▼	2,2	
	IFN-γ	3,1	0,8	1,4	2,3	1,2	1,3	1,3	0,4	0,5	8,6	1,6	1,9	1,8	3,2	1,9	1,3	1,2	0,3	1,7	
IND 07	FOXP3 (8d)	9,4	0,3	0,1	1,4	2,2	0,9	0,1	0,1	0,3	0,4	0,1	0,1	0,4	0,7	0,1	0,1	0,2	0,4	1,3	
	IL-10	2,8	0,9	nr	3,3	3,3	1,7	1,2	1,8	1,9	1,2	2,4	1,1	1,4	1,2	0,6	2,8	5,7	4,0	1,9	
	TGFβ	1,5	0,6	nr	1,5	0,9	0,9	0,6	2,0	1,0	0,6	0,9	1,0	0,6	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	
	GATA3	0,6	0,4	nr	1,6	1,3	0,7	0,5	1,0	0,5	0,4	0,7	0,6	0,8	0,4	0,2	1,7	1,6	0,9	2,0	
	IDO	6,4	0,3	nr	2,6	4,0	4,4	2,4	3,7	5,4	1,6	4,3	3,0	3,6	15,8	4,4	▼	5,2	9,6	7,0	
	T-bet	0,5	0,3	nr	0,9	0,4	0,6	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	0,8	0,4	0,2	0,7	0,1	0,1	0,5	
	RORγt	0,4	0,3	nr	2,8	0,3	0,4	0,6	0,8	0,8	1,1	1,1	0,7	1,8	0,4	0,4	1,2	0,2	0,1	1,2	
	IFN-γ	0,6	1,1	nr	1,8	1,1	1,6	0,6	1,6	0,9	0,8	1,2	1,0	1,1	0,7	0,6	1,8	0,6	0,6	0,8	

Os valores mostrados na tabela são os valores de Q.R. (quantificação relativa) para o respectivo gene e peptídeo, comparativos à condição de cultura sem peptídeo ou Hsp60. A cor verde indica aumento de expressão do gene e a cor vermelha indica inibição de expressão. Aumento de expressão gênica: QR≥2; diminuição de expressão gênica: QR≤0,5. A cor cinza ■ indica modificação de expressão gênica com perfil REGULA (aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ) e a cor amarela ■ indica modificação com perfil INFLAMA (diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ). A coluna “predomínio REG/INFLAMA” mostra o perfil predominante de alterações de expressão observado por indivíduo, para cada gene. IND – indivíduo; nr – não realizado; ▼ – inibição de expressão gênica não calculada (valores de Ct detectáveis para o controle sem estímulo e valores de Ct>35, indetectáveis na presença do estímulo). N total = 14 indivíduos.

Tabela 3 (continuação). Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos estímulos da Hsp60: análise individual.

IND #	Gene analisado	ESTÍMULOS																			Predomínio REG/INFLAMA
		N2	N3	N4	N6	N7	N10	I2	I4	I5	I6	I8	I9	C3	C4	C8	C9	C10	p277	Hsp60	
IND 08	FOXP3 (8d)	1,5	0,9	1,0	0,9	1,3	1,2	1,8	2,4	0,9	0,6	0,6	10,4	0,8	0,4	0,7	0,4	0,8	0,1	17,6	
	IL-10	1,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,6	1,0	0,8	0,5	0,3	0,4	0,4	0,3	0,7	0,3	0,4	1,5	0,1	2,9	
	TGFβ	2,7	3,1	2,2	0,7	1,3	1,8	2,1	2,6	1,8	1,8	1,6	1,5	0,7	1,1	1,0	1,3	0,4	1,4	0,7	
	GATA3	0,8	0,4	1,8	1,0	0,4	0,5	1,3	0,4	0,3	0,3	0,8	0,3	0,1	0,2	1,2	0,2	0,7	0,2	0,2	
	IDO	2,0	0,9	1,6	0,3	0,5	2,7	2,5	2,3	1,4	1,6	1,9	0,4	0,4	3,6	2,4	1,0	0,7	1,7	1,9	
	T-bet	0,7	1,7	2,6	0,1	0,6	1,6	2,8	1,4	0,9	0,9	1,7	0,9	0,5	0,7	0,6	0,9	nr	0,7	0,1	
	RORγt	0,5	2,1	2,7	0,1	0,7	2,2	2,1	1,8	1,1	0,8	1,2	1,0	0,6	0,6	0,3	1,0	0,1	0,7	▼	
	IFN-γ	2,2	1,6	1,1	1,8	1,0	4,5	12,4	5,9	2,7	4,9	8,3	5,5	1,8	2,0	5,8	3,9	2,4	2,2	0,2	
IND 09	FOXP3 (8d)	1,2	0,8	1,5	1,1	1,0	1,3	1,5	1,2	1,3	1,1	1,0	1,2	0,7	2,2	1,4	0,1	2,1	1,3	0,8	
	IL-10	3,4	5,2	2,4	2,6	2,7	2,8	2,0	6,4	3,5	5,6	4,9	3,0	3,9	3,5	1,4	1,4	2,1	2,6	17,2	
	TGFβ	2,6	0,9	1,6	1,4	2,5	2,6	3,4	3,6	2,4	3,4	3,3	5,9	1,0	3,2	3,8	1,5	1,3	3,3	3,8	
	GATA3	0,6	1,9	1,0	1,3	0,7	7,6	1,7	0,9	0,3	0,5	0,6	0,2	0,2	0,5	0,4	0,4	1,3	0,2	1,3	
	IDO	4,5	1,3	1,0	1,3	3,0	1,3	9,2	3,5	1,5	5,5	0,2	2,9	▼	6,3	1,9	▼	0,1	5,6	0,2	
	T-bet	2,5	0,3	1,6	1,6	2,2	2,1	3,2	3,3	2,0	5,1	1,4	2,1	2,4	0,9	1,1	1,4	▼	▼	2,1	
	RORγt	1,9	▼	1,3	0,8	2,5	3,0	6,5	5,6	4,1	11,3	3,0	3,0	3,5	1,5	2,1	1,5	0,3	5,1	3,4	
	IFN-γ	2,8	3,4	1,2	1,9	1,9	1,9	2,7	1,5	1,7	4,7	1,6	0,5	2,7	2,8	1,8	0,7	4,0	2,5	0,3	
IND 10	IL-10	1,0	0,5	0,6	0,3	0,5	0,5	0,9	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,8	0,3	0,5	0,7	0,8	0,8	0,7	
	TGFβ	3,1	0,7	1,4	0,6	1,9	2,0	1,6	0,6	0,5	0,6	0,9	1,2	0,9	0,1	1,4	1,2	0,8	1,3	5,2	
	GATA3	1,0	0,6	0,6	0,5	1,0	0,5	0,8	0,7	0,7	0,4	0,4	0,5	0,9	0,3	0,5	0,7	0,7	0,7	0,9	
	T-bet	4,7	2,1	2,9	2,0	1,4	▼	2,9	2,3	1,6	0,9	3,9	3,2	7,8	0,8	8,0	2,5	3,7	3,3	2,9	
	RORγt	1,7	1,1	1,9	1,2	2,5	0,6	1,4	1,7	0,8	0,9	1,4	1,8	1,4	0,5	1,0	1,4	0,9	2,5	0,9	
	IFN-γ	0,8	0,3	0,5	0,2	0,5	2,0	1,2	0,6	0,4	0,3	0,5	1,0	0,9	0,04	1,0	0,8	0,7	0,2	1,1	
IND 11	Foxp3 (8d)	2,1	1,6	1,4	1,8	3,0	2,1	0,8	1,1	2,0	1,1	0,6	1,4	3,2	0,6	0,8	1,0	0,1	0,3	1,7	
	IL-10	1,3	2,0	1,2	0,8	1,6	2,2	1,5	2,2	0,9	2,3	2,2	1,4	2,4	3,4	2,8	0,8	1,5	1,2	3,4	
	TGFβ	1,0	1,8	1,8	1,5	1,4	1,7	1,8	1,1	1,2	1,0	1,5	2,0	2,2	2,4	2,4	0,8	2,0	2,5	2,2	
	GATA3	1,5	1,6	1,5	1,0	1,6	1,3	1,5	1,5	1,1	1,1	2,1	1,3	1,2	1,9	1,7	1,1	1,5	1,1	4,4	
	IDO	0,3	0,3	0,6	0,4	0,6	0,2	0,5	0,3	0,4	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,6	
	T-bet	0,6	2,8	2,0	0,8	2,4	2,0	0,4	1,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,9	1,2	0,2	0,6	1,1	1,2	
	RORγt	1,7	2,7	2,8	1,0	1,7	2,2	1,5	1,7	2,0	1,0	0,2	3,5	3,7	2,3	0,7	0,1	1,0	1,2	0,8	
	IFN-γ	0,4	0,6	0,5	0,5	0,6	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,4	0,2	1,1	

Os valores mostrados na tabela são os valores de Q.R. (quantificação relativa) para o respectivo gene e peptídeo, comparativos à condição de cultura sem peptídeo ou Hsp60. A cor verde indica aumento de expressão do gene e a cor vermelha indica inibição de expressão. Aumento de expressão gênica: QR≥2; diminuição de expressão gênica: QR≤0,5. A cor cinza indica modificação de expressão gênica com perfil REGULA (aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ) e a cor amarela indica modificação com perfil INFLAMA (diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ). A coluna "predomínio REG/INFLAMA" mostra o perfil predominante de alterações de expressão observado por indivíduo, para cada gene. IND – indivíduo; nr – não realizado; ▼ – inibição de expressão gênica não calculada (valores de Ct detectáveis para o controle sem estímulo e valores de Ct>35, indetectáveis na presença do estímulo). N total = 14 indivíduos.

Tabela 3 (continuação). Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos estímulos da Hsp60: análise individual.

IND #	Gene analisado	ESTÍMULOS																			Predomínio REG/INFLAMA
		N2	N3	N4	N6	N7	N10	I2	I4	I5	I6	I8	I9	C3	C4	C8	C9	C10	p277	Hsp60	
IND 12	Foxp3 (8d)	0,8	0,2	1,5	0,9	1,2	0,8	0,9	0,5	1,3	0,9	0,7	1,4	1,0	0,4	0,4	7,3	0,2	0,5	13,8	
	IL-10	1,6	16,7	1,4	0,9	0,9	0,7	0,8	0,9	1,1	1,7	1,3	1,3	1,5	2,0	1,2	0,6	0,7	0,7	1,7	
	TGFβ	3,6	7,3	1,2	0,9	2,7	1,9	2,0	3,0	4,6	6,3	1,4	3,3	2,9	3,9	0,9	2,4	1,2	0,6	2,0	
	GATA3	0,5	16,5	1,2	0,8	0,6	0,3	0,3	0,4	0,7	1,1	0,6	0,6	0,4	0,4	0,8	0,5	0,4	0,5	1,4	
	T-bet	13,0	▼	1,0	0,7	1,8	15,7	16,7	20,6	24,5	36,3	8,0	24,0	15,9	24,9	0,1	12,0	5,6	1,0	6,7	
	RORγt	13,1	▼	0,4	0,4	5,2	12,6	8,1	9,5	14,6	84,2	2,5	10,9	10,7	44,0	▼	5,1	4,8	1,1	5,2	
	IFN-γ	1,1	3,4	9,2	1,8	1,8	1,2	2,1	2,0	1,4	3,2	2,1	1,7	1,9	1,2	8,9	5,1	2,6	1,0	0,9	
	IDO	1,4	0,5	1,0	0,8	2,0	0,7	1,1	1,0	2,5	4,2	1,2	0,7	2,2	1,5	1,1	1,6	1,2	0,7	0,7	
IND 13	Foxp3 (8d)	0,1	0,1	0,4	0,2	0,5	0,1	0,5	4,2	0,2	0,1	0,1	0,6	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	0,1	
	IL-10	1,2	1,8	0,8	0,5	1,5	1,6	1,3	0,9	2,7	1,0	1,2	1,0	1,1	1,1	0,7	0,6	0,5	0,4	0,8	
	TGFβ	1,3	1,0	0,9	0,3	1,2	0,9	1,4	0,9	2,4	2,4	2,8	0,4	0,8	1,6	1,7	0,6	0,3	1,8	1,0	
	GATA3	1,3	2,0	1,0	0,4	3,6	1,6	1,5	1,1	3,6	1,1	1,0	1,4	1,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,6	0,9	
	T-bet	0,4	23,8	2,6	0,9	0,8	0,4	0,1	0,5	1,0	2,3	0,5	0,3	0,8	1,9	4,7	1,2	0,5	0,4	0,8	
	IFN-γ	1,4	0,7	0,7	0,4	1,9	1,4	0,04	1,8	1,9	1,3	0,8	0,9	1,7	1,2	0,4	1,9	0,8	0,8	1,3	
	RORγt	0,9	0,5	0,7	0,5	1,5	1,1	1,9	0,8	2,3	0,7	0,3	0,8	0,7	0,4	0,3	0,1	0,1	0,5	1,6	
	IDO	0,9	0,2	0,2	0,2	0,6	1,0	1,3	0,8	0,9	0,6	0,2	0,1	0,4	1,5	0,2	0,3	0,1	0,8	0,7	
IND 14	Foxp3 (8d)	2,1	1,9	3,1	2,2	2,3	2,7	1,7	2,0	2,3	3,9	2,2	4,1	0,3	2,0	1,6	1,9	2,9	1,3	1,6	
	IL-10	0,6	1,3	0,6	0,5	0,9	0,5	0,4	0,2	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,6	0,4	0,2	0,3	0,4	0,9	
	TGFβ	0,9	0,8	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,7	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,3	0,4	0,3	0,7	
	GATA3	1,2	0,8	0,6	0,9	0,8	0,7	0,4	0,7	0,8	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,8	
	T-bet	1,0	1,1	0,7	0,5	1,2	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6	0,5	0,8	0,6	0,5	0,5	0,2	0,3	0,2	1,7	
	RORγt	0,7	0,8	0,6	0,7	0,5	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,4	0,7	0,2	0,4	0,5	0,1	0,1	0,1	0,8	
	IFN-γ	0,7	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,2	0,5	0,6	0,6	0,4	0,5	0,5	0,8	0,2	0,6	0,4	0,3	0,4	
	IDO	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,05	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	

Os valores mostrados na tabela são os valores de Q.R. (quantificação relativa) para o respectivo gene e peptídeo, comparativos à condição de cultura sem peptídeo ou Hsp60. A cor verde indica aumento de expressão do gene e a cor vermelha indica inibição de expressão. Aumento de expressão gênica: QR≥2; diminuição de expressão gênica: QR≤0,5. A cor cinza indica modificação de expressão gênica com perfil REGULA (aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ) e a cor amarela indica modificação com perfil INFLAMA (diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ). A coluna “predomínio REG/INFLAMA” mostra o perfil predominante de alterações de expressão observado por indivíduo, para cada gene. IND – indivíduo; nr – não realizado; ▼ – inibição de expressão gênica não calculada (valores de Ct detectáveis para o controle sem estímulo e valores de Ct>35, indetectáveis na presença do estímulo). N total = 14 indivíduos.

4.3 Análise geral dos peptídeos em relação ao efeito REGULA x INFLAMA

Analizando juntamente todos os peptídeos da Hsp60, agrupados por região, nota-se que não existe diferença significativa na porcentagem de modificações do perfil REGULA entre as regiões. Porém, a região N-terminal mostrou menor frequência de modificações INFLAMA (19,7%), quando comparada às demais regiões (27,8% para a intermediária e 30,6% para C-terminal). A região N-terminal também mostrou maior número de condições sem induzir modificações de expressão gênica em relação à condição controle, não estimulada. (Figura 9).

Figura 9. Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de condições sem modificação induzidas pela Hsp60 e peptídeos das diferentes regiões. O gráfico mostra a porcentagem de modificações REGULA, INFLAMA e condições em que não houve modificação para cada região e para a Hsp60 inteira, considerando-se todas as condições analisadas (todos os genes, peptídeos e indivíduos). Aumento de expressão gênica: $QR \geq 2$; diminuição de expressão gênica: $QR \leq 0,5$. Foram consideradas modificações de expressão do perfil REGULA aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF- β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, ROR γ t e IFN- γ e, foram consideradas modificações do perfil INFLAMA as diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF- β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, ROR γ t e IFN- γ ; todas as modificações em relação à condição sem o antígeno da Hsp60. n=14 indivíduos, 6 peptídeos por região.

Analisando-se os peptídeos da região N-terminal separadamente, nota-se que os peptídeos N2, N6 e N7 mostraram uma maior frequência de modificações REGULA e que, desses 3 peptídeos, o peptídeo N7 foi o que mostrou menor número de modificações INFLAMA (13,3%). O peptídeo N4 foi o que induziu o menor número de modificações no geral, mostrando alta frequência de condições em que não induziu modificações de expressão gênica em relação à condição controle (67,3%) (Figura 10).

Figura 10. Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de condições sem modificação induzidas pelos peptídeos da região N-terminal da Hsp60. O gráfico mostra as porcentagens de modificações REGULA, INFLAMA e condições em que não houve modificação para cada peptídeo, considerando-se todas as condições analisadas (todos os genes e indivíduos). Foram consideradas modificações de expressão do perfil REGULA aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF- β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, ROR γ t e IFN- γ e, foram consideradas modificações do perfil INFLAMA as diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF- β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, ROR γ t e IFN- γ ; todas as modificações em relação à condição sem o estímulo do peptídeo. n=14 indivíduos.

Fazendo um balanço da análise de todos os genes de todos os indivíduos, observamos que a Hsp60 e 9 peptídeos, sendo 5 da região N-terminal (N2, N3, N4, N6 e N7), 1 da intermediária (I8) e 1 da C-terminal (C4)

mostraram predomínio de modificações do perfil REGULA. Por outro lado, para 10 dos peptídeos foi observado um predomínio de modificações do perfil INFLAMA, sendo a maioria pertencente às regiões intermediária e C-terminal da Hsp60 (I2, I5, I6, I9, C3, C8, C9, C10 e p277). Apenas o peptídeo I4 mostrou equilíbrio entre o número de modificações REGULA e INFLAMA (Tabela 4).

