Adalberto Socorro da Silva

Papel das células dendríticas no direcionamento funcional
da auto-reatividade celular à HSP60, no sistema humano

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Verônica Coelho

São Paulo

2007

Adalberto Socorro da Silva

Papel das células dendríticas no direcionamento funcional
da auto-reatividade celular à HSP60, no sistema humano

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Verônica Coelho

São Paulo

2007

“Oh bendito que semeia livros
Livros a mão cheia
E manda o povo pensar
O livro caindo n'alma
É gèrmem que faz a palma
É chuva que faz o mar”

Castro Alves

*Aos meus pais, Júlia e Mudestino,
Pelo amor e exemplo de pais e exemplo de vida,*

*Aos meus irmãos Francisca, Dineusa, Suelene e
Jonas por tudo que representam na minha.
Que, mesmo à distância sempre me apoiaram
muita força e coragem para , elementos
necessários para vencer mais esta etapa,*

*Todos eles são os meus grandes estímulos
para continuar sonhando, vivendo e realizando*

Agradecimentos

A elaboração desse trabalho foi uma tarefa realizada a muitas mãos e cabeças. Foram muitos os que devotaram tempo paciência para que essa laboriosa obra chegasse a bom termo. Essa tese é, portanto, a obra de uma coletividade a quem doravante torno público os seus muito integrantes.

Gostaria inicialmente de agradecer à minha orientadora, Dra Verônica Coelho que me aceitou como seu aluno, me ensinou pensar em ciência sob o prisma da crítica e esteve ao meu lado principalmente nas etapas mais críticas desse trabalho. Verônica você marcou uma etapa muito importante na minha vida. Muito obrigado pelo exemplo e dedicação à ciência aos alunos e ao indivíduo.

Ao Prof Dr Jorge Kalil, que me recebeu no InCor, me acolheu no seu laboratório e no seu departamento locais onde o comprometimento com o aprendizado do aluno e a produção intelectual rezam a sua melhor cartilha. Professor Kalil meu muito obrigado.

Aos doutores Edécio Cunha Neto, Luiza Guilherme Guglielmi, Ana Carla Goldeberg, que sempre se mostraram disponíveis para conversar e ajudar nos momentos difíceis, mesmo sendo eles próprios já muito atarefados. Doutores meu sincero agradecimento.

À Maria Lúcia Marin, uma pessoa todo afeto e bondade que me ajudou sobremaneira nas etapas finais desse trabalho. Malu, meu muito obrigado.

À minha amiga Evelyn Volsi que teve uma importante colaboração para o desenvolvimento desse trabalho quando ela ainda estava na sua primeira infância. Evelyn, meu eterno agradecimento.

À Sandra Emiko Oshiro, Sandra Maria Maonteiro, Hui Tzu Lin, minhas companheiras de bancada, de conversa e de almoço. Pessoas com quem tenho orgulho de ter convivido por todo o período em que aqui estive.

Ao meu amigo Gabriel Victora, um amigo com que sempre pude contar inclusive na finalização desse trabalho.

À Cristina Caldas, Geórgia Porto, Ernesto Luna, Edilberto Postol, Flávio Alcântara, Angelina Bilate, Simone Fonseca, Kellen Faé, Rosemeire Silva, Mônica Ferreira, Sandra Drigo. Minhas grandes amigas e companheiras com as quais convivi durante a minha longa jornada na pós-no meu doutorado. Foi ótimo trabalhamos, viajarmos e conviver juntos. É um prazer estar sempre junto a vocês.

À Priscila C. Teixeira, Andréia Kuramoto, Adriana Coutinho, Natalie Guida Miller, Dani, Susane. Que sempre estiveram prontas para conversar sobre o trabalho e ajudar na sua realização.

Ao Washington R Silva e ao Cláudio, sem os quais a realização desse trabalho não seria possível. Meus amigos esse trabalho também é de vocês

Aos administradores e secretárias, passados e atuais: Jair Martins, Douglas Cavalcanti, Neuzeti Santos, Andréia Verdille, Tânia J Mota, Gisele, Sônia, Dr Paulo. Vocês são essenciais ao trabalho de todos aqui. Meu obrigado a vocês.

Aos colegas e chefes da Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP, Dr Fábio Castro, Dr Luiz Vicente Rizzo, Fanny Lima, Sayuri Watanabe, Soraya Andrade, Ariana Yang, Gustavo Graudenz, Pedro Bianchi, Dra Myrtes Barros, Dr Kald Abdallah, Dra Cristina Kokron, Dr Abílio Mota. Agradeço a amizade, companheirismo e alegre convívio.

Às colegas Eliane Mairena, Luciana Nogueira e Bia Stolf que foram parte essenciais para a realização desse trabalho, notavelmente ajudando com os experimentos de PCR em tempo real.que ajudaram com as reaForam grandes amigas e companheiras neste meu trajeto ao longo do doutorado.

Aos colegas da vacina, InCor: Fabio Higa, Edilberto Postól, Flávio Alcântara, Selma Palácios, Samar Freschi, Raquel Alencar, Ricardo Giordano, Daniela Tegani, Simone Regina, Cláudio Puschel, Karina Loffredo, Juliana Mattos e Viviane Rocha, pela amizade e convívio.

Aos colegas do HLA, InCor: Hécio Rodrigues, Nicolas Panajotopoulos, Carlos Sergio Viggiani, Carla Ronda, Germano Preus, Cláudia Borba, Yoni Amorim, Ivete Ramos e todos os outros que compõem aquele promissor setor: Susane, Carol, Sandra, Célia, Olga, Marcelo patrícia e Mário. Obrigado pela amizade companheirismo e bom humor.

Aos colegas: Geórgia MUNDIN, Idania Suarez, Mônica Ferreira, Luiz Mundel sempre estiveram me apoiando e me ajudando nos momentos de necessidade. Agradeço o agradável convívio. Aprendi muito com todos vocês.

Ao amigo Rajendranath Ramasawmy que sempre me apoiou e neste mostrou-se dispostos a me ajudar neste projeto.

Na trilha da gratidão não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à Dra semíramis Jamil Hadad a quem devo meus primeiros passos na imunologia e que me apoiou e me apóia nessa difícil caminho que é a formação de um pesquisador. Semíramis meu muito obrigado.

Da mesma forma gostaria de agradecer ao Dr Davi Jamil Hadad que me acolheu como a um membro da família e que me ajudou e continua ajudando nessa árdua batalha.

Gostaria de agradecer a todos os meus familiares e amigos, patamares sólidos em quem sempre pude me apoiar.

Às Instituições: Instituto do Coração (InCor) e Universidade São Paulo, oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Instituto de Investigação em Imunologia do Insituto do Milênio do CNPq e ao laboratório farmacêutico Teuto pelo suporte financeiro.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudo para que eu pudesse me dedicar à pós - graduação.

Ao CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior)

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

E a Deus, principalmente...

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A resposta imune: uma breve visão	1
1.2 Auto-imunidade fisiológica	12
1.3 Proteínas de Choque Térmico	14
1.4 Células dendríticas	18
1.4.1 Origem das Células Dendríticas	19
1.4.2 Células dendríticas mielóides	20
1.4.3 Células dendríticas e polarização da resposta imune	22
1.4.4 Células dendríticas tolerogênicas	26
1.4.5 Células dendríticas e terapia celular	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Indivíduos do estudo	32
3.2 Delineamento experimental	32
3.3 Produção da região C-Terminal da Hsp60	35
3.4 Remoção de endotoxinas	36
3.5 Teste de endotoxina por LAL (Limulus Amebocyte Lysate)	37
3.6 Produção dos peptídeos derivados das regiões C-Terminal, N-Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana	37
3.7 Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos saudáveis	42
3.8 Obtenção de células T	42
3.9 Obtenção de monócitos	43
3.10 Geração de células dendríticas	44
3.11 Caracterização morfológica das Células Dendríticas	45
3.12 Caracterização imunofenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo	46
3.13 Ensaios de Reação Linfocitária Mista (MLR)	47
3.14 Pulso de DC com antígenos da Hsp60	48
3.15 Ensaios de linfoproliferação	48
3.16 Detecção de citocinas por <i>cytometric beads array</i> (CBA)	50
3.17 Separação de linfócitos T para ensaios de PCR em tempo real	51
3.18 PCR em tempo real	52

3.18.1 Extração de RNA	52
3.18.2 Quantificação de RNA.....	52
3.18.3 Transcrição reversa	53
3.18.4 Reação de RT-PCR em tempo real.....	53
3.18.5 Desenho e padronização dos primers	55
3.18.6 Especificidade e adequação dos primers	56
3.18.7 Cálculo da Eficiência.....	56
3.18.8 Critérios de Validação	57
4 RESULTADOS	58
4.1 Geração de células dendríticas.....	58
4.2 Caracterização morfológica e funcional das células dendríticas.....	61
4.2.1 Caracterização Morfológica	61
4.2.2 Caracterização imunofenotípica das diferentes células dendríticas.....	62
4.3 Caracterização funcional das células dendríticas.....	66
4.3.1 Reação Linfocitária Mista (MLR)	66
4.3.2 Produção espontânea de citocinas pelas diferentes DCs.....	69
4.4 Interação de antígenos da Hsp60 com as células dendríticas: produção de citocinas.....	72
4.4.1 Produção de IFN γ por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, pulsadas com peptídeos da Hsp60.....	74
4.4.2 Produção de TNF α por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, com e sem estímulo com antígenos da Hsp60	78
4.4.3 Produção de IL-10 por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, com e sem o estímulo com antígenos da Hsp60	81
4.4.4 Produção de IL-4 por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, com e sem estímulo com antígenos da Hsp60	86
4.5 Auto-reatividade de linfócitos T a células dendríticas e a antígenos da Hsp60	89
4.5.1 Proliferação.....	90
4.5.2 Produção de citocinas.....	110
4.6 Regulação x Inflamação: Expressão de mRNA de fatores imunorreguladores e pró-inflamatórios em linfócitos T co-cultivados com DC imaturas pulsadas com antígenos da Hsp60.....	127
5 DISCUSSÃO	141
6 CONCLUSÕES	163
7 REFERÊNCIAS	165
ANEXOS	185

Resumo

SOCORRO-SILVA A. Papel das células dendríticas no direcionamento funcional da auto-reatividade celular à Hsp60, no sistema humano [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Nosso objetivo, neste trabalho, foi verificar se a interação das células dendríticas (DCs) com antígenos da Hsp60 induz um efeito sinérgico no direcionamento de uma resposta imune reguladora, no sistema humano. Células dendríticas humanas maduras (mDC) e imaturas (iDC e iDC IL-10) foram geradas, *in vitro*, a partir de monócitos de 15 de indivíduos saudáveis. Estas células foram caracterizadas quanto à (i) morfologia, (ii) imunofenotipagem, (iii) produção de citocinas e, (iv) capacidade de estimular a proliferação. Analisamos a auto-reatividade de linfócitos T (LT) dirigida a diferentes DCs (mDC, iDC e iDC IL-10). Na interação de antígenos da Hsp60 com essas diferentes DCs, verificamos: (i) a capacidade de induzir a produção de citocinas pelas DCs e de inibir a sua produção espontânea, (ii) a auto-reatividade de linfócitos T dirigida a esses antígenos (proliferação e produção de citocinas), (iii) a expressão gênica de um painel de moléculas reguladoras (TGF β , receptor de TGF- β , IL-10 e GATA3) e inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e T-bet) em linfócitos, T no contexto de células dendríticas imaturas.

As mDC apresentaram expressão de CD83, maior expressão de CD80, e CD86, assim como induziram respostas alogênicas mais intensas do que as DCs imaturas. Apesar de haver variabilidade na produção de citocinas, apenas as DC imaturas produziram espontaneamente IL-10, e as DCs maduras produziram mais frequentemente IFN- γ e TNF- α . Analisando o efeito dos antígenos da Hsp60 sobre a produção de citocinas, observamos tanto indução quanto inibição da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 nos três grupos de DC. Porém, a inibição predominou sobre a produção nos três grupos de DC.

A auto-reatividade proliferativa de LT dirigida às diferentes DCs foi mais frequente nas culturas com as DCs maduras (6/10) do que com as DCs imaturas (4/10). Também detectamos produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , e IL-2 para todos os grupos de células, porém, mais frequentemente na auto-reatividade contra as DCs maduras. Diversos antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir esta auto-reatividade. O peptídeo N7 teve um efeito dominante na inibição da auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às mDCs. A auto-reatividade a antígenos da Hsp60, de um modo geral, foi maior com as DCs imaturas. Diversos antígenos foram capazes de induzir proliferação e produção de citocinas. Todavia, o peptídeo C3 foi imunodominante (6/10) na indução de resposta linfoproliferativa, no contexto das iDCs. A expressão gênica de moléculas reguladoras e inflamatórias foi verificada em linfócitos T, na auto-reatividade a antígenos da Hsp60. Observamos modificações importantes de praticamente todas as moléculas estudadas. Verificamos um predomínio de modificações reguladoras para os genes TGF β , TGF- β R, GATA3, TNF- α e T-bet. O peptídeo N7 induziu

modificações predominantemente reguladoras em todas as condições em que ele foi testado.

Em conclusão, verificamos que antígenos da Hsp60 têm efeito direto na produção de citocinas das diferentes DCs. Também têm a capacidade de ativar, simultaneamente, em linfócitos T, na interação com as células dendríticas, genes funcionalmente antagônicos. Isto reafirma a diversidade funcional da Hsp60. Ademais, identificamos o peptídeo N7 como potencialmente imunorregulador e o consideramos um candidato a ser testado em protocolos para indução de tolerância.

Descritores (Tolerância imunológica, células dendríticas, proteínas de choque térmico, peptídeos)

SUMMARY

SOCORRO-SILVA A. Papel das células dendríticas no direcionamento funcional da auto-reatividade celular à Hsp60, no sistema humano [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

The aim of the present study was to determine whether the interaction of dendritic cells (DCs) with antigens derived from Hsp60 is capable of inducing a synergistic effect in directing a regulatory immune response, using a human system. Human DCs with mature (mDC) and immature (iDC and iDC IL-10) phenotype were generated *in vitro* from monocytes obtained from 15 healthy subjects. These cells were characterized according to (i) morphology, (ii) expression of surface markers, (iii) cytokine production, and (iv) ability to stimulate alloproliferation.

We analyzed the autoreactivity of T lymphocytes (TL) directed against different DC types (mDC, iDC, and iDC IL-10). For the interaction of Hsp60 antigens with these different DCs, we determined: (i) the ability to induce cytokine production by DCs as well as to inhibit their spontaneous production, (ii) the autoreactivity of TL to these antigens (proliferation and cytokine production), and (iii) gene expression levels of a panel of regulatory (TGF β , TGF- β receptor, IL-10, and GATA3) and inflammatory (IFN- γ , TNF- α , and T-bet) molecules by TL when stimulated by mDC.

mDC expressed CD83 and showed higher levels of CD80 and CD86 and induced stronger allogeneic responses than immature DCs. Although cytokine production varied, only immature DCs spontaneously produced IL-10, and mature DCs more frequently produced IFN- γ and TNF- α . An analysis of the effects of Hsp60 antigens on cytokine production showed both induction and inhibition of production of IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-10 by the three sets of DCs; however, inhibition predominated over induction in all three DC groups.

The proliferative autoreactivity of LT directed towards the different DCs was more frequent in cultures containing mDCs (6/10) than in those containing immature DCs (4/10). We also detected production of IFN- γ , TNF- α , and IL-2 by all groups of cells; however this was more frequent in the context of autoreactivity against mDCs. Several Hsp60 antigens were capable of inhibiting this autoreactivity. Peptide N7 had a dominant effect on the inhibition of the proliferative autoreactivity of LT directed towards mDCs. Autoreactivity to Hsp60 antigens was generally greater in cultures containing immature DCs. Several antigens were capable of inducing proliferation and cytokine secretion. However, peptide C3 was immunodominant (6/10) in the induction of a lymphoproliferative response in cultures containing iDCs. Gene expression of regulatory and inflammatory molecules was determined in LTs in the context of autoreactivity to Hsp60 antigens. There were important modifications in virtually all molecules studied. There was a predominance of regulatory-oriented changes in expression of TGF β , TGF- β R, GATA3, TNF- α , and T-bet. Peptide N7 induced dominantly regulatory changes in gene expression in all conditions in which it was tested.

In conclusion, we have shown that Hsp60 antigens have a direct effect on cytokine production by different DCs. These antigens are also able to

activate, during the interaction of LT with DCs, genes that are functionally antagonistic. This finding reinforces the functional diversity of Hsp60. Furthermore, we have identified peptide N7 as potentially immunoregulatory, and consider it as a candidate to be tested in protocols for the induction of tolerance.

Descriptors (Immunological tolerance, dendritic cells, heat shock proteins, peptides)

1. Introdução

1.1 A resposta imune: uma breve visão

O sistema imune é uma intrincada rede de tecidos, células e moléculas capaz de montar respostas, contra a maioria dos agentes infecciosos, ao mesmo tempo em que não agride os tecidos próprios em condições fisiológicas.

Dado o seu dinamismo, o sistema imune é capaz de montar dois tipos de respostas com características distintas, porém com diversas interfaces: a resposta imune inata e a resposta adaptativa. A resposta imune inata, que se caracteriza por não ser específica para um dado patógeno, inclui elementos que carecem de memória imunológica. Tais elementos podem ser (i) celulares: neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC), mastócitos, basófilos, eosinófilos, células “Natural Killer” (NK) e (ii) moleculares: proteínas solúveis constitutivamente presentes nos fluidos biológicos (complemento e defensinas) (Frank and Fries 1991) ou liberadas por células ativadas (citocinas, quimiocinas) (Yang, Biragyn 2002).

Como parte da resposta inata existem ainda moléculas de superfície celular, que reconhecem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês, “Pathogen-associated molecular patterns”). Dentre essas moléculas, denominadas PRR (Receptor de Reconhecimento Padrão, do inglês, “Pattern-Recognition Receptors”) (Janeway 1989), destaca-se uma família de receptores transmembrânicos do tipo I denominada “Toll-like Receptors” (TLR) (Medzhitov 2001). TLRs são principalmente encontrados em macrófagos e células dendríticas, embora possam ser expressos

também em outras células. TLRs ligam-se principalmente a produtos microbianos: TLR2, a peptidoglicanos e lipoproteínas (Schwandner, Dziarski 1999); TLR3, a RNA de dupla fita (Alexopoulou, Holt 2001); TLR4, a lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicóico (Hoshino, Takeuchi 1999); TLR5, à flagelina bacteriana (Hayashi, Smith 2001) e TLR9 a DNA CpG (Hemmi, Takeuchi 2000). Além dos ligantes acima mencionados, há relatos de que auto-antígenos, dentre eles as proteínas de choque térmico (HSP, do inglês “Heat Shock Proteins”) também podem se ligar a TLR (Zanin-Zhorov, Nussbaum 2003).

A resposta imune adaptativa tem como características principais o reconhecimento de antígenos polimórficos através de receptores também polimórficos, o desenvolvimento de maior afinidade na interação molecular no reconhecimento antigênico (resposta humoral) e a memória imunológica. A especificidade imunológica também tem sido apontada como uma importante característica desse tipo de resposta. No entanto, o conceito de especificidade imunológica vem sendo discutido frente à observação de que o reconhecimento imunológico cruzado parece ser uma característica fisiológica do sistema imune (Mason 1998). As células envolvidas nessa resposta são linfócitos T, NKT e B, cujos receptores (denominados RCT- em células T e NKT- e RCB em células B) são formados por rearranjos somáticos aleatórios entre genes da linhagem germinal. Tal rearranjo confere ao sistema imune uma enorme capacidade de reconhecimento antigênico - aproximadamente 10^{15} receptores diferentes (Mason 1998).

Dentre as células da imunidade adaptativa mencionadas acima, focalizaremos nos linfócitos T, porque realizam um papel central na resposta

adaptativa, e porque constituem objeto de pesquisa do presente trabalho. Os linfócitos T se diferenciam no timo, onde são chamados timócitos, a partir de precursores linfóides oriundos da medula óssea (Borowski, Martin 2002). Uma vez no timo, uma pequena percentagem desses timócitos rearranja genes das cadeias γ e δ produzindo o RCT $\gamma\delta$. Estas células deixam o timo rapidamente e migram para as superfícies epiteliais, incluindo aquelas do trato gastrintestinal, onde contribuem para a defesa de superfícies mucosas (Aljurf, Ezzat 2002) e manutenção da homeostase.

A maioria dos timócitos, no entanto, rearranja os genes das cadeias α e β , e ainda no timo, é testada quanto a sua habilidade em reconhecer pequenos peptídeos, resultantes do processamento intracelular de antígenos protéicos. Tais peptídeos são apresentados na superfície celular complexados a moléculas altamente polimórficas codificadas no complexo gênico MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) que, em humanos, são chamadas HLA (Antígenos Leucocitários Humanos, do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) e classificadas em: (i) classe I, moléculas HLA-A, B e C e (ii) classe II, moléculas HLA-DR, DQ e DP.

Os timócitos com avidéz intermediária por complexos peptídeos/MHC no timo, são selecionados positivamente. Em contrapartida, os timócitos que não reconhecem ou que reconhecem tais complexos com alta avidéz, morrem no timo por morte celular programada (apoptose), um processo conhecido como seleção negativa. A “educação” dos linfócitos T no timo é necessária para o processo da tolerância central. Esta é a base da teoria da

seleção clonal proposta em 1959 (Burnet 1959), segundo a qual todos os clones de linfócitos T auto-reativos seriam eliminados no timo, sendo liberados para a periferia apenas as células não reativas ao “próprio”.