Os peptídeos que mostraram a maior razão REGULA/ INFLAMA foram N7 (2,2) N2 (1,8), seguidos do N6 (1,4) e I8 (1,2). A Hsp60 inteira também induziu alta frequência de modificações REGULA em relação às do perfil INFLAMA, mostrando razão REGULA/INFLAMA igual a 2,4. Os peptídeos com maior frequência de modificações INFLAMA foram C9 e C10, mostrando razão REGULA/INFLAMA igual a 0,6 e 0,7, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Balanço do efeito REGULA/INFLAMA induzido pelos estímulos da Hsp60.

	N2	N3	N4	N6	N7	N10	I2	I4	I5	I6	I8	I9	C3	C4	C8	C9	C10	P277	HSP60
Modificações REGULA	33	30	17	32	31	27	26	30	30	28	33	26	25	34	29	21	26	29	36
Modificações INFLAMA	18	27	15	23	14	30	29	30	31	32	28	30	30	32	31	34	38	31	15
Razão REGULA/INFLAMA	1,8	1,1	1,1	1,4	2,2	0,9	0,9	1,0	1,0	0,9	1,2	0,9	0,8	1,1	0,9	0,6	0,7	0,9	2,4
Sem Modificações	54	48	66	50	60	48	50	44	44	45	44	49	50	39	45	49	41	45	47
No. Total condições	105	105	98	105	105	105	105	104	105	105	105	105	105	105	105	104	105	104	98
Faixa ↑ QR	2 a 13,8	2 a 265,8	2,2 a 127,6	2 a 14,9	2,1 a 8,3	2 a 25,3	2 a 545,3	2 a 237,2	2 a 19,5	2 a 28,9	2,2 a 25,3	2 a 11,7	2,1 a 247,1	2,1 a 171,5	2,1 a 14,1	2 a 7	2 a 8,3	2 a 431,1	2,1 a 121,3
Faixa ↓ QR	0,5 a 0,1	0,5 a 0,02	0,5 a 0,00	0,5 a 0,1	0,5 a 0,01	0,5 a 0,1	0,5 a 0,03	0,5 a 0,1	0,5 a 0,02	0,5 a 0,1	0,5 a 0,00	0,5 a 0,1	0,5 a 0,1	0,5 a 0,01	0,5 a 0,1	0,5 a 0,00	0,5 a 0,01	0,5 a 0,01	0,5 a 0,03

Os valores da tabela mostram o número total de modificações observadas para cada peptídeo, considerando todas as condições estudadas (genes e indivíduos). As duas últimas linhas mostram a faixa de indução de expressão (faixa ↑) e de inibição (faixa ↓) observadas para o respectivo peptídeo (tabelas 1.1, 1.2 e 1.3). Aumento de expressão gênica: $QR \geq 2$; diminuição de expressão gênica: $QR \leq 0,5$. A cor cinza indica modificação de expressão do perfil REGULA (aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ) e a cor amarela indica modificação do perfil INFLAMA (diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ). Número de peptídeos: 18; número de indivíduos estudados =14.

4.4 Perfil de citocinas induzidas por peptídeos da Hsp60 em PBMC

A produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de PBMC na interação com os peptídeos da Hsp60 foi, em geral, baixa. O **IFN- γ** foi uma das citocinas encontradas com maior frequência (em 50% das condições analisadas), especialmente na presença dos peptídeos N2 e C4, sendo os valores máximos encontrados iguais a 285,4 pg/ml para o N2 e 966,4 pg/ml para o C4, após descontar o valor da condição basal (sem estímulo). Em apenas 2 de 9 experimentos foi detectado IFN- γ na presença do N7 e, os valores foram baixos (1,8 e 3,4 pg/ml) (Figura 11).

Figura 11. Produção de IFN- γ por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (CB) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. Os valores brutos constam no anexo 3. O limite de detecção da técnica é 2,5pg/ml. Os valores de CB entre 0 e 2,5 foram arredondados para 2,4. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina pelos peptídeos, ou seja, a produção da citocina foi menor na presença do estímulo do que no controle basal sem estímulo. Os valores de CB variaram de 3,5 a 11,3 e em 2 experimentos os valores de CB foram mais altos, iguais a 57,3 e 506,7. Os valores brutos constam no anexo 2. Tempo de cultura = 72h. Número de experimentos = 9.

A **IL-10** foi a citocina detectada com maior frequência nos sobrenadantes das culturas, em 26 de 34 condições analisadas na presença de peptídeos (76%). Os maiores valores encontrados foram para os peptídeos N6 e N7 (54,6 e 68,8 pg/ml, respectivamente) e o peptídeo C4 foi o que menos induziu a citocina (6 de 9 experimentos com valor máximo de 7,7pg/ml). Ocorreram inibições da produção basal de IL-10, porém essas foram pouco frequentes (1 de 9 para N7, 2 de 9 para N2 e N6, 3 de 9 para C4). (Figura 12).

Figura 12. Produção de IL-10 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (CB) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. Os valores brutos constam no anexo 3. O limite de detecção da técnica é 2,5pg/ml. Os valores de CB entre 0 e 2,5 foram arredondados para 2,4. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina pelos peptídeos, ou seja, a produção da citocina foi menor na presença do estímulo do que no controle basal sem estímulo. Os valores de CB variaram de 0 a 4,9. Os valores brutos constam no anexo 2. Tempo de cultura = 72h. Número de experimentos = 9.

Figura 14. Produção de IL-5 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (CB) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. Os valores brutos constam no anexo 3. O limite de detecção da técnica é 2,5pg/ml. Os valores de CB entre 0 e 2,5 foram arredondados para 2,4. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina pelos peptídeos, ou seja, a produção da citocina foi menor na presença do estímulo do que no controle basal sem estímulo. Os valores de CB variaram de 0 a 6,5. Os valores brutos constam no anexo 2. Tempo de cultura = 72h. Número de experimentos = 9.

Figura 15. Produção de IL-4 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (CB) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. Os valores brutos constam no anexo 3. O limite de detecção da técnica é 2,5pg/ml. Os valores de CB entre 0 e 2,5 foram arredondados para 2,4. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina pelos peptídeos, ou seja, a produção da citocina foi menor na presença do estímulo do que no controle basal sem estímulo. Os valores de CB variaram de 0 a 6,1. Os valores brutos constam no anexo 2. Tempo de cultura = 72h. Número de experimentos = 9.

Figura 16. Produção de IL-2 por PBMC estimuladas com peptídeos da Hsp60. Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (CB) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. Os valores brutos constam no anexo 3. O limite de detecção da técnica é 2,5pg/ml. Os valores de CB entre 0 e 2,5 foram arredondados para 2,4. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina pelos peptídeos, ou seja, a produção da citocina foi menor na presença do estímulo do que no controle basal sem estímulo. Os valores de CB variaram de 0 a 7,8 e em um experimento foi obtido um valor mais alto igual a 39,2. Os valores brutos constam no anexo 2. Tempo de cultura = 72h. Número de experimentos = 9.

Em resumo, as citocinas IL-10 e IFN- γ foram detectadas com maior frequência e em maiores concentrações. O peptídeo N7 foi o maior indutor de IL-10 sendo observada razão IL-10/IFN- γ igual a 21,54. Já, o peptídeo C4 foi o que mais induziu a produção de IFN- γ , de forma que a sua razão IFN- γ /IL-10 foi igual a 89,9 (Tabela 5).

Tabela 5. Razão IL-10/IFN- γ e IFN- γ /IL10 para os peptídeos da Hsp60

Peptídeo	IL-10/IFN- γ	IFN- γ /IL-10
N2	0,07	14,20
N6	0,45	2,20
N7	21,54	0,05
C4	0,01	89,09

A razão foi calculada a partir do total de produção de cada citocina para o respectivo peptídeo, somando os valores de pg/ml de todos os experimentos. Número de experimentos = 9.

4.5 Relação entre a produção de citocinas e a expressão gênica de moléculas relacionadas

Os dados obtidos da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura foram, em sua maioria, coerentes com aqueles obtidos nas reações de PCR em tempo real, para as moléculas relacionadas. Analisamos as seguintes moléculas como relacionadas: a proteína IFN- γ e seu RNA mensageiro, a proteína IL-10 e seu RNA mensageiro e a proteína IL-4 com o RNA mensageiro para o fator de transcrição Th2, GATA-3. A frequência total de resultados coerentes (as duas técnicas mostrando resultados coerentes/semelhantes) foi de 54,9%, enquanto que a frequência de resultados discrepantes (observado aumento em uma técnica e diminuição na outra ou vice-versa) foi de 10,7%. Em 34,3% das condições os resultados foram distintos, mas não opostos (sem alteração em uma técnica e aumento ou diminuição na outra). Para o total de 34 condições analisadas para cada citocina, os dados foram opostos em 6 condições para IFN- γ (17,6%), 4 para IL-10 (11,7%) e 1 para IL-4 e GATA-3 (2,9%). Total coerência dos dados foi observada em 16 condições para IFN- γ (47,1%) e 20 para IL-10 e para IL-4 e GATA-3 (58,8%) (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre a expressão gênica e proteína relacionada

IND#	Peptídeo	IFN-g		IL-10		GATA-3	IL-4
		Q.R.	pg/ml	Q.R.	pg/ml	Q.R.	pg/ml
1	N6	0,01	▼ 0,4	3,2	▼ 0,8	0,4	▼ 0,8
	N7	0,01	▼ 0,4	2,9	2,7	0,9	▼ 2,1
	C4	0,01	1,7	10	6,4	1,3	▼ 1,6
2	N6	0,5	▼ 3,7	2,3	8,6	14,9	13,4
	N7	0,6	1,8	2,1	7,9	8,2	9,2
	C4	1,4	▼ 11,3	0,1	1,6	0,1	▼ 0,6
3	N2	2,3	64,1	2,7	17	4,1	1,2
	N6	1,7	26,6	2,3	6	1,9	0
	N7	1	0	3,8	11,2	1,2	0
	C4	0,9	927,7	4,1	4,9	2,1	1,4
4	N2	1	▼ 48,8	0,6	0,2	0,2	▼ 2
	N6	0,7	▼ 50,7	2,3	24,7	0,4	▼ 2,4
	N7	0,6	▼ 38,7	1,1	0,1	0,8	▼ 4
	C4	0,7	▼ 14	0,1	▼ 1,3	0,1	▼ 4
5	N2	nr	67	1,1	0,1	0,9	▼ 0,9
	N6	nr	130,7	2	0,1	0,9	▼ 3,1
	N7	nr	▼ 1,6	2,7	0,1	0,3	▼ 3,1
	C4	nr	142,5	2,2	3,4	0,2	▼ 1,2
6	N2	3,1	9,6	1	▼ 0,5	1,2	0
	N6	2,3	69,8	1	▼ 3,7	1,4	0
	N7	1,2	▼ 2,9	0,9	1	1,3	0
	C4	3,2	71	1,9	0,8	0,7	0
7	N2	0,6	▼ 0,4	2,8	4,3	0,6	▼ 3,6
	N6	1,8	▼ 4,6	3,3	54,4	1,6	▼ 1,8
	N7	1,1	3,4	3,3	68,8	1,3	▼ 0,2
	C4	0,7	▼ 2	1,2	▼ 2,5	0,4	▼ 3,6
8	N2	2,2	4,1	1,8	▼ 2,5	0,8	▼ 4
	N6	1,8	0,9	0,5	▼ 2,5	1	▼ 6,1
	N7	1	▼ 0,9	0,5	▼ 2,5	0,4	▼ 3,7
	C4	2	11	0,7	▼ 2,5	0,2	▼ 6,1
9	N2	2,8	285,4	3,4	6,4	0,6	▼ 3,3
	N6	1,9	▼ 474,3	2,6	7	1,3	▼ 2,4
	N7	1,9	▼ 479,4	2,7	16,6	0,7	▼ 3,4
	C4	2,8	966,4	3,5	3,3	0,5	▼ 2,4

Os valores das colunas Q.R. são os valores de quantificação relativa para o respectivo gene sob efeito de cada peptídeo, comparativos à condição de cultura sem peptídeo. A cor verde indica aumento de expressão do gene ($QR \geq 2$) e a cor vermelha indica diminuição de expressão ($QR \leq 0,5$). Os valores das colunas pg/mL são os valores obtidos para a quantidade de citocinas e estão descontados do controle basal sem estímulo (CB) do respectivo experimento (dados da tabela 5). A cor verde indica maior produção da citocina que o CB. A cor laranja indica que os resultados obtidos na PCR em tempo real e do CBA são opostos e, a cor azul indica coerência entre os resultados da PCR em tempo real e CBA. A ausência de preenchimento colorido indica que os dados são discrepantes, mas não opostos. ▼ = inibição da produção da citocina (valor para o peptídeo menor que o valor do CN) QR = quantificação relativa; nr = não realizado. Número de indivíduos avaliados = 9.

4.6 Efeito dos peptídeos N2, N6 e N7 na expressão gênica de moléculas REGULA x INFLAMA em linfócitos T purificados

Com base nos resultados do painel REGULA/INFLAMA, selecionamos alguns peptídeos (N2, N6 e N7) para verificar se eles eram capazes de induzir modificações de expressão gênica, dos mesmos genes, diretamente em linfócitos T purificados, analisando células de 4 indivíduos (indivíduos 1, 2, 15 e 16).

Nossos resultados mostraram haver também uma ação direta de todos os peptídeos testados (N2, N6 e N7) sobre os linfócitos T purificados (LT). Os aumentos de expressão gênica observados para todos os peptídeos foram de baixa intensidade (QR de 2 a 2,5), e ocorreram apenas para os genes Foxp3 (8 dias), TGF- β , GATA-3 e IL-10. A única exceção de alta intensidade ocorreu com a IL-10 para o indivíduo 15, na presença do peptídeo N6 (QR= 357). Destes genes, Foxp3 e GATA-3 foram os que apresentaram a maior frequência de aumentos de expressão, 4 de 10 condições experimentais para ambos. Todas as modificações INFLAMA foram caracterizadas por diminuições de expressão de genes reguladores, com destaque para IDO que teve a sua expressão diminuída em 6 de 10 condições experimentais (Tabela 7).

Outra observação importante foi que as modificações observadas nos linfócitos T foram, em sua maioria, distintas daquelas observadas para PBMC (Tabela 7). Foi interessante notar que, analisando a somatória de todos os experimentos, o N6 teve uma inversão no perfil geral, sendo predominantemente INFLAMA para PBMC e REGULA para o efeito direto

em LT. Já, o N7 teve um maior número de modificações REGULA para PBMC e, mostrou um número igual de modificações REGULA e INFLAMA para LT. Não foram observadas diferenças marcantes para o N2.

O indivíduo 01, já analisado nos experimentos anteriores, manteve o perfil REGULA observado em PBMC. Embora tenham ocorrido diminuições de expressão dos genes de IL-10 e IDO, o perfil REGULA foi também dominante para LT e, o N6 foi o que mostrou o maior número de modificações REGULA para esse indivíduo. O indivíduo 02 também foi analisado anteriormente com PBMC e manteve um perfil similar ao observado para esses peptídeos. Em LT apenas ocorreram modificações do tipo REGULA e, os 3 peptídeos foram capazes de induzir Foxp3 tardiamente.

Os outros indivíduos, 15 e 16, mostraram um maior número de modificações de expressão gênica do tipo INFLAMA, tanto em PBMC como em LT. Para esses 2 indivíduos foi observado um maior número de modificações de expressão gênica para a população de PBMC em relação à de LT. Para o indivíduo 16, por exemplo, os aumentos de expressão gênica foram muito expressivos em PBMC na presença do N7, ocorrendo para todos os genes analisados e chegando a valores altos de QR (ex: QR de 244,2 para TGF- β). Já em LT, não foram observados aumentos de expressão; as modificações observadas consistiram em 3 inibições, 2 para IDO e uma para GATA-3 (Tabela 7).

Tabela 7. Modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA induzidas pelos peptídeos N2, N6 e N7: comparação PBMC vs linfócitos T purificados.

IND #	Gene analisado	PBMC			LINFÓCITOS T			PREDOMÍNIO REG/INFLAMA	
		N2	N6	N7	N2	N6	N7	PBMC	LT
IND 01	Foxp3 (72h)	1,0	1,1	1,1	0,9	1,0	0,8		
	Foxp3 (8d)	nr	nr	nr	1,0	2,2	0,9		
	IL-10	3,1	1,0	2,0	0,5	1,1	0,5		
	TGFβ	0,9	2,6	2,1	1,0	2,2	2,3		
	GATA3	0,9	0,7	0,8	0,7	2,1	1,2		
	IDO	1,1	1,2	0,8	0,3	0,5	1,0		
	RORγt	1,0	1,0	1,4	1,9	1,7	0,8		
	IFN-γ	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	1,1		
	T-bet	0,8	0,7	0,5	1,3	1,5	0,5		
IND 02	Foxp3 (72h)	0,8	1,3	0,6	0,9	1,1	0,9		
	Foxp3 (8d)	nr	nr	nr	2,0	2,1	2,4		
	IL-10	0,5	1,0	2,3	0,6	0,9	1,0		
	TGFβ	3,5	2,4	1,0	1,2	1,3	1,0		
	GATA3	0,8	2,1	0,9	2,2	1,4	1,1		
	IDO	0,7	3,2	0,7	0,8	0,6	0,8		
	RORγt	0,8	1,3	0,6	0,5	0,8	0,3		
	IFN-γ	0,5	1,3	1,3	1,0	0,6	0,4		
	T-bet	0,7	0,8	0,3	0,7	0,8	0,9		
IND 15	Foxp3 (72h)	nr	2,1	1,7	nr	0,6	0,5		
	IL-10	nr	0,003	0,003	nr	357,1	0,1		
	TGFβ	nr	0,3	2,0	nr	1,0	1,2		
	GATA3	nr	0,8	0,9	nr	2,5	2,2		
	IDO	nr	2,4	0,4	nr	0,2	0,4		
	RORγt	nr	1,2	2,3	nr	0,7	0,9		
	IFN-γ	nr	1,5	1,4	nr	1,2	1,1		
	T-bet	nr	2,1	3,4	nr	1,8	1,3		
IND 16	Foxp3 (72h)	nr	1,7	33,8	nr	0,8	1,3		
	IL-10	nr	1,0	33,4	nr	1,2	0,7		
	TGFβ	nr	0,8	244,2	nr	1,2	1,0		
	GATA3	nr	0,5	18,0	nr	1,0	0,5		
	IDO	nr	0,3	11,9	nr	0,4	0,5		
	RORγt	nr	5,2	91,1	nr	1,3	1,1		
	IFN-γ	nr	2,2	51,4	nr	1,1	1,6		
	T-bet	nr	2,5	46,3	nr	1,1	0,9		
Modificações REGULA		4	7	12	5	7	6	13	10
Modificações INFLAMA		1	8	7	1	2	6	6	7
Sem Modificações		11	17	13	11	24	21	15	17
No. Total condições		16	32	32	17	33	33	34	34
Faixa ↑		3,1 a 3,5	2,1 a 5,2	2,0 a 244,2	2,0 a 2,2	2,5 a 357,1	= 2,2	na	na
Faixa ↓		0,5 a 0,4	0,5 a 0,003	0,4 a 0,003	0,5 a 0,2	0,4 a 0,2	0,5 a 0,4	na	na
Concordância de modificações PBMC x LT		9/16	16/32	14/32	9/16	16/32	14/32	12/34	12/34

Os valores mostrados na tabela são os valores de Q.R. (quantificação relativa) para o respectivo gene e peptídeo, comparativos à condição de cultura sem peptídeo. A cor verde indica aumento de expressão do gene e a cor vermelha indica diminuição de expressão. Aumento de expressão gênica: $QR \geq 2$; diminuição de expressão gênica: $QR \leq 0,5$. A cor cinza indica modificação de expressão do perfil REGULA (aumentos de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e diminuições de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ) e a cor amarela indica modificação do perfil INFLAMA (diminuições de expressão de Foxp3, GATA-3, IL-10, TGF-β e IDO e aumentos de expressão de T-bet, RORγt e IFN-γ). A coluna "predomínio REG/INFLAMA" mostra o perfil predominante de alterações de expressão observado por indivíduo, para PBMC e LT, para cada gene. IND – indivíduo. nr = não realizado; na = não se aplica. Número de indivíduos estudados = 4.