Durante o processo de “educação” no timo, os timócitos passam por uma série de mudanças fenotípicas, incluindo a expressão de moléculas de superfície celular, dentre elas, os co-receptores CD4, CD8 e o CD3, que faz parte essencial do RCT. As moléculas CD4 e CD8 são co-expressas em uma fase de desenvolvimento dos linfócitos, no entanto, quando maduros, estes perdem a expressão de uma delas e passam a ser CD4+CD8- ou CD4-CD8+ (Ellmeier, Sawada 1999).

As células T CD4+, que reconhecem principalmente antígenos de origem exógena apresentados no contexto de moléculas MHC de classe II, podem se diferenciar em células T1 (produtoras de IL-2 e IFN- γ) ou T2 (produtoras de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) revisado em (Mosmann and Sad 1996, Abbas, Murphy 1996). Células T1, em geral, estão envolvidas em respostas inflamatórias, induzindo respostas celulares mediadas por macrófagos, mas também podem auxiliar linfócitos B a produzir anticorpos. As células T2, além de produzir citocinas com algumas atividades antagônicas às citocinas T1, estão envolvidas no direcionamento das respostas de células B, induzindo a mudança de isótipo de imunoglobulinas (para IgG, IgA ou IgE) (Abbas, Murphy *et al.*, 1996).

As células T CD8+, que reconhecem predominantemente antígenos endógenos, apresentados principalmente no contexto de moléculas MHC de classe I, são bem conhecidas por sua atividade citotóxica, e eliminação de células infectadas com patógenos intracelulares (York IA, 1996). Elas atuam

principalmente através da secreção de substâncias que causam morte celular, como perforinas e granzimas. No entanto, além da sua atividade lítica, as células CD8+ também são capazes de produzir citocinas, tanto do perfil T1 como T2 (Woodland and Dutton 2003), além de poderem atuar como células reguladoras (Filaci and Suci-Foca 2002).

Completada a maturação, os timócitos selecionados são liberados para a periferia, onde podem identificar e reconhecer complexos peptídeo:MHC na superfície de células alvo, através do seu RCT. A ligação do RCT com um complexo peptídeo:MHC deflagra a fosforilação de tirosinas na cauda citoplasmática da molécula CD3 (Sharpe and Freeman 2002), o que, dependendo da intensidade do sinal, pode levar à ativação transcricional de genes envolvidos na resposta imune, incluindo aqueles que estimulam e regulam as respostas de células T.

Se o linfócito T envolvido em tal reconhecimento for de memória, apenas o engajamento do RCT, como mencionado acima, é suficiente para desencadear uma resposta. No entanto, se tal linfócito for não sensibilizado, sua ativação completa só ocorrerá mediante a liberação de um coestímulo, sem o qual o linfócito torna-se anérgico (Berard and Tough 2002). Este coestímulo, antigamente referido como segundo sinal, é liberado pelo engajamento de moléculas coestimuladoras presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, "Antigen Presenting Cells"). As APCs são assim denominadas porque expressam moléculas MHC de classe II e moléculas coestimuladoras constitutivamente na sua membrana celular. Estas células compreendem as DC, os macrófagos e os linfócitos B. Note-se no entanto, que algumas outras células quando

ativadas, também podem atuar como apresentadoras, como por exemplo, células endoteliais, que expressam moléculas de MHC de classe II, induzidas por IFN- γ (Collins, Korman 1984).

Moléculas na superfície do linfócito T que se ligam a moléculas na superfície das APC para a liberação do segundo sinal incluem: **(i)** CD28, que se liga a CD80/CD86; **(ii)** CD40L, que se liga a CD40 e **(iii)** CD2, que se liga a CD58. A expressão dessas moléculas coestimuladoras nas APC é induzida tanto por citocinas inflamatórias, quanto por agentes infecciosos. Uma vez ativado, o linfócito desencadeia uma resposta dirigida ao antígeno que o ativou, porém esta resposta diminui à medida que o antígeno vai desaparecendo. Existem muitos mecanismos periféricos envolvidos no controle de tal resposta. Assim, o próprio linfócito apresenta mecanismos fisiológicos de auto-regulação. Por exemplo, após a ativação, linfócitos T expressam CTLA-4 (Antígeno 4 do linfócito T citotóxico, do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), que compete com a molécula CD28 pela ligação com o CD80/CD86 nas APCs, levando a um embargo na transcrição de IL-2 e posterior apoptose do linfócito T (Sharpe and Freeman 2002). Outro mecanismo de auto-regulação, é a expressão de Fas e FasL que induzem a morte do linfócito T por apoptose (revisado por Clark DA. 2005). Os mecanismos de regulação periférica da resposta imune incluem ainda a ação de citocinas, predominantemente antiinflamatórias, como o TGF- β e a IL-10 produzidas principalmente por células T reguladoras, e de IL-2, que em uma fase tardia de ativação auxilia na indução de apoptose de células T (revisado por Clark DA. 2005).

Dados do nosso laboratório (Granja 2000) corroboram outros existentes na literatura (Munk, Schoel 1989, Abulafia-Lapid, Elias 1999, Ramage, Young 1999) no sentido de mostrar a presença de células T auto-reativas no sistema imune de indivíduos sadios. Essas observações nos leva a pensar que tais linfócitos sejam silenciados por mecanismos reguladores na periferia. Estes mecanismos, já bem documentados na literatura, incluem: **(i)** ignorância imunológica, mecanismo pelo qual o linfócito não reconhece o antígeno por causa da existência de uma barreira física entre eles; **(ii)** deleção/anergia que ocorre quando os linfócitos auto-reativos encontram o antígeno na ausência de coestímulo e **(iv)** supressão, um processo ativo que envolve células com capacidade de regulação das respostas de outras células, revisado em Kamradt e Mitchison (Kamradt and Mitchison 2001).

O envolvimento de linfócitos T na supressão de uma resposta imunológica foi primeiramente relatado no fim dos anos 60, quando se observou que camundongos timectomizados desenvolviam auto-reatividade patológica órgão-específicas (Nishizuka and Sakakura 1969). Essas doenças auto-imunes podiam ser inibidas pela transferência de linfócitos T CD4+ de animais saudáveis, sugerindo um papel supressor dessas células sobre respostas patológicas dirigidas a antígenos próprios (Fowell, 1993, Taguchi, 1980; Tung, Smith 1987). Durante os anos 70, apesar das dificuldades encontradas para a determinação das características das células chamadas supressoras, mostrou-se a sua atividade antígeno-específica (Gershon and Kondo 1970).

Aprendeu-se de estudos realizados em modelos animais que existem várias população dessas células e desde então, têm-se tentado caracterizá-

las quanto ao fenótipo e quanto aos mecanismos utilizados por elas para a supressão das respostas de outras células. As populações de células fenotipicamente distintas apresentando atividade reguladora incluem: células $T\gamma\delta$ (Delves and Roitt 2000), células $CD8^+$ (Gilliet and Liu 2002), $CD8^+CD28^-$ (Ciubotariu, Colovai 1998), células NKT (Sonoda, Faunce 2001) e células $CD4^+$ (Taylor and Namba 2001).

Dentre estas populações celulares, as mais extensivamente estudadas têm sido as células $CD4^+$ que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25). Estas células, descritas por Sakaguchi (Sakaguchi, Sakaguchi 1995), não produzem IL-2 em resposta a um estímulo do seu RCT e expressam constitutivamente, dentre outras moléculas, CTLA-4 e TGF- β na sua membrana. Há dados experimentais mostrando que essas moléculas podem atuar sobre outras células T, inibindo suas atividades efectoras (Shevach 2000). Os trabalhos realizados por Sakaguchi levaram a uma retomada do conceito de regulação mediada por linfócitos T.

Uma série de trabalhos realizados com células $CD4^+CD25^+$ têm evidenciado um papel crítico para essa população celular na manutenção da tolerância imunológica. Assim, tem-se mostrado atividade reguladora dessas células em condições patológicas em animais experimentais: (i) inibindo diabetes auto-imune (Salomon, Lenschow 2000); (Stephens and Mason 2000) prevenindo doença inflamatória do intestino (Howarth, Xian 2000) e prevenindo a expansão de outras células T, in vivo (Annacker, Pimenta-Araujo 2001); (Murakami, Sakamoto 2002).

Apesar do progresso alcançado no tocante ao entendimento da imunobiologia das células reguladoras ainda existem muitas lacunas de conhecimento sobre tais células. Uma das grandes discussões ainda vigentes na literatura é a existência de especificidade antigênica nas células reguladoras. Apesar dos esforços realizados por diferentes grupos de pesquisa nesse sentido, pouco progresso foi alcançado na identificação de alvos antigênicos reconhecidos por células reguladoras CD4+CD25+. Os estudos desenvolvidos com o objetivo de elucidar tais antígenos, realizados em modelos experimentais de auto-imunidade órgão-específica, sugerem que as células T reguladoras reconhecem antígenos derivados do órgão que está sob ataque imunológico (Taguchi and Nishizuka 1987); (Taguchi, Kontani 1994); (Smith, Lou 1992). Dados resultantes de uma série de trabalhos sugerem que o “encontro” do sistema imune com antígenos órgão-específicos é necessário para a manutenção da tolerância a antígenos específicos daquele órgão. Assim, ratos fetais cuja glândula tireóide é destruída por irradiação desenvolvem tireoidite na idade adulta, mesmo quando implantados com tireóide de rato singenéticos adultos saudáveis (McCullagh 1996). Embora dados recentes apontem para a existência de tal especificidade, dirigida a auto-antígenos (Shevach 2000), essas células também parecem apresentar mecanismos de reconhecimento não específicos. Recentemente, foi relatada a existência de TLR 4, 5, 7 e 8 na membrana de células T reguladoras em camundongos (Caramalho, Lopes-Carvalho 2003). Além disso, células T CD4+CD25+ humanas expressam (Zanin-Zhorov, Cahalon 2006). Assim, pelo menos para essa subpopulação

de linfócitos T, o reconhecimento parece apoiar-se também em elementos da imunidade inata.

Ainda não se conhece um marcador fenotípico exclusivo das células reguladoras naturais CD4+CD25+. Sabe-se que estas expressam constitutivamente a molécula CD25 na membrana. No entanto, porque o CD25 é expresso em células T CD4+ efectoras recentemente ativadas, o uso dessa molécula é limitado como marcador de célula T CD4+CD25+ reguladora. Uma molécula candidata a marcador de células CD4+CD25+ recentemente descrita é o fator de transcrição Foxp3 (do inglês, “Forkhead box protein P3”). Esta molécula, que é codificada no cromossomo X, foi primeiramente descrita em trabalhos com camundongos “*scurf*”. Esses camundongos apresentam linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia e infiltrados de linfócitos T na pele e fígado. Foi mostrado que esse fenótipo, característico de doença auto-imune resulta de uma mutações no gene FoxP3 (Lyon, Peters 1990); (Clark, Appleby 1999). Essa mutação parece levar a uma ineficiência do sistema imune em regular negativamente a atividade proliferativa de linfócitos T, levando à quebra de tolerância imunológica ao próprio. Uma série de experimentos elegantes mostrou que Foxp3, um fator de transcrição gênica da proteína escurfina, é predominantemente expresso por células CD4+CD25+ (Khattari, Cox 2003, Fontenot, Gavin 2003) com capacidade de inibir respostas linfoproliferativas e produção de citocinas por outras células T CD4+ convencionais (Suri-Payer, Amar 1998). Além disso, a expressão desse fator de transcrição parece ser essencial para o desenvolvimento de células T reguladoras. De fato Hori et al mostraram que a infecção de células CD4+CD25- com um

retrovírus codificando para Foxp3 era suficiente para converter as células CD4+CD25⁻ em células com fenótipo regulador capazes de inibir as respostas linfoproliferativas de outras células efectoras (Hori, Nomura 2003)

A identificação de Foxp3 em camundongos *scurf* levou à investigação do envolvimento desse gene em uma síndrome humana semelhante àquela observada nos camundongos. A síndrome humana conhecida como IPEX (do inglês, *immune/dysfunction/ polyendocrinopathy/enteropathy/X-linked*) também parece resultar de uma mutação do Foxp3 ou de algum fator que interage com essa molécula revisado em (Ziegler 2007).

Ao contrário do que ocorre nas células reguladoras CD4+CD25⁺ de camundongos, nas células reguladoras CD4+CD25⁺ humanas são encontradas duas isoformas da proteína Foxp3 originadas a partir do mesmo mRNA por processamento alternativo (Kasprowicz, Smallwood 2003). Uma isoforma apresenta uma deleção do exon 2 do mRNA, enquanto a segunda, considerada a o ortólogo humano do Foxp3 murino (Allan, Passerini 2005) não apresenta qualquer deleção. As implicações da expressão dessas duas isoformas de Foxp3 em células T reguladoras humanas ainda não foram esclarecidas e estão atualmente sob investigação.

Usando Foxp3 como um marcador para células reguladoras alguns pesquisadores têm mostrado que células T CD4+CD25⁻ são passíveis de conversão em células reguladoras CD4+CD25⁺ e que a circunstância em que ocorre a estimulação dos linfócitos T pode exercer papel fundamental nesse processo (Walker, Carson 2005). Visto dessa perspectiva é possível que a auto-reatividade a antígenos próprios seja uma característica fisiológica para a manutenção da homeostase.

1.2 Auto-imunidade fisiológica

O sistema imune é capaz de responder a antígenos estranhos e ao mesmo tempo desenvolver tolerância às células do próprio organismo, a despeito da constante exposição a antígenos próprios. Essa característica do sistema imune tem levado os imunologistas a discutir o conceito da discriminação imunológica entre o próprio e o não próprio. Há quem discuta que a “função” do sistema imune não seja discriminar o próprio/não próprio, e sim reconhecer sinais de perigo (Matzinger 1994). No entanto, esta hipótese ainda é objeto de muita discussão na imunologia. Por outro lado, uma série de observações feitas por diferentes grupos de pesquisa aponta para um papel fisiológico da auto-reatividade (Cohen 2000); revisado por (Coutinho, Hori 2001). Este é o caso da teoria do homúnculo imunológico, proposta por Irun Cohen (Cohen and Young 1991), que discute a organização do sistema imune e a manutenção da homeostase com base na auto-imunidade fisiológica. De acordo com esta teoria, o sistema imune reconheceria a imagem interna do organismo, pela exposição dos seus antígenos, tanto no timo quanto na periferia, sendo esse reconhecimento fundamental para manutenção da homeostase. A alteração em um dado auto-antígeno (ou no contexto da sua apresentação) ao longo da vida poderia funcionar como um alarme de perigo e poderia desencadear uma resposta imune inflamatória e auto- agressividade tecidual. Sob esta ótica, a contextualização do antígeno teria um papel fundamental no desfecho da resposta imune. Assim, dentro da visão de auto-imunidade fisiológica, é possível que células T auto-reativas, naturalmente ativadas, possam ser também mediadoras de respostas protetoras contra auto-imunidade

patológica, e que possam regular reações inflamatórias, diminuindo danos imunopatológicos decorrentes de respostas imunes efectoras.

Ainda dentro desta hipótese, o repertório de linfócitos envolvidos na auto-imunidade fisiológica estaria dirigido a três classes principais de antígenos homunculares: moléculas do sistema imune, moléculas de manutenção e moléculas tecido-específicas (Cohen 2000). Dentre estas, as moléculas de manutenção são as que têm sido melhor estudadas, e algumas delas estão envolvidas em uma série de processos de homeostase intracelular. Este é o caso das proteínas de choque térmico (HSP, do inglês “Heat shock proteins”), que vêm sendo cada vez mais estudadas tanto em modelos de auto-imunidade fisiológica como em modelos de auto-imunidade patológica, como doenças auto-imunes e transplante.

No nosso laboratório, temos trabalhado com uma dessas proteínas, a Hsp60, e vislumbramos a possibilidade de auto-imunidade fisiológica ser utilizada para a manipulação da resposta inflamatória no contexto de transplante e mesmo de doenças auto-imunes. No contexto do transplante mostramos que o peptídeo p277, derivado da Hsp60 é capaz de prolongar a sobrevida de enxerto de pelo no modelo murino e (Ernesto Luna, Edilberto Postol et al., 2007, *no prelo*). No contexto do transplante renal humano o nosso grupo mostrou que populações de células T periféricas e infiltrantes do enxerto produzem IL-10 em resposta ao estímulo com Hsp60 *in vitro*, sugerindo um papel regulador para a Hsp60 no transplante (Caldas, Luna 2006).

1.3 Proteínas de Choque Térmico

As HSP são moléculas filogeneticamente conservadas presentes em todos os organismos (procariotos e eucariotos) e representam de 1% - 5% de todas as proteínas do compartimento intracelular (Csermely 2001). Estas proteínas podem ser classificadas em diferentes famílias, de acordo com seu peso molecular aproximado em kDa: Hsp110, Hsp90, Hsp70, HSP60 e um complexo grupo com peso entre 15 e 30 kDa, designadas como HSPs de baixo peso molecular (Srivastava 2002). Embora as HSPs estejam constitutivamente expressas nas células em condições fisiológicas, uma das característica dessas proteínas é o aumento da sua expressão em situações de estresse celular (Srivastava 2002).

O aumento da expressão das HSPs em situações de estresse está relacionado à “função” de chaperonas que elas realizam no organismo. Essas moléculas são capazes de se ligar não covalentemente a sítios hidrofóbicos presentes em polipetídeos e impedir o dano celular letal que o estresse pode ocasionar, de duas maneiras: **(i)** auxiliando na resistência à desnaturação protéica e no dobramento e transporte de proteínas intracelulares (Hsp40, Hsp60 e Hsp90) (Feder and Hofmann 1999); **(ii)** marcando e direcionando proteínas anormais para degradação (ubiquitina, Hsp104) pelo proteassoma (Csermely 2001).

O papel fisiológico essencial realizado pelas HSPs pode explicar a conservação evolutiva observada para essas proteínas. Tal conservação, no entanto, aliada ao aumento da sua expressão durante o estresse celular, torna as HSPs moléculas importantes para o reconhecimento pelo sistema imunológico.

Os estudos sobre as funções imunológicas das HSPs ganharam maior destaque na década de 80, com a verificação de que HSPs purificadas de tumores continham peptídeos derivados de antígenos tumorais (Srivastava and Das 1984). Essas funções tornaram-se mais evidentes com a descoberta de que complexos HSP/peptídeos eram capazes de desencadear respostas por linfócitos T, tanto CD4+ (Roman and Moreno 1997) quanto CD8+ (Blachere, Li 1997). Ademais, peptídeos derivados das próprias HSPs foram encontrados no repertório de peptídeos eluídos de moléculas de MHC, e podem ser apresentados a linfócitos T e desencadear uma resposta imune adaptativa (de Kleer, Vastert 2006).

Além de participar na resposta imune adaptativa, essas proteínas também são capazes de ativar a resposta imune inata, sendo algumas HSPs capazes de se ligar às moléculas CD91, CD14 e TLRs (Srivastava 2002). A ligação desses receptores parece atuar como um “sinal de perigo” para o sistema imune, deflagrando a liberação de mediadores pró-inflamatórios como descrito para a Hsp60 humana e a Hsp65 de bactérias (Kol, Lichtman 2000); (Chen, Syldath 1999). É interessante notar que a maioria desses receptores estão presentes em APCs, notadamente nas células dendríticas, que apresentam um papel fundamental nas respostas imunológicas tanto inata como adaptativa (Takeda, Kaisho 2003). Assim, podemos dizer que, a exemplo do que ocorre com os macrófagos e com o sistema do complemento, tanto as HSPs quanto as células dendríticas funcionam como uma ponte entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

A atividade funcional das HSPs na resposta imune tem sido objeto de inúmeras investigações. Há relatos de que elas podem induzir tanto

respostas inflamatórias quanto antiinflamatórias (Pockley 2003). A Hsp60 tem sido uma das mais estudadas em diversas condições inflamatórias patológicas e muitos trabalhos têm implicado a imunidade a esta proteína na patogênese de doenças auto-imunes, tanto em modelos animais de artrite (van Eden, van der Zee 1998) e diabetes, em camundongos NOD (Chen, Galy 1997), quanto em humanos (Abulafia-Lapid, Elias 1999). Em alguns modelos experimentais, a injeção de peptídeos derivados da Hsp65 bacteriana (seqüência 180-188) é capaz de induzir linfócitos T patogênicos capazes de transferir artrite para um animal sadio não imunizado (van Eden, van der Zee 1998). Talvez, parte desta atividade inflamatória induzida pela HSP seja o resultado da reação cruzada entre Hsp60 autóloga e membros da família Hsp65 bacterianas, sabidamente imunogênicas e imunodominantes (Chien, Chen 1999).

A participação de imunidade à Hsp60 também tem sido sugerida no contexto de transplante, uma vez que um aumento da sua expressão foi encontrada em aloenxertos renais rejeitados em humanos (Trieb, Dirnhof 2001) e parte dos linfócitos infiltrantes do enxerto durante a rejeição têm reatividade à Hsp65 (Molitero, Woan 1995). No entanto, a atividade funcional dessas células não foi determinada, nesses trabalhos.

Dados do nosso laboratório apontam para uma dupla participação de HSP no contexto do transplante renal humano. O estudo seqüencial da resposta celular às Hsp60 e 70 humanas mostrou uma associação entre a resposta proliferativa dirigida à Hsp60 no período pré-transplante e rejeição, enquanto que a produção de IL-4 induzida pela Hsp60 estava associada com ausência de rejeição. Esses dados sugerem a coexistência de

populações auto-reativas à Hsp60 inflamatórias e outras potencialmente reguladoras (Granja, Moliterno 2004).

Em concordância com esses achados, reforçando o potencial papel da Hsp60 na manutenção da homeostase, na regulação da resposta inflamatória e mesmo na indução de tolerância, podemos citar os seguintes dados. Indivíduos sadios têm auto-anticorpos assim como linfócitos T reativos à Hsp60, sugerindo que esta auto-reatividade possa contribuir para a manutenção da homeostase (Pockley 2003) (Ernesto Luna, Edilberto Postol et al., 2007, *no prelo*). As imunizações com uma vacina de DNA-Hsp60, assim como com um peptídeo derivado da região C-terminal da Hsp60 (p277, sequência 437-460) foram capazes de induzir tolerância em modelo de diabetes experimental em camundongos NOD (Cohen 2002, Quintana, Carmi 2002); e em modelos experimental de artrite (Santos-Junior, Sartori 2005). Em humanos, este peptídeo (p277) foi também utilizado em um ensaio clínico de fase II em pacientes diabéticos tipo I (auto-imune), diminuindo a necessidade de administração de insulina, em tais pacientes (Elias, Avron 2006, Raz, Elias 2001).

Há dados na literatura sugerindo que as diferentes regiões da Hsp60 possam induzir respostas imunes com atividades funcionais distintas, e que algumas dessas regiões possam estimular células T com atividade reguladora (Moudgil, Chang 1997).

A Hsp60 pode exercer seus efeitos ou por ligação direta a receptores de superfície celular (TLR4, TLR2) ou por serem apresentadas para o reconhecimento por linfócitos T, no contexto de moléculas MHC. A ligação direta da Hsp60 a receptores TLR2 expressos por linfócitos T reguladores foi

mostrada, recentemente, pelo grupo do Irun Cohen (Zanin-Zhorov, Cahalon 2006). Nesse trabalho, o tratamento de células T reguladoras com baixas doses de Hsp60 foi capaz de inibir a proliferação celular e a produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T CD4+CD25- e por linfócitos T CD8+. A inibição das respostas dos linfócitos efetores parece ter sido mediada pela secreção das citocinas IL-10 e TGF- β pelas células T reguladoras tratadas com Hsp60.

É possível que a Hsp60 exerça efeitos reguladores semelhantes sobre outras células do sistema imune. Nesse sentido, as células dendríticas, células profissionais na apresentação de antígeno, podem desempenhar um papel fundamental. É possível que nessas células o efeito regulador da Hsp60 possa ser desencadeado na própria dendrítica (via ligação de TLR), nos linfócitos T, pela apresentação de peptídeos derivado da Hsp60 pelas células dendríticas ou ainda por ambos os mecanismos.

1.4 Células dendríticas

As células dendríticas (DC, do inglês *Dendritic Cells*) são células profissionais na apresentação de antígenos que desempenham papel fundamental no início da resposta imune dependente de linfócitos T. Essas células, descritas pela primeira vez em 1973 (Steinman and Cohn 1973), são uma população celular rara, porém heterogênea, que juntamente com monócitos, macrófagos e neutrófilos constituem as células fagocíticas do sistema imunológico.

As DC apresentam uma grande plasticidade funcional que parece depender da sua origem, do seu estado de maturação e da natureza do estímulo sob o qual se encontra.

1.4.1 Origem das Células Dendríticas

Existem diferentes linhagens de DC. Estas, originam-se de precursores derivados de células tronco hematopoiéticas CD34+ da medula óssea (Ardavin, Martinez del Hoyo 2001); (Banchereau, Briere 2000); (Pulendran, Lingappa 1997), circulantes no sangue. As células CD34+ diferenciam-se na medula óssea em dois progenitores: progenitores mielóides comuns e progenitores linfóides comuns. Estes, posteriormente dão origem a precursores que finalmente se diferenciam em células dendríticas.

A origem das células dendríticas a partir de progenitores linfóides ainda é assunto de bastante discussão na imunologia. Sabe-se que o progenitor linfóide com capacidade de diferenciação em célula dendrítica em humanos apresenta o fenótipo CD34+ Lin- CD10+. Essas células expressam a cadeia α do receptor de IL-7 (CD123), TdT (deoxinucleotidil transferase terminal, do inglês "terminal deoxynucleotidyltransferase"), RAG-1 (gene 1 de ativação de recombinação, do inglês "recombination-activating gene 1) e os fatores de transcrição Pax5 e Ikaros. Essas moléculas são também marcadores presentes no primeiro precursor de células B humanas na medula óssea (Galy, Christopherson 2000, Ryan, Nuccie 1997). Por esse motivo, as DC diferenciadas a partir desses precursores têm sido chamadas células dendríticas plasmacitóides. Pôde-se mostrar através da análise de

diluição limitante que clones únicos do precursor CD34⁺ Lin⁻ CD10⁺ podem gerar células B, células NK e células dendríticas (Galy, Travis 1995). Embora o local de desenvolvimento ou diferenciação das DCs linfóides, *in vivo*, ainda não tenha sido elucidado, especula-se que elas possam se desenvolver em órgãos linfóides tais como o timo, onde já foram descritos progenitores celulares com o duplo potencial de diferenciação linfócito/DC (Ardavin, Wu 1993). Os progenitores linfóides dão origem a células CD4⁺ CD11c⁻ precursoras de células dendríticas com estrutura plasmacitóide e produtoras de IFN do tipo II. Estas são semelhantes em estrutura e função a uma população de células dendríticas imaturas murinas com fenótipo Ly6C/GR-1⁺, B220⁺, CD11c^{low}, CD4⁺ (Kadowaki 2003, Kadowaki, Ho 2001); (Nakano, Yanagita 2001). As células dendríticas plasmacitóides parecem ser especializadas na resposta a antígenos de origem endógena pois expressam TLR9 e TLR7.

1.4.2. Células dendríticas mielóides

Em humanos, os progenitores mielóides comuns dão origem a dois tipos de DC imaturas (CD11c⁺CD14⁺ e CD11c⁺CD14⁻) e pelo menos um precursor de DC: os monócitos.

Em estudos *in vitro* com células CD34⁺ humanas foi mostrada a existência de dois subconjuntos de precursores de DC. Estes podem ser distinguidos exclusivamente com base na expressão dos marcadores de superfície celular CD1a e CD14 (Caux, Vanbervliet 1996). Os precursores CD1a⁺ dão origem a DC com as mesmas características fenotípicas (com antígeno Lag, E-caderina e grânulos de Birbeck) de um grupo de células

presentes na pele, denominadas células de Langerhans (LC). Em contrapartida, os precursores CD14⁺ diferenciam-se em DC CD1a⁺ que expressam CD2, CD9, CD68 e o fator de coagulação XIIIa (presente em DC dérmicas), mas não os antígenos característicos de LC (Canque, Camus 1998). A diferenciação em um ou outro precursor parece estar associada à expressão da molécula CLA (Antígeno Associado a Linfócito Cutâneo, do inglês, "Cutaneous-lymphocyte-associated antigen") na célula CD34⁺. De fato, células CD34⁺CLA⁺ tratadas com GM-CSF e TNF α diferenciam-se em LC. Células CD34⁺CLA⁻ tratadas com as mesmas citocinas, nas mesmas condições, diferenciam-se em DC CD1a⁺ carentes de antígenos característicos de LC (Strunk, Egger 1997).

Tanto as DC derivadas de precursores CD14⁺ quanto aquelas derivadas de precursores CD1a⁺ são potentes estimuladoras de células T com fenótipo *naïve* (Caux, Massacrier 1997). No entanto, DC derivadas de precursores CD14⁺ são 10 vezes mais eficientes na captura de antígenos do que as DC derivadas de precursores CD1a⁺. Essa alta eficiência na captura de antígenos pelas DC derivadas de precursores CD14⁺ é corregulada com o aumento da atividade esterase específica nessas células. Ao contrário das DC derivadas de precursores CD14⁺, as DC derivadas de precursores CD1a⁺ não expressam qualquer atividade esterase específica. Funcionalmente, as DC derivadas de precursores CD14⁺ assemelham-se às DC dos centros germinativos (Grouard, Durand 1996) dos órgãos linfóides secundários. Essas células são capazes de estimular a proliferação de células B e induzir a mudança de isotipo de imunoglobulina de IgM para IgG1, de maneira independente de IL-10 (Dubois, Barthelemy 1999).

O processo de diferenciação de DC humanas é complexo e firmemente regulado por citocinas. Dentre as citocinas envolvidas na regulação positiva da diferenciação de DC humanas a partir de precursores CD34+, destaca-se o Fator Estimulador de Colônia de Granulócito e Macrófago (GM-CSF, do inglês, “Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating factor”) (Reid, Stackpoole 1992). Em contraste, o Fator Estimulador de Colônia de Macrófago (M-CSF, do inglês, “Macrophage-Colony-stimulating factor”) e a IL-6, sozinhos ou em sinergismo, podem bloquear o efeito do GM-CSF e desviar a diferenciação das células CD34+ de DC para monócitos/macrófagos. A produção dessas citocinas pode constituir-se em uma estratégia empregada por células tumorais na supressão da diferenciação de DC (Menetrier-Caux, Montmain 1998).

Em 1986 foram descritos monócitos que apresentavam características morfológicas de DC (Knight, Farrant 1986). Este fato levou à especulação de que os monócitos circulantes do sangue poderiam se diferenciar em DC. Quase uma década depois mostrou-se que era possível induzir a expressão da molécula CD1a em monócitos humanos pelo tratamento dos mesmos com GM-CSF mais IL-4 (Porcelli, Morita 1992) ou com GM-CSF apenas (Kasinerker, Baumruker 1993). Hoje se sabe que é possível diferenciar células dendríticas a partir de monócitos, *in vitro*, pelo tratamento com GM-CSF e IL-4.

1.4.3 Células dendríticas e polarização da resposta imune

As células dendríticas apresentam pelo menos dois estágios de maturação: imaturo e maduro. As DC imaturas são encontradas

principalmente em tecidos não linfóides e são caracterizadas pela baixa expressão das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD58 e pela alta capacidade de endocitose (Flores-Romo 2001). Além disso, essas células expressam moléculas de MHC de classe II dentro do compartimento intracitoplasmático, e não expressam a glicoproteína de membrana marcadora de maturação de células dendríticas CD83 (Sallusto and Lanzavecchia 1994). O CD83 é uma molécula de adesão celular que se liga a receptores expressos na superfície de monócitos (Scholler, Hayden-Ledbetter 2001) e que está aumentado na superfície de células dendríticas maduras.

O alto potencial endocítico das DC imaturas é conferido por uma série de receptores se superfície celular que permitem a ligação e a internalização de uma variedade de antígenos incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos e nucleotídeos. A ligação desses antígenos, bem como de algumas citocinas inflamatórias podem ativar vias de sinalização intracelulares que culminam na maturação da DC (Viney 2001). Durante a maturação, estas células mobilizam-se dos tecidos não linfóides para os órgãos linfóides secundários através dos vasos linfáticos aferentes. Essa migração é acompanhada por mudanças fenotípicas e morfológicas que incluem: (I) reorganização do citoesqueleto, (II) formação de dendritos, (III) translocação das moléculas de MHC de classe II das vesículas intracelulares para a superfície da célula (apresentação de antígeno), (IV) aumento da expressão de moléculas coestimuladoras e receptores de quimiocinas, (V) secreção de determinadas quimiocinas e citocinas (Guermonprez, Valladeau 2002), (Banchereau and Steinman 1998); (Romani, Koide 1989); (Inaba, Schuler 1986). Uma vez no

órgão linfóide, as DC migram para as áreas ricas em células T, onde são maximizadas as chances de interações DC – LT. Dependendo dos sinais coestimulatórios e das citocinas envolvidas no contexto da apresentação do antígeno pelas DC, as respostas dos linfócitos T CD4 podem polarizar para um perfil T1 e/ou T2 (Maldonado-Lopez, Maliszewski 2001). Os linfócitos assim ativados deixam o órgão linfóide e migram para o tecido inflamado, onde desenvolvem suas funções.

Até bem pouco tempo acreditava-se que a polarização da resposta imune induzida pelas DC fosse uma função do seu estágio de maturação, onde DC maduras induziriam respostas pró-inflamatórias e DC imaturas induziriam respostas não-inflamatórias. À luz dos conhecimentos atuais, no entanto, esse paradigma parece ser simples demais para explicar a grande versatilidade das DC na manutenção da homeostase imune (Wallet, Sen 2005). De fato, pelo menos 3 outras variáveis parecem ter influência sobre a natureza da resposta dos linfócitos T, desencadeada pelas DC: o subtipo de DC; a natureza do antígeno apresentado e o microambiente de citocinas. Todos esses fatores podem agir independentemente ou em sinergismo e induzir a ativação de fatores de transcrição que direcionam as respostas para o tipo T2 (como o fator de transcrição GATA3) ou para uma resposta do tipo T1 (como o fator de transcrição T-bet).

O envolvimento de diferentes subtipos de DC na polarização da resposta de LT foi descrito em pelo menos três estudos diferentes realizados em camundongos (Iwasaki and Kelsall 2001);(Pulendran, Smith 1999); (Maldonado-Lopez, De Smedt 1999). Em todos esses estudo mostrou-se uma dicotomia na polarização das respostas dos LT pelas DC, com as DC

CD8 α ⁺ induzindo as citocinas pró-inflamatórias IL-2 e INF γ e as DC CD8 α ⁻ induzindo as citocinas reguladoras IL-4 e IL-10.

Porque as DC são reguladas por citocinas e porque estas são liberadas principalmente por células do sistema imunológico em resposta a um determinado estímulo, a natureza do antígeno alvo da resposta imune pode ter influência direta sobre as DC (Vieira, de Jong 2000). Experimentos com DCs frente a células necróticas e apoptóticas mostraram que somente as células necróticas são capazes de induzir maturação das DCs (Sauter, Albert 2000). A falta de uma resposta ativa contra antígenos derivados de células apoptóticas, foi interpretada como uma potencial atividade tolerogênica e, um provável mecanismo de indução de tolerância periférica (Steinman, Turley 2000).

As células dendríticas em diferentes estágios de maturação parecem diferir não só quanto a expressão de moléculas HLA e coestimuladoras, mas também quanto ao perfil de citocinas que secretam. Células dendríticas imaturas parecem não secretar IL-12 enquanto as células dendríticas maduras parecem produzir altos níveis de IL-12, de TNF α e não produzem IL-10, caracterizando um perfil inflamatório. Células dendríticas em estágio de maturação intermediário (semi maduras) expressam um perfil de citocinas basicamente anti-inflamatório (IL-12⁻, TN α , IL-10⁺) intermediário (Rutella and Lemoli 2004).

1.4.4 Células dendríticas tolerogênicas

Os avanços alcançados nos últimos anos no entendimento da imunobiologia das DC têm colocado em evidência o papel que estas células realizam na prevenção de auto-imunidade ou tolerização de células T auto-imunes já existentes. Existem dados na literatura mostrando que as células dendríticas podem exercer sua atividade tolerogênica, através de diversos mecanismos não excludentes. Um de tais mecanismos é a indução de apoptose de células T, por DCs CD8 α ⁺ murinas expressando FasL (Suss and Shortman 1996). Um outro mecanismo seria a indução de anergia de células T, observada em experimentos nos quais DCs imaturas secretoras de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 são capazes de anergizar células T (Steinbrink, Jonuleit 1999); (Enk, Angeloni 1993). Um terceiro mecanismo ainda descrito é a indução e manutenção de células T reguladoras. Nesse sentido, em trabalhos publicados nos últimos anos é sugerido um papel relevante para as DCs na indução de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ reguladores. Foi mostrado que, em humanos, DC alogeneicas imaturas podem induzir populações de células T CD4⁺ com propriedades imunorreguladoras *in vitro*, a partir de repetidas estimulações de células T virgens (Jonuleit, Schmitt 2000); (Rea, Laface 2004). Foi mostrado em camundongos transgênicos cujo TCR reconhece um peptídeo de OVA (ovalbumina), que DCs estimuladas com esse antígeno induzem o crescimento de células T CD4⁺CD25⁺ em cultura, e que tais células expandidas, podem suprimir respostas efectoras de células CD4⁺CD25⁻ (Yamazaki, Iyoda 2003). Ademais, níveis basais de CD80/CD86, presentes nas APC, mantêm uma população de células T CD4⁺CD25⁺ capazes de

regular as respostas de células T efectoras (Lohr, Knoechel 2003). Mais recentemente, Muriel Moser (Moser 2003) lançou a hipótese de que DCs, em diferentes estágios de maturação, atuarem sobre diferentes tipos de células reguladoras. Para a pesquisadora, o repertório de células T estaria sob controle de DCs em três pontos de controle: DCs no timo (tolerância central), DCs imaturas na periferia através de Tr1, e DCs imaturas na periferia através de células CD4+CD25+.

1.4.5 Células dendríticas e terapia celular

O potencial terapêutico das células DC tem sido explorado em vários modelos de doenças auto-imunes, em condições patológicas como AIDS (Kundu, Engleman 1998) e câncer (Banchereau, Briere 2000) e ainda em protocolos de indução de tolerância a alotransplante.

No tangente à imunoterapia do câncer, há vários estudos em fase I e II em que um número significativo de pacientes imunizados com DC, estimuladas com antígenos tumorais, apresenta uma clara regressão do tumor (Small, Fratesi 2000); (Timmerman, Czerwinski 2002). No Brasil o grupo liderado pelo professor José Alexandre M Barbuto tem mostrado que a vacinação com um híbrido de células dendríticas alogênicas derivadas de monócitos e células tumorais induz a recuperação da função de células dendríticas em pacientes com melanoma ou carcinoma renal metastáticos (Barbuto, Ensina 2004). Neste estudo, 71% dos pacientes apresentaram estabilidade do tumor até 19 meses. No contexto de doenças auto-imunes foi mostrado que a injeção subcutânea de DC isoladas de linfonodos em dreno do pâncreas podia conferir proteção a diabetes tipo I em

camundongos NOD (Clare-Salzler, Brooks 1992). Mais tarde, verificou-se que DC derivadas da medula óssea realizavam um papel fundamental em tal processo (Feili-Hariri, Dong 1999), e que a proteção mediada por DC era o resultado da indução de uma resposta do tipo T2 (Papaccio, Nicoletti 2000).

O valor terapêutico de DC tem sido mostrado em outras doenças auto-imunes em modelos experimentais, mas não em humanos. Estas doenças incluem: **(i)** Encefalomielite auto-imune experimental (EAE do inglês, “Experimental autoimmune encephalomyelitis”) onde a injeção subcutânea de DC derivadas da medula óssea, tratadas com TGF- β 2 e estimuladas com antígenos da mielina, induziu células T CD8+ reguladoras e supressão da EAE em camundongos (Faunce, Terajewicz 2004); **(ii)** EMG (do inglês, “Experimental myasthenia gravis”), em que a injeção subcutânea de DC tratadas com TGF- β confere proteção contra a doença em ratos Lewis, quando desafiados com o receptor de acetilcolina (Yarilin, Duan 2002); **(iii)** na tireoidite auto-imune experimental (EAT, do inglês, “Experimental autoimmune thyroiditis”) onde a transferência passiva de células T CD4+CD25+ secretoras de IL-10 expandidas na presença de DC estimuladas com o antígeno TG (tireoglobulina), foi capaz de suprimir a doença em animais previamente desafiados com o mesmo antígeno (Verginis, Li 2005).

Da mesma forma que para as doenças auto-imunes, o potencial tolerogênico das DC pode ser uma ferramenta poderosa para o tratamento de rejeição do enxerto no transplante de órgãos.

No contexto do transplante, têm-se explorado as seguintes propriedades das DC: **(i)** estágio de maturação da célula, onde se tem

mostrado um prolongamento na sobrevida de aloenxertos cardíacos por mais que 100 dias pela administração endovenosa de DC imaturas em camundongos CBA (Lutz, Suri 2000); **(ii)** potencial para indução de resposta T2, com DC produtoras de IL-10, mas não de IL-12, derivadas do doador, capazes de induzir tolerância a aloenxertos cardíacos em camundongos (Gao, Madrenas 1999); **(iii)** diferentes subtipos de DC, com DC CD8 α + facilitando a pega de células tronco purificadas, em transplante de medula óssea em camundongos (Gandy, Domen 1999); **(iv)** DC estimuladas com antígenos, onde se mostrou, em ratos, que a injeção de DC tímicas estimuladas com peptídeos derivados de moléculas MHC de classe I do doador, sete dias antes do transplante cardíaco ou de ilhotas, levava a uma sobrevida permanente dos mesmos (Ali, Garrovillo 2000). Mais recentemente, foi relatado que DC diferenciadas com GM-CSF, IL-10 e TGF- β são capazes de induzir populações mistas de células T CD25+ e produtoras de IL-10 tanto capazes de induzir doença do enxerto contra leucemia (GVHL) como de impedir a doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) em camundongos (Sato, Yamashita 2003).

Os mecanismos precisos pelos quais as DC levam à tolerância no contexto da auto-reatividade patológica e da rejeição de alotransplante ainda são objeto de intensa investigação. No entanto, à luz dos conhecimentos atuais, acredita-se que um dos possíveis mecanismos envolvidos seja a indução de células reguladoras.

Um dos principais desafios nos últimos anos tem sido a identificação de fatores necessários para a diferenciação e expansão de células reguladoras. A identificação de tais fatores é um pré-requisito necessário

para o desenvolvimento de estratégias de terapia celular para doenças auto-imunes, alergias e rejeição do transplante. Apesar de ter sido mostrado que DC tolerogênicas tratadas com vitamina D (3) podem aumentar as respostas de células reguladoras em camundongos NOD, muito ainda se tem a aprender a respeito dos mecanismos pelos quais isso ocorre (Adorini 2003). Embora diferentes dados da literatura apontem a IL-10 como um fator necessário para a indução de DC tolerogênicas *in vivo*, é possível que outros fatores tolerogênicos expressos nas DC possam estar envolvidos na indução de células T reguladoras.