4.7 Efeito supressor de peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3 e na resposta alogênica

Os peptídeos selecionados (N2, N6 e N7) foram capazes de inibir a proliferação de PBMC induzida por α CD3, porém tal inibição foi baixa, chegando aos valores máximos de 31% para o N2, 25,1% para o N6 e 26% para o N7 (Tabela 8 e Figura 17).

Tabela 8. Efeito inibidor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3

Experimento	Peptídeos		
	N2	N6	N7
% Inibição			
1	nr	9,10	15,31
2	nr	13,97	18,01
3	9,45	8,09	20,94
4	12,17	9,64	19,60
5	10,29	1,59	16,44
6	31,01	25,06	23,82
7	4,77	13,68	26,04
% Média de inibição	13,54	11,59	20,02

As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Proliferação feita com CFSE e análise feita por citometria de fluxo; concentração dos peptídeos utilizada: 10 μ g/ml; nr = não realizado. Os valores brutos constam no anexo 3.

Figura 17. Efeito de peptídeos da Hsp60 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3. As percentagens de proliferação foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). N2, N6 e N7: peptídeos da Hsp60. Proliferação feita com CFSE; concentração dos peptídeos utilizada: 10 μ g/ml As barras marcam o desvio padrão de cada condição. Número de experimentos = 7.

O uso das diferentes concentrações dos peptídeos nos mostrou resultados distintos. Para o N2 e o N7, a concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ foi a que inibiu mais intensamente a proliferação induzida por αCD3 , sendo as porcentagens de inibição 16,44% e 31,74% para o N2 e 18,31% e 68,84% para o N7, nessa concentração (Tabela 9 e Figuras 12 e 14). Porém, a concentração que mostrou maior homogeneidade nos dois experimentos foi a de 10 $\mu\text{g/ml}$, para o N2 e N7. O peptídeo N3 nos mostrou um padrão diferenciado. A concentração que mostrou maior percentagem de inibição da proliferação induzida por αCD3 , além de maior constância de resultado entre experimentos foi a de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 9 e Figuras 19, 20 e 21).

Figura 18. Exemplo de inibição da proliferação induzida por αCD3 . Os quadrantes à direita delimitam a região das células marcadas com CFSE que não perderam a intensidade de fluorescência em FL1, ou seja, não proliferaram. Os quadrantes à esquerda delimitam a região das células que perderam a fluorescência em FL1, ou seja, proliferaram. Desse modo, em **A** 38,3 células proliferaram na ausência do peptídeo, enquanto em **B** apenas 12,7 células proliferaram na presença do peptídeo N7. A inibição induzida pelo peptídeo N7 foi de 66,8%. Concentração do peptídeo = 25 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 9. Efeito inibidor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3: curva dose/ resposta.

Exp.	Peptídeos Hsp60													µg/ml
	N2				N3				N7					
	0,1	1	10	25	0,1	1	10	25	0,1	1	10	25		
1	-2,1	15,9	17,4	16,4	21	-0,7	5,6	-0,8	3,9	11,3	19,1	18,5	%	
2	29,5	12,8	18,5	31,7	23	11,7	10,7	9,5	14,5	2,7	15,6	68,8	%	
Média	13,73	14,3	17,9	24,1	22	5,53	8,2	4,4	9,22	6,97	17,3	43,7	%	

As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). A cor vermelha destaca valores negativos de inibição, ou seja, a proliferação foi maior do que na ausência do peptídeo. Proliferação feita com CFSE e análise por citometria de fluxo. Os valores brutos constam no anexo 3. n=2.

Figura 19. Efeito do peptídeo N2 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3: curva dose/ resposta.

As percentagens de proliferação foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência do peptídeo, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Cada barra ilustra o valor de proliferação obtido em cada experimento separadamente. Proliferação feita com CFSE. Número de experimentos = 2.

Figura 20. Efeito do peptídeo N3 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3: curva dose/ resposta. As percentagens de proliferação foram calculadas a partir do valor % de células que proliferaram com α CD3 na ausência do peptídeo, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Cada barra ilustra o valor de proliferação obtido em cada experimento separadamente. Proliferação feita com CFSE. Número de experimentos = 2.

Figura 21. Efeito do peptídeo N7 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo policlonal α CD3: curva dose/ resposta. As percentagens de proliferação foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência do peptídeo, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Cada barra ilustra o valor de proliferação obtido em cada experimento separadamente. Proliferação feita com CFSE. Número de experimentos = 2.

Os três peptídeos selecionados mostraram maior capacidade de inibição com o estímulo alogênico, em reação linfocitária mista (MLR). Os maiores valores de inibição de proliferação obtidos foram 33,45% para o N2, 52,30% para o N6 e 60,53% para o N7 (Tabela 10 e Figura 22).

Tabela 10. Efeito inibidor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por MLR

Experimento	Peptídeos		
	N2	N6	N7
	% Inibição		
1	nr	30,74	48,39
2	nr	52,30	60,53
3	33,45	36,60	50,44
4	25,21	17,50	34,79
% Média de inibição	29,33	34,29	48,54

As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com a MLR na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Proliferação feita com CFSE e análise por citometria de fluxo; concentração dos peptídeos utilizada: 10µg/ml; nr = não realizado. Os valores brutos constam no anexo 3.

Figura 22. Efeito de peptídeos da Hsp60 na proliferação de PBMC induzida pelo estímulo da MLR. As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram na MLR na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). As barras marcam o desvio padrão de cada condição. Proliferação feita com CFSE e análise por citometria de fluxo. Número de experimentos = 4. Teste ANOVA (Kruskal-Wallis) *(p=0,018).

Tabela 11. Balanço global dos resultados com os principais peptídeos da Hsp60

Pep.	Razão REG/ INFLAMA	Genes mais afetados	Citocinas induzidas	Razão IL-10/IFN- γ	Valor máximo de Inibição de proliferação	
					α CD3	MLR
N2	1,8	↑ TGF- β , IFN- γ e IDO	IFN- γ e IL-10	0,07	31,01%	33,45%
N6	1,4	↑ IL-10 ↓ T-bet	IL-10	0,45	25,06%	52,30%
N7	2,2	↑ Foxp3 e IL-10 ↓ ROR γ t	IL-10	21,54	26,04%	60,53%
C4	1,1	↑ IDO ↓ TGF- β e GATA-3	IFN- γ , IL-10 e IL-2	0,01	nr	nr

Estão representados os principais resultados obtidos com os peptídeos que foram escolhidos para os ensaios funcionais. Genes mais afetados: modificações da expressão gênica induzida, em PBMC, pelos peptídeos da Hsp60, analisadas por PCR em tempo real (dados da Tabela 3); Citocinas induzidas: produção de citocinas induzida pelos peptídeos da Hsp60, em sobrenadante de cultura com PBMC, em 72h de cultura. Análise feita por CBA (dados das Figuras 11-16); As percentagens de inibição de proliferação foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 ou MLR na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Proliferação feita com CFSE e análise por citometria de fluxo (dados das Tabelas 8 e 10). Pep – peptídeo da Hsp60; MLR – reação linfocitária mista; ↑ - aumento de expressão gênica; ↓ - diminuição de expressão gênica; nr – não realizado.

5. DISCUSSÃO

O nosso principal objetivo neste trabalho foi identificar peptídeos da Hsp60 potencialmente imunorreguladores, a partir da análise de um painel de genes da resposta imune. Os peptídeos estudados foram capazes de interagir com as células do sistema imune, *in vitro*, modulando a expressão de diversos genes simultaneamente. Isto que confirma nossa hipótese de que diversas vias moleculares podem estar envolvidas na resposta potencialmente imunorreguladora dirigida à Hsp60 própria. Além disso, nossos resultados mostraram que o efeito *in vitro* da Hsp60 e de seus peptídeos sobre células de indivíduos sadios foi diverso. Mesmo assim, para a maioria dos peptídeos da região N-terminal, com destaque para os peptídeos N2, N6 e N7, o efeito observado foi predominantemente do perfil REGULA, enquanto que o efeito dos demais peptídeos foi predominantemente do perfil INFLAMA, com poucas exceções.

Como já mencionado, os peptídeos N7, N2 e N6 foram os que tiveram as maiores frequências de modificações de expressão gênica do perfil REGULA. A avaliação de seu efeito supressor *in vitro* nos mostrou que esses peptídeos são capazes de inibir a proliferação de PBMC induzida por estímulos policlonais com o anticorpo anti-CD3 (α CD3) e alogeneico em cultura linfocitária mista (MLR). O efeito de peptídeos da Hsp60 sobre o estímulo alogeneico foi muito mais intenso, com inibições de até 60%, com o peptídeo N7. Esses resultados nos mostram que a escolha dos peptídeos a partir da análise do nosso painel de genes foi válida, uma vez que os

peptídeos selecionados mostraram capacidade supressora. O estímulo inespecífico com α CD3 é muito intenso, e a simples adição dos peptídeos na cultura não foi suficiente para induzir uma inibição de proliferação mais expressiva. Apesar do uso de maiores concentrações dos peptídeos na cultura não ter mostrado um efeito dose dependente claro para todos os peptídeos, para o peptídeo N7 houve aumento do efeito supressor, mostrando inibição de 68% com de 25 μ g/ml do peptídeo.

A partir desses resultados, podemos discutir muitas questões que consideramos interessantes e relevantes. Apesar de certa diversidade de efeitos, a nossa forma de análise nos permitiu ver um padrão dominante, de modificações com o perfil imunorregulador, principalmente em relação aos peptídeos da região N-terminal da Hsp60. Esses dados sugerem que apesar da Hsp60 ter um papel na sinalização de perigo, como descrito na literatura (Chen *et al.*, 1999), diversos dos seus peptídeos podem desempenhar atividade imunorreguladora. Isso reforça a dupla função da Hsp60 na interação com o sistema imune – próinflamatória e imunorreguladora – assim como outras Hsps.

A Hsp60 e os peptídeos N2 e N7 apresentaram as maiores frequências de aumentos da expressão tardia de Foxp3 (5 de 14 para Hsp60 e 6 de 14 para N2 e N7). A expressão prolongada de Foxp3 é importante por ser atribuída à geração de células Treg (Wan *et al.*, 2007), em contraste com a expressão transitória em células T efectoras (Mantel *et al.*, 2006). Assim, é possível que o aumento sustentado da expressão de Foxp3 observado seja decorrente da indução de novas células Treg pelos peptídeos da Hsp60 N2

e N7. A expressão de Foxp3 pode ter sido induzida diretamente pelos peptídeos, pela ligação ao TCR, ou ainda pode ter ocorrido estímulo indireto, via células dendríticas. Não encontramos na literatura qualquer trabalho que mostrasse a Hsp60 sozinha induzindo a expressão de Foxp3. Porém, a administração de células dendríticas tratadas com Hsp60 e rapamicina aumentou a expressão de Foxp3 e CD25 em células T CD4 *naive in vitro*, mostrando a possibilidade de indução de Tregs (Yang *et al.*, 2006). Neste estudo, as células geradas, possivelmente Tregs, foram posteriormente testadas em modelo de aterosclerose e, os animais tratados mostraram menor desenvolvimento da placa. É possível, em nossos ensaios, que a Hsp60 inteira tenha sido processada pelas células apresentadoras e, que o aumento da expressão do Foxp3 tenha sido consequência do estímulo dos peptídeos gerados a partir desse processo. O efeito pode ter ocorrido via células dendríticas, de forma similar ao trabalho mencionado anteriormente, ou pela interação com outras APCs ou mesmo pelo efeito direto em linfócitos T. Não sabemos se esses peptídeos gerados endogenamente são similares aos nossos peptídeos sintéticos ou não e, para isso seria necessário eluir os peptídeos das moléculas MHC e depois sequenciar, conforme já foi feito na literatura (Ciatto *et al.*, 2003; Michaëlsen *et al.*, 2002).

Outros peptídeos, principalmente da região intermediária e C-terminal da Hsp60, foram capazes de induzir a expressão precoce (72h) do Foxp3, mas esta foi perdida em 8 dias. Hoje, sabe-se que a expressão de Foxp3 pode ocorrer em células T CD4 e CD8 sem relação com atividade reguladora, como consequência da ativação celular (Gavin *et al.*, 2006). Tal

expressão é pouco compreendida e não confere atividade supressora e, foi mostrado que essas células T com expressão transitória de Foxp3 não perdem a capacidade de produzir citocinas próinflamatórias (Gavin *et al.*, 2006). É possível que a expressão precoce de Foxp3, induzida pelos peptídeos das regiões intermediária e C-terminal da Hsp60, tenha sido consequência da ativação das células presentes na cultura. Ainda, outra possibilidade é a que células Treg previamente presentes nas PBMCs dos indivíduos sadios tenham perdido a expressão de Foxp3. Nesse sentido, existe um trabalho recente onde foi mostrado que existem, na periferia, dois tipos de populações de Treg, sendo uma estável e outra que mantém plasticidade funcional. Esta população plástica pode perder a expressão de Foxp3 e passar a secretar citocinas como IL-17 e IFN- γ (Komatsu *et al.*, 2009). Além disso, em outro estudo, foi mostrado que a expressão de Foxp3 é necessária para manter as características e funções das células Treg na periferia (Williams e Rudensky, 2007). Neste trabalho, a perda de sua expressão levou à perda da capacidade supressora *in vivo* e, as células ganharam a capacidade de produzir citocinas inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , tornando-se potencialmente patogênicas. Como não analisamos as citocinas induzidas por todos os peptídeos da Hsp60, não sabemos se a perda da expressão de Foxp3 observada em nossos resultados ocasionou a formação dessas células produtoras de citocinas proinflamatórias. O único dado que permite sugerir tal interpretação foi o aumento da expressão gênica de IFN- γ observado em 6 experimentos (46%) com o peptídeo I6 e, na presença desse mesmo peptídeo, a expressão de Foxp3 foi perdida em 4

dos 5 experimento nos quais ocorreu a expressão precocemente. Foi, também, recentemente descrito que o ambiente autoimune, ou seja, a presença de antígenos próprios no contexto inflamatório favorece a perda da expressão do Foxp3, levando à formação de células de memória efetora patogênicas (Zhou et al., 2009). Neste contexto, a instabilidade da expressão do Foxp3 poderia ser sugerida como um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da autoimunidade patológica.

A perda da expressão do Foxp3 foi observada na presença de vários dos peptídeos estudados, sendo mais frequente para os peptídeos da região intermediária, especialmente o I6. A partir dessa observação, e lembrando que a perda da expressão do Foxp3 pode levar à formação de células patogênicas (Zhou et al., 2009), podemos sugerir que o envolvimento da Hsp60 em processos de doenças autoimunes, já descrito por diversos pesquisadores (Prakken *et al.*, 2003; Knoflach *et al.*, 2009; Imatoh *et al.*, 2009), possa envolver a resposta imune dirigida à sua região intermediária. Tal perda de expressão foi muito pouco frequente para os peptídeos da região N-terminal e, com o N7 houve diminuição da expressão de Foxp3, tardiamente, em apenas 1 experimento.

Os nossos experimentos funcionais mostraram que os peptídeos da Hsp60 são capazes de suprimir a resposta proliferativa. Sabendo que a expressão prolongada de Foxp3 ocorre exclusivamente em células Tregs (Wan *et al.*, 2007), é muito provável que os nossos peptídeos tenham induzido esse tipo celular, e isso seja um dos fatores importantes na supressão de proliferação obtida. Embora os dados atuais indiquem forte

correlação entre a presença do RNA mensageiro e a expressão protéica de Foxp3 (Mantel *et al.*, 2006), será importante verificar a expressão protéica de Foxp3 intracelular, juntamente com a expressão de superfície de CD4 e CD25, para confirmar o tipo celular que expressa esse fator de transcrição.

A indução de T-bet ou GATA-3 pode contrabalancear a indução de FOXP3, já que a polarização Th1/Th2 parece interferir na indução periférica de células reguladoras FOXP3⁺, como já foi descrito (Wei *et al.*, 2007). Em nosso estudo, ocorreu em poucos casos o aumento simultâneo da expressão de Foxp3 e de qualquer desses fatores de transcrição. Apenas em 2 de 14 experimentos, a Hsp60 induziu Foxp3 juntamente com GATA-3 e, isso ocorreu para o N2 em apenas 1 experimento. Além disso, o peptídeo N7 induziu aumento simultâneo de Foxp3 e T-bet em 1 experimento. Isso mostra que a interferência Th1/Th2, descrita na literatura (Wei *et al.*, 2007), pode não ser um fator forte em todos os casos de indução periférica de células Treg.

Outro gene estudado, que é muito importante em processos de regulação da resposta imune, é o da IL-10. A Hsp60 e os peptídeos N6 e N7 foram os seus maiores indutores (Hsp60 em 8 de 14, N6 em 7 de 14 e N7 em 6 de 14 experimentos). Além disso, houve pouca inibição da expressão da IL-10 com todos os peptídeos da região N-terminal, contrariamente aos das demais regiões. As células Treg secretam IL-10, de modo que a sua presença pode ser um indício da presença dessas células na cultura. Em outros trabalhos, já foi mostrado que a Hsp60, *in vitro*, pode induzir a secreção de IL-10 tanto por células T (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005b) como por

células B (Cohen- Sfady *et al.*, 2005) e ainda, que a IL-10 é importante na atividade supressora de Tregs pela Hsp60 *in vitro* (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006). Como já mencionamos, os nossos peptídeos N6 e N7 mostraram as maiores frequências de aumento da expressão gênica da IL-10. É possível que esses peptídeos compreendam os epitopos da Hsp60 capazes de induzir IL-10 e, que sejam capazes de induzir atividade imunorreguladora seja pela indução de novas Tregs seja pelo incremento de sua resposta.

Sabe-se também que IL-10 induz a geração de células Tr1 (revisado por Roncarolo e Gregori, 2008) e é possível que os peptídeos também induzam células Tr1. Em outro trabalho do nosso grupo, no qual foram estudados os mesmo peptídeos que estudamos neste projeto, foi visto que a IL-10 foi produzida principalmente na presença de peptídeos derivados da região C-terminal e intermediária da Hsp60 (Caldas *et al.*, 2004). Tal evento foi avaliado em pacientes receptores de transplante renal e, é possível que os indivíduos transplantados apresentem uma reatividade às regiões da Hsp60 distinta daquela presente em indivíduos sadios. Em outro estudo, a administração de um peptídeo, derivado da Hsp60 de *M. tuberculosis*, induziu tolerância dependente de IL-10 em um modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA) (Prakken *et al.*, 2002). A indução de secreção de IL-10 e IL-4 consiste em um mecanismo já proposto para a imunorregulação induzida pela Hsp60 (revisado por Pockley, 2008) e, é possível que a resposta dirigida à região que abrange os peptídeos N6 e N7 seja responsável por esse evento já observado por outros grupos. Cabe acrescentar que a IL-10 pode também ser produzida por outros tipos celulares, como monócitos e

células B reguladoras (Lemoine *et al.*, 2009). Em nosso estudo, em alguns casos, foi detectado o aumento da expressão de IL-10 na ausência da expressão tardia de Foxp3. Isso ocorreu especialmente na presença do peptídeo N6 (5 de 13 experimentos – 38,5%) e, sendo a população estudada muito heterogênea, é possível que o N6 tenha estimulado outros tipos celulares a secretar a IL-10.

O TGF- β é outra citocina importante para a geração de células Treg. O peptídeo N2 foi o que mais aumentou a sua expressão e não diminuiu a sua expressão em nenhum experimento. Como já mencionado anteriormente, o N2 foi um dos peptídeos que mais aumentou a expressão de Foxp3 tardiamente, juntamente com o N7. É possível que a expressão simultânea desses 2 genes resulte no aumento da geração de células Treg. Ao mesmo tempo, o N2 aumentou a expressão de ROR γ t em 4 de 14 experimentos então, esse peptídeo poderia também provocar a diferenciação e manutenção de células Th17. A interpretação desses dados é muito complexa e para uma melhor compreensão, seria interessante também analisar as interleucinas 6, 21 e 23, sabidamente importantes na diferenciação de células Th17 (revisado por Warren *et al.*, 2008). Foi interessante observar que a Hsp60 inteira induziu o aumento de ROR γ t em 3 dos 14 experimentos e, na literatura, não encontramos qualquer trabalho relacionando a Hsp60 com as células Th17. Nossos dados sugerem que a Hsp60 pode induzir a diferenciação desse tipo celular, uma vez que foi capaz de induzir aumento da expressão do fator ROR γ t simultaneamente com TGF- β .

Como já foi mencionado, o TGF- β é necessário para a diferenciação de Tregs e de células Th17. Já foi mostrado que, na ausência de um segundo sinal de citocinas pró-inflamatórias, o Foxp3 pode inibir a função do ROR γ t e levar à diferenciação de Tregs. Entretanto, quando as células também recebem sinais de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, esta função do FOXP3 é inibida e ocorre a indução da via de diferenciação Th17 (Ziegler *et al.*, 2009). Além disso, recentemente foi mostrado que Tregs humanas de memória podem secretar IL-17 *ex vivo* e expressam constitutivamente ROR γ t e, além disso, essas Tregs de memória compartilham algumas características fenotípicas e funcionais das células Th17 (Ayyoub *et al.*, 2009). Dessa forma, parece que, em análises *ex vivo*, a expressão de ROR γ t não pode ser relacionada apenas com a presença de células Th17. A indução da expressão simultânea dos fatores de transcrição Foxp3 e ROR γ t, vista, por exemplo, na presença do peptídeo N2, pode também ser interpretada como a presença de células Treg que expressam também o fator ROR γ t. Certamente esses achados recentes aumentam a complexidade da interpretação de nossos resultados e é provável que existam ainda outras interações ainda não exploradas, envolvendo as moléculas analisadas neste estudo. Apesar do desafio que é a interpretação sobre a expressão de múltiplos genes, acreditamos que este tipo de análise mais global possa trazer informações importantes, que são normalmente perdidas em análises pontuais.

Annunziato *et al* (2007) mostraram que, ao menos em humanos, pode existir uma relação entre o desenvolvimento e/ou função Th1 e Th17, uma

vez que células Th17 também expressam T-bet. Porém, a administração da citocina polarizante para Th1, IL-12, provocou diminuição da expressão de ROR γ t e IL-17, e o aumento da expressão de T-bet e IFN- γ . Outro grupo mostrou que as células Th17 são fortemente afetadas por IL-12 *in vitro*, tornando-se duplamente positivas para IFN- γ e IL-17 (Shi *et al.*, 2008). O aumento simultâneo da expressão de ROR γ t e T-bet, observado para os peptídeos I6, I9 e C8, poderia estar relacionado à geração dessas células duplamente positivas, salientando que, na presença desses peptídeos, também ocorreu aumento da expressão de IFN- γ .

O fator de transcrição T-bet, importante para a geração de células Th1, foi um dos genes que teve mais frequentemente diminuições de expressão gênica induzida pelos peptídeos da Hsp60. O desvio para a resposta Th2 já foi relacionado com a atividade imunorreguladora da Hsp60 por outro grupo (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005b). Neste trabalho, a administração da Hsp60 provocou diminuição de lesões hepáticas induzidas por Con-A e esse efeito mostrou estar relacionado ao aumento da expressão de GATA-3 e diminuição de T-bet. Em nossos resultados obtivemos uma frequência baixa de aumentos da expressão de GATA-3 (12,5% do total), sugerindo não ser esse um mecanismo de regulação importante induzido pelos peptídeos que estudamos, nessas condições.

Ao analisarmos os resultados obtidos para IFN- γ , verificamos que o peptídeo N7 não aumentou a sua expressão em nenhum dos experimentos e, o N6, em apenas 1. Já, o N2, apesar de ter sido o segundo estímulo com maior número de modificações de expressão do perfil REGULA, foi o que

mais aumentou a expressão de IFN- γ (5 de 14 experimentos). Apesar dessa observação, o N2 também aumentou a expressão de IDO em 5 experimentos, o que sugere que o aumento de IFN- γ tenha induzido o aumento da expressão de IDO como já relatado na literatura (Koide e Yoshida, 1994). Não encontramos na literatura qualquer trabalho mostrando o envolvimento da IDO em mecanismos imunorreguladores induzidos pela Hsp60 e acreditamos ser importante estudar mais a fundo essa possibilidade.

Já foi mostrado que a Hsp60 tem a sua expressão aumentada em pacientes com câncer cervical, de ovário, de intestino grosso, leucemia, entre outros (Hwang et al., 2009). Além disso, em outro trabalho, foi mostrado que a Hsp60, quando expressa juntamente com a β -catenina, é indicativo de péssimo prognóstico para pacientes com câncer de cabeça e pescoço, podendo estar associada à indução de metástases (Tsai et al., 2009). Sabe-se que a IDO é uma enzima imunossupressora que apresenta a sua expressão aumentada em ambientes tumorais (revisado por Katz et al., 2008) e, estando a Hsp60 também aumentada em diversos tipos de tumores, é possível que uma das vias de indução da IDO, neste contexto, seja pela Hsp60 e peptídeos dela derivados e, considerando os nossos resultados com o peptídeo N2, sugerimos que ele possa ter importância neste processo. Por outro lado, uma vacina de DNA de Hsp65 de micobactéria mostrou efeito imunoestimulador em um teste clínico de fase 1 para câncer de cabeça e pescoço, do qual o nosso grupo participou (Michaluart et al., 2008). Nesse trabalho, alguns pacientes mostraram

indícios de estimulação imune, apresentando dor, edema e aumento da proliferação basal de PBMC após vacinação. Lembrando que a Hsp60 apresenta sequências compartilhadas com a Hsp65, é possível que a Hsp60 possa desencadear também respostas inflamatórias, importantes no tratamento do câncer, como já relatado anteriormente (Huang *et al.*, 2007).

A enzima IDO já foi, há alguns anos, descrita como expressa por células dendríticas (Hwu *et al.*, 2000) e já se sabe que outros tipos celulares, como células epiteliais do pulmão (Hayashi *et al.*, 2001) e intestino (Barcelo-Batllori *et al.*, 2002), também expressam IDO. Como em nosso trabalho, utilizamos PBMC e, a população de células dendríticas é muito pequena nas PBMC, é possível que outros tipos celulares presentes expressem esta enzima, tornando possível a detecção do seu transcrito. Outra possibilidade é que os estímulos da Hsp60 induzam uma grande expressão de IDO, permitindo a sua detecção em PBMC, mesmo que a expressão ocorra em um número limitado de células.

Ao analisarmos todos os genes estudados, verificamos que os genes que mais frequentemente tiveram de aumento de expressão, induzido pelos estímulos da Hsp60, foram Foxp3 e IL-10, dois genes predominantemente imunorreguladores. Esses resultados sugerem que esses peptídeos possam induzir a diferenciação de novas células Treg. Cabe ressaltar que utilizamos Hsp60 recombinante em níveis muito baixos de LPS e que a proteína ativou predominantemente vias imunorreguladoras *in vitro*. Alguns autores acreditam que a contaminação por LPS tenha sido o motivo dos resultados encontrados em alguns trabalhos nos quais foi apontada a participação da

Hsp60 na inflamação e/ou agravamento em modelos de doenças autoimunes (Gao e Tsan, 2004). Além disso, em outro trabalho, foi mostrado que a Hsp60 e o LPS podem apresentar um efeito sinérgico na indução *in vitro* de IL-12p40 e IFN- γ por macrófagos e células dendríticas, sendo o efeito ainda mais intenso quando ambos foram preincubados para formar complexos (Osterloh *et al.*, 2007). Os nossos resultados nos levam a acreditar que os dois tipos de resposta à Hsp60 - inflamatória e imunorreguladora - ocorram dependendo do contexto e mesmo de qual região ou fragmento está sendo reconhecido pelo sistema imune. Salientamos ser necessária sempre muita cautela com possíveis contaminações com LPS em estudos e interpretações de resultados com a Hsp60 recombinante.

Os resultados que encontramos na análise da expressão gênica foram coerentes com as citocinas detectadas nos sobrenadantes das culturas. O IFN- γ e a IL-10 foram as citocinas mais detectadas e, a primeira foi encontrada na presença dos peptídeos N2 e C4 e, a IL-10, na presença dos peptídeos N6 e N7. O peptídeo N7 induziu a maior razão de produção IL-10/IFN- γ , o que reforça os nossos resultados anteriores e a nossa interpretação sobre o potencial imunorregulador desse peptídeo. O IFN- γ foi a citocina que mostrou maior discrepância com os dados de expressão gênica, mostrando, às vezes, grandes concentrações de citocina em condições onde não foi detectada sua expressão gênica pelo PCR em tempo real. Isso pode ter ocorrido porque essa citocina apresenta uma expressão mais precoce e, no período de 72h, o RNA mensageiro codificante para o

seu gene pode não estar mais presente na célula, embora a citocina, já produzida, esteja presente no sobrenadante da cultura. As demais citocinas praticamente não foram detectadas, provavelmente pelo mesmo motivo mencionado anteriormente.

A IL-2 foi detectada em baixas concentrações apenas na presença do peptídeo C4. Sabe-se que essa citocina não é fundamental para a função supressora das células Treg, mas a sua neutralização, *in vitro*, mostrou diminuir a porcentagem e o número absoluto de células Foxp3+, além de reduzir da expressão de CD25 (Fontenot *et al.*, 2005). As células Treg consomem muita IL-2, mas não a produzem e, dessa forma, privam as outras células desse estímulo de sobrevivência (Pandiyan *et al.*, 2007). Então, com a possível interpretação da ausência dessa citocina, observada nas condições com os peptídeos N6 e N7, pode ser atribuída tanto à falta de produção, como ao alto consumo pelas células Treg possivelmente induzidas pelos peptídeos.

Conforme mencionamos, em diversos estudos anteriores com a Hsp60 humana, foi mostrado que o aumento de sua expressão pode estar relacionado tanto ao aumento de inflamação, como também à regulação de processos inflamatórios. De forma interessante, vimos que as células dos indivíduos sadios interagem com os peptídeos derivados da Hsp60 de formas bem diferentes e diversificadas. Para os indivíduos 01, 03, 05, 07, 08, 11 e 13 os estímulos da Hsp60 induziram um predomínio de modificações de expressão gênica reguladoras, enquanto para outros indivíduos, como 02, 04, 10 e 12, as modificações de expressão gênica foram predominantemente

do perfil inflamatório. Alguns indivíduos ainda mostraram maior equilíbrio entre as modificações de expressão gênica REGULA x INFLAMA (06, 09 e 14). Além disso, notamos que, para o indivíduo 01, os aumentos de expressão gênica observados foram muito intensos quando comparados aos dos demais indivíduos.

Para discutir essas diferenças individuais, é importante destacar que, ao longo de sua vida, cada pessoa passa por diferentes experiências imunológicas que, somadas à sua bagagem genética, podem modificar a resposta imune individual (Alves e Palermo-Neto, 2007). Estamos estudando uma população celular muito heterogênea e não sabemos ao certo que células foram as responsáveis pelas respostas por nós observadas.

Sabe-se que a Hsp60 pode se ligar a diferentes receptores, como os receptores do tipo *Toll* (Cohen-Sfady *et al.*, 2005; Graaf *et al.*, 2006), membros da família dos receptores *scavenger*, como o LOX-1 e SREC-1, e o receptor de lipoproteína de baixa densidade, CD91 (Thériault *et al.*, 2006). É provável que os peptídeos utilizados em nosso trabalho possam também interagir com diferentes receptores presentes nas células do sistema imune e, por esse motivo, induzam diferentes tipos de respostas, tanto dependentemente quanto independentemente de apresentação por APCs. Neste sentido, o grupo de pesquisa do Cohen já mostrou importância do receptor TLR2 na resposta celular, *in vitro*, após o tratamento com Hsp60, induzindo diminuição da secreção de IFN- γ e TNF- α e aumento da secreção de IL-10 por células T ativadas (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005b). Em outro trabalho, esse mesmo grupo observou que a Hsp60 pode atuar em células B

in vitro, por meio da ativação de TLR4, provocando indução da secreção de quantidades significativas de IL-10 e IL-6 (Cohen-Sfady *et al.*, 2005). Existe ainda outro trabalho, no qual foi mostrado que a Hsp60 está aumentada em mulheres na menopausa e que a sua presença excessiva provoca apoptose de osteoclastos mediada por TLR2 e TLR4 (Kim *et al.*, 2009). Então, a Hsp60 pode não apenas interagir com os receptores TLR, como pode atuar no aumento da sua expressão e exercer atividades funcionais distintas em diferentes tipos celulares.

Nossos resultados obtidos com populações purificadas de linfócitos T nos mostraram que os peptídeos N2, N6 e N7 interagem diretamente com os linfócitos T e podem ter se ligado aos receptores da resposta inata. Destacamos que as modificações de expressão obtidas com os linfócitos foram, em grande parte, diferentes daquelas obtidas com PBMCs do mesmo indivíduo, cultivados nas mesmas condições de cultura. Assim, é provável que a interação direta dos peptídeos com os LT leve a uma ativação diferente daquela obtida na presença de células apresentadoras (em PBMC), levando à ativação de diferentes vias de sinalização e à transcrição de diferentes genes. Porém, outra possibilidade interpretativa é que, em PBMC, o RNA dos linfócitos esteja diluído em outros RNAs derivados de outros tipos celulares e, isso poderia levar à detecção diferencial da expressão dos genes nos dois tipos de amostra.