Nesse contexto, considerando o potencial papel das DCs na indução e manutenção das respostas imunológicas, assim como a atividade reguladora da Hsp60, levantamos como hipótese no presente trabalho, que células dendríticas imaturas, estimuladas com o auto-antígeno potencialmente tolerogênico, Hsp60, poderiam atuar sinergicamente na indução de uma resposta imune reguladora, no sistema humano. Baseados nas informações acima mencionadas exploramos o potencial das DCs e da Hsp60 no direcionamento da resposta imune com vistas à manipulação dessa resposta para um contexto imunorregulador.

2. Objetivos

2.1 Geral

verificar se a interação das células dendríticas com antígenos da Hsp60 induz um efeito sinérgico no direcionamento de uma resposta imune reguladora, no sistema humano, visando a identificação de antígenos com atividade imunorreguladora.

2.2 Específicos

1. Determinar diferenças imunofenotípicas e funcionais de DC maduras e imaturas, assim como a estabilidade do fenótipo imaturo das DC geradas na presença de IL-10.
2. Analisar o efeito direto de antígenos da Hsp60 na produção de citocinas pelas DC maduras e imaturas.
3. Determinar a produção de citocinas e resposta proliferativa induzidas na auto-reatividade de linfócitos T a antígenos da Hsp60, em coculturas de com DC maduras e imaturas.
4. Determinar o perfil molecular de mRNA em linfócitos T de moléculas envolvidas em imunorregulação (FOXP3, GATA3, TGF β , IL-10,) e de outras envolvidas em resposta imune pró-inflamatória (T-bet, IFN- γ , TNF- α) induzidas na auto-reatividade a antígenos da Hsp60 em cocultura de LT com DC maduras e imaturas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos do estudo

Este estudo foi realizado com células de 16 indivíduos adultos sadios de ambos os sexos masculino e feminino. Fizemos a coleta de 500 ml de sangue desses indivíduos mediante a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo de pesquisa do presente trabalho (Nº 165/04) foi apreciado e aprovado pelo CAPEPesq (Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa) do Hospital das Clínicas – FMUSP, na sessão de 25/03/2004.

3.2 Delineamento Experimental

Na Figura 1 mostramos o nosso delineamento experimental

Figura 1. Visão geral das etapas realizadas no presente trabalho. Células dendríticas maduras (mDC), imaturas (iDC) e imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), diferenciadas a partir de monócitos de voluntários saudáveis, foram estimuladas com antígenos da Hsp60 e analisadas quanto a produção de citocinas. Células dendríticas não estimuladas e estimuladas com antígenos da Hsp60 foram cultivadas com linfócitos T e a auto reatividade destes foi medida pela proliferação celular e produção de citocinas. Linfócitos T cultivados com DCs imaturas estimuladas com antígenos da Hsp60 foram estudados quanto a expressão de um painel de genes envolvidos na inflamação e regulação de auto-reatividade através de linfoproliferação e medida da produção de citocinas. PBMC: células mononucleares periféricas; Hsp60: proteína de choque térmico de 60 kDa; CBA (*cytometric bead array*).

3.3 Produção da região C-Terminal da Hsp60

A região carboxiterminal da Hsp60 humana recombinante (C-Hsp60, aa 437-573) foi produzida em nosso laboratório em *Escherichia coli*, a partir do gene que codifica essa região, de acordo com o protocolo padronizado e em uso no nosso laboratório (Caldas 2005). Foi feita uma produção em larga escala em 2 litros de cultura. Resumidamente, células de *Escherichia coli* da linhagem bacteriana BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pRSET-Cal pelo método de cloreto de cálcio. Foi inoculada uma colônia transformante em 50ml de meio LB com ampicilina (100 µg/ml). Essa colônia foi incubada por 16 horas a 37°C sob agitação constante. A partir deste pré-inóculo, foi feito um inóculo em 1 litro de meio com os antibiótico ampicilina (Amershan, USB) e cloranfenicol (Sigma Aldrich), de modo que a ABS 600nm atingisse 0,1. Este inóculo foi incubado a 37°C com agitação, até a cultura celular atingir uma densidade óptica de 0,8 a 600nm. Neste momento, 1ml da cultura bacteriana foi separado e centrifugado. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 80µl de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE. Esta amostra antes da indução, foi separada para posterior análise em gel SDS-PAGE. O restante da cultura bacteriana foi induzido adicionando-se IPTG (1,2 mM) e incubando-se a 37°C sob agitação constante por 2 horas. Após este tempo de indução, 1ml de cultura bacteriana foi processado para posterior análise em gel SDS-PAGE (amostra pós-indução). A cultura bacteriana induzida foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O Sedimento bacteriano foi ressuspenso em 90 ml de Tris 100mM pH8,0 NaCl 300mM imidazol 5mM e Triton X-100 0,3% (Tampão detergente). Este tampão foi utilizado para a lise bacteriana. O

tubo foi homogeneizado e incubado no gelo por 60 minutos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 15000 g por 20 minutos a 4°C, visando a separação da fração protéica solúvel da insolúvel. Após a produção de C-Hsp60 a mesma foi purificada por meio de coluna de níquel (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia). A proteína foi eluída com imidazol, dialisada em PBS e quantificada. As preparações protéicas foram submetidas a protocolos para eliminação de LPS (lipopolissacarídeos), com o detergente Triton X-114, padronizado no nosso laboratório (Tese de e Cristina Caldas, aluna de doutorado do nosso laboratório). A dosagens de endotoxina nas preparações foi feita utilizando-se o kit LAL QCL-1000 (BioWhittaker, inc).

3.4 Remoção de endotoxinas

Padronizou-se o protocolo do Triton X-114 para a remoção de endotoxinas das proteínas recombinantes, adaptado de Aida & Pabst (1990). Inicialmente, preparou-se uma solução de Triton X-114 10% (em água apirogênica) e incubou-se a 4°C na geladeira para a completa dissolução do detergente. Adicionou-se Triton X-114 (1%) à solução protéica e ao PBS (como controle) e misturou-se esta solução cuidadosamente com uma micropipeta. Os tubos foram incubados no gelo por pelo menos 30 minutos, agitando-se no vortex a cada 5 a 10 minutos. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 37°C por 5 minutos, para permitir a formação de duas fases. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 18000g, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se uma fase de detergente no fundo do tubo.

A fase aquosa foi removida cuidadosamente para não misturar com a fase oleosa. Este ciclo foi repetido por mais 6 vezes.

3.5 Teste de endotoxina por LAL (Limulus Amebocyte Lysate) cromogênico QCL1000

Os testes para detecção de endotoxina foram realizados utilizando-se o kit LAL QCL1000 cromogênico (*BioWhittaker*), seguindo-se as instruções do fabricante. Em linhas gerais, este teste foi desenvolvido a partir da observação de que o *Limulus* (caranguejo “fóssil vivo” marinho que habita a costa leste dos Estados Unidos), após infecção por bactéria gram-negativa, morre por coagulação intravascular. Uma pró-enzima, presente no lisado de amebócitos do *Limulus*, é capaz de se converter em uma enzima, mas somente na presença de endotoxina. Esta enzima, por sua vez, é capaz de degradar um substrato cromogênico, produzindo uma coloração amarela que é lida no comprimento de onda de 405-410nm. O uso deste ensaio no nosso laboratório nos permitiu a quantificação de endotoxina presente nas amostras de proteínas recombinantes antes e pós-tratamento com Triton X-114. Somente amostras com < 10 unidades endotóxicas (EU)/ml foram consideradas apropriadas para uso em nossos experimentos.

3.6 Produção dos peptídeos derivados das regiões C-Terminal, N-Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana

Os peptídeos derivados das regiões C-Terminal, N-Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana foram sintetizados a partir da

seqüência Hsp60 humana (Jindal et al, 1989; em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) conforme ilustrado na Tabela 1, que mostra as seqüências de todos os peptídeos sintetizados.

Foi utilizado o programa TEPITOPE (Hammer *et al.*, 1997) para a escolha dos peptídeos. Este programa é um algoritmo para predição de ligação de peptídeos às moléculas HLA-DR (25 diferentes moléculas), mostrando dentro da Hsp60 as regiões com maior probabilidade de ligação às diferentes moléculas HLA-DR que constituem peptídeos potencialmente apresentados para o reconhecimento por linfócitos T. Após a análise no TEPITOPE e seleção de peptídeos com maior probabilidade de ligação a um maior número de moléculas HLA-DR, as seqüências geradas foram comparadas às seqüências de peptídeos já descritas na literatura como sendo pró-inflamatória ou imunoreguladora.

As sínteses de peptídeos em fase sólida foram realizadas em um sintetizador múltiplo de oito canais da Shimadzu Inc, Kyoto, Japan, modelo PSSM-8 e em um sintetizador múltiplo de 96 canais da Advanced Chemtech, EUA, modelo Apex 396 seguindo o processo geral descrito por Stewart e Young [1984]. O sintetizador Shimadzu é composto de 8 reatores em paralelo comandados eletronicamente, na qual a adição dos reagentes e aminoácidos é feita através de um braço mecânico. A programação do sintetizador é realizada através de um programa de computador próprio da empresa Shimadzu que funciona em plataforma PC, ambiente DOS 6.2. A gravação dos programas em cartão de leitura é auxiliada por um módulo BMD-1 da mesma empresa que permite o armazenamento dos protocolos de síntese os quais são transferidos para a memória do equipamento. O

sintetizador da Apex 396 é composto por 96 reatores e os aminoácidos, diferentemente do Shimadzu, são dissolvidos em N-metil-pirrolidona (NMP). A programação do sintetizador é realizada através de um programa de computador próprio da empresa Advanced Chemtech que funciona em ambiente Windows XP.

As sínteses foram feitas utilizando a metodologia Fmoc de acordo com Atherton e Sheppard [1989], Chang *et al.* [1978] e Fields e Noble [1989]. No sintetizador PSSM-8, os aminoácidos foram previamente ativados com tetrafluoroborato de tetrametilurônio (TBTU), hidroxibenzotriazol (HOBt) e N-metil morfolina (NMM) (Richelieu Biotechnology, França) por 5 minutos em dimetilformamida (DMF) (Lab Synth, São Paulo, Brasil) com 0,1% Triton X-100. Os acoplamentos foram realizados usando-se um equivalente a cinco vezes de excesso de aminoácido na direção usual de carboxi para o amino terminal sobre a resina TGR, grau de substituição de 0,20 mmol/g (Novabiochem, San Diego, USA) durante 1 hora. No sintetizador Apex 396 os reagentes TBTU, HOBt e NMM foram adicionados concomitantemente aos aminoácidos nos vasos de reação e os acoplamentos realizados durante uma hora.

Em ambos os equipamentos, as desproteções do grupo Fmoc foram feitas com 500µl de piperidina (Merck, Darmstadt, Alemanha) 20% em DMF + 0,1% Triton X-100 + 0,1 M de HOBt por 2 séries de 15 minutos, seguidas de 5 lavagens com 600µl DMF por 1 minuto cada.

Os peptídeos foram clivados da resina por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA):fenol:anisol:água:etanoditiol a 82,5:5,0:5,0:5,0:2,5 (v/v)

de acordo com King *et al.* [1990], extraídos com ácido acético glacial 95% e liofilizados em liofilizador Super Modulyo modelo Pirani 501 (Boc-Edwards Inc, EUA).

Os peptídeos foram analisados em HPLC dotados de bombas Shimadzu Inc. Japan, modelo LC-10AD, detector de UV Shimadzu Inc. Japão, modelo SPD-10AV e analisados em software Class LC10 versão 1.41 para Windows da mesma empresa. Utilizou-se como fase móvel, acetonitrila grau HPLC (Malinkrodt, Nova Jersey, USA ou JT Baker, Nova Jersey, EUA), ácido fosfórico (Lab Synth, São Paulo, Brasil) e água, obtida em destilador Milli-Ro (Millipore Inc, EUA) com subsequente passagem por sistema de purificação por filtros Milli-Q (Millipore Inc, EUA), equipado com cartuchos para retenção de íons e compostos orgânicos. As condições de desenvolvimento da análise de HPLC foram: solvente A composto de ácido orto-fosfórico 0,1% em água e solvente B composto por acetonitrila e solvente A na proporção de 9:1. As análises foram realizadas empregando-se coluna C-18 (CLC-ODS Shimadzu, 4,6 x 250 mm) e detectadas a um comprimento de onda de 220 nm em sistema de gradiente 5-95% de solvente B em 30 minutos a um fluxo de 1,0 ml/min.

As purificações dos peptídeos foram realizadas em HPLC semi-preparativo, bombas Shimadzu modelo LC-8A, detector de UV-Vis Shimadzu modelo SPD-6AU usando-se coluna C-18 (22,5 x 250,0 mm) com os seguintes sistemas de solvente: TFA 0,1% em água como solvente A e acetonitrila e solvente A na proporção de 9:1 como solução B em um gradiente de 1% do solvente B por minuto durante 30 a 90 minutos a um

fluxo de 3 ml/ min até que se observava a completa saída do peptídeo. As leituras foram realizadas a 220nm.

O grau de pureza dos peptídeos foi determinado através da integração da área obtida nos gráficos de HPLC.

Tabela 1. Sequências dos peptídeos da Hsp60.

Peptídeo * Resíduo aa	Quantidade aa	Seqüência
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
Região Intermediária		
I4 (269-289)	21	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN
I8 (353-352)	20	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ
I9 (372-391)	20	QEIIIEQLDVTTSEYEKEKLN
Região C-Terminal		
p277 (437-460)	24	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED
C3 (449-468)	20	PALDSLTPANEDQKIGIEII
C4 (464-483)	20	GIEIKRTLKIPAMTIKNA
C9 (539-558)	20	LTTAEVVVTEIPKEEKDPGM

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

3.7 Obtenção de células mononucleares periféricas do sangue de indivíduos sadios

As células mononucleares foram isoladas a partir do sangue de indivíduos adultos sadios, obtido por punção venosa em bolsas contendo anticoagulante (Liquemine, La Roche, Basiléia, Suíça).

As amostras de sangue, 500ml, 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 centrifugação a 350g por 30 minutos, as células mononucleares (PBMC do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) foram coletadas, ressuspensas com salina e centrifugadas a 315g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento celular foi lavado duas vezes. Nessas lavagens as células eram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) e centrifugadas novamente a 175g por 8 minutos. As células assim lavadas foram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de soro humano normal inativado (roveniente do setor de hematologia do Hospital das clínica), 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.

3.8 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 10^7 e para a marcação secundária usamos 40 µl de anticorpos para 10^7 . 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. Esse processo permitiu a passagem das células T através da coluna e retenção das células não T na mesma.

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

3.9 Obtenção de Monócitos

monócitos enriquecidos a partir de PBMC por processo de separação negativa utilizando-se contas magnéticas (Monocyte isolation kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach- Alemanha), de acordo as instruções do fabricante. Brevemente, as PBMC 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 10^7 e para a marcação secundária usamos 40 µl de anticorpos para 10^7 . 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. Esse processo permitiu a passagem de monócitos através da coluna e retenção das células não monocíticas mesma.

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

3.10 Geração de células dendríticas

Essa técnica foi padronizada em nosso laboratório com a assessoria da Dra. Cláudia Brodskyn, da FioCruz - BA, que faz parte do Instituto de Investigação em Imunologia (iii) – Instituto do Milênio e também do Prof. Dr. José Alexandre M Barbuto – ICB-USP. As células dendríticas foram geradas a partir de monócitos obtidos por separação negativa. Esses monócitos foram ressuspensos em RPMI 1640 (Invitrogen, CA, USA) 5% FCS contendo 20 ng/ml de GM-CSF (R&D system, MN, USA) e 20 ng/ml de IL-4 (R&D System,

MN, USA) e plaqueados em placas de cultura celular de 6 poços (Nunc, Denmark) na concentração de 2×10^6 células em 3 ml de meio/poço. As placas foram divididas em três grupos para a diferenciação em DC: grupos A , B e C. Todos os grupos foram cultivados por 7 dias a 37 °C em estufa úmida e tensão constante de 5% CO₂. A cada dois dias, trocou-se a metade do meio de cultura celular dos poços de cada placa por meio novo, contendo as mesmas citocinas, nas mesmas concentrações (concentração final 20ng/ml de GM-CSF e de IL-4). O grupo A foi destinado à geração de células dendríticas imaturas (iDC) e foi tratado apenas com GM-CSF e IL-4. O grupo B foi destinado à geração de células dendríticas maduras (mDC) e foi tratado com 200 ng/ml de LPS (Sigma Aldrich) por 48 horas no 5º dia. O grupo C foi destinado à geração de células dendríticas imaturas com estabilidade deste fenótipo. Estas células foram tratadas com 10 ng/ml de IL-10 (R&D system, MN, USA) a partir do 3º dia de cultura. No 7º dia de cultura as células não aderentes dos três diferentes grupos de células foram retiradas das placas, lavadas em meio RPMI 1640 e ressuspensas em meio RPMI 5% FCS numa concentração de 10^6 células /ml.

3.11 Caracterização morfológica das Células Dendríticas

Nós avaliamos a morfologia dos três grupos de células dendríticas estudadas nesse trabalho. Para tanto ressuspendemos as células em uma densidade de 1×10^6 células/ml de meio RPMI sem soro e colocamos 50 µl da suspensão celular em cubetas de citocentrífuga para *citospin*. As células foram

centrifugadas a 120 g por 5 minutos. Após a remoção das cubetas, as lâminas de vidro nelas contidas foram retiradas, secadas ao ar livre por 5 minutos, e a região dessas lâminas que continha o sedimento celular foi delimitada utilizando-se uma caneta. As lâminas foram posteriormente coradas por 5 minutos em solução de Giemsa, lavadas em água corrente e analisadas em microscópio ótico (Carl Zeiss, Alemanha) quanto ao seu aspecto morfológico. As células foram analisadas morfolologicamente quanto ao tamanho, formato presença de dendritos, presença de vacúolos intracitoplasmáticos e posição do núcleo.

3.12 Caracterização imunofenotípica de células dendríticas por citometria de fluxo

As células dendríticas geradas foram caracterizadas imunofenotipicamente, por citometria de fluxo. As células dos grupos A e C foram caracterizadas no 7º dia de cultura. A caracterização imunofenotípica incluiu marcadores de superfície celular: CD14PE, CD80PE, CD86 FITC, CD83 APC, CD1a FITC e HLA-DR CY (Pharmingen, San Diego, EUA). As células foram ressuspensas em tampão FACS (PBS com 2% de FCS) numa concentração de $1,5 \times 10^6$ células /ml e adicionadas em volume 100 µl em cada um dos poços de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U (Nunc, Denmark). Em seguida, as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado por inversão da placa. Toda a

reação de imunofluorescência foi realizada em banho de gelo. Após a lavagem, adicionamos 25 µl dos anticorpos monoclonais, previamente titulados, ao sedimento celular, para a detecção dos marcadores de superfície celular acima mencionados. As placas foram incubadas a 4 °C por 30 minutos em banho de gelo e ao abrigo da luz. Terminada a reação, as células foram lavadas duas vezes com tampão FACS por centrifugação a 300g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 400µl de tampão FACS. Foram adquiridas 2×10^5 células em um FACSCalibur (Becton & Dickinson) e a análise dos dados foi feita através do programa CELLQUEST. A viabilidade destas células verificada através de Iodeto de Propidium (PI). As DC CD83+ e HLA DR+ com alta intensidade de imunofluorescência foram consideradas maduras, ao passo que CD83- ou DC CD83+ e HLA DR+ com baixa intensidade de imunofluorescência foram consideradas imaturas. A perda do CD14 e a expressão do CD1a foram os parâmetros de diferenciação dos monócitos em células dendríticas. Em adição à caracterização imunofenotípica dos diferentes grupos de DC, avaliamos a pureza destes utilizando-se marcadores de linfócitos (CD3-cy, BD; CD19-PE, BD; CD56-Cy, BD) e de células NK (CD56-FITC, BD).

3.13 Ensaios de Reação Linfocitária Mista (MLR)

Para testar papel de APC das diferentes DCs por nós geradas, na indução de proliferação, nós realizamos ensaios de proliferação de linfócitos T alogenícos frente aos três grupos de DC. Como controles positivo e negativo

foram utilizadas células T mais DC estimuladas com PHA e apenas células T em meio, respectivamente. As culturas celulares foram cultivadas por 5 dias a 37 °C em estufa com 5% CO₂. Dezoito horas antes do término do experimento foram adicionados 25µl de meio DMEM contendo com 0,5 µCi de ³H (Timidina Triciada, Amersham). No 5º dia as células foram coletadas e contadas em contador de cintilação líquida (Beta Plate 1205-LK-Wallac). A intensidade da resposta linfoproliferativa induzida pelos diferentes grupos de células foi dado através do índice de estimulação (IE). Este foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $IE = \text{cpm linfócito T} + \text{DC} / \text{cpm linfócitos T sozinho} \text{ ou DC sozinho}$, escolhendo-se sempre o maior valor da média de cpm. Para verificar se as DC maduras induziam respostas proliferativas maiores do que aquelas das iDC e iDC IL-10, nós dividimos os índices de estimulação induzida pelas DC maduras pelos índices de estimulação das iDC e iDC tratadas com IL-10.

3.14 Pulso de DC com antígenos da Hsp60

Para a realização dos ensaios funcionais propostos neste trabalho nós trabalhamos com células dendríticas não pulsadas e pulsadas com antígenos da Hsp60. O pulso das células, que foi realizado em placas de 6 poços (Nunc, Denmark) contendo 1×10^6 células em um ml de RPMI 1640, foram: **(i)** 10 µg/ml da fração C-Terminal da Hsp60 (C-Hsp60) ou **(iii)** 5mM dos peptídeos derivados da Hsp60.