O que podemos dizer em relação aos nossos resultados é que os peptídeos selecionados podem interagir diretamente com LT na ausência de APCs e levar à ativação de genes da resposta imune. Essa ativação foi, na

sua maioria, diferente daquela obtida com PBMC e resultou em um perfil predominantemente REGULA. Esse predomínio foi observado para o N2 e N6 e foi observado um perfil equilibrado REGULA/INFLAMA para o N7. Em 2 dos indivíduos foi observado apenas o aumento tardio (8 dias) de expressão de Foxp3, sugerindo a indução de células T reguladoras. Em nenhum dos experimentos ocorreu aumento precoce de Foxp3 ou aumento de expressão de genes INFLAMA: ROR γ t, IFN- γ e T-bet. Além disso, todas as modificações do tipo INFLAMA observadas foram caracterizadas por diminuições de expressão de genes reguladores, especialmente IDO e IL-10. Parece que, em LT purificados, os peptídeos interferem preferencialmente nos genes predominantemente reguladores. Será importante, determinar o tipo de receptor no qual os peptídeos se ligam e, isso nos trará informações para complementar os nossos resultados. É possível que os peptídeos interajam com múltiplos receptores ativando diversas vias de sinalização simultaneamente. Desse modo, os resultados observados e o desfecho funcional resultante devem ser decorrentes de uma somatória do conjunto das interações moleculares com os peptídeos da Hsp60 e diferentes receptores e tipos celulares.

Outro fator importante que pode provocar a variação do perfil de interação dos peptídeos com as células dos indivíduos é a presença de diversos polimorfismos genéticos relacionados às moléculas do sistema imune. Um exemplo importante são as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), HLA em humanos. Os peptídeos utilizados neste trabalho foram desenhados por nosso grupo em estudos anteriores e

selecionados conforme a sua probabilidade de ligação às moléculas HLA-DR (Caldas, 2005). Em outros trabalhos, já foi mostrado que alguns peptídeos da Hsp60 podem ser apresentados pelas moléculas MHC, tanto no contexto murino (Ciatto *et al.*, 2003), como no humano (Michaëlson *et al.*, 2002). Isso foi mostrado a partir da eluição dos peptídeos das moléculas MHC, e esse processo permitiu o encontro de vários peptídeos derivados da Hsp60. Então, devemos considerar a possibilidade de que as diferentes moléculas HLA possam interagir de forma diferenciada com os antígenos da Hsp60, contribuindo para os diferentes tipos de respostas, ou ainda, ausência de resposta, se o peptídeo não se ligar às moléculas HLA. É possível que alguma molécula HLA-DR interaja com maior ou menor afinidade com os peptídeos estudados e que isso seja um dos fatores para a diversidade dos resultados encontrados. No entanto, o tamanho da nossa amostra é muito pequeno para qualquer análise desta natureza. A observação de que mesmo compartilhando moléculas HLA-DR (DR 13 e 7 para os indivíduos 01 e 09), os indivíduos mostraram perfis gerais distintos, sugere que a apresentação por moléculas HLA não deve ser o único fator envolvido na capacidade dos antígenos da Hsp60 de induzir modificação na expressão gênica em PBMC.

Ainda, outro fator que pode ter influência na diversidade da reatividade individual são os demais polimorfismos relacionados a receptores do sistema imune. Sabe-se que existem polimorfismos nos TLRs e que a sua presença pode alterar a susceptibilidade a infecções (Hawn *et al.*, 2009), câncer (Pandey *et al.*, 2009) e ainda a rejeições do alotransplante (Ducloux *et al.*, 2005). Considerando que a Hsp60 pode se ligar a TLR4 e

TLR2 e que o peptídeo p277 também pode ligar a TLR2 (Nussbaum *et al.*, 2006), é possível que os nossos peptídeos também apresentem essa capacidade. Deste modo, a presença de polimorfismos de TLR nos indivíduos estudados, também poderia alterar a afinidade dos peptídeos ao receptor, interferindo na resposta imune. Não encontramos qualquer trabalho que relacionasse a resposta imune à Hsp60 com polimorfismos de TLR.

Sem dúvida, o universo que existe em relação à diversidade e à complexidade constitui um grande desafio enfrentado em estudos com seres humanos. É certo que o estudo em modelos animais é mais simples, não apenas por permitir o trabalho com uma menor complexidade imunológica, devido ao uso de linhagens isogênicas selecionadas, mas também por permitir o avanço para estudos *in vivo*, fundamentais para a busca de novos agentes terapêuticos. Porém, existem exemplos de estudos que foram desenvolvidos em modelos animais e que pareciam apresentar grande potencial para o uso em humanos, como o estudo da última vacina para HIV da Merck, que mostrou resultados decepcionantes após o teste em seres humanos (Cohen, 2007). Por esse motivo, acreditamos ser importante que qualquer estudo, cujo objetivo, em médio prazo, é ser traduzido para seres humanos, seja também desenvolvido em células humanas, mesmo com as suas dificuldades e restrições. Algum conhecimento prévio sobre a atuação do agente candidato em células humanas certamente ajudaria a escolher melhores caminhos para a continuidade do estudo visando a sua aplicação em seres humanos.

Apesar da diversidade observada em nossos resultados, foi possível verificar a existência de perfis dominantes na interação com os antígenos da Hsp60. Os peptídeos derivados da região N-terminal da Hsp60 induziram, predominantemente, modificações do tipo REGULA e, os demais peptídeos mostraram um padrão oposto. Poderíamos supor que o reconhecimento imunológico direcionado às diferentes regiões da Hsp60 leve aos diferentes tipos de desfechos já observados em outros trabalhos. Já foi mostrado que a Hsp60 pode atuar no aumento da ativação de células T (Osterloh *et al.*, 2004), no estímulo das funções efectoras de neutrófilos (Osterloh *et al.*, 2009), que pode induzir liberação de mediadores inflamatórios pelos adipócitos (Gülden *et al.*, 2009), ou ainda atuar na patogênese de doenças autoimunes (Pockley, 2003). Ao mesmo tempo, a Hsp60 já foi estudada em diversos contextos de regulação imunológica, como no desvio Th2 (Zanin-Zorov *et al.*, 2005), no aumento das funções de células Treg (Zanin-Zorov *et al.*, 2006) e ainda diminuindo adesão e quimiotaxia, fatores importantes na patogênese de doenças autoimunes (Zanin-Zorov *et al.*, 2003).

Conjunto desses dados nos permite verificar a diversidade de repostas atribuídas à Hsp60. Será que o reconhecimento das regiões intermediária e C-terminal poderiam direcionar para uma resposta do perfil INFLAMA, enquanto que a resposta reguladora estaria resultando do reconhecimento da região N-terminal? Os nossos resultados nos levaram a pensar que sim, nas condições testadas. Assim, os peptídeos N7, N2 e N6 foram selecionados como os melhores candidatos para os experimentos de supressão. Os peptídeos C9 e C10 podem ser testados em protocolos de

vacinas, como adjuvantes, uma vez que foram os que induziram um maior número de modificações INFLAMA. Cabe lembrar que o peptídeo p277, já testado com sucesso no contexto da diabetes autoimune, está presente na região C-terminal da Hsp60. Não sabemos todos os mecanismos pelos quais o p277 atua e então, não podemos generalizar dizendo que a região C-terminal da Hsp60 está sempre envolvida com repostas imunes de perfil inflamatório.

Em alguns trabalhos já foi mostrada eficácia do uso da Hsp60 humana recombinante em vacinas, sendo uma utilizada em um protocolo contra infecção pulmonar experimental por *Paracoccidioides brasiliensis* (De Bastos *et al.*, 2008), e a outra no controle de uma síndrome autoimune experimental, em camundongo NOD (Delaleu *et al.*, 2008). Nesse trabalho, além da Hsp60 inteira, foi também utilizado um peptídeo da região C-terminal (aa 437-460), que mostrou resposta similar à da Hsp60, salientando a possibilidade do uso de peptídeos da Hsp60 como adjuvantes em vacinas. Em contraste, em outro trabalho no qual a Hsp60 foi estudada o controle de um modelo de autoimunidade patológica, foi utilizado outro peptídeo, o Hu3, que corresponde à região dos peptídeos N3 e N4 por nós estudados. A vacinação de ratos com o Hu3 inibiu o desenvolvimento de artrite, pela indução de células T específicas produtoras de IL-10 e TGF- β (Quintana *et al.*, 2003). Existe ainda o trabalho já citado anteriormente, da vacina de DNA de Hsp65 de micobactéria, que mostrou algum efeito imunoestimulador em um teste clínico de fase 1 para câncer de cabeça e pescoço (Michaluart *et*

al., 2008), apesar de não ter induzido a produção de IFN- γ e sem o aumento de IL-10 em resposta à Hsp60 e Hsp65, *in vitro* (Victoria *et al.*, 2009).

Vale discutir que o peptídeo p277, da região C-terminal da Hsp60, já testado com sucesso em ensaios clínicos para a indução de atividade imunorreguladora (Huurman *et al.*, 2008; Eldor *et al.*, 2007), mostrou maior número de modificações do tipo INFLAMA, em nosso estudo. As modificações de expressão gênica por ele induzidas foram muito diversas e, é muito provável que outras moléculas do sistema imune, estejam agindo em conjunto para resultar na resposta clínica descrita na administração desse peptídeo. Sabemos que os caminhos para a imunorregulação são diversos e é muito provável que o p277 ative também vias e genes imunorreguladores que não foram aqui estudados. É possível também que contextos patológicos distintos requeiram diferentes caminhos para a imunorregulação. Levando em consideração que o p277 foi utilizado como agente imunorregulador no contexto de diabetes, acreditamos que os nossos peptídeos selecionados possam também ter efeito semelhante em outros contextos de autoimunidade patológica ou ainda no alotransplante. Futuramente, pensamos também em realizar ensaios funcionais com os peptídeos que apresentaram perfil mais semelhante ao p277 buscando outros potenciais agentes imunorreguladores. Também selecionaremos outros peptídeos, que apresentaram potencial atividade inflamatória, que possam servir em outros contextos, como por exemplo, adjuvantes de vacinas.

Outro peptídeo derivado da Hsp60 (aminoácidos 253-268) foi estudado como imunorregulador em modelo de aterosclerose, em um protocolo de indução de tolerância oral (Van Puijvelde *et al.*, 2007). Os aminoácidos deste peptídeo correspondem em parte à região entre os peptídeos I2 (aa - 223-242) e I4 (aa - 269-289) estudados em nosso trabalho. Neste trabalho, a administração da Hsp60 e do peptídeo 253-268 provocou aumento do número de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e diminuição do tamanho da placa, associado ao do aumento da produção de IL-10 e TGF- β . Esses dados nos mostram que não apenas a Hsp60 inteira, mas peptídeos dela derivados, possuem atividade imunorreguladora e que podem atuar, via geração de células T reguladoras, diminuindo processos inflamatórios. Os peptídeos I2 e I4 não apresentaram o perfil geral REGULA em nosso painel e não foram escolhidos para os experimentos de supressão. O I4 foi capaz de induzir a expressão tardia de Foxp3 em 4 experimentos e o I2 em apenas em 1. Também não encontramos aumentos expressivos da expressão de IL-10 ou TGF- β . É possível que algum epitopo não presente em nossos peptídeos seja fundamental para essa resposta reguladora observada no contexto da aterosclerose pelo grupo de Van Puijvelde (2007), ou ainda que haja diferenças funcionais relacionadas às diferenças de espécies – camundongos e humanos.

Os nossos últimos experimentos de supressão de proliferação nos permitiram confirmar que, apesar de toda a sua complexidade, a escolha de peptídeos potencialmente imunorreguladores a partir da análise do painel foi válida, já que obtivemos resultados de inibição da proliferação induzida tanto

por α CD3 como pela resposta alogênica. Além disso, os resultados de supressão obtidos para a resposta alogênica nos incentivam a estudar esses peptídeos no contexto do alotransplante, onde a alorreatividade é desencadeadora do processo de rejeição. Os estudos devem ser iniciados em modelos animais e poderão trazer informações importantes sobre a possibilidade do uso desses peptídeos como agentes terapêuticos no desvio da resposta inflamatória decorrente de processos de rejeição.

Como já mencionado anteriormente, a população celular estudada (PBMC) é muito heterogênea e, por isso, não pudemos discriminar os tipos celulares alvos dos peptídeos. Não obstante, os nossos resultados nos permitem dizer que as células T consistem em um dos alvos dos peptídeos, mas é certo que, em PBMC, a interação dos peptídeos com os linfócitos T pode ocorrer tanto via células apresentadoras de antígenos como por interação com receptores da imunidade inata, como os TLR. É muito provável que os outros tipos celulares presentes na população de PBMC estejam interagindo com os peptídeos e que os nossos resultados de expressão gênica sejam decorrentes da somatória total do que está sendo transcrito na cultura.

Dessa forma, para uma abordagem de terapia celular, talvez seja mais viável o uso de populações purificadas, pois, diminuindo a diversidade celular, podemos obter maior homogeneidade funcional. Por outro lado, o estudo realizado com PBMC pode nos fornecer uma abordagem fácil com potencial aplicação em terapia celular já que essas células são facilmente obtidas a partir de sangue periférico e, a incubação com os peptídeos não

exige maiores manipulações dessas células. Estudos mais aprofundados são necessários para que possamos concluir algo a este respeito.

O presente estudo nos permitiu selecionar peptídeos da Hsp60 capazes de provocar um padrão de modificações predominantemente REGULA no perfil de expressão de uma população celular diversificada e complexa. Já comprovamos o seu efeito supressor, *in vitro*, e os necessários estudos *in vivo*, em modelos animais, serão em breve realizados no nosso laboratório. Acreditamos em uma futura aplicação desses peptídeos no contexto clínico. Tal abordagem poderia ser realizada a partir da retirada de células mononucleares do paciente, seguida de sua incubação com os peptídeos selecionados, para, então, realizar a devolução dessas células, agora com atividade reguladora, ao paciente. O protocolo poderia ser utilizado para o tratamento de doenças autoimunes e para a indução de tolerância ao aloenxerto, uma vez que os peptídeos mostraram maior potencial imunossupressor no contexto alogênico. Outra abordagem potencial é o uso em terapias com peptídeos, em diferentes formulações, como descrito para o p277 (Jin *et. al.*, 2008). Como mencionado anteriormente, já está em andamento um projeto, em modelo murino, similar ao presente estudo. Os dados deste trabalho, analisados em conjunto com os resultados do projeto em modelo murino, nos trarão maiores informações a respeito dos peptídeos da Hsp60 humana e nos permitirá realizar uma melhor escolha dos candidatos para os ensaios “*in vivo*”.

Este estudo mais amplo dos peptídeos da Hsp60 nos trouxe novos conhecimentos relacionados ao efeito *in vitro* de peptídeos da Hsp60 em

células do sangue de indivíduos sadios. Esses conhecimentos nos incentivam a elaborar outros estudos visando, no futuro, o uso de abordagens mais direcionadas para a aplicação terapêutica na clínica.

A Hsp60 apresenta funções muito diversas. A sua presença em todos os organismos, sejam bactérias, vegetais ou animais, e a sua grande conservação filogenética, nos permite sugerir que a Hsp60 tenha grande importância para a homeostase dos organismos, que vai além de suas atividades como chaperona. Podemos indagar: por que, ao longo de toda a evolução, as Hsps se mantiveram tão presentes e conservadas? Será que a presença da Hsp60 foi um dos fatores relevantes na seleção natural das espécies? Será que esta proteína propiciou vantagens evolutivas aos organismos que a continham, e isso a tornou uma das proteínas mais conservadas ao longo da evolução?

Dados de diversos grupos apontam que a Hsp60 tem atividade imunológica em contextos muito variados, podendo tanto estar envolvida na patogênese de doenças autoimunes (Pockley, 2003), no desenvolvimento de tumores (Hwang et al., 2009), ou ainda em mecanismos imunorreguladores (Zanin-Zorov *et al.*, 2003; Zanin-Zorov *et al.*, 2005; Zanin-Zorov *et al.*, 2006). Como a resposta imune à Hsp60 poderia estar envolvida em toda essa diversidade de processos? Em nosso trabalho, verificamos que diferentes peptídeos da Hsp60 têm efeitos distintos em moléculas da resposta imune. Alguns peptídeos mostraram a capacidade de induzir predominantemente modificações de expressão gênica do perfil regulador, enquanto que outros peptídeos induziram um predomínio de modificações inflamatórias. Vimos

que dentro de uma só proteína existe a capacidade de induzir moléculas da resposta imune tanto inflamatórias como reguladoras, ao menos *in vitro*. Queremos trazer como reflexão que alguns dos peptídeos estudados possam ser também gerados endogenamente, como consequência da degradação da Hsp60 própria. Assim, o seu papel no direcionamento da resposta imune, ora para a inflamação ora para a regulação, poderia também ocorrer *in vivo*. Lembrando da teoria do homúnculo imunológico (Cohen e Young, 1991), poderíamos supor que existe um grande número de células responsivas à Hsp60 própria e, o aumento da expressão dessa proteína em locais de desequilíbrio imunológico poderia ser interpretado como parte dos mecanismos amplificadores e reguladores da resposta imune naquele local. A Hsp60 poderia auxiliar a resposta inflamatória onde ela é necessária e, ao mesmo tempo, regular negativamente tal resposta onde essa ocorre de forma exacerbada. Assim, a Hsp60 poderia ser importante e fundamental para a homeostase e, dessa forma, fornecer vantagens adaptativas na evolução.

6. CONCLUSÕES

1. O nosso painel de expressão gênica REGULA/INFLAMA foi adequado para discriminar peptídeos da Hsp60 com perfil predominantemente pró-inflamatório e outros com predomínio regulador, e nos permitiu selecionar alguns peptídeos potencialmente imunorreguladores.
2. Como a maioria dos peptídeos com perfil molecular predominantemente REGULA são da região N-terminal da Hsp60, enquanto que aqueles com predomínio do perfil INFLAMA são da região C-terminal, sugerimos que, no contexto analisado, haja uma relação funcional dominante relacionada à região da Hsp60.
3. Os peptídeos da Hsp60 selecionados, com perfil predominantemente regulador, foram capazes de inibir a resposta proliferativa induzida pelo anticorpo anti-CD3 e, principalmente, a proliferação alogênica, indicando sua capacidade supressora, *in vitro*, e, portanto, a correspondência funcional do predomínio molecular REGULA.
4. A capacidade dos peptídeos selecionados como reguladores de induzir/aumentar a expressão gênica de moléculas imunorreguladoras como IL-10, TGF- β e sustentada de Foxp3, assim como a alta razão de produção proteica IL-10/IFN- γ para o peptídeo N7, sugere que os mecanismos supressores desses peptídeos envolvam essas vias de imunorregulação, inclusive a geração de células T reguladoras.