3.15 Ensaios de linfoproliferação

As diferentes DCs imaturas e maduras não pulsadas e pulsadas com os diferentes antígenos da Hsp60 foram utilizadas em ensaios de proliferação de linfócitos T autólogos. Esses ensaios foram feitos em placas de 96 poços com fundo em U (Nunc, Denmark) utilizando-se 100µl da suspensão de DC (2×10^4 células/ml) e 100µl de células T (2×10^5 células/ml) (proporção DC:LT = 1:10). Como controles positivo e negativo foram utilizadas células T mais DC cultivadas na presença do mitógeno PHA (Sigma Aldrich) . como controle negativo foram utilizadas células T sózinhas ou DC sózinhas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. As placas foram incubadas a 37°C em estufa 5% de CO₂ por 5 dias. Dezoito horas antes do término do experimento foram adicionados 25µl de meio contendo 0,5 µCi de ³H (Timidina Triciada, Amersham). No 5º dia as células foram coletadas e contadas em contador de cintilação líquida (Beta plate 1205-LK-Wallac). A resposta linfoproliferativa foi analisada através do índice de estimulação (IE), calculado como cpm do experimento com antígeno / com do experimento sem antígeno. Consideramos que houve indução de resposta linfoprolifertaiva para um determinado antígeno se este induziu $IE \geq 2$. Por outro lado, consideramos que houve inibição da resposta linfoproliferação por um dado antígeno se o seu IE foi $\leq 0,5$.

3.16 Detecção de citocinas por *cytometric beads array* (CBA)

Nós realizamos ensaios para a análise do perfil de citocinas em sobrenadantes de cultura dos diferentes grupos de DC em cinco condições diferentes: **(i)** células dendríticas não estimuladas, **(ii)** DC não estimuladas cultivadas com linfócitos T, **(iii)** DC estimuladas com C-Hsp60 ou peptídeos da Hsp60, **(iv)** DC estimuladas com os antígenos referidos mais linfócitos T e **(v)** DC não estimuladas mais linfócitos T mais PHA. Estes ensaios foram realizados em placas de 24 poços (Nunc, Denmark) em 1ml de meio DMEM contendo 10^5 DC e 10^6 linfócitos (proporção DC:LT = 1:10). Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados após 48h de cultura, 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 (de *Cytometric Beads Array*, Pharmingen, San Diego, EUA) seguindo as instruções do fabricante. CBA é um Imuno-ensaio que usa contas conjugadas com anticorpos de alta afinidade que podem capturar especificamente antígenos solúveis. O antígeno capturado é evidenciado com anticorpos fluorescentes de detecção. Através do citômetro de fluxo podemos distinguir as contas baseadas no tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. A auto-reatividade às DCs foi analisada descontando-se produção DC+LT da produção encontrada para a DC sozinha ou para o linfócito sozinho, escolhendo-se sempre aquele com maior produção da citocina em questão. O nível de citocina induzido pelos estímulos foi descontado daquele produzido

pelas DC sozinhas (espontânea), quando avaliamos o efeito dos antígenos da Hsp sobre as DC. Quando avaliamos o efeito desses antígenos nas coculturas com linfócitos T, a produção induzida de citocina pelos antígenos ([DC+Ag]) foi descontada daquela produzida pelos linfócitos T frente às DC (DC+LT). Uma vez que os limites máximo e mínimo de detecção do teste são $\geq 20\text{pg/ml}$ e 5000pg/ml , respectivamente, os valores inferiores a 20pg/ml foram por nós desconsiderados.

3.17 Separação de linfócitos T para ensaios de PCR em tempo real.

Linfócitos T autólogos foram cultivados com células dendríticas imaturas por 5 dias. Ao término desse período os linfócitos T foram purificados das culturas com as DCs por meio de separação negativa imunomagnéticas (Pan T cell isolation Kit II para humanos, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach-Alemanha) de acordo as instruções do fabricante.

As células das coculturas 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 $30\mu\text{l}$ do coquetel de anticorpos para 10^7 e para a marcação secundária usamos $40\mu\text{l}$ de anticorpos para 10^7 . 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. Esse processo permitiu a passagem

das células T através da coluna e retenção das células dendíticas.

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

3.18 PCR em tempo Real

3.18.1 Extração de RNA

O RNA foi extraído pelo método baseado em Chomzynski et al (1987), o qual utiliza solução de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) para isolamento de RNA total. Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe as células mantendo a integridade do RNA. Este material foi mantido a – 80°C até o momento da transcrição.

3.18.2 Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, 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 entre 1,6 a 1,9. 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, 1989).

Além disto, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para visualização da integridade das amostras, observando as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA.

3.18.3 Transcrição reversa

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com 5µg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA 1µl de oligo dT (500 µg/ml), 1µl de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 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. Por último foi adicionado 1µl da enzima transcriptase reversa (200U/µl) e esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 50 minutos seguidos de 70°C por 15 minutos.

3.18.4 Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96

poços, usando 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 acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn , que seria uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de *primers*. 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 alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi feito pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001), utilizando como gene de referência a média geométrica de 3 genes de referência: o GAPDH (D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase),

Ciclofilina A e HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase).

Consideramos significativo todo o valor de $QR > 2$ ou $QR < 0,5$.

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

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

3.18.5 Desenho e padronização dos primers

Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, USA). O tamanho dos primers variou de 18 a 25 bases, o *melting point* 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 (*melting point*).

A concentração de uso de cada par de seqüências de primers foi padronizada em reações de RT-PCR em tempo real foi utilizado um *pool* de cDNA de todas as amostras de linfócitos T, onde foram testadas as concentrações de 100nM, 200nM e 300nM, para cada par de *primers*. Após as reações de RT-PCR em tempo real foi observado o valor de Ct de cada par de primers em cada concentração e foi escolhida 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 primer foi escolhida baseando-se no valor de Ct, de forma que a concentração de cada par de “primers” não fosse um fator limitante da reação.

3.18.6 Especificidade e adequação dos primers.

A especificidade dos “primers” desenhados pelo *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 ou *melting point* (T_m) do produto de amplificação (*amplicon*).

3.18.7 Cálculo da Eficiência.

O cálculo da eficiência foi realizado como sugerido em Pfaffl e colaboradores (2002). Para calcularmos o valor da eficiência de cada par de seqüências primers, fizemos um pool de todas as amostras estudadas (pool cDNA). Em seguida, diluímos esse pool em diluições que variavam de 1:10, 1:50, 1:250 e 1:1250 ou 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, e realizamos ensaios de RT-PCR em tempo real, onde cada seqüência de primers, já padronizada quanto a

sua concentração de uso, foi testada. Após a reação de RT-PCR em tempo real, foi obtido o valor de Ct (das triplicatas) de cada diluição para cada sequência de *primers* testada. As médias dos valores de Ct foram utilizadas no cálculo da eficiência, onde a linha da regressão linear (gráfico) foi composta pelo valor logaritmo das diluições testadas (log ng RNA; eixo X) e pelos valores da média de Ct (eixo Y). O valor de *slope*, obtido da reta do gráfico da eficiência, é utilizado para determinar a eficiência da sequência de primers para o gene de interesse. A fórmula utilizada para a eficiência (E) é:

$$E = (10^{-1/\text{slope}})$$

3.18.8 Critérios de Validação

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: **(i)** presença de controles brancos 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, **(vi)** análise de eficiência da reação, com amostras com diluições seriadas, com razão entre 1,8 e 2,0.

4. Resultados

4.1. Geração de células dendríticas

Para estudar o efeito da interação entre as DCs e a proteína de choque térmico Hsp60 humana sobre a resposta imune, nós inicialmente diferenciamos DCs a partir de monócitos humanos. Para tanto, separamos células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de voluntários saudáveis em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque. Em seguida, nós fizemos a seleção positiva dos monócitos das PBMC por meio de contas imunomagnéticas. Na Figura 2 mostramos o rendimento ($15\% \pm 2$) e a pureza ($98\% \pm 3$) dos monócitos purificados. O rendimento dos monócitos foi calculado como a porcentagem de células recuperadas das PBMC totais após a seleção positiva com as contas imunomagnéticas e contagem em câmara citométrica. A pureza dessas células foi determinada como a porcentagem de células positivas para CD14 e negativas para marcadores de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD19) e células dendríticas (CD1a), por meio de citometria de fluxo.

Cultivamos monócitos humanos com GM-CSF e IL-4 ou com GM-CSF, IL-4 e IL-10 (para a geração de DC com fenótipo imaturo estável) por 5 dias. A eficiência de diferenciação de monócitos em células dendríticas foi maior do que 90%, conforme observada pela não detecção da molécula CD14 na superfície das células diferenciadas. A maturação das células dendríticas foi feita utilizando-se LPS (lipopolissacarídeo, do inglês “lipopolysaccharide”) em

cultura por 24 horas. O LPS também foi utilizado para testar a estabilidade do fenótipo imaturo das iDC cultivadas com IL-10. Na Figura 3 mostramos a pureza das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos purificados.

Figura 2 - Rendimento e pureza de monócitos purificados com contas magnéticas. Monócitos purificados com contas magnéticas apresentaram um rendimento médio de 15% (a). A imunofenotipagem desses monócitos revelou uma pureza média de mais de 95% CD14+ (b) e quantidades pequenas de células dendríticas (CD1a+) (c), linfócitos T (CD3+) (d) e células B (CD19+) (e). Figura representativa de 16 experimentos.

Figura 3 - Pureza das células dendríticas derivadas de monócitos humanos *in vitro*: análise por citometria de fluxo. Foram adquiridos 10000 (a) eventos e as células analisadas com base no tamanho (FSC, do inglês, "Forward Scatter", dispersão frontal) e na granulosidade (SSC, do inglês, "Side Scatter", dispersão lateral). As células apresentaram 92% de positividade para o marcador de DC (CD1a, 92%) e apenas quantidades mínimas de marcadores de monócitos/macrófagos (CD14, 3%) e de células T (CD3, 1%). Um experimento representativo de 16.

4.2 . Caracterização morfológica e funcional das células dendríticas

4.2.1 Caracterização Morfológica

O tratamento de monócitos com GM-CSF e IL-4, quer na presença quer na ausência de IL-10, resultou na geração de células com características morfológicas de DC (Figura 4).

Figura 4. Características morfológicas das células dendríticas humanas geradas *in vitro* a partir de monócitos. (a) Grupo de Células dendríticas imaturas, ainda em uma fase precoce de diferenciação, apresentam formato arredondado. (b) Células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 não são agrupadas em grumos e apresentam formato irregular e variado. (c) Células dendríticas maduras em grumos e não grumadas apresentam formato arredondado e dendritos proeminentes. Microscopia óptica comum com aumento 400X.

As análises da morfologia feitas por *citospin* e coloração com GIEMSA revelaram que ambos os tipos celulares apresentam semelhanças morfológicas: são multiformes e sem vacúolos (Figura 5). No entanto, essas mesmas células apresentaram também algumas diferenças quanto à posição do núcleo e quanto às projeções membranosas. As células cultivadas apenas na presença de GM-CSF e IL-4, células dendríticas imaturas (iDC), apresentaram núcleo central e superfície celular relativamente lisa, com poucas e curtas projeções membranosas (Figura 5 A). Em contraste, as células tratadas com GM-CSF, IL-4 e IL-10 (iDC IL-10) apresentaram núcleo periférico e projeções membranosas longas e numerosas (Figura 5 B). Além disso, as iDC IL-10 mostraram-se mais aderentes do que as iDC. Ao contrário, as iDC tratadas com LPS amadureceram (mDC) e passaram por modificações morfológicas notáveis. Essas células, que tiveram um aumento substancial do seu volume, passaram a ter um núcleo totalmente periférico, um citoplasma com numerosos vacúolos e superfície celular com muitas projeções membranosas pequenas e curtas (Figura 5 C).

4.2.2. Caracterização imunofenotípica das diferentes células dendríticas

A imunofenotipagem das diferentes células dendríticas revelou uma semelhança entre as iDC e as iDC IL-10. Esses dois tipos celulares diferiram imunofenotipicamente das mDC que expressaram altos níveis de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), moléculas HLA-DR e o marcador de maturação celular CD83 (Tabela 2 e Figuras 6 e 7). A análise

Figura 5 - Características morfológicas das células dendríticas humanas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC), geradas *in vitro* a partir de monócitos. (A) As iDCs são esféricas, com dendritos pouco evidentes e sem vacúolos intracitoplasmáticos. (B) As iDC IL-10 têm tamanho e forma variados, apresentam longas projeções membranosas e poucos vacúolos intracitoplasmáticos. (C) As mDC têm formato esférico, projeções membranosas finas, curtas e numerosas e muitos vacúolos intracitoplasmáticos. As setas mostram vacúolos e finas projeções membranosas. Experimento realizado por “citospin” e coloração com Giemsa. Aumento 400X.

imunofenotípica das células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 e, posteriormente, desafiadas com LPS (iDC IL-10+LPS) revelou um padrão de expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), de moléculas

HLA-DR e do marcador de maturação CD83, semelhante àquele observado para as iDC e para as iDC IL-10. Esse achado mostra que o tratamento com IL-10 durante a diferenciação das DCs foi capaz de manter o estado de imaturidade estável.

Tabela 2 - Imunofenotipagem de células dendríticas: medianas de intensidade de fluorescência e porcentagem (%) de positividade de marcadores de superfície celular em células dendríticas humanas geradas, *in vitro*, a partir de monócitos.

Marcador	positividade (%)				MIF			
	iDC	iDC IL-10	iDC IL-10 +LPS	mDC	iDC	iDC IL-10	iDC IL-10 +LPS	mDC
CD1a	78 ± 27	66 ± 24	69 ± 20	79 ± 19	146	52	32	56
CD14	3 ± 3	2 ± 3	2 ± 4	1 ± 1	2	3	4	3
CD83	8 ± 4	7 ± 5	14 ± 12	75 ± 26	3	5	3	63
CD80	68 ± 19	23 ± 13	59 ± 20	89 ± 5	30	23	28	114
CD86	26 ± 31	24 ± 30	35 ± 33	87 ± 16	7	5	6	149
HLA-DR	31 ± 36	27 ± 33	29 ± 31	56 ± 34	7	9	11	21

Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), imaturas tratadas com IL-10 e posteriormente desafiadas com LPS (iDC IL-10+LPS) e maduras (mDC). O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados como porcentagem média mais desvio padrão de células marcadas com os diferentes anticorpos monoclonais fluorescentes (%) e como medianas das intensidades de fluorescência (MIF). Em negrito estão as moléculas com maior expressão nas mDC. Foram realizados 16 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Figura 6 - Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), imaturas tratadas com IL-10 e posteriormente desafiadas com LPS (iDC IL-10+LPS) e maduras (mDC). O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados como Medianas das Intensidades de Fluorescência (MIF). Os marcadores utilizados foram: CD1a, expresso em DC; CD14, expresso em monócitos; CD83, expresso em DC maduras; CD80, CD86 e HLA-DR, expressos em altos níveis em DC maduras e baixos níveis em DC imaturas e monócitos. Foram realizados 16 experimentos com células de indivíduos diferentes. Análise por Kruskal Wallis usando programa GraphPad Prism 3.0.

Figura 7 - Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), imaturas tratadas com IL-10 e posteriormente desafiadas com LPS (iDC IL-10+LPS) e maduras (mDC). O fenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os marcadores utilizados foram: CD1a, expresso em DC; CD14, expresso em monócitos; CD83, expresso em DC maduras; CD80, CD86 e HLA-DR, expressos em altos níveis em DC maduras e baixos níveis em DC imaturas e monócitos. Os valores são dados como mediana da % células positivas para cada marcador. Foram realizados 16 experimentos com células de diferentes indivíduos.

4.3. Caracterização funcional das células dendríticas

4.3.1. Reação Linfocitária Mista (MLR)

Para avaliar a capacidade diferencial das DCs maduras e imaturas de estimular uma resposta de células T, nós realizamos ensaios de MLR (do inglês, *Mixed Lymphocyte Reaction*, cultura linfocitária mista). Na Figura 8 ilustramos os resultados obtidos desses experimentos. Nela pode-se observar que todas as DCs, independentemente do seu estágio de maturação, foram capazes de induzir resposta linfoproliferativa alogênica. Note-se, no entanto, que conforme descrito na literatura, as mDC induziram índices de estimulação de linfócitos T significativamente mais altos do que aqueles induzidos pelos

outros tipos de DCs (iDC, iDC IL-10 e iDC IL-10+LPS). Quando fizemos a razão entre os índices de estimulação induzidos por mDC e aqueles induzidos pelos outros tipos de DCs encontramos uma razão > 2 em 8 de 13 experimentos realizados com iDCs; em 5 de 13 experimentos realizados com iDC IL-10, e em 8 dos 11 experimentos realizados com iDC IL-10+LPS.

Figura 8 - Reação linfocitária mista. Proliferação de linfócitos T alogênicos frente às células dendríticas imaturas (iDC), DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), DCs imaturas tratadas com IL-10 e posteriormente desafiadas com LPS (iDC IL-10+LPS) e DCs maduras (mDC). I.E: índice de estimulação= média de cpm dos ensaios DC + LT dividida pela média de cpm de LT. cpm: contagem por minuto. Foram realizados 13 experimentos com células de indivíduos diferentes.

Em alguns casos, a razão encontrada entre os índices de estimulação induzidos por mDC foi até 9 vezes maior em relação às iDCs, 13 vezes maior em relação às iDC IL-10 e 17 vezes maior em relação às iDC IL-10+LPS (Tabela 3), mostrando a maior capacidade das mDC de induzir proliferação de linfócitos T em uma MLR.

Tabela 3 - Reação Linfocitária Mista: Índices de estimulação de proliferação linfócitos T frente a diferentes DCs alogênicas

Nº experimento	iDC+LT	iDC IL-10+LT	iDC IL-10 [+LPS] +LT	mDC +LT	*mDC/iDC	*mDC/iDC IL-10	*mDC/iDC IL- 10+LPS
DC 24	107,1	78,1	nr	357,6	3,36	4,6	nr
DC 25	5,8	8,5	nr	46,9	9,0	5,6	nr
DC 26	144,3	210,9	164,7	247,3	1,71	1,15	1,50
DC 27	8,8	29,7	17,3	42,6	4,8	1,45	2,5
DC28	35,8	58,9	14,5	68,5	1,9	1,15	4,77
DC 29	11,0	52,6	19,6	87,9	8,0	1,7	4,57
DC31	38,8	27,5	142,8	352,8	9,1	12,9	2,5
DC 32	167,6	211,8	108,5	310,9	1,8	1,5	2,9
DC 33	158,0	155,5	139,1	236,8	1,5	1,6	1,76
DC 34	81,6	182,6	61,1	219,4	2,7	1,3	3,6
DC 35	4,2	3,6	2,2	36,6	8,8	10,1	17,0
DC 36	4,1	4,7	5,0	24,8	6,1	5,4	5,1
DC 37	63,4	64,0	58,1	108,0	1,70	1,7	1,7
mediana	38,8	58,8	58,1	107,9	3,3	1,61	2,81

Índices de estimulação (I.E) de proliferação de linfócitos T (LT) alogênicos frente a células dendríticas (DC) derivadas de monócitos após 5 dias de cocultura. Ensaio de proliferação medido por incorporação de timidina triciada. I.E: índice de estimulação= média de cpm dos ensaios iDC + LT dividida pela média de cpm de LT. cpm: contagem por minuto. LPS = Lipopolissacarídeo; iDC = células dendríticas imaturas; iDC IL-10 = células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; iDC IL-10[+LPS] = células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 e posteriormente desafiadas com LPS; mDC= células dendríticas maduras. O * representa a razão entre os IE das mDC e o das iDC, DC-IL10 e IDC IL-10+LPS. nr = não realizado. Em **negrito** estão os maiores I.E para cada experimento assim como as razões nas quais as mDC induziram pelo menos 2x maiores I.E do que as DCs imaturas. Foram realizados 13 experimentos com células de diferentes indivíduos.

O fato de os índices de estimulação induzidos pelas iDC IL-10+LPS (mediana 58,12) terem sido similares àqueles induzidos pelas iDC e iDC IL-10 (medianas 38,8 e 58,8, respectivamente) reforça o nosso achado de estabilidade de fenótipo imaturo mediado pela IL-10, também funcionalmente.

4.3.2. Produção espontânea de citocinas pelas diferentes DCs

Para determinar o perfil de citocinas secretadas espontaneamente pelos diferentes tipos de DCs geradas com os protocolos utilizados neste trabalho, analisamos sobrenadantes de culturas celulares (iDCs, iDC IL-10 e mDCs, n=15) após 48 h sem estímulo com antígenos exógenos, por citometria de fluxo (Figura 9), em ensaios de CBA (*Cytometric Bead Array*). Nesses experimentos nós investigamos a secreção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2.

No geral, observamos que a produção das citocinas avaliadas esteve abaixo do limite de detecção do nosso teste. Todavia, pudemos detectar produção espontânea das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 em alguns dos experimentos realizados. A citocina que foi mais freqüentemente detectada foi IFN- γ . Houve maior positividade de produção dessa citocina pelas mDC (6/15 indivíduos) do que por iDC (2/15) ou iDC IL-10 (2/15). No entanto, os níveis de IFN- γ secretado pelas mDC variaram de 41 pg/ml a 2145 pg/ml, e foram menores do que aqueles observados para as iDC e iDC IL-10, que produziram níveis de IFN- γ acima do limite superior de detecção do nosso teste nos experimentos (>5000 pg/ml).

Observamos produção de TNF- α em mDC (2/15), iDC (2/15) e iDC IL-10 (3/15). Os níveis dessa citocina foram mais altos nas iDC IL-10 (704 a >5000 pg/ml) do que nas iDC (23,1 a 2502 pg/ml) e mDC (38,3 a 48,9 pg/ml). A produção de IL-10 foi detectada apenas nas células dendríticas imaturas, iDC (2/15) e iDC IL-10 (3/15) em uma baixa frequência. O nível de produção dessa citocina foi semelhante nas iDCs (160 e 184 pg/ml) mas variou nas iDC IL-10 (de 264 – 4306,7 pg/ml). A produção de IL-4 foi detectada apenas em níveis muito baixos (20,3 a 28,8 pg/ml) em mDC (1/15), iDC (1/15) e iDC IL-10 (2/15). Não detectamos IL-5 nem IL-2 em quaisquer dos experimentos realizados (Tabela 4).