5. Os peptídeos da Hsp60 selecionados, com perfil predominantemente regulador, também tiveram efeito diretamente sobre linfócitos T purificados, inclusive na indução tardia da expressão gênica de Foxp3. Apesar de alguns efeitos terem sido diferentes daqueles observados em PBMC, esses dados nos indicam que a atividade desses peptídeos, no eixo inflamatório/imunorregulador, não depende de células apresentadoras de antígenos, inclusive a potencial geração de células T reguladoras.
6. Com base no conjunto dos nossos resultados, concluímos que peptídeos da Hsp60 têm atividade funcional na rede imunológica inflamatória/reguladora. Sugerimos que peptídeos semelhantes sejam gerados *in vivo* e desempenham atividades funcionais na amplificação e na regulação da resposta imune, contribuindo para a manutenção da homeostase.

7. ANEXOS

Anexo 1: Curvas de dissociação

Anexo 2: Valores brutos do CBA

Anexo 3: Valores brutos de proliferação

Anexo 4: Moléculas HLA-DR dos indivíduos estudados

ANEXO 1

Curvas de dissociação

Figura 23. Curva de dissociação. Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos). (A) Foxp3, (B) GATA-3, (C) IL-10, (D) TGF- β , (E) IDO, (F) TNF- α , (G) IFN- γ , (H) T-bet, (I), ROR γ t.

ANEXO 2

**Valores brutos da produção de citocinas e
análise por CBA (*Cytometric Beads Array*)**

Tabela 12 – Produção de citocinas basal e induzida pelos peptídeos da Hsp60

Experimento	Amostra	IFN-g pg/ml	TNF-a pg/ml	IL-10 pg/ml	IL-5 pg/ml	IL-4 pg/ml	IL-2 pg/ml
1	CB	8,9	0,0	1,2	1,2	3,5	0,0
	N6	8,5	2,7	1,7	2,4	2,7	0,0
	N7	8,5	1,5	5,2	1,2	1,4	0,0
	C4	10,6	3,6	8,9	0,0	1,9	2,3
2	CB	11,3	1,9	0,0	1,2	1,3	0,0
	N6	7,6	5,4	8,6	0,0	15,9	0,0
	N7	13,1	2,2	7,9	0,0	11,7	0,0
	C4	0,0	1,5	1,6	1,2	1,9	0,0
3	CB	3,4	4,9	0,0	0,0	7,0	8,0
	N2	1,7	21,9	0,0	1,2	5,7	72,1
	N6	2,6	10,9	0,0	0,0	5,7	34,6
	N7	2,1	16,1	0,0	0,0	3,8	8,0
	C4	4,8	9,8	1,3	1,4	9,0	935,7
4	CB	57,3	0,0	2,6	0,0	4,0	4,9
	N2	8,5	0,0	2,8	1,2	2,0	6,9
	N6	6,6	1,6	27,3	0,0	1,6	1,7
	N7	18,6	1,9	2,7	1,2	0,0	5,2
	C4	43,3	0,0	1,3	1,2	0,0	5,9
5	CB	7,2	2,8	0,4	0,0	3,1	5,4
	N2	74,2	2,4	2,6	0,0	2,2	3,5
	N6	137,9	2,5	2,6	1,3	0,0	4,3
	N7	5,6	2,7	2,6	0,0	0,0	4,0
	C4	149,7	4,0	5,9	1,3	1,9	10,6
6	CB	6,8	3,5	3,7	0,0	0,0	7,8
	N2	16,4	1,9	3,2	0,0	0,0	8,3
	N6	76,6	1,6	0,0	1,1	0,0	5,9
	N7	3,9	4,7	4,7	1,4	0,0	5,9
	C4	77,8	0,0	4,5	1,1	0,0	9,5
7	CB	4,6	0,0	2,3	0,0	3,6	0,0
	N2	4,2	0,0	6,8	0,0	0,0	0,0
	N6	0,0	0,0	56,9	0,0	1,8	0,0
	N7	8,0	0,0	71,3	0,0	3,4	0,0
	C4	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3
8	CB	1,6	1,9	1,5	6,1	0,0	3,5
	N2	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	7,6
	N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4
	N7	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	2,6
	C4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,5
9	CB	506,7	57,0	2,7	6,5	5,2	39,2
	N2	792,1	7,2	9,1	2,4	1,9	22,2
	N6	32,4	8,6	9,7	1,4	2,8	26,3
	N7	27,3	10,4	19,3	1,1	1,8	30,1
	C4	1473,1	6,1	6,0	1,7	2,8	41,8

Os valores representados são os valores brutos de produção de citocinas obtidos nas reações de CBA. O limite de detecção da técnica é 2,5pg/ml e para o cálculo da produção de citocina induzida pelos peptídeos, os valores de CB entre 0 e 2,5 foram arredondados para 2,4. CB – controle basal sem peptídeo; N2, N6, N7 e C4 – peptídeo da Hsp60. Tempo de cultura = 72h. Número de experimentos = 9.

ANEXO 3

Valores brutos de proliferação com CFSE

Tabela 13 – Efeito supressor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α CD3

Experimento	Amostra	% cels em prolif.	Média da duplicata	Prolif. em relação ao estímulo α CD3 (%)	Inibição (%)
1	PBMC + α CD3	49,40	46,7	100	na
	PBMC + α CD3	44			
	PBMC + α CD3 + N6	42,40	42,45	90,90	9,10
	PBMC + α CD3 + N6	42,50			
	PBMC + α CD3 + N7	40,70	39,55	84,69	15,31
	PBMC + α CD3 + N7	38,40			
2	PBMC + α CD3	56,60	56,9	100,00	na
	PBMC + α CD3	57,20			
	PBMC + α CD3 + N6	48,70	48,95	86,03	13,97
	PBMC + α CD3 + N6	49,20			
	PBMC + α CD3 + N7	45,40	46,65	81,99	18,01
	PBMC + α CD3 + N7	47,90			
3	PBMC + α CD3	59,90	58,75	100,00	na
	PBMC + α CD3	57,60			
	PBMC + α CD3 + N2	55,70	53,2	90,55	9,45
	PBMC + α CD3 + N2	50,70			
	PBMC + α CD3 + N6	55,80	54	91,91	8,09
	PBMC + α CD3 + N6	52,20			
	PBMC + α CD3 + N7	47,90	46,45	79,06	20,94
	PBMC + α CD3 + N7	45,00			
4	PBMC + α CD3	62,10	63,25	100,00	na
	PBMC + α CD3	64,40			
	PBMC + α CD3 + N2	54,30	55,55	87,83	12,17
	PBMC + α CD3 + N2	56,80			
	PBMC + α CD3 + N6	57,90	57,15	90,36	9,64
	PBMC + α CD3 + N6	56,40			
	PBMC + α CD3 + N7	51,70	50,85	80,40	19,60
	PBMC + α CD3 + N7	50			
5	PBMC + α CD3	47,90	47,15	100,00	na
	PBMC + α CD3	46,40			
	PBMC + α CD3 + N2	40	42,3	89,71	10,29
	PBMC + α CD3 + N2	44,60			
	PBMC + α CD3 + N6	41,50	46,4	98,41	1,59
	PBMC + α CD3 + N6	51,30			
	PBMC + α CD3 + N7	34,60	39,4	83,56	16,44
	PBMC + α CD3 + N7	44,20			

6	PBMC + aCD3	45,40			
	PBMC + aCD3	43,60	44,5	100,00	na
	PBMC + aCD3 + N2	30,40			
	PBMC + aCD3 + N2	31	30,7	68,99	31,01
	PBMC + aCD3 + N6	30			
	PBMC + aCD3 + N6	36,70	33,35	74,94	25,06
	PBMC + aCD3 + N7	35,10			
	PBMC + aCD3 + N7	32,70	33,9	76,18	23,82
7	PBMC + aCD3	71,40			
	PBMC + aCD3	71,10	71,25	100,00	na
	PBMC + aCD3 + N2	65,30			
	PBMC + aCD3 + N2	70,40	67,85	95,23	4,77
	PBMC + aCD3 + N6	59,30			
	PBMC + aCD3 + N6	63,70	61,5	86,32	13,68
	PBMC + aCD3 + N7	54,90			
	PBMC + aCD3 + N7	50,50	52,7	73,96	26,04

As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Proliferação feita com CFSE e análise feita por citometria de fluxo. PBMC – células mononucleares de sangue periférico; aCD3 – anticorpo anti-CD3; prolif. – proliferação; N2, N6 e N7 – peptídeos da Hsp60, concentração dos peptídeos = 10 μ g/ml.

Tabela 14 – Efeito supressor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida por α -CD3: curva dose/resposta.

Amostra	% cels em prolif.	Média da duplicata	Prolif. em relação ao estímulo α CD3 (%)	Inibição (%)
EXPERIMENTO 1				
PBMC + aCD3	46,80		100,00	na
PBMC + aCD3	40,20	43,50		
PBMC + aCD3 + N2 0,1 μ g	48,40	44,40	102,07	-2,07
PBMC + aCD3 + N2 0,1 μ g	40,40			
PBMC + aCD3 + N2 1 μ g	36,60	36,60	84,14	15,86
PBMC + aCD3 + N2* 1 μ g	36,60			
PBMC + aCD3 + N2 10 μ g	36	35,95	82,64	17,36
PBMC + aCD3 + N2 10 μ g	35,90			
PBMC + aCD3 + N2 25 μ g	34,00	36,35	83,56	16,44
PBMC + aCD3 + N2 25 μ g	38,70			
PBMC + aCD3 + N3 0,1 μ g	31,80	34,35	78,97	21,03
PBMC + aCD3 + N3 0,1 μ g	36,90			
PBMC + aCD3 + N3 1 μ g	42,90	43,80	100,69	-0,69
PBMC + aCD3 + N3 1 μ g	44,70			
PBMC + aCD3 + N3 10 μ g	40	41,05	94,37	5,63
PBMC + aCD3 + N3 10 μ g	42,10			
PBMC + aCD3 + N3 25 μ g	40,40	43,85	100,80	-0,80
PBMC + aCD3 + N3 25 μ g	47,30			
PBMC + aCD3 + N7 0,1 μ g	42,20	41,80	96,09	3,91
PBMC + aCD3 + N7 0,1 μ g	41,40			
PBMC + aCD3 + N7 1 μ g	41	38,60	88,74	11,26
PBMC + aCD3 + N7 1 μ g	36,20			
PBMC + aCD3 + N7 10 μ g	34,80	35,20	80,92	19,08
PBMC + aCD3 + N7 10 μ g	35,60			
PBMC + aCD3 + N7 25 μ g	36,70	35,45	81,49	18,51
PBMC + aCD3 + N7 25 μ g	34,20			

EXPERIMENTO 2				
PBMC + aCD3	42,90			
PBMC + aCD3	43,10	43,00	100,00	na
PBMC + aCD3 + N2 0,1ug	28,30			
PBMC + aCD3 + N2 0,1ug	32,30	30,30	70,47	29,53
PBMC + aCD3 + N2 1ug	37,50			
PBMC + aCD3 + N2* 1ug	37,50	37,50	87,21	12,79
PBMC + aCD3 + N2 10ug	34			
PBMC + aCD3 + N2 10ug	36,10	35,05	81,51	18,49
PBMC + aCD3 + N2 25ug	34,70			
PBMC + aCD3 + N2 25ug	24	29,35	68,26	31,74
PBMC + aCD3 + N3 0,1ug	28,60			
PBMC + aCD3 + N3 0,1ug	37,60	33,10	76,98	23,02
PBMC + aCD3 + N3 1ug	35,50			
PBMC + aCD3 + N3 1ug	40,40	37,95	88,26	11,74
PBMC + aCD3 + N3 10ug	41,10			
PBMC + aCD3 + N3 10ug	35,70	38,40	89,30	10,70
PBMC + aCD3 + N3 25ug	36,70			
PBMC + aCD3 + N3 25ug	41,10	38,90	90,47	9,53
PBMC + aCD3 + N7 0,1ug	35,30			
PBMC + aCD3 + N7 0,1ug	38,20	36,75	85,47	14,53
PBMC + aCD3 + N7 1ug	44,10			
PBMC + aCD3 + N7 1ug	39,60	41,85	97,33	2,67
PBMC + aCD3 + N7 10ug	38,30			
PBMC + aCD3 + N7 10ug	34,30	36,30	84,42	15,58
PBMC + aCD3 + N7 25ug	14,10			
PBMC + aCD3 + N7 25ug	12,70	13,40	31,16	68,84

As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com α CD3 na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Proliferação feita com CFSE e análise feita por citometria de fluxo PBMC – células mononucleares de sangue periférico; prolif. – proliferação; aCD3 – anticorpo anti-CD3; N2, N3 e N7 – peptídeos da Hsp60.

Tabela 15 – Efeito supressor dos peptídeos da Hsp60 na proliferação induzida pela MLR (reação linfocitária mista).

Experimento	Amostra	% cels em prolif.	Média da duplicata	Prolif. em relação ao estímulo da MLR (%)	Inibição (%)
1	MLR	5,11	5,27	100,00	na
	MLR	5,43			
	MLR + N6	3,48	3,65	69,26	30,74
	MLR + N6	3,81			
	MLR + N7	2,61	2,72	51,61	48,39
	MLR + N7	2,83			
2	MLR	3,74	3,04	100,00	na
	MLR	2,33			
	MLR + N6	1,56	1,45	47,70	52,30
	MLR + N6	1,34			
	MLR + N7	1,20	1,2	39,47	60,53
	MLR + N7	1,20			

3	MLR	3,03			
	MLR	2,68	2,86	100,00	na
	MLR + N2	2,05			
	MLR + N2	1,75	1,9	66,43	33,45
	MLR + N6	1,71			
	MLR + N6	1,91	1,81	63,29	36,60
	MLR + N7	1,60			
	MLR + N7	1,23	1,42	49,65	50,44
4	MLR	24,70			
	MLR	23,30	24	100,00	na
	MLR + N2	17,80			
	MLR + N2	18,10	17,95	74,79	25,21
	MLR + N6	19,30			
	MLR + N6	20,30	19,8	82,50	17,50
	MLR + N7	16,30			
	MLR + N7	15,00	15,65	65,21	34,79

As percentagens de inibição foram calculadas a partir do valor de % de células que proliferaram com a MLR na ausência de peptídeos, para cada experimento, sendo tal valor considerado o valor máximo de proliferação (100%). Proliferação feita com CFSE e análise por citometria de fluxo; concentração dos peptídeos utilizada: 10µg/ml. MLR – reação linfocitária mista; prolif. – proliferação; N2, N6 e N7 – peptídeos da Hsp60. Número de experimentos = 4.

ANEXO 4

Moléculas HLA-DR dos indivíduos estudados

Tabela 16 – Relação entre as moléculas HLA-DR e o predomínio de modificações de expressão gênica REGULA/INFLAMA

INDIVÍDUO	DRB1(a)	DRB1(b)	Nº MOD. EXPRESSÃO GÊNICA	PREDOMÍNIO REGULA/INFLAMA
01	7	13	101/152	REGULA
09	7	13	92/152	EQUILÍBRIO
10	7	0	51/114	INFLAMA
07	13	13	76/145	REGULA
06	1 (0103)	13	74/152	EQUILÍBRIO
02	4 (0411)	13 (1302)	87/152	INFLAMA
13	15	13	64/152	REGULA
14	13	14	97/152	EQUILÍBRIO
08	14	14 (1406)	74/152	REGULA
12	9	12	79/152	INFLAMA
04	15	9	82/152	INFLAMA
03	11	11	75/145	REGULA
05	nd	nd	33/57	REGULA
11	nd	nd	73/152	REGULA
15	nd	nd	nr	nr
16	nd	nd	nr	nr

O número entre parênteses consiste no subtipo da respectiva molécula HLA-DR. Os dados de predomínio REGULA/INFLAMA constam na tabela 3, página 52. A coluna Nº MOD. EXPRESSÃO GÊNICA mostra o número total de modificações de expressão gênica induzidas nas células do respectivo indivíduo, podendo ser aumento ou diminuições de expressão. O primeiro número representa o total de modificações de expressão gênica e o número posterior à barra indica o total de condições realizadas para o indivíduo. nd – não disponível, nr – não realizado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*. 5ª edição. 2005, Rio de Janeiro: Elsevier.
- ABULAFIA-LAPID, R.; GILLIS, D.; YOSEF, O.; ATLAN, H.; COHEN, I. R. T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children. *J. Autoimmun*, v. 20, n. 4, p. 313-321, 2003.
- ABULAFIA-LAPID, R.; ELIAS, D.; RAZ, I.; KEREN-ZUR, Y.; ATLAN, H.; COHEN, I. R. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J. Autoimmun*, v. 12, n.2, p. 121-129, 1999.
- ALLAN, S.E., ALSTAD, A.N., MERINDOL, N., CRELLIN, N.K., AMENDOLA, M., BACCHETTA, R., NALDINI, L., RONCAROLO, M.G., SOUDEYNS, H., LEVINGS, M.K. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3. *Mol. Ther*, v. 16, n. 1, p. 194-202, 2008.
- ALVES, G. J; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune system. *Rev. Bras. Psiquiatr*, 2007.
- ANDERSON, M. S.; VENANZI, E. S.; CHEN, Z.; BERZINS, S. P.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*, v. 23, n. 2, p. 227-239, 2005.
- ANDERTON, S. M.; RADU, C. G.; LOWREY, P. A.; WARD, E. S.; WRAITH, D. C. Negative selection during the peripheral immune response to antigen. *J. Exp. Med*, v. 193, n. 1, p. 1-11, 2001.
- ANDERTON, S. M.; WRAITH, D. C. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat. rev. immunol*, v. 2, n. 7, p. 487-498, 2002.
- ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; SANTARLASCI, V.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; MAZZINGHI, B.; PARENTE, E.; FILÌ, L.; FERRI, S.; FROSALI, F.; GIUDICI, F.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; TONELLI, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *JEM*, v. 204, n. 8, p. 1849-1861, 2007.
- AYYOUB, M.; DEKNUYDT, F.; RAIMBAUD, I.; DOUSSET, C.; LEVEQUE, L.; BIOLEY, G.; VALMORI, D. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *PNAS*, v.106, n. 21, p. 8635-40, 2009.
- BARCELO-BATLLORI, S.; ANDRE, M.; SERVIS, C.; LEVY, N.; TAKIKAWA, O.; MICHETTI, P.; REYMOND, M.; FELLE-Y-BOSCO, E. Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics*, v. 2, p. 551-560, 2002.