Figura 9. Produção espontânea de citocinas por células dendríticas. (a) controle negativo. (b) um exemplo representativo da detecção das citocinas IL-10 e TNF em sobrenadante de cultura de células dendríticas por CBA (*Cytometric Bead Array*). Foram realizados 15 experimentos com células de indivíduos diferentes.

Tabela 4 - Produção espontânea de citocinas por células dendríticas humanas, diferenciadas, *in vitro*, a partir de monócitos de indivíduos saudáveis (pg/ml)

Exp.	IFN γ			TNF α			IL-10			IL-5			IL-4			IL-2		
	iDC	iDC IL-10	mDC	iDC	iDC IL-10	mDC	iDC	iDC IL-10	mDC	iDC	iDC IL-10	mDC	iDC	iDC IL-10	mDC	iDC	iDC IL-10	mDC
DC 20	*	*	58	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 21	*	*	41	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 22	*	*	533	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 24	*	*	739	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 25	≥ 5000	≥ 5000	1956	3237	≥ 5000	*	160	264	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 26	≥ 5000	≥ 5000	2145	2502	≥ 5000	*	184	298	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 28	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 31	*	*	*	*	*	38,3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 32	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 33	*	*	*	*	*	48,9	*	4307	*	*	*	*	*	22,9	28,8	*	*	*
DC 34	*	*	*	*	704	*	*	*	*	*	*	*	20,3	23,4	*	*	*	*
DC 35	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC 36	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Quantidade de citocinas produzidas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC), coletados após 48h de cultura na ausência de antígenos exógenos. O ensaio utilizado foi CBA (*Cytometric Beads Array*). Valores em pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do teste = 20pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. * = produção < 20 pg/ml. Foram estudadas células de 15 diferentes indivíduos. Exp.= experimento.

4.4. Interação de antígenos da Hsp60 com as células dendríticas: produção de citocinas

Nós estudamos a produção de citocinas induzida por peptídeos sintéticos da Hsp60 e o seu fragmento carboxiterminal (C-Hsp60) nas células dendríticas. Avaliamos os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 em sobrenadantes de culturas celulares, coletados após 48 horas de estímulo com os referidos antígenos. Vale ressaltar que estudamos os sobrenadantes das culturas acima referidas tanto com DC irradiadas quanto com DCs não irradiadas. A irradiação não modificou a produção das citocinas estudadas em nenhum dos 5 experimentos realizados (dado não mostrado). Em função disso, passamos a trabalhar apenas com células não irradiadas.

Das seis citocinas avaliadas nós conseguimos detectar quatro: duas geralmente consideradas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α) e duas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). No geral, observamos diferenças entre o perfil das citocinas produzidas pelo grupo de células maduras (mDC) e os grupos de células imaturas (iDC e iDC IL-10). Também observamos um padrão variável de produção de citocinas das diferentes DCs, na interação com os antígenos da Hsp60. De fato, nos diferentes grupos de células, vários peptídeos mostraram-se capazes de ora induzir a produção de uma determinada citocina, ora inibir a produção espontânea desta. No Quadro 1 resumimos os nossos achados de produção de citocinas pelos diferentes grupos de DCs em resposta aos antígenos da Hsp60.

Resultados

Quadro 1 – Balanço do perfil de citocinas produzidas pelas diferentes DC após o estímulo com antígenos da Hsp60

Tipo de DC	Citocinas						Condição Experimental
	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-4	IL-5	IL-2	
mDC	3/10 N2 I8 C3 p277 N4 I9 C9 C-Hsp	1/10 N 4	1/10 N4	3/10 C9 p277			+ Ag Hsp60
	• • • Todos	• • • Menos N10 Todos		• N2, N3 N 7 I9			Sem Hsp60
iDC	2/10 C9 p277	2/10 I8 I9	2/10 C4 I8	1/10 C3			+ Ag Hsp60
	• • • N 7	• • • Todos	• • • Todos	•			Sem Hsp60
iDC IL-10	1/10 C4	4/10 N 6 I8 I9 C4	2/10 C4	2/10 N4 I9			+ Ag Hsp60
	• • • N 7	• • • Todos	• • • Todos	• • • I4 I9			Sem Hsp60

A produção de citocinas foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de DC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Representamos a frequência de produção de cada citocina com os diferentes tipos de DCs (iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10; mDC: maduras) na interação com pelo menos um dos antígenos da Hsp60. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Produção espontânea de citocinas por DC: sem antígenos da Hsp60. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. ■ : frequência de valores positivos para a produção da citocina induzida por antígenos. Os antígenos da Hsp60 que induziram a produção de citocinas estão marcados abaixo da marcação em cinza. □ : não houve produção de citocinas. ■ : houve inibição > 50% da produção espontânea de citocina mediada por algum antígeno da Hsp60. • : refere-se a cada experimento com produção espontânea de citocinas de DC de 10 diferentes indivíduos. Os antígenos que inibiram a produção de citocinas estão marcados abaixo. Foram realizados experimentos com células de 10 indivíduos diferentes.

4.4.1. Produção de IFN γ por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, com e sem o estímulo com antígenos da Hsp60

A produção espontânea de IFN- γ foi observada nos três grupos de células dendríticas porém, tal produção ocorreu mais frequentemente nas mDC (3 de 10 experimentos: DC24, DC25 e DC26) do que nas iDC (2 dos 10 experimentos: DC25 e DC26) e iDC IL-10 (2 de 10 experimentos: DC25 e DC26). O tratamento com antígenos da Hsp60 foi capaz de modular a produção de IFN- γ pelos três diferentes grupos de DCs de duas maneiras: inibindo a produção espontânea e induzindo a secreção dessa citocina.

A inibição da produção espontânea de IFN- γ em resposta a antígenos da Hsp60 foi mais freqüente no grupo das mDC e iDC IL-10 (2 de 3 de experimentos: DC25 e DC26) do que no grupo das iDC (DC25). Os antígenos envolvidos na inibição da produção espontânea, diferiram entre os grupos de células dendríticas maduras e imaturas. Enquanto que no grupo das mDC todos os antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir a produção espontânea de IFN- γ (em 2 de 3 experimentos), no grupo das iDC e iDC IL-10 tal inibição da produção espontânea de IFN γ , foi observada apenas em resposta ao peptídeo N7.

Com relação à indução da produção de IFN- γ em resposta a antígenos da Hsp60 observamos que essa citocina foi mais frequentemente produzida no grupo das mDCs (DC24, DC35 e DC36) do que no grupo das iDC (DC24 e DC32) e das iDC IL-10 (DC36). Os antígenos envolvidos na indução da produção de citocinas diferiram nos diferentes grupos de células: (i) para as mDC foram: N2 (1 de 10), N4 (2 de 10), I8 (1 de 10), I9 (1 de 10),

C3 (1 de 10), C4 (1 de 10), C9 (1 de 10), p277 (1 de 10) e C-Hsp60 (1 de 10) (Tabela 5); (ii) para as iDC: C9 (1 de 10) e p277 (2 de 10) (Tabela 6), ambos da região carboxiterminal; (iii) para as iDC IL-10: C4 (1 de 10) (Tabela 7).

Tabela 5 – mDCs: produção de IFN- γ após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígeno da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	872	149 (92)	254 (88)	*	*	*	*	*	*	nr
N3	*	132 (93)	254 (88)	*	*	*	*	*	*	*
N4	1379	103 (95)	173 (92)	*	*	*	*	112	*	nr
N6	*	173 (91)	341 (84)	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	405 (79)	592 (72)	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	209 (89)	280 (87)	*	*	*	*	*	*	nr
I4	*	638 (67)	811 (62)	*	*	*	*	*	*	nr
I8	1028	738 (62)	872 (59)	*	*	*	*	*	*	nr
I9	1299	191 (90)	283 (87)	*	*	*	*	*	*	nr
C3	821	188 (90)	286 (87)	*	*	*	*	*	*	nr
C4	*	327 (83)	398 (81)	*	*	*	*	*	1114	*
C9	1057	42 (97)	112 (95)	*	*	*	*	*	*	*
P277	1107	185 (91)	167 (92)	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	1276	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	739	1956	2145	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IFN γ foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de mDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. ■ = inibição $\geq$ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. nr: não realizado. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Tabela 6 - iDCs : produção de IFN- γ após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígeno da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	2415 (52)	*	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
I8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
I9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C9	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P277	38	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	≥5000	≥5000	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IFN γ foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parêntese. = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. nr: não realizado. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes

Tabela 7 - iDC IL-10: produção de IFN- γ após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígeno da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	725 (81)	853 (83)	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	*	*	*	*	*	*	nr	nr	nr
I4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C4	*	*	*	*	*	*	*	*	1250	*
C9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	≥5000	≥5000	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IFN γ foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC IL-10 cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. nr: não realizado. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Além da diferença na frequência de antígenos da Hsp60 capazes de induzir a produção de IFN γ nas mDC, iDC e iDC IL-10, observamos diferença também nos níveis secretados dessa citocina pelos três tipos celulares: mDC (112 a 1299 pg/ml), iDC (24 a 38 pg/ml) e iDC IL-10 (1250 pg/ml). Foi interessante notar que os níveis de IFN γ produzidos pelas iDCs

em resposta aos peptídeos C9 e p277 foram baixos quando comparados àqueles produzidos pelas mDCs.

4.4.2. Produção de $TNF\alpha$ por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, após o estímulo com antígenos da Hsp60

A análise dos sobrenadantes das culturas das diferentes DCs revelou que os três tipos de DC foram capazes de produzir $TNF\alpha$, espontaneamente, em pelo menos 2 de 10 experimentos.

Assim como ocorreu para o $IFN\gamma$, a grande maioria dos antígenos da Hsp60 que foram testados pôde inibir a produção espontânea de $TNF\alpha$ nos três grupos de células. A única exceção foi o peptídeo N10 que não inibiu a produção espontânea na condição mDC.

Observamos que os antígenos da Hsp60 também foram capazes de induzir a produção de $TNF\alpha$ nos três diferentes grupos de DCs. Verificamos, porém, que a frequência de antígenos da Hsp60 indutores dessa citocina foi menor do que aquela observada para o $IFN\gamma$ nas mDC e iDC. Para as mDC apenas o peptídeo N4 foi capaz de induzir a produção dessa citocina (1 de 10 experimentos) (Tabela 8). Nas iDCs os peptídeos responsáveis por induzir a produção de $TNF\alpha$ foram os peptídeos I8 e I9 (1 de 10 experimentos, cada) (Tabela 9).

Como pode ser visto na Tabela 10, em contraste com as mDCs e com as iDCs, no grupo das iDCs IL-10 observamos maior frequência de produção de $TNF\alpha$ induzida por antígenos da Hsp60 (4 dos 10 experimentos realizados). Os peptídeos que induziram a produção dessa citocina nas iDC

IL-10 foram: N6 (1 de 10); I8 (1 de 10); I9 (1 de 10) e C4 (1 de 10). Observamos que, ao contrário do que foi visto para o IFN γ , apenas baixos níveis de TNF α foram induzidos pelos antígenos acima mencionados em todos os grupos celulares, exceto para o peptídeo C4 que induziu altos níveis de TNF α na DC36 (670,7 pg/ml) na condição iDC IL-10.

Tabela 8 - mDCs: produção de TNF α após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígeno da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	0 (100)	*	*	*	*	*	*
N3	*	*	*	11,6 (70)	*	16,6(66,)	*	*	*	*
N4	*	*	*	0 (100)	*	1,6 (97)	*	61,7	*	*
N6	*	*	*	0 (100)	*	0 (100)	*	*	*	*
N7	*	*	*	1,4 (96)	*	15,7 (68)	*	*	*	*
N10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	*	*	*	*	11,7(76)	*	*	*	*
I8	*	*	*	0 (100)	*	*	*	*	*	*
I9	*	*	*	0 (100)	*	18,6 (62)	*	*	*	*
C3	*	*	*	0 (100)	*	0 (100)	*	*	*	*
C4	*	*	*	0 (100)	*	1,3 (97)	*	*	*	*
C9	*	*	*	1,9 (95)	*	1,9 (96)	*	*	*	*
P277	*	*	*	1,2 (97)	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	*	*	2,4 (94)	*	22,7 (53)	*	*	*	*
Sem estímulo	*	*	*	38,3	*	48,9	*	*	*	*

A produção de TNF α foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de mDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. □ = inibição $\geq$ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Tabela 9 - iDCs: produção de TNF α após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	228 (93)	187 (93)	*	*	*	*	*	*	*
N3	*	743 (77)	593 (76)	*	*	*	*	*	*	5,2 (78)
N4	*	435 (87)	380 (85)	*	*	*	*	*	*	*
N6	*	828 (74)	722 (71)	*	*	*	*	*	*	*
N7	*	93 (97)	70 (97)	*	*	*	*	*	*	3,5 (85)
N10	*	1042 (67)	810 (68)	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	251 (92)	221 (91)	*	*	*	*	*	*	1,1 (96)
I8	*	425 (87)	377 (85)	*	*	*	*	70,7	*	4,8 (80)
I9	*	800 (75)	701 (72)	*	*	*	*	*	*	80,9
C3	*	466 (85)	411 (84)	*	*	*	*	*	*	*
C4	*	1212 (63)	1095 (56)	*	*	*	*	*	*	*
C9	*	641 (80)	588 (76)	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	773 (76)	773 (69)	*	*	*	*	*	*	1,2 (95)
C-Hsp60	*	611 (81)	560 (78)	*	*	*	*	*	*	1,4 (94)
Sem estímulo	*	3237	2502	*	*	*	*	*	*	23,1

A produção de TNF α foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parêntese. ■ = inibição $\geq$ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Tabela 10 - iDCs IL-10 : produção de TNF α após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	475 (91)	461 (91)	*	*	*	1,6 (100)	*	*	*
N3	*	1021 (80)	943 (81)	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	694 (86)	687 (86)	*	*	*	1,4 (99)	*	*	*
N6	*	1314 (74)	1383 (72)	55,1	*	*	1,9 (100)	*	*	*
N7	*	62 (99)	58 (99)	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	1268 (74)	1118 (78)	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	463 (90)	437 (91)	*	*	*	2,8 (100)	*	*	*
I8	36	991 (80)	943 (81)	*	*	*	1,7 (100)	*	*	*
I9	*	1106 (78)	1074 (79)	*	56,9	*	1,8 (100)	*	*	*
C3	*	661 (87)	629 (87)	*	*	*	2,9 (100)	*	*	*
C4	*	2026 (60)	1883 (62)	*	*	*	3,1 (100)	*	670,7	*
C9	*	153 (97)	145 (97)	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	897 (82)	853 (83)	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	828 (83)	773 (84)	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	≥5000	≥5000	*	*	*	704	*	*	*

A produção de TNF α foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC-IL10 cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

4.4.3 Produção de IL-10 por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, com e sem estímulo com antígenos da Hsp60

A citocina IL-10 foi muito escassamente produzida pelas DCs nos diferentes estágios de maturação. Não detectamos produção espontânea de

IL-10 em quaisquer das culturas com mDCs (Tabela 11) , porém nós a detectamos nas culturas de iDCs (DC25 e DC26) e de iDC IL-10 (DC25, DC26 e DC33) em 2 de 10 e em 3 de 10 experimentos realizados, respectivamente (Tabelas 12 e 13).

À maneira do que foi observado para as citocina pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , os antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir a produção espontânea da citocina antiinflamatória IL-10 pelas iDC e iDC IL-10, bem como de induzir a produção dessa citocina pelas DCs nos três diferentes estágios de diferenciação.

Com relação à inibição da produção espontânea de IL-10, todos os peptídeos da Hsp60 foram capazes de inibi-la nas culturas de iDC em 2 dos 3 experimentos em que tal produção espontânea ocorreu (DC25 e DC26). Nas culturas com iDC IL-10 observamos inibição da produção espontânea de IL-10 nos três experimentos em que houve produção espontânea. Dos três experimentos em que houve produção espontânea de IL-10 nas culturas com iDC IL-10 os antígenos N2, N4, N6, I4, I8, I9, C3 e C4 foram capazes de inibir tal produção em todos eles. Os antígenos N3, N7, C9, p277 e C-Hsp60 inibiram a produção espontânea de IL10 em 2 dos 3 experimentos.

A produção de IL-10 induzida por antígenos da Hsp60, foi observada nos três diferentes grupos de DCs, ainda que em baixa frequência. Nas culturas de mDC tal produção foi observada em um único experimento (DC35) e em resposta a um único peptídeo (N4) (Tabela 11). Nas culturas com iDC observamos produção de IL-10 em resposta aos antígenos da

Hsp60, notadamente aos peptídeos I8 e C4 (1 de 9 experimentos, cada) (Tabela 12).

Tabela 11 - mDCs: produção de IL-10 após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	*	*	*	*	21,6	*	nr
N6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-10 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de mDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. nr = não realizado. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Nas culturas com iDC IL-10 também observamos produção induzida de IL-10, mas apenas em resposta ao peptídeo C4 (2 de 10 experimentos) (Tabela 13). É interessante notar que o antígeno C4 induziu a produção de IL-10 em ambos os grupos de células imaturas: iDC e iDC IL-10.

Tabela 12 - iDCs: produção de IL-10 após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	8 (95)	9 (95)	*	*	*	*	*	*	*
N3	*	16 (90)	15 (92)	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	11 (93)	12 (94)	*	*	*	*	*	*	*
N6	*	18 (89)	21 (89)	*	*	*	*	*	*	*
N7	*	3 (98)	3 (98)	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	17 (89)	17 (91)	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	8 (95)	9 (95)	*	*	*	*	*	*	*
I8	*	13 (92)	15 (92)	*	*	*	*	*	*	29,9
I9	*	13 (92)	15 (92)	*	*	*	*	*	*	*
C3	*	12 (92)	16 (91)	*	*	*	*	*	*	*
C4	*	16 (90)	17 (91)	*	*	*	47,8	*	*	*
C9	*	8 (95)	10 (95)	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	12 (92)	14 (92)	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	15 (91)	14 (94)	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	160	184	*	*	*	*	*	*	23,1

A produção de IL-10 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. ■=inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Tabela 13 - iDC IL-10: produção de IL-10 após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	15 (94)	17 (94,)	*	*	1,2 (100)	*	*	*	nr
N3	*	17 (94)	19 (94)	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	20 (92)	22 (92)	*	*	0 (100)	*	*	*	nr
N6	*	24 (91)	28 (91)	*	*	1,7 (100)	*	*	*	nr
N7	*	5 (98)	5 (98)	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	19 (93)	21 (93)	*	*	nr	*	*	*	nr
I4	*	14 (95)	20 (93)	*	*	1,9 (100)	*	*	*	nr
I8	*	18 (93)	21 (93)	*	*	1,7 (100)	*	*	*	nr
I9	*	20 (92)	22 (93)	*	*	0 (100)	*	*	*	nr
C3	*	13 (95)	14 (95)	*	*	1,4 (100)	*	*	*	nr
C4	*	24 (91)	24 (92)	*	22,9	2,5 (100)	*	*	20,9	nr
C9	*	8 (97)	8 (97)	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	17 (94)	20 (93)	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	19 (93)	21 (93)	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	264	298	*	*	4306,7	*	*	*	*

A produção de IL-10 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC-IL10 cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. nr = não realizado. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Vale destacar que os níveis de IL-10, induzidos por antígenos da Hsp60 foram baixos em todos os estágios de maturação avaliados.

4.4.4. Produção de IL-4 por células dendríticas em diferentes estágios de maturação, com e sem estímulo com antígenos da Hsp60

A produção espontânea da citocina IL-4 foi observada em frequência muito baixa nos três diferentes grupos de células: mDCs (1 de 10 experimentos; DC33), iDC (1 de 10 experimentos; DC34) e iDC IL-10 (2 de 10 experimentos; DC33, DC34).

A produção espontânea da citocina IL-4 foi inibida nas mDC pelos antígenos N2, N3, N7 e I9 (1 de 10 experimentos cada um deles ambos) e nas iDC IL-10 pelos antígenos I4 e I9 (também em 1 de 10 experimentos cada um deles).

Em adição à inibição da produção espontânea de IL-4, os antígenos da Hsp60 foram capazes de também induzir a produção dessa citocina nos três diferentes tipos de DCs. Nas mDC houve produção dessa citocina em resposta aos peptídeos C9 (3 de 10 experimentos) e p277 (1 de 10 experimentos) (Tabela 14). No grupo das iDCs, o único antígeno responsável pela indução da produção de IL-4 foi o peptídeo C3 em 1 de 10 experimentos (Tabela 15). No grupo das iDC IL-10 foi onde mais observamos produção induzida de IL-4. Os antígenos da Hsp60 que induziram a produção dessa citocina nesse grupo das células foram os peptídeos N4, I9 e C9 (1 de 10 experimentos, cada) (Tabela 16).

Em todos os grupos de células dendríticas a IL-4 foi produzida apenas em baixos níveis pelos estímulos supra-referidos.

Tabela 14 - mDCs : produção de IL-4 após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	*	*	14,1 (51)	*	*	*	nr
N3	*	*	*	*	*	11 (62)	*	*	*	*
N4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	*	*	*	*	9,4 (67)	*	*	*	*
N10	*	*	*	*	*	nr	*	*	*	nr
I4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I9	*	*	*	*	*	14,2 (51)	*	*	*	nr
C3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C9	*	*	*	*	*	31,5	*	*	21,9	23
P277	*	*	*	*	*	*	*	*	23,1	*
C-Hsp60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	*	*	*	*	28,8	*	*	*	*

A produção de IL-4 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de mDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. nr = não realizado. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Para as mDC a produção espontânea de IL-4 foi inibida principalmente por peptídeos derivados da região aminoterminal da Hsp60

Tabela 15 - iDCs: produção de IL-4 após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C3	*	*	*	*	*	22	*	*	*	nr
C4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
P277	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	*	*	*	*	*	20	*	*	*

A produção de IL-4 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

Tabela 16 - iDC IL-10: produção de IL-4 após estímulo com antígenos da Hsp60

Antígenos da Hsp60	Experimento									
	DC24	DC25	DC26	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37
N2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	*	*	23,4	*	*	*	nr
N6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
N7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I4	*	*	*	*	*	*	10,4 (55,6)	*	*	nr
I8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
I9	*	*	*	*	*	11,2 (51)	23,7	*	*	nr
C3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nr
C9	*	*	*	*	*	25,8	*	*	*	*
P277	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Sem estímulo	*	*	*	*	*	22,9	23,4	*	*	*

A produção de IL-4 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de iDC-IL10 cultivadas com e sem antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (produção espontânea) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja espontânea, seja induzida por antígenos. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. A percentagem de inibição está em parênteses. = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção espontânea de citocina. Foram realizados experimentos com sobrenadantes de culturas celulares de 10 indivíduos diferentes.

4.5. Auto-reatividade de linfócitos T a células dendríticas e a antígenos da Hsp60

Objetivando estudar a auto-reatividade de linfócitos T a células dendríticas e a antígenos da Hsp60 nós cocultivamos linfócitos T autólogos

com células dendríticas em três diferentes estágios de maturação (mDC, iDC ou iDC IL-10), não estimuladas ou estimuladas com antígenos da Hsp60. Utilizamos dois parâmetros para mensuração da auto-reatividade: análise da produção de citocinas nos sobrenadantes coletados após 48 horas de cocultura e análise das respostas linfoproliferativas. Os sobrenadantes foram avaliados quanto à presença de seis citocinas: IFN- γ ; TNF- α ; IL-10; IL-5; IL-4 e IL-2. As respostas linfoproliferativas foram medidas como índice de estimulação da cocultura em relação ao controle linfócito T ou célula dendrítica sozinhos (DC+LT/LT ou DC+LT/DC), dependendo de que tipo celular apresentasse maior cpm.

4.5.1 Proliferação

A análise da auto-reatividade em termos de resposta proliferativa de LT autólogos purificados nos permitiu observar auto-reatividade de linfócitos T frente à DC nos três diferentes estágios de maturação (mDC, iDC e iDC IL-10). Observamos, porém, que nos experimentos com as mDC houve maior frequência de positividade (7 de 10 experimentos) em comparação com os dois tipos de DCs imaturas (iDC e iDC IL-10, ambas 4 de 10 experimentos) (Quadro 2 e Tabela 17). Nos experimentos em que tal auto-reatividade foi observada investigamos se os diferentes antígenos da Hsp60 eram capazes de inibir a intensidade dessa resposta em pelo menos 50%. Verificamos que tal inibição ocorre nos três diferentes tipos de coculturas. Pelo menos 1 antígeno da Hsp60 foi capaz de inibir a resposta linfoproliferativa frente às mDC em 7 dos 7 experimentos em que havia proliferação (Quadro 2). Tanto antígenos da região aminoterminal quanto antígenos da região

Resultados

Tabela 17. Auto-reatividade celular: resposta proliferativa de linfócitos T a células dendríticas maduras e imaturas

Condição	Resposta linfoproliferativa (cpm)										frequência de positividade
	DC27	DC28	DC29	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37	
LT	334,6	353,1	631,2	415,4	271,9	146,8	361,3	259,7	238,5		7 / 10
mDC	173,3	172,4	245,9	318,3	134	391,4	387,6	148,5	153		
mDC+LT	1980,3	1174,5	1496,1	3140,7	333,3	948,9	725,9	729,6	907,1	327,9	
LT	73,6	220	246,6	415,4	271,9	146,8	361,3	139,8	241,4	327,9	4/10
iDC	353,2	970,3	379,4	140,8	137,3	186,3	104,9	152,8	125,6	132,9	
iDC+LT	358,6	2282	658,7	757,6	322,7	261,6	1840,7	210,3	1341,6	850,2	
LT	381	158,2	986,1	415,4	271,9	146,8	361,3	139,8	241,4	327,9	4/10
iDC IL10	311,1	248	148,7	135,7	151,4	249,44	135	149,3	102,7	351,5	
iDC IL10+LT	782	1099,1	1168	543,81	311,33	277,7	611,3	196,1	1000,8	1203,7	

Células dendríticas maduras (mDC), imaturas (iDC) ou imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), não estimuladas com antígenos exógenos, foram cocultivadas com linfócitos T (LT) autólogos por 5 dias. A resposta proliferativa das células nessas coculturas foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. A auto-reatividade (mDC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das DCs sozinhas, dependendo de quem apresentasse maiores cpm. = cpm usada para dividir a cpm da condição DC+LT. = valores de cpm $\geq 2 \times$ as cpm usadas como denominador. Foram realizados experimentos com células de 10 indivíduos diferentes.

Resultados

DC	Auto-reatividade de linfócitos T às DCs																								
	Citocinas															Resposta proliferativa									
	IFN- γ					TNF- α					IL-5					IL-2									
mDC	DC 27	DC28	DC29	DC33		DC28	DC29	DC33	DC34		DC28	DC29				DC27	DC28	DC29			DC27	DC28	DC29	DC31	DC33
																					DC35	DC36			
iDC	DC27	DC28				DC27	DC33									DC27					DC28	DC34	DC36	DC37	
iDC IL10	DC28					DC28					DC28					DC28					DC27	DC28	DC36	DC37	

Quadro 2 – Balanço da auto-reatividade de linfócitos T às diferentes DCs: perfil da produção de citocinas e de proliferação celular. A produção de citocinas foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de 48 horas de LT+ DC (auto-reatividade às DCs). Representamos a frequência de produção de cada citocina nas diferentes coculturas com os diferentes tipos de DCs. iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10; mDC: maduras. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. As resposta linfoproliferativas foram medidas como índices estimulação obtidos como a razão entre a cpm média da cocultura e aquela dos linfócitos T ou das células dendríticas sozinhas, dependendo de qual das duas apresentasse maiores cpm. Cada casela representa um experimento. ■ : Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas mDC. ■ Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas iDC. ■ Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas iDC IL-10. Os números dentro das caselas referem-se a cada experimento com produção de citocinas e resposta linfoproliferativa na auto-reatividade LT x DC. Foram realizados experimentos com células de 10 indivíduos diferentes.

carboxiterminal foram capazes de inibir as resposta proliferativas nas culturas com mDC, no entanto os antígenos que o fizeram mais freqüentemente foram o peptídeo N7 (inibiu a proliferação em 5 dos 7 experimentos) e o peptídeo C3 e a proteína C-Hsp60 (ambos inibiram proliferação em 4 dos 7 experimentos) (Tabela 18 e Figuras 10a e b). Nas coculturas com iDCs, os antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir a proliferação em 3 dos 4 experimentos. Também para esse grupo de células, os antígenos que mais freqüentemente inibiram as respostas de linfoproliferativas frente as DCs foram os antígenos N7 (em 2 dos 3 em que houve inibição), C3 e C-Hsp60 (ambos em 2 dos 3 em que houve inibição) (Quadro 2, Tabela 19 e Figuras 11a e b). Finalmente, observamos que os antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir a resposta linfoproliferativa dirigida às iDC IL-10 sem antígenos exógenos, em todos os 4 experimentos em que tal proliferação foi detectada. Também para esse grupo de células observamos que o peptídeo N7 foi capaz de inibir a proliferação em todos os 4 experimentos. Note-se, no entanto que em adição ao N7 outros antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir a proliferação de LT com as iDC IL-10. Dentre tais antígenos destacam-se: o peptídeo p277 (em 3 de 4 experimentos) C-Hsp60 e o peptídeo C3 (em 2 de 4 experimentos) (Quadro 2, Tabela 20 e Figuras 12a e b).

Analizando a indução de resposta linfoproliferativa dirigida aos diferentes antígenos da Hsp60, no contexto da apresentação pelas DC nos diferentes estágios de maturação, observamos o seguinte: Os antígenos da Hsp60 foram capazes de induzir resposta linfoproliferativa

independentemente do estágio de maturação da DC envolvida na resposta. Observamos, porém, uma maior frequência de auto-reatividade a antígenos da Hsp60 nas coculturas com as iDCs (em 6 dos 10 experimentos) (Quadro 2, Tabela 20 e Figuras 11a e b) do que naquelas com as mDCs (em 5 de 10 experimentos) (Quadro2, Tabela 19 e Figuras 10a e b) e com as iDCs IL-10 (em 4 de 10 experimentos) (Quadro 2, tabela 21 e Figuras 12a e b). Também foi nas coculturas com as iDCs que observamos resposta a um maior número de antígenos da Hsp60. Vale destacar que nas coculturas com nesse grupo de DC o peptídeo C3 mostrou-se imunodominante induzindo proliferação em 6 de 10 experimentos. Nas coculturas com mDC e com iDC IL-10 o antígeno que induziu proliferação com maior frequência foi o peptídeo p277 (4 de 10 e 3 de 10 experimentos, respectivamente). No entanto o peptídeo C3, imunodominante nas coculturas com iDC, também induziu linfoproliferação nas coculturas com as mDCs (em 3 de 10 experimentos) e com as iDCs IL-10 (em 2 dos 10 experimentos).

Analisando a intensidade da resposta linfoproliferativa não verificamos índices de estimulação variáveis nas 3 diferentes coculturas de DCs. Observamos, porém, que nas coculturas com as iDCs houve maior frequência de índices de estimulação > 3 (24 das 31 condições com antígenos da Hsp60 em que detectamos proliferação = 77%) (Tabela 20) do que nas coculturas com mDC (em 4 das 11 condições com antígenos da Hsp60 em que detectamos proliferação = 36%) (Tabela 19) ou com iDCs IL-10 (em 10 das 16 condições com antígenos da Hsp60 em que detectamos proliferação = 62%) (Tabela 21).

Tabela 18 . Auto-reatividade celular: resposta proliferativa de linfócitos T às mDC pulsadas com antígenos da Hsp60.

Antígeno	mDC										Total de positividade
	DC27	DC28	DC29	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37	
N2	0,82	1,22	1,57	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	5/10
N3	1,41	0,96	1,59	0,35	0,61	1,95	9,67	0,31	0,26	1,84	
N4	0,85	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
N6	1,11	1,41	1,61	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
N7	0,16	0,42	1,01	0,31	0,63	0,54	4,5	0,18	0,35	0,98	
N10	1,09	1,82	2,19	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
I4	1,32	nr	0,82	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
I8	1,35	1,45	1,88	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
I9	1,21	1,65	0,88	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
C3	0,16	0,32	2,9	2,87	1,13	0,6	1,38	0,41	0,3	2,69	
C4	1,18	1,83	1,62	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
C9	1,47	1,8	1,97	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
p277	1,45	0,85	1,68	2,59	1,27	3,33	3,39	0,39	0,41	2,21	
C-Hsp60	1,16	0,84	0,44	2,34	0,35	0,24	1,93	0,17	0,2	0,88	
PHA	43,96	78,52	48,39	18,43	165,68	29,82	161,25	27,39	20,95	40,51	
mDC+LT	5,9	3,3	2,4	7,6	1,2	2,4	1,9	2,8	3,8	1,2	7/10

LT = linfócitos T, mDC= células dendríticas maduras, N2, N3, N4, N6, N7, N10, I8, I9, C3, C4, C9, p277 e C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. mDC pulsadas ou não com antígenos da Hsp60 na concentração de 10 µM por 24 horas foram cultivadas com linfócitos T autólogos por 5 dias. A resposta proliferativa foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. A auto-reatividade às DCs (mDC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das mDCs sozinhas, dependendo de quem apresentasse maiores cpm. O efeito de cada antígeno da Hsp60 sobre a auto-reatividade de linfócitos T às mDC foi calculado dividindo-se a média de cpm dos linfócitos T cultivados com mDCs pulsadas com esse antígeno pela média de cpm da condição mDC+LT. Índice de estimulação (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E. $\leq 0,5$ indica inibição da proliferação. Antígeno que mais freqüentemente induziu proliferação: p277. Foram realizados 10 experimentos com células de indivíduos diferentes.

Tabela 19. Auto-reatividade celular: resposta proliferativa de linfócitos T às iDC pulsadas com antígenos da Hsp60.

Antígeno	iDC										Total de positividade
	DC27	DC28	DC29	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37	
N2	3,3	4,79	2,2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	6/10
N3	5,9	4,64	2,3	0,4	1,63	0,96	2,67	1,18	0,12	0,26	
N4	3,1	4,51	0,6	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
N6	1,8	8,45	4,4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
N7	0,4	0,34	2,2	0,5	0,52	0,99	2,16	1,38	0,26	0,71	
I4	7,1	5,18	0,7	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
I8	5,1	1,96	1,1	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
I9	5,1	1,18	0,8	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
C3	4,7	7,17	4,6	5,4	3,39	1,04	3,88	1,08	0,14	0,43	
C4	8,7	9,66	2,5	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
C9	1,4	9,62	2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	4/10
p277	1,2	5,78	3,3	0,6	1,3	1,89	0,78	1,29	0,19	0,64	
C-Hsp60	3,1	4,52	1,7	0,7	0,73	0,87	2,83	0,66	0,16	0,37	
PHA	56,8	31,65	82,8	26,4	152,35	108,17	54,02	121,89	19,72	58,03	
DC+LT	1	2,4	1,7	1,8	1,2	1,4	5,1	1,4	5,6	2,6	

LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas, N2, N3, N4, N6, N7, N10, I8, I9, C3, C4, C9, p277 e C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. iDC pulsadas ou não com antígenos da Hsp60 na concentração de 10 µM por 24 horas foram cultivadas com linfócitos T autólogos por 5 dias. A resposta proliferativa foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. A auto-reatividade às DCs (iDC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das iDCs sozinhas, dependendo de quem apresentasse maiores cpm. O efeito de cada antígeno da Hsp60 sobre a auto-reatividade de linfócitos T dirigida às iDCs foi calculado dividindo-se a média de cpm dos linfócitos T cultivados com iDCs pulsadas com esse antígeno pela média de cpm da condição iDC+LT. Índice de estimulação (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E. ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. Antígeno que mais freqüentemente induziu proliferação: C3. Foram realizados 10 experimentos com células de indivíduos diferentes.

Tabela 20. Auto-reatividade celular: resposta proliferativa de linfócitos T às células iDC IL-10 pulsadas com antígenos da Hsp60.

Antígeno	iDC IL-10										Total de positividade
	DC27	DC28	DC29	DC31	DC32	DC33	DC34	DC35	DC36	DC37	
N2	3	2,82	0,3	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	4/10
N3	1,2	7,71	0,3	0,6	2,2	0,7	1,4	0,8	0,6	0,4	
N4	1,8	1,11	0,2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
N6	5,5	1,55	0,2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
N7	0,4	0,49	0,2	0,7	0,7	0,7	1,1	0,9	0,2	0,3	
I8	0,8	3,47	0,7	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
I9	8,2	0,46	0,2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
C3	4,4	0,52	1	1,1	2,3	0,5	1,3	1	0,3	0,3	
C4	2,6	1,05	0,3	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
C9	3,7	1,34	1,6	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	
p277	3,2	0,23	0,3	1,7	7,9	0,9	2,4	1,1	0,2	0,4	4/10
C-Hsp60	3,4	1,39	0,3	0,8	0,9	0,6	3,6	0,8	0,1	0,2	
PHA	103	58,4	41,5	93,8	139,7	36,4	121,8	125,4	34,3	30,6	
DC+LT	2,1	4,4	1,2	1,3	1,1	1,1	1,7	1,3	4,1	3,4	4/10

LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas, N2, N3, N4, N6, N7, N10, I8, I9, C3, C4, C9, p277 e C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. iDC pulsadas ou não com antígenos da Hsp60 na concentração de 10 µM por 24 horas foram cultivadas com linfócitos T autólogos por 5 dias. A resposta proliferativa foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. A auto-reatividade às DCs (iDC IL-10+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das iDCs IL-10 sozinhas, dependendo de quem apresentasse maiores cpm. O efeito de cada antígeno da Hsp60 sobre a auto-reatividade de linfócitos T dirigida às DC IL-10 foi calculado dividindo-se a média de cpm dos linfócitos T cultivados com iDC IL-10 pulsadas com esse antígeno pela média de cpm da condição iDC IL-10+LT. Índice de estimulação (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E. ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. Antígeno que mais freqüentemente induziu proliferação: p277. Foram realizados 10 experimentos com células de indivíduos diferentes.

Figura 10a. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T com mDCs: efeito dos antígenos da Hsp60 na proliferação. mDCs sem antígenos ou pulsadas com antígenos da Hsp60, na concentração 10 μ M por 24 h, foram cocultivadas com linfócitos T autólogos durante 5 dias. A proliferação dos linfócitos foi avaliada pela incorporação de timidina triciada adicionada às coculturas durante as últimas 18 h, e medida em cpm (contagens por minuto). As cpm obtidas na condição mDC+LT foram comparadas às cpm obtidas na presença dos diferentes antígenos da Hsp60 e do mitógeno PHA. Quando a média das cpm nas condições com antígenos foi $\geq 2x$ do que aquela sem antígenos (mDC+LT), foi considerado que aquele antígeno induziu proliferação. Quando, a média das cpm nas condições com antígenos foi 50% menor do que na condição sem antígenos (mDC+LT), foi considerado que aquele antígeno inibiu a auto-reatividade proliferativa às mDCs. A inibição só foi considerada para os testes em que houve proliferação de linfócitos T contra DCs (cpm de mDC+LT ≥ 2 vezes do que cpm de LT ou DC sozinhos). Em cinza estão as cpm das coculturas mDC+LT. Em branco, as cpm de mDC e de LT, sozinhos. * ensaios em que houve inibição da proliferação de LT dirigida às mDCs > 50%. Antígenos que inibiram proliferação: N3, N7, C3, C-Hsp60. n= 10 experimentos.

Resultados

Figura 10b. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T com mDCs: efeito dos antígenos da Hsp60 na proliferação. mDCs sem antígenos ou pulsadas com antígenos da Hsp60, na concentração 10 μ M por 24 h, foram cocultivadas com linfócitos T autólogos durante 5 dias. A proliferação dos linfócitos foi avaliada pela incorporação de timidina triciada adicionada às coculturas durante as últimas 18 h, e medida em cpm (contagens por minuto). As cpm obtidas na condição mDC+LT foram comparadas às cpm obtidas na presença dos diferentes antígenos da Hsp60 e do mitógeno PHA. Quando a média das cpm nas condições com antígenos foi $\geq 2x$ do que aquela sem antígenos (mDC+LT), foi considerado que aquele antígeno induziu proliferação. Quando, a média das cpm nas condições com antígenos foi 50% menor do que na condição sem antígenos (mDC+LT), foi considerado que aquele antígeno inibiu a auto-reatividade proliferativa às mDCs. A inibição só foi considerada para os testes em que houve proliferação de linfócitos T contra DCs (cpm de mDC+LT ≥ 2 vezes do que cpm de LT ou DC sozinhos). Em cinza estão as cpm das coculturas mDC+LT. Em branco, as cpm de mDC e de LT, sozinhos. * ensaios em que houve inibição da proliferação de LT dirigida às mDCs > 50%. Antígenos que inibiram proliferação: N3, N7, C3, p277 e C-Hsp60. n= 10 experimentos.

Figura 11a. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T com iDCs: efeito dos antígenos da Hsp60 na proliferação. mDCs sem antígenos ou pulsadas com antígenos da Hsp60, na concentração 10 μ M por 24 h, foram cocultivadas com linfócitos T autólogos durante 5 dias. A proliferação dos linfócitos foi avaliada pela incorporação de timidina triciada adicionada às coculturas durante as últimas 18 h, e medida em cpm (contagens por minuto). As cpm obtidas na condição mDC+LT foram comparadas às cpm obtidas na presença dos diferentes antígenos da Hsp60 e do mitógeno PHA. Quando a média das cpm nas condições com antígenos foi $\geq 2x$ do que aquela sem antígenos (iDC+LT), foi considerado que aquele antígeno induziu proliferação. Quando, a média das cpm nas condições com antígenos foi 50% menor do que na condição sem antígenos (iDC+LT), foi considerado que aquele antígeno inibiu a auto-reatividade proliferativa às iDCs. A inibição só foi considerada para os testes em que houve proliferação de linfócitos T contra DCs (cpm de iDC+LT ≥ 2 vezes do que cpm de LT ou DC sozinhos). Em cinza estão as cpm das coculturas iDC+LT. Em branco, as cpm de iDC e de LT, sozinhos. * ensaios em que houve inibição da proliferação de LT dirigida às iDCs > 50%. Antígenos que inibiram proliferação: N3 e N7. n= 10 experimentos.

Resultados

Figura 11b. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T com iDCs: efeito dos antígenos da Hsp60 na proliferação. mDCs sem antígenos ou pulsadas com antígenos da Hsp60, na concentração 10 μ M por 24 h, foram cocultivadas com linfócitos T autólogos durante 5 dias. A proliferação dos linfócitos foi avaliada pela incorporação de timidina triciada adicionada às coculturas durante as últimas 18 h, e medida em cpm (contagens por minuto). As cpm obtidas na condição mDC+LT foram comparadas às cpm obtidas na presença dos diferentes antígenos da Hsp60 e do mitógeno PHA. Quando a média das cpm nas condições com antígenos foi $\geq 2x$ do que aquela sem antígenos (iDC+LT), foi considerado que aquele antígeno induziu proliferação. Quando, a média das cpm nas condições com antígenos foi 50% menor do que na condição sem antígenos (iDC+LT), foi considerado que aquele antígeno inibiu a auto-reatividade proliferativa às iDCs. A inibição só foi considerada para os testes em que houve proliferação de linfócitos T contra DCs (cpm de mDC+LT ≥ 2 vezes do que cpm de LT ou DC sozinhos). Em cinza estão as cpm das coculturas iDC+LT. Em branco, as cpm de iDC e de LT, sozinhos. * ensaios em que houve inibição da proliferação de LT dirigida às iDCs > 50%. Antígenos que inibiram proliferação: N3, N7, C3, p277 e C-Hsp60. n= 10 experimentos.