- BASSO, A.S.; CHEROUTRE, H.; MUCIDA, D. More stories on Th17 cells. *Cell Res*, v. 19, n. 4, p. 399-411, 2009.
- BETTELLI, E.; DASTRANGE, M.; OUKKA, M. FOXP3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *PNAS*, v. 102, n. 14, p. 5138-5143, 2005.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol*, v. 19, n. 6, p. 652-7, 2007.
- BINI, L.; MAGI, B.; MARZOCCHI, B.; ARCURI, F.; TRIPODI, S.; CINTORINO, M.; SANCHEZ, J.C.; FRUTIGER, S.; HUGHES, G.; PALLINI, V.; HOCHSTRASSER, D.F.; TOSI, P. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*, v. 18, n. 15, p. 2832-41, 1997.
- BRUNKOW, M. E.; JEFFERY, E. W.; HJERRILD, K. A.; PAEPER, B.; CLARK, L. B.; YASAYKO, S.; WILKINSON, J. E.; GALAS, D.; ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet*, v. 27, n.1, p. 68-73, 2001.
- CALDAS, C. A. **Estudo seqüencial da auto-reatividade celular à proteína de choque térmico 60 em pacientes transplantados renais em indivíduos sadios: busca de epitopos potencialmente reguladores.** São Paulo: Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2005.
- CALDAS, C.; SPADAFORA-FERREIRA, M.; FONSECA, J.A.; LUNA, E.; IWAI, L.K.; KALIL, J.; COELHO, V. T-cell response to self HSP60 peptides in renal transplant recipients: a regulatory role? *Transplant Proc*, v. 36, n. 4, p. 833-5, 2004.
- CAPPELLO, F.; DAVID, S.; ANZALONE, R.; ZUMMO, G. Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, Hsp60, Hsp10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res*, v. 23, n. 2B, p. 1325-31, 2003.
- CAPPELLO, F.; DI STEFANO, A.; D'ANNA, S.E.; DONNER, C.F.; ZUMMO, G. Immunopositivity of heat shock protein 60 as a biomarker of bronchial carcinogenesis. *Lancet Oncol*, v. 6, n. 10, p. 816, 2005a.
- CAPPELLO, F.; DAVID, S.; RAPPA, F.; BUCCHIERI, F.; MARASÀ, L.; BARTOLOTTA, T.E.; FARINA, F.; ZUMMO, G. The expression of Hsp60 and Hsp10 in a large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer*, v. 28, p. 5-139, 2005b.
- CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol*, v. 30, n.6, p. 1538- 1543, 2000.
- CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MC GRADY, G.; WAHL, S.M. 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, 2003.

- CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V.; KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol*, v. 162, n. 6, p.3212-3219, 1999.
- CIATTO, C.; CAPITANI, G.; TISSOT, A.C.; PECORARI, F.; PLÜCKTHUN, A.; GRÜTTER, M.G. Structural analysis of mycobacterial and murine hsp60 epitopes in complex with the class I MHC molecule H-2Db. *FEBS Lett*, v. 543, n. 1-3, p. 11-5, 2003.
- COELHO, V.; BROERE, F.; BINDER, R.J.; SHOENFELD, Y.; MOUDGIL, K.D. Heat-shock proteins: inflammatory versus regulatory attributes. *Cell Stress Chaperones*, v. 13, n. 2, p. 119-25, 2008.
- COHEN, J. AIDS research. Promising AIDS vaccine's failure leaves field reeling. *Science*, v. 318, n. 5847, p. 28-9, 2007.
- COHEN-SFADY, M.; NUSSBAUM, G.; PEVSNER-FISCHER, M.; MOR, F.; CARMIL, P.; ZANIN-ZHOROV, A.; LIDER, O.; COHEN, I. R. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J. Immunol*, v. 175, n.6, p. 3594-3602, 2005.
- COHEN, I.R.; QUINTANA, F.J., MIMRAN, A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest*, v. 114, n.9, p. 1227-1232, 2004.
- COHEN, I. R.; YOUNG, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today*, v.12, n. 4, p. 105-110, 1991.
- COHEN-SFADY, M.; PEVSNER-FISCHER, M.; MARGALIT, R.; COHEN, I.R. Heat shock protein 60, via MyD88 innate signaling, protects B cells from apoptosis, spontaneous and induced. *J Immunol*, v. 183, n. 2, p. 890-6, 2009.
- CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest*, v. 98, n. 8, p. 1709–1712, 1996.
- DANKE, N. A.; KOELLE, D. M.; YEE, C.; BEHERAY, S.; KWOK. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J. Immunol*, v. 172, n. 10, p. 5967-5972, 2004.
- DE BASTOS, A. S. R.; GOMEZ, F.J.; DE ALMEIDA SOARES, C.M.; DEEPE, G.S. Jr. Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental Paracoccidioides brasiliensis pulmonary infection. *Infect. Immun*, v. 76, n. 9, p. 4214-21, 2008.
- DELALEU, N.; MADUREIRA, A.C.; IMMERSVOLL, H.; JONSSON, R. Inhibition of experimental Sjögren's syndrome through immunization with HSP60 and its peptide amino acids 437-460. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 8, p. 2318-28, 2008.
- DIDELOT, C.; SCHMITT, E.; BRUNET, M.; MAINGRET, L.; PARCELLIER, A.; GARRIDO, C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb. Exp. Pharmacol*, v. 172, p. 171–198, 2006.

- DUCLOUX, D.; DESCHAMPS, M.; YANNARAKI, M.; FERRAND, C.; BAMOULID, J.; SAAS, P.; KAZORY, A.; CHALOPIN, J.M.; TIBERGHIE, P. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int*, V. 67, N. 6, P. 2454-61, 2005.
- ELIAS, D. e COHEN, I. R. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet*, v. 343, n. 8899, p. 704-6, 1994.
- FAÉ, K. C.; OSHIRO, S. E.; TOUBERT, ^a; CHARRON, D.; KALIL, J.; GUILHERME, L. How an autoimmune reaction triggered by molecular mimicry between streptococcal M protein and cardiac tissue proteins leads to heart lesions in rheumatic heart disease. *J. Autoimmun*, v. 24, n. 2, p.101-109, 2005.
- FENG, H.; ZENG, Y.; GRANER, M.W.; KATSANIS, E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood*, v. 100, n. 12, p. 4108-15, 2002.
- FEHÉRVARI, Z. e SAKAGUCHI, S. CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest*, v. 114, n. 9, p. 1209-1217, 2004.
- FERRARINI, M.; HELTAI, S.; ZOCCHI, M.R.; RUGARLI, C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer*, v. 51, n.4, p. 613–619, 1992.
- FLOHE, S. B.; BRUGGEMANN, J.; LENDEMANS, S.; NIKULINA, M.; MEIERHOFF, G.; FLOHE, S.; KOLB, H. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a TH1-promoting phenotype. *J. Immunol*, v.170, n. 5, p.2340-2348, 2003.
- 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. 330-336, 2003.
- FURUTA, S.; KAGAMI, S.; TAMACHI, T.; IKEDA, K.; FUJIWARA, M.; SUTO, A.; KOICHI H. N. W.; IWAMOTO, K.I.; NAKAJIMA, H. Overlapping and Distinct Roles of STAT4 and T-bet in the Regulation of T Cell Differentiation and Allergic Airway Inflammation¹. *J. Immunol*, v. 180, n. 10, p. 6656-62, 2008.
- GAMBINERI, E.; TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol*, v. 15, n. 4, p. 430-435, 2003.
- GAO, B.; TSAN, M. Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 317, n. 4, p. 1149-1154, 2004.
- GAVIN, M.A.; TORGERSON, T.R.; HOUSTON, E.; DEROOS, P.; HO W.Y.; STRAY-PEDERSEN, A.; OCHELTREE, E.L.; GREENBERG, P.D.; OCHS, H.D.; RUDENSKY, A.Y. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 17, p. 6659-64, 2006.

- GLOZAK, M.A.; SENGUPTA, N.; ZHANG, X.; SETO E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, v. 363, p. 15-23, 2005.
- GRAAF, R.; KLOPPENBURG, G.; KITSLAAR, P. J. H. M.; BRUGGEMAN, C. A.; STASSEN, F. Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. *Microbes and Infection*, v. 8, n. 7, p. 1859-65, 2006.
- GRANJA, C. B. **Estudo sequencial da resposta celular anti-proteínas de choque térmico humanas no transplante renal.** Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- GRANJA, C.; MOLITERNO, R. A.; FERREIRA, M. S.; FONSECA, J. A.; KALIL, J.; COELHO, V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. *Immunol*, v. 65, n. 2, p.124-134, 2004.
- GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R.; ORABONA, C.; VACCA, C.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. A defect tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med*, v. 198, n. 1, p.153-60, 2003.
- GUILHERME, L.; CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; R.SNITCOWSKY, R.; POMERANTZRRFF, P. M. A.; ASSIS, R. V.; PEDRA, F.; NEUMANN, J.; GOLDBERG, A.; PATARROYO, M. E.; PILEGGI, F.; KALIL, J. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation*, v. 92, n. 3, p. 415-420, 1995.
- GÜLDEN, E.; MÄRKER, T.; KRIEBEL, J.; KOLB-BACHOFEN V.; BURKAT, V.; HABICH, C. Heat shock protein 60: evidence for receptor-mediated induction of proinflammatory mediators during adipocyte differentiation. *FEBS Lett*, v. 583, n. 17, p. 2877-81, 2009.
- GUPTA, R. S. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol*, v. 15, n. 1, p. 1-11, 1995.
- GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. Hsp60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 292, n. 6, p. H3052-6, 2007.
- HABICH, C.; KEMPE, K.; VAN DER ZEE, R.; RÜMENAPF, R.; AKIYAMA, H.; KOLB, H.; BURKART, V. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J Immunol*, v. 174, n. 3, p. 1298-305, 2005.
- HAWN, T.R.; SCHOLLES, D.; LI, S.S.; WANG, H.; YANG, Y.; ROBERTS, P.L.; STAPLETON, A.E.; JANER, M.; ADEREM, A.; STAMM, W.E.; ZHAO, L.P.; HOOTON, T.M. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One*, v. 4, n. 6, p. e5990, 2009.
- HAYASHI, T.; RAO, S.P.; TAKABAYASHI, K.; VAN UDEN, J.H.; KORNBLUTH, R. S.; BAIRD, S. M.; TAYLOR, M. W.; CARSON, D. A.; CATANZARO, A.; RAZ, E. Enhancement of innate immunity against Mycobacterium avium infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*, v. 69, n. 10, p. 6156-64, 2001.

- HIRSH, M.I.; HASHIGUCHI, N.; CHEN, Y.; YIP, L.; JUNGER, W.G. Surface expression of Hsp72 by LPS-stimulated neutrophils facilitates gammadelta T cell-mediated killing. *Eur J Immunol*, v. 36, p. 712–721, 2006.
- HIRSH, M. I.; JUNGER, W. G. Roles of heat shock proteins and $\gamma\delta$ T cells in inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 39, n. 5, p. 509-13, 2008.
- HUANG, C.Y.; CHEN, C.A.; LEE, C.N.; CHANG, M.C.; SU Y.N.; LIN, Y.C.; HSIEH, C.Y.; CHENG, W.F. DNA vaccine encoding heat shock protein 60 co-linked to HPV16 E6 and E7 tumor antigens generates more potent immunotherapeutic effects than respective E6 or E7 tumor antigens. *Gynecol Oncol*, v. 107, n. 3, p. 404-12, 2007.
- HUURMAN, V.A., VAN DER MEIDE, P.E., DUINKERKEN, G., WILLEMEN, S., COHEN, I.R., ELIAS, D., ROEP, B.O. Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277 therapy in clinical type I diabetes. *Clin. Exp. Immunol*, v. 152, n. 3, p. 488-97, 2008.
- HWANG, Y.J.; LEE, S.P.; KIM, S.Y.; CHOI, Y.H.; KIM, M.J.; LEE, C.H.; LEE, J.Y.; KIM, D.Y. Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer. *Yonsei Med J*, v. 50, n. 3, p. 399-406, 2009.
- HWU, P.; DU, M. X.; LAPOINTE, R.; DO, M.; TAYLOR, M. W.; YOUNG, H.A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol*, v. 164, n. 7, p. 3596-9, 2000.
- ICHIYAMA, K., YOSHIDA, H., WAKABAYASHI, Y., CHINEN, T., SARKI, K., NAKAYA, M., TAKAESU, G., HORI, S., YOSHIMURA, A., KOBAYASHI, T. FOXP3 inhibits ROR γ t-mediated *IL-17A* mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. *J. Biol. Chem*, v. 283, n. 25, p.17003-8, 2008.
- IMATOH, T.; SUGIE, T.; MIYAZAKI, M.; TANIHARA, S.; BABA, M.; MOMOSE, Y.; URYU, Y.; UNE, H. Is heat shock protein 60 associated with type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Res Clin Pract*, v. 85, n. 2, p. 208-12, 2009.
- IZCUE, A.; HUE, S.; BUONOCORE, S.; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C.V.; AHERN, P.P.; IWAKURA, Y.; MALOY, K.J.; POWRIE, F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity*, v. 28, n. 4, 559-70, 2008.
- JIN, L., ZHU, A., WANG, Y., CHEN, Q., XIONG, Q., LI, J., SUN, Y., LI, T., CAO, R., WU, J., LIU, J. A Th1-recognized peptide P277, when tandemly repeated, enhances a Th2 immune response toward effective vaccines against autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol*, v. 180, n. 1, p. 58-63, 2008.
- JONULEIT, H. e SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol*, v. 171, n. 12, p. 6323-7, 2003.
- JUNG, I.D.; LEE, C.M.; JEONG, Y.I.; LEE, J.S.; PARK, W.S.; HAN, J.; PARK, Y.M. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Lett*, v. 581, n. 7, p.1449-56, 2007.

- KAWAHATA, K.; MISAKI, Y.; YAMAUCHI, M.; TSUNEKAWA, S.; SETOGUCHI, K.; MIYAZAKI, J.; YAMAMOTO, S. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J. Immunol.* v. 168, n. 9, p. 4399-4405, 2002.
- KHATTRI, R.; COX, T.; YASAYKO, S. A.; RAMSDEÇÇ, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* v. 4, n. 4, p. 337-42, 2003.
- KIM, Y.S.; KOH, J.M.; LEE, Y.S.; KIM, B.J.; LEE, S.H.; LEE, K.U.; KIM, G.S. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. *Bone*, v. 45, n. 1, p. 68-76, 2009.
- KNOFLACH, M.; KIECHL, S.; PENZ, D.; ZANGERLE, A.; SCHMIDAUER, C.; ROSSMANN, A.; SHINGH, M.; SPALLEK, R.; GRIESMACHER, A.; BERNHARD, D.; ROBATSCHER, P.; BUCHBERGER, W.; DRAXL, W.; WILLEIT, J.; WICK, G. Cardiovascular risk factors and atherosclerosis in young women: atherosclerosis risk factors in female youngsters (ARFY study). *Stroke*, v. 40, n. 4, p. 1063-9, 2009.
- KOIDE, Y.; YOSHIDA, A. The signal transduction mechanism responsible for gamma interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression. *Infect. Immunol.* v. 62, n. 3, p. 948-55, 1994.
- KOL, A., LICHTMAN, A.H., FINBERG, R.W., LIBBY, P., KURT-JONES, E.A. 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, 2000.
- KOMATSU, N.; MARIOTTI-FERRANDIZ, M. E.; WANG, Y.; MALISSEN, B.; WALDMANN, H.; HORI, S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *PNAS*, v. 106, n. 6, p. 1903-8, 2009.
- KWIDZINSKI, E.; BUNSE, J.; ROSSETTO, C.; GONG, X.; TAKIKAWA, O.; TAKABAYASHI, K.; BROIDE, D. H.; CARSON, D. A.; RAZ, E. Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J*, v. 19, n. 10, p.1347-9, 2005.
- KYIEWSKI, B.; KLEIN, L. A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* v. 24, p. 571-606, 2006.
- LEMOINE, S.; MORVA, A.; YOUINOUE, P.; JAMIN, C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Ann N Y Acad Sci.* v. 1173, p. 260-7, 2009.
- LEONARD, W.J., SPOLSKI, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* v. 5, n. 9, p. 688-98, 2005.
- LEVINGS, M.K., GREGORI, S., TRESOLDI, E., CAZZANIGA, S., BONINI, C., RONCAROLO M.G. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells

requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*, v. 105, n. 3, p. 1162-9, 2005a.

LEVINGS, M.K.; RONCAROLO, M.G. Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, v. 293, p. 303-26, 2005b.

MALOY, K. J.; SALAUN, L.; CAHILL, R.; DOUGAN, G.; SAUNDERS, N. J.; POWRIE, F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med*, v. 197, n. 1, p. 111-9, 2003.

MANTEL, P. Y.; OUAKED, N.; RÜCKERT, B.; KARAGIANNIDIS, C.; WELZ, R.; BLASER, K.; SCHMIDT-WEBER, C.B. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*, v. 176, n. 6, p. 3593-602, 2006.

MARSH, A. F.; HARRISON, L. C. Emerging evidence that molecules expressed by mammalian tissue grafts are recognized by the innate immune system. *J. Leukoc. Biol*, v. 71, n. 3, p. 401-9, 2002.

MICHAËLSSON, J.; TEIXEIRA DE MATOS, C.; ACHOUR, A.; LANIER, L.L.; KÄRRE, K.; SÖDERSTRÖM, K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med*, v. 196 n. 11, p. 1403-14, 2002.