Figura 12a. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T com iDC IL-10s: efeito dos antígenos da Hsp60 na proliferação. iDC IL-10s sem antígenos ou pulsadas com antígenos da Hsp60, na concentração 10 μ M por 24 h, foram cocultivadas com linfócitos T autólogos durante 5 dias. A proliferação dos linfócitos foi avaliada pela incorporação de timidina triciada adicionada às coculturas durante as últimas 18 h, e medida em cpm (contagens por minuto). As cpm obtidas na condição iDC IL-10+LT foram comparadas às cpm obtidas na presença dos diferentes antígenos da Hsp60 e do mitógeno PHA. Quando a média das cpm nas condições com antígenos foi $\geq 2x$ do que aquela sem antígenos (iDC IL-10+LT), foi considerado que aquele antígeno induziu proliferação. Quando, a média das cpm nas condições com antígenos foi 50% menor do que na condição sem antígenos (iDC IL-10+LT), foi considerado que aquele antígeno inibiu a auto-reatividade proliferativa às iDC IL-10s. A inibição só foi considerada para os testes em que houve proliferação de linfócitos T contra DCs (cpm de iDC IL-10+LT ≥ 2 vezes do que cpm de LT ou DC sozinhos). Em cinza estão as cpm das coculturas iDC IL-10+LT. Em branco, as cpm de iDC IL-10 e de LT, sozinhos. * ensaios em que houve inibição da proliferação de LT dirigida às iDC IL-10 > 50%. Antígenos que inibiram proliferação: N2, N3, N4, N7, I9, C4, p277 e C-Hsp60. n= 10 experimentos.

Figura 12b. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T com iDC IL-10s: efeito dos antígenos da Hsp60 na proliferação. iDC IL-10s sem antígenos ou pulsadas com antígenos da Hsp60, na concentração 10 μ M por 24 h, foram cocultivadas com linfócitos T autólogos durante 5 dias. A proliferação dos linfócitos foi avaliada pela incorporação de timidina triciada adicionada às coculturas durante as últimas 18 h, e medida em cpm (contagens por minuto). As cpm obtidas na condição iDC IL-10+LT foram comparadas às cpm obtidas na presença dos diferentes antígenos da Hsp60 e do mitógeno PHA. Quando a média das cpm nas condições com antígenos foi $\geq 2x$ do que aquela sem antígenos (iDC IL-10+LT), foi considerado que aquele antígeno induziu proliferação. Quando, a média das cpm nas condições com antígenos foi 50% menor do que na condição sem antígenos (iDC IL-10+LT), foi considerado que aquele antígeno inibiu a auto-reatividade proliferativa às iDC IL-10s. A inibição só foi considerada para os testes em que houve proliferação de linfócitos T contra DCs (cpm de iDC IL-10+LT ≥ 2 vezes do que cpm de LT ou DC sozinhos). Em cinza estão as cpm das coculturas iDC IL-10+LT. Em branco, as cpm de iDC IL-10 e de LT, sozinhos. * ensaios em que houve inibição da proliferação de LT dirigida às iDC IL-10 > 50%. Antígenos que inibiram proliferação: N3, N7, C3, p277 e C-Hsp60. n= 10 experimentos.

4.5.2 Produção de citocinas

A análise da produção de citocinas no sobrenadante de coculturas de LT com as diferentes DC sem antígenos (DC x LT) nos permitiu observar auto-reatividade de LT dirigida aos três diferentes grupos de DC. Detectamos a produção de quatro citocinas (IFN γ , TNF- α , IL-5 e IL-2) nas três diferentes coculturas. As coculturas em que estas citocinas foram detectadas com maior frequência foi naquelas com mDC (Quadro 3). As frequências com que as diferentes citocinas foram detectadas nas diferentes coculturas foram as seguintes: (i) IFN- γ : nas mDC, em 4 dos 10 experimentos (Quadro 3 e Tabela 21); nas iDCs, em 2 de 10 experimentos (Quadro 3 e Tabela 22) e para as iDC IL-10 em apenas 1 de 10 experimentos (Quadro 3 e Tabela 23). (ii) TNF- α : detectado nas coculturas de linfócito T + DCs exatamente nas mesmas frequências encontradas para IFN γ , apesar de nem sempre nos mesmos experimentos (Tabelas 24, 25 e 26 para mDC, iDC e iDC IL-10, respectivamente). (iii) IL-5 (detectada em menor frequência do que IFN γ e TNF- α): nas coculturas com mDC foi detectada em 2 de 10 experimentos (Quadro 3 e Tabela 27), nas coculturas com iDC IL-10 em 1 de 10 experimentos (Quadro 3 e Tabela 29) e nas coculturas com iDC não foi detectada. (iv) IL-2: detectada em 3 de 10 experimentos nas coculturas com mDCs (Quadro 3 e Tabela 30) e 1 de 10 experimentos para ambas, iDC e iDC IL-10 (Quadro 3 e tabelas 31 e 32, respectivamente).

Resultados

Quadro 3 – Coculturas de DCs e linfócitos T: Balanço do perfil de citocinas produzidas na auto-reatividade às DC e após o estímulo com os antígenos da Hsp60

Cocultura	Auto-reatividade de linfócitos T																	Condição (DC+LT)					
	Citocina													Resposta proliferativa									
	IFN- γ				TN- α				IL-5				IL-2										
mDC+LT	DC27	DC28	DC29	3/10	DC27	DC28	2/10	DC27	DC28	DC29	3/10	DC27	DC28	DC29	3/10	DC29	DC31	DC33	DC34	DC37	com Ag		
	5/10																5/10				sem Ag		
	N3, N7, N10, C3, p277 e C-Hsp60																						
	Todos				Todos				Todos				Todos										
iDC+LT	DC 27	DC28	DC29	DC33	DC28	DC29	DC33	DC 34	DC28	DC29	DC27	DC28	DC29	DC27	DC28	DC29	DC27	DC28	DC29	DC31	DC33	com Ag	
	DC35				DC36																sem Ag		
	N2, N3, N6, N7, I 8, I9, C3, C4 e C-Hsp60				todos menos N2, N4, N7, C3 C9 e p277				N6, N7, I4, I8, I9, C3 e C4				N6, N7, I4, I8, I9, C3 e C4				N3, N7, C3, p277 e C-Hsp60						
	Todos menos N3, N4 e I9				Todos menos I9				Todos menos N4 e I9				Todos menos N4				todos						
iDC IL-10+LT	DC27	DC28	DC29	DC32	DC33	DC27	DC28	DC29	3/10	DC27	DC28	DC29	3/10	DC27	DC28	DC29	3/10	DC27	DC28	DC29	DC31	DC32	com Ag
	5/10																DC34				6/10	sem Ag	
	Todos menos N3, N4 e I9				Todos menos I9				Todos menos N4 e I9				Todos menos N4										
	DC27				DC28	DC27	DC33	DC27	DC34	DC36	DC37												
	Todos menos N2				N3												N3 , N7 , C3, p277 e C-Hsp60				com Ag		
	DC27	DC28	2/10	DC27	DC28	DC32	3/10	DC27	DC28	2/10	DC27	DC29	2/10	DC27	DC28	DC29	DC32	DC34	com Ag				
	5/10																5/10				sem Ag		
	Todos menos I8				Todos menos C4 e C9				Todos menos I8				Todos menos I8				N2, N3, N6, I8, C3, C4, C9, p277 e C-Hsp60						
DC28				DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC28	DC27	DC28	DC36	DC37	com Ag				
Todos menos N6, C4 e C9				N3, N4, I4, C4, C9 e C-Hsp60				I8, I9 e C3				N2, N3, N7, I4, I8, I9, C3 e C-Hsp60				N3, N7, I9, p277 e C-Hsp60							

Quadro 3. Balanço da auto-reatividade de linfócitos T a antígenos da Hsp60 no contexto de diferentes DCs: produção de citocinas e proliferação. A produção de citocinas foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de culturas de 48 horas de LT+ DC, seja com DC previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 (auto-reatividade Ag Hsp60) ou sem antígenos (auto-reatividade a DC). Representamos a frequência de produção de cada citocina nas diferentes coculturas com os diferentes tipos de DCs. mDCs: Células dendríticas maduras; iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (auto-reatividade às DC) e > limite mínimo de detecção. A resposta proliferativa das células nas coculturas foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. A auto-reatividade [(DC+ag)+LT] foi dada em índice de estimulação (I.E), calculado dividindo-se as médias de cpm da condição[(DC+ag)+LT] pela média de cpm da condição DC+ LT. $I.E \geq 2$ = proliferação. $I.E \leq 0,5$ = inibição de proliferação. ■ : Experimentos com valores positivos para a produção de citocinas e proliferação celular induzida por antígenos da Hsp60. Os antígenos da Hsp60 que induziram produção de citocinas ou proliferação celular estão marcados logo abaixo. □ : não houve inibição da produção de citocinas ou proliferação celular com relação à condição DC+LT. ■ : experimentos com inibição > 50% da produção de citocinas ou proliferação celular detectada na auto-reatividade DC+LT, por algum antígeno da Hsp60. Os antígenos da Hsp60 que inibiram a produção de citocinas ou a proliferação celular estão marcados logo abaixo. Foram realizados experimentos com células de 10 indivíduos diferentes.

Tabela 21 – Coculturas mDC+LT autólogos: Efeito dos antígenos da Hsp60 sobre a produção de IFN γ

Antígenos	IFN γ									
	mDC									
	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	365	44	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	217	*	262	*	*	0	*	*	*	*
N4	421	*	129	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	424	46	22	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	399	*	5	*	*	*	*	*	*	*
I4	349	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	655	183	16	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	292	*	19	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	475	561	30	*	*	*	*	*	*	*
C4	566	*	15	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	432	1346	724	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	436	*	103	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	650	143	*	*	*	2,7	*	*	*	*
mDC +LT +PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	59,8	≥ 5000	≥ 5000	73,9	410	107
mDC+ LT	108	118	81,2	*	*	546	*	*	*	*

A produção de IFN γ foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com mDC sem antígenos (DC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (DC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. mDC = células dendríticas maduras. LT = linfócitos T. mDC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 22 – Coculturas iDC+LT autólogos: efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IFN γ

Antígenos	IFN γ									
	iDC									
	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	1959	36	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	44	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	26	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	14	451	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	18	*	484	*	*	*	*	*	*	*
I4	33	80	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	58	274	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	15	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	21	28	28	*	*	*	*	*	*	*
C4	117	272	22	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	73	253	86	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	150	*	*	*	47,7	*	*	*	*	*
CHSP60	115	277	21	*	*	22,1	*	*	*	*
iDC + LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	806	≥ 5000	1204	≥ 5000	116	502	≥ 5000
iDC+ LT	561	23	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IFN γ foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC sem antígenos (iDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. iDC = células dendríticas imaturas. LT = linfócitos T. iDC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 23 – Coculturas iDC IL-10+LT autólogos: efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IFN γ

Antígenos	IFN γ									
	iDC IL-10									
	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	99	31	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	123	14	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	192	35	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	279	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	82	37	*	*	*	*	*	*	*	*
I4	310	57	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	*	32	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	21	3	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	126	13	*	*	*	*	*	*	*	*
C4	178	172	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	107	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	119	53	*	*	*	*	*	*	*	*
CHSP60	149	5	*	*	*	*	*	*	*	*
iDC IL-10+ LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	429,1	189,4	994,4	*	133,1	1250	76,9
iDC IL-10 + LT	*	122	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IFN γ foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC IL-10 sem antígenos (iDC IL-10+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC IL-10+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. iDC IL-10 = células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT = linfócitos T. iDC IL-10 + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, CHSP60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 24 - Coculturas mDC +LT autólogos: efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de TNF α .

Antígenos	TNF α									
	mDC									
	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	73	72	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	40	98	*	*	*	*	1,9	*	*	*
N4	113	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	77	*	21	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	97	70	8	*	*	*	0	*	*	*
I4	87	0	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	124	*	15	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	78	83	15	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	63	86	16	*	*	*	1,4	*	*	*
C4	76	95	2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	106	767	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	81	82	*	*	*	4,1	0	*	*	*
C-Hsp60	89	*	*	*	*	*	0	*	*	*
mDC+ LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	460,0	268,6	78,6	218,6	124,8	133,5
mDC+ LT	*	67,0	73,5	*	*	81,7	36,7	*	*	*

A produção de TNF α foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com mDC sem antígenos (mDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (mDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. mDC = células dendríticas maduras. LT = linfócitos T. mDC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizados. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 25 – Coculturas iDC +LT autólogos: Efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de TNF α .

Antígenos	TNF α									
	iDC									
	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	48	31	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	*	42	*	*	*	76,4	*	*	*	*
N4	*	21	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	*	96	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	*	*	28	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	31	*	*	*	*	*	*	*	*
I8	*	197	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	*	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	*	40	*	*	*	*	*	*	*	*
C4	47	58	31	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	31	254	33	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	39	34	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	55	42	27	*	*	*	*	*	*	*
iDC+ LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	41,3	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	154	219	591
iDC+ LT	26	*	*	*	*	242	*	*	*	*

A produção de TNF α foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC sem antígenos (iDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. iDC = células dendríticas imaturas. LT = linfócitos T. DC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizados. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 26 – Coculturas iDC IL-10+LT autólogos: Efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de TNF α .

Antígenos	TNF α									
	iDC IL-10									
	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	67	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	121	18	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	43	35	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	296	nr	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	36	*	*	*	*	*	*	*	*	*
I4	70	19	*	*	*	*	*	*	*	*
I8	91	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	78	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	43	265	*	*	*	*	*	*	*	*
C4	*	13	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	*	3	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	42	146	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	193	8	*	*	26,3	*	*	*	*	*
iDC IL-10 + LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	32,5	784	537	*	71	1250	362
iDC IL10 + LT	*	60	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de TNF α foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC IL-10 sem antígenos (iDC IL-10+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC IL-10+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição $\geq 50\%$; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina em pg/ml. iDC il-10= células dendríticas. LT = linfócitos T. iDC IL-10 + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 27 – Coculturas mDC+LT autólogos: Efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IL-5.

IL-5										
mDC										
Antígenos	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	137	294	264	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	136	276	211	*	*	*	*	*	*	*
N4	149	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	189	*	52	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	110	188	18	*	*	*	*	*	*	*
I4	151	0	217	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	163	*	50	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	143	294	90	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	204	*	77	*	*	*	*	*	*	*
C4	145	267	7	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	226	927	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	152	198	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	162	*	273	*	*	*	*	*	*	*
mDC + LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	60	*	104	49	32	37	125
mDC+ LT	*	182,6	188	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-5 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com mDC sem antígenos (mDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (mDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. mDC = células dendríticas maduras. LT = linfócito T. mDC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizados. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 28 – Coculturas iDC+LT autólogos: Efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IL-5.

IL-5										
iDC										
Antígenos	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	*	25	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	*	40	53	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	*	91	73	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	*	*	64	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	39	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	*	99	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	*	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	*	42	121	*	*	*	*	*	*	*
C4	75	79	69	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	52	95	59	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	65	60	37	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	103	33	37	*	*	*	*	*	*	*
iDC + LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	*	86	41	627	86	66	27
iDC+ LT	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-5 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC sem antígenos (iDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina, seja induzida ou não por antígenos. * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. iDC = células dendríticas imaturas. LT = linfócito T. iDC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 29 – Coculturas iDC IL-10+LT autólogos: Efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IL-5.

IL- 5										
iDC IL-10										
Antígenos	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	117	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	110	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	42	95	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	167	nr	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	60	87	*	*	*	*	*	*	*	*
I4	100	78	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	*	20	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	32	1	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	93	12	*	*	*	*	*	*	*	*
C4	100	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	123	75	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	87	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	163	*	*	*	*	*	*	*	*	*
iDC IL-10 +LT +PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	*	31	325	*	31	*	48
iDC IL-10 + LT	*	69	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-5 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC IL-10 sem antígenos (iDC IL-10+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (DC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. iDC IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT = linfócito T. iDC IL-10 + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 30 – Coculturas mDC +LT autólogos: efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IL-2.

IL-2										
mDC										
Antígenos	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	344	467	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	158	442	395	*	*	*	*	*	*	*
N4	303	*	187	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	285	*	97	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	524	292	68	*	*	*	*	*	*	*
I4	406	0	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	438	335	105	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	318	381	97	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	406	425	83	*	*	*	*	*	*	*
C4	406	509	8	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	410	1010	470	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	332	421	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	623	433	*	*	*	*	*	*	*	*
mDC+ LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	78	222	27	23	561	552
mDC+ LT	38	222	381	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-2 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com mDC sem antígenos (mDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (mDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. ■ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. mDC = células dendríticas maduras. LT = linfócitos T. mDC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 31 – Coculturas iDC +LT autólogos: efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IL-2.

IL-2										
iDC										
Peptídeos	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	58	71	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	*	36	29	*	*	*	*	*	*	*
N4	*	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	*	399	54	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	*	53	142	*	*	*	*	*	*	*
I4	*	184	*	*	*	*	*	*	*	*
I8	*	752	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	*	50	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	*	84	63	*	*	*	*	*	*	*
C4	106	285	63	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	88	124	43	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	106	71	20	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	83	133	47	*	*	*	*	*	*	*
iDC+ LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	157	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	615	701	505
iDC+ LT	54	*	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-2 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC sem antígenos (iDC+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina em pg/ml. iDC = células dendríticas imaturas. LT = linfócitos T. DC + LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Tabela 32 – Coculturas iDC IL-10 +LT autólogos: efeito dos antígenos da Hsp60 humana sobre a produção de IL-2.

IL-2										
iDC IL-10										
Antígenos	DC 27	DC 28	DC 29	DC 31	DC 32	DC 33	DC 34	DC 35	DC 36	DC 37
N2	112	66	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N3	97	34	*	*	*	*	*	*	*	*
N4	77	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N6	159	nr	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
N7	87	64	*	*	*	*	*	*	*	*
I4	113	44	38	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I8	*	42	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
I9	32	4	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C3	61	24	*	*	*	*	*	*	*	*
C4	97	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
C9	176	*	*	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
P277	63	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C-Hsp60	137	24	*	*	*	*	*	*	*	*
iDC IL-10 + LT+PHA	≥ 5000	≥ 5000	≥ 5000	78	659	597	*	102	1250	22
iDC IL-10 + LT	*	146	*	*	*	*	*	*	*	*

A produção de IL-2 foi quantificada por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo, em sobrenadantes de coculturas de linfócitos T autólogos com iDC IL-10 sem antígenos (iDC IL-10+LT) ou previamente pulsadas com antígenos da Hsp60 por 48h. Os resultados estão expressos em pg/ml. Os valores mínimo e máximo de detecção foram 20 pg/ml e 5000 pg/ml, respectivamente. Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (iDC IL-10+LT) e > limite mínimo de detecção. Em negrito estão os valores brutos positivos para a produção da citocina induzida por antígenos, linfócitos T ou DCs. A inibição da produção de citocina pelos antígenos da Hsp60 foi avaliada quando houve produção na condição sem antígenos. □ = inibição ≥ 50%; * = não houve produção induzida ou não houve inibição da produção (condição sem antígeno) de citocina. iDC IL-10 = células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT = linfócitos T. iDC IL-10+ LT = produção basal da citocina. N2, N3, N4, N6, N7, I4, I8, I9, C3, C4, C9, P277, C-Hsp60 = antígenos da Hsp60. nr = não realizado. Foram realizados 10 experimentos com células de diferentes indivíduos.

Assim como fizemos para a resposta linfoproliferativa, também analisamos a capacidade dos antígenos da Hsp60 de inibir a produção de

citocinas induzida na auto-reatividade de linfócitos T dirigida aos três diferentes tipos de DC. Verificamos que os diferentes antígenos da Hsp60 foram capazes de inibir a produção de citocinas nas coculturas nos diferentes tipos de coculturas. Observamos que diversos antígenos foram capazes de inibir a produção das variadas citocinas, não sendo possível destacar apenas um ou poucos antígenos como inibidores.

Analisando agora a produção de citocinas em resposta aos diferentes antígenos da Hsp60, observamos que estes foram capazes de induzir a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-5 e IL-2 nos três diferentes tipos de coculturas. Comparando-se a produção das diferentes citocinas na auto-reatividade de linfócitos T à DCs e na auto-reatividade a antígenos da Hsp60 observamos maior frequência de auto-reatividade no segundo grupo. Ainda fazendo um paralelo da produção de citocinas entre os dois grupos de experimentos (DC + LT vs [DC+antígeno]+LT), notamos diferença entre o tipo de DC em que mais frequentemente se observou a produção de citocinas. De fato, enquanto que a produção de IFN- γ na auto-reatividade às DC sem antígenos (DC + LT) foi maior nas coculturas com as mDCs, na presença de antígenos da Hsp60 ([DC+antígeno]+LT) essa frequência foi maior nas coculturas com iDCs (5 de 10 experimentos nas coculturas com iDC, em contraste com 3 de 10 nas coculturas com mDCs e 2 de 10 nas coculturas com iDC IL-10) (Quadro 3). Diferença semelhante foi observada para a produção do TNF- α , uma vez que os antígenos da Hsp60