MICHALUART, P.; ABDALLAH, K.A.; LIMA, F.D.; SMITH, R.; MOYSÉS, R.A.; COELHO, V.; VICTORA, G.D.; SOCORRO-SILVA, A.; VOLSI, E.C.; ZÁRATE-BLADÉS, C.R.; FERRAZ, A.R.; BARRETO A.K.; CHAMMAS M.C.; GOMES, R.; GEBRIM, E.; ARAKAWA-SUGUENO, L.; FERNANDES K.P.; LOTUFO, P.A.; CARDOSO, M.R.; KALIL, J.; SILVA, C.L. Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther.*, v. 15, n. 10, p. 676-84, 2008.

MILLER, J. F.; HEATH, W. R. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol Rev*, v. 133, p. 131-50, 1993.

MONTEIRO, J. P.; FARACHE, J.; MERCADANTE, A. C.; MIGNACO, J. A.; BONAMINO, M.; BONOMO, A. Pathogenic effector T cell enrichment overcomes regulatory T cell control and generates autoimmune gastritis. *J Immunol*, v. 181, n. 9, p. 5895-903, 2008.

MORIMOTO, R. I. e SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotechnol*, v. 16, n. 9, p. 833-8, 1998.

MATHIS, D. e BENOIST, C. Back to central tolerance. *Immunity*, v. 20, n. 5, p. 509-16, 2004.

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, v. 317, n. 5835, p. 256-60, 2007.

MUNN, D.H.; SHARMA, M.D.; HOU, D.; BABAN, B.; LEE, J.R.; ANTONIA, S.J.; MESSINA, J.L.; CHANDLER, P.; KONI, P.A.; MELLOR, A.L. Expression of

indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*, v. 114, n. 2, p. 280-90, 2004.

MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr. Opin. Immunol*, v. 18, n. 2, p. 220-5, 2006.

MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, v. 281, n. 5380, p. 1191-3, 1998.

NASTA, F.; UBALDI, V.; PACE, L.; DORIA, G.; PIOLI, C. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibits GATA-3 but not T-bet mRNA expression during T helper cell differentiation. *Immunology*, v. 117, n. 3, p. 358-67, 2006.

NUSSBAUM, G.; ZANIN-ZHOROV, A.; QUINTANA, F.; LIDER, O. Peptide p277 of Hsp60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis. *Inter. Immunol*, v. 18, n. 10, p. 1413-9, 2006.

OKAMOTO, A.; NIKAIDO, T.; OCHIAI, K.; TAKAKURA, S.; DAITO, M.; AOKI, Y.; ISHII, N.; YAHAIHARA, N.; YAMADA, K.; TAKIKAWA, O. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin. Cancer res*, v. 11, n. 16, p. 6030-9, 2005.

OSTERLOH, A.; GEISINGER, F.; PIÉDAVENT, M.; FLEISCHER, B.; BRATTIG, N.; BRELOER, M. heat shock protein 60 (HSP60) stimulates neutrophil effector functions. *J Leukoc Biol*, v. 86, n. 2, p.423-34, 2009.

OSTERLOH, A.; KALINKE, U.; WEISS, S.; FLEISCHER, B.; BRELOER, M. Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, v. 282, n. 7, p. 4669-80, 2007.

OSTERLOH, A.; MEIER-STIEGEN, F.; VEIT, A.; FLEISCHER, B.; VON BONIN, A.; BRELOER, M. Lipopolysaccharide-free heat shock protein 60 activates T cells *J Biol Chem*, v. 279, n. 46, p. 47906-11, 2004.

PANDEY, S.; MITTAL, R.D.; SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, K.; SINGH, S.; SRIVASTAVA, S.; MITTAL, B. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecol Oncol*. V. 114, N. 3, P. 501-5, 2009.

PARIJS, L. V.; ABBAS, A. K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, v. 280, n. 10, p. 243-8, 1998.

PARK, J.E., FACCIPONTE, J., CHEN, X., MACDONALD, I., REPASKY, E.A., MANJILI, M.H., WANG, X.Y., SUBJECK, J.R. Chaperoning function of stress protein grp170, a member of the hsp70 superfamily, is responsible for its immunoadjuvant activity. *Cancer Res*, v. 66, n. 2, p. 1161-8, 2006.

PASSERINI, L., ALLAN, S.E., BATTAGLIA, M., DI NUNZIO, S., ALSTAD, A.N., LEVINGS, M.K., RONCALORO, M.G., BACCHETTA, R. STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int. Immunol*, v. 20, n. 3, p. 421-31, 2008.

- POCKLEY, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, v. 362, n. 9382, p. 469-76, 2003.
- POCKLEY, A. G., MUTHANA, M., CALDERWOOD, S.K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends. Biochem. Sci*, v. 33, n. 2, p. 71-9, 2008.
- PRAKKEN, B. J.; ROORD, S.; RONAGHY, A.; WAUBEN, M.; ALBANI, S.; VAN EDEN, W. Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis. *Springer Semin. Immunopathol*, v. 25, n. 1, p. 47-63, 2003.
- PRAKKEN, B.J.; ROORD, S.; VAN KOOTEN, P.J.; WAGENAAR, J.P.; VAN EDEN, W.; ALBANI, S.; WAUBEN, M.H. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. *Arthritis Rheum*, v. 46, n. 7, p. 1937-46, 2002.
- QUINTANA, F. J.; MIMRAN, A.; CARMI, P.; MOR, F.; COHEN, I. R. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. *PLoS ONE*, v. 3, n. 12, p. e4026, 2008.
- QUINTANA F.J.; CARMI, P.; MOR, F.; COHEN, I.R. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J Immunol*, v. 171, n. 7, p. 3533-41, 2003.
- RAMAGE, J.M., YOUNG, J.L., GOODALL, J.C., GASTON, J.S. T cell responses to heat-shock protein 60: differential responses by CD4+ T cell subsets according to their expression of CD45 isotypes. *J. Immunol*, v. 162, n. 2, p. 704-10, 1999.
- RAZ, I.; ELIAS, D.; AVRON, A.; TAMIR, M.; METZGER, M.; COHEN, I.R. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*, v. 358, n. 9295, p. 1749-53, 2001.
- READ, S.; MALMSTROM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med*, v. 192, n. 2, p. 295-302, 2000.
- RITOSSA, F. M. Behavior of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res*, v. 36, p. 15-523, 1964.
- RONCAROLO, M.G.; GREGORI, S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur J Immunol*, v. 38, n. 4, p. 925-7, 2008.
- 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.
- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. 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*. 1995, 155:1151-1164.

- SALOMON, B.; LENSCHOW, D. J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A.; BLUESTONE, J. A. B7/CD28 co-stimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25 immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, v. 12, n. 4, p. 431-40, 2000.
- SAMALI, A.; CAI, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; JONES, D.P.; ORRENIUS, S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J*, v. 18, n. 8, p. 2040-8, 1999.
- SCHNEIDÉR, J.; JIMÉNEZ, E.; MARENBACH, K.; ROMERO, H.; MARX, D.; MEDEN, H. Immunohistochemical detection of Hsp60-expression in human ovarian cancer. Correlation with survival in a series of 247 patients. *Anticancer Res*, v. 19, n. 3A, p. 2141-6, 1999.
- SHARMA, M.D., BABAN, B., CHANDLER, P., HOU, D., SINGH, N., YAGITA, H., AZUMA, M., BLAZAR, B.R., MELLOR, A.L., MUNN, D.H. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest*, v. 117, n. 9, p. 2570-82, 2007.
- SHI, G.; COX, C. A.; VISTICA, B. P.; TAN, C.; WAWROUSEK, E. F.; GERY, I. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J. Immunol*, v. 181, n. 10, p. 7205-13, 2008.
- TAO, R.; DE ZOETEN, E.F.; OZKAYNAK, E.; CHEN, C.; WANG, L.; PORRETTN P.M.; LI, B.; TURKA, L.A.; OLSON, E.N.; GREENE, M.I.; WELLS, A.D.; HANCOCK, W.W. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med*, v.13, n.11, p.1299-307, 2007.
- TERNESS, P.; CHUANG, J.J.; BAUER, T.; JIGA, L.; OPELZ, G. Regulation of human auto and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)–producing dendritic cells: too much ado about IDO? *Blood*, v. 105, n. 6, p. 2480-6, 2005.
- THÉRIAULT, J.R., MAMBULA, S.S., SAWAMURA, T., STEVENSON, M.A., CALDERWOOD, S.K. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett*, v. 579, n. 9, p. 1951-60, 2005.
- THÉRIAULT, J.R, ADACHI, H., CALDERWOOD, S.K. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J. Immunol*, v. 177, n. 12, p. 8604-11, 2006.
- TONE, Y.; FURUUCHI, K.; KOJIMA, Y.; TYKOCINSKI, M. L.; GREENE, M. I.; TONE, M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol*, v. 9, n. 2, p. 194-202, 2007.
- TSAN, M.F., GAO, B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol*, v. 1, n. 4, p. 274-9, 2004.
- USUI, T.; PREISS, J. C.; KANNO, Y.; YAO, Z. J.; BREAN, J. H.; O'SHEA, J. J.; STROBER, W. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J. Exp. Med*, v. 203, n. 3, p. 755-66, 2006.

- UYTTENHOVE, C.; PILOTTE, L.; THEATE, I.; STROOBANT, V.; COLAU, D.; PARMENTIER, N.; BOON, T.; VAN DEN EYNDE, B. J. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med*, v. 9, n. 10, p. 1269-74, 2003.
- VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol*, v. 5, n. 4, p. 318-30, 2005.
- VAN PARIJS, L.; IBRAGHIMOV, A.; ABBAS, A.K. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*, v. 4, n. 3, p. 321-8, 1996.
- VAN PUIJVELDE, G. H.; VAN ES, T.; VAN WANROOIJ, E. J.; HABETS, K. L.; DE VOS, P.; VAN DER ZEE, R.; VAN EDEN, W.; VAN BERKEL, T. J.; KUIPER, J. Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, n. 12, p. 2677-83, 2007.
- VELDMAN, C., PAHL, A., BEISSERT, S., HANSEN, W., BUER, J., DIECKMANN, D., SCHULER, G., HERTL, M. Inhibition of the transcription factor FOXP3 converts desmoglein 3-specific type 1 regulatory T cells into Th2-like cells. *J. Immunol*, v. 106, n. 5, p. 3215-22, 2006.
- VICTORA, G.D.; SOCORRO-SILVA, A.; VOLSI, E.C.; ABDALLAH, K.; LIMA, F.D.; SMITH, R.B.; MOYSES, R.A.; ZÁRATE-BLADÉS, C.R.; MICHALUART, P.; SILVA, C.L.; KALIL, J.; COELHO, V. Immune response to vaccination with DNA-Hsp65 in a phase I clinical trial with head and neck cancer patients. *Cancer Gene Ther*, v. 16, n. 7, p. 598-608, 2009.
- VINODH PILLAI, STERLING, B., ORTEGA, C.K., WANG, NITIN, J.K. Transient regulatory T-cells: A state attained by all activated human T-cells. *Clin. Immunol*, v. 123, n. 1, p. 18-29, 2007.
- VOLPE, E.; SERVANT, N.; ZOLLINGER, R.; BOGIATZI, S.I.; HUPE, P.; BARILLOT, E.; SOUMELIS, V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, v. 9, n. 6, p. 650-7, 2008.
- VOO, K.S.; WANG, Y.; SANTORI, F.R.; BOGGIANO, C.; WANG, Y.; ARIMA, K.; BOVER, L.; HANABUCHI, S.; KHALILI, J.; MARINOVA, E.; ZHENG, B.; LITTMAN, D.R.; LIU, Y. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *PNAS*, v. 106, n. 12, p. 4793-8, 2009.
- WAN, Y.Y.; FLAVELL, R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*, v. 445, n. 7129, p. 766-70, 2007.
- WANG, L.; TAO, R.; HANCOCK, W.W. Using histone deacetylase inhibitors to enhance Foxp3(+) regulatory T-cell function and induce allograft tolerance. *Immunol Cell Biol*, v. 87, n. 3, p. 195-202, 2009.
- WEAVER, C.T., HATTON, R.D., MANGAN, P.R., HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol*, v. 25, p. 821-52, 2007.

- WEI, J., DURAMAR, O., PERNG, O.A., REINER, S.L., LIU, Y., QIN, X.F. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of FOXP3⁺ regulatory T cells. *PNAS*, v. 104, n. 46, p. 18169-74, 2007.
- WIETEN, L., BROERE, F., VAN DER ZEE, R., KOERKAMP, E.K., WAGENAAR, J., VAN EDEN, W. Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators? *FEBS Lett*, v. 581, n. 19, p. 3716-22, 2007.
- WILLIAMS, L.M.; RUDENSKY, A.Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*, v. 8, n. 3, p. 277-84, 2007.
- YANG K.; LI D., LUO, M.; HU Y. Generation of HSP60-specific regulatory T cell and effect on atherosclerosis. *Cell Immunol*, v. 243, n. 2, p. 90-5, 2006.
- YANG, X.O.; NURIEVA, R.; MARTINEZ, G.J.; KANG, H.S.; CHUNG, Y.; PAPPU, B.P.; SHAH, B.; CHANG, S.H.; SCHLUNS, K.S.; WATOWICH, S.S.; FENG, X.H.; JETTEN, A.M.; DONG, C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, v. 29, n. 1, p. 44-56, 2008.
- ZANIN-ZHOROV, A.; BRUCK, R.; TAL, G.; OREN, S.; AEED, H.; HERSHKOVIS, R.; COHEN, I. R.; LIDER, O. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J. Immunol*, v. 174, n. 6, p. 3227-36, 2005b.
- ZANIN-ZHOROV, A.; CAHALON, L.; TAL, G.; MARGALIT, R.; LIDER, O.; COHEN, I. R. 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, 2006.
- ZANIN-ZHOROV, A.; NUSSBAUM, G.; FRANITZA, S.; COHEN, I. R.; LIDER, O. T cells respond to heat shock protein via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J*, v. 17, n. 11, p. 1567-69, 2003.
- ZANIN-ZHOROV, A.; TAL, G.; SHIVTIEL, S.; COHEN, M.; LAPIDOT, T.; NUSSBAUM, G.; MARGALIT, R.; COHEN, I. R.; LIDER, O. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J. Immunol*, v. 175, n. 1, p. 276-85, 2005a.
- ZHENG, W. e FLAVELL, R. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, v. 89, n. 4, p. 587-96, 1997.
- ZHOU, X.; BAILEY-BUCKTROUT, S.L.; JEKER, L.T.; PENARANDA, C.; MARTÍNEZ-LLORDELLA, M.; ASHBY, M.; NAKAYAMA, M.; ROSENTHAL, W.; BLUESTONE, J.A. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol*, v. 10, n. 9, p. 1000-7, 2009.

- ZHOU, L., IVANOV, I., SPOLSKI, R., MIN, R., SHENDEROV, K., EGAWA, T., LEVY, D.E., LEONARD, W.J., LITTMAN, D.R. IL-6 programs T_H-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol*, v. 8, n. 9, p. 967-74, 2007.
- ZIEGLER, S.F.; BUCKNER, J.H. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect*, v. 11, n. 5, p. 594-8, 2009.

APÊNDICE

Apêndice A: Termo de consentimento livre e esclarecido

Apêndice B: Aprovação do projeto pela CAPPesq

Apêndice A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE ..... CEP: .....

TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....DOCUMENTO IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: .../.../...

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: ..... CEP: ..... TELEFONE: DDD

(.....) .....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo molecular de mecanismos envolvidos na atividade potencialmente reguladora da proteína de choque térmico 60 e seus peptídeos

PESQUISADOR: Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA. CRM 45907

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração – Laboratório de Imunologia

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ( )

RISCO MÍNIMO (X)

RISCO MÉDIO ( )

RISCO BAIXO ( )

RISCO MAIOR ( )

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos (24 Meses)

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Neste projeto de pesquisa temos como objetivo estudar a resposta de algumas células de seu sistema imune, encontradas no seu sangue, dirigida a uma proteína do seu organismo, chamada proteína de choque térmico 60 (Hsp 60) e alguns de seus fragmentos (peptídeos). Pretendemos estudar a função de algumas células, denominadas células mononucleares de sangue periférico, que estão envolvidas na defesa e na manutenção do equilíbrio do seu organismo. Essas células de indivíduos saudáveis serão estudadas no laboratório e, para isso, precisamos de uma amostra de seu sangue, do qual as células serão separadas e cultivadas na presença da Hsp60 e seus fragmentos. Posteriormente, será feita análise da expressão de moléculas relacionadas à regulação da resposta imune. As informações obtidas nesse trabalho poderão ser usadas, no futuro, para o tratamento de algumas doenças auto-imunes e para a prevenção de rejeição de transplante.

Para participar deste trabalho de pesquisa, será necessário que você concorde em doar 80 ml de sangue que serão retirados da veia do braço para conseguirmos obter as células e realizarmos os testes no laboratório.

A retirada do sangue é muito simples. Não há risco para o indivíduo, sendo o desconforto apenas uma picada no braço, na hora de introduzir a agulha.

É importante ressaltar que não haverá benefício direto para você, uma vez que se trata de um trabalho de pesquisa, porém poderá ajudar a outras pessoas no futuro. Quando entendermos melhor como esta proteína (Hsp60) pode atuar sobre essas células do sistema imune, induzindo uma resposta anti-inflamatória, poderemos utilizá-la como uma nova forma de tratamento para doenças auto-imunes e na prevenção de rejeições de transplante.

Dentro desta pesquisa, não usaremos nenhum outro procedimento que possa ser vantajoso para os indivíduos participantes.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Profa. Dra. Verônica Coelho - Laboratório de Imunologia /InCor – Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 44, 9º andar, Bloco 2. Telefone: 3069-5907 ou 5912.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,   de   de 19   .

_____
assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

_____
assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Apêndice B

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.06.07 **APROVOU**, o Protocolo de Pesquisa **nº 0441/07**, intitulado: **"ESTUDO MOLECULAR DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE POTENCIALMENTE REGULADORA DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60 E SEUS PEPTÍDEOS"**, apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Profª. Drª. Verônica Porto Carreiro de Vasconcelos Coelho**

Pesquisador (a) Executante: **Fernanda Gonçalves Martello**

CAPPesq, 20 de junho de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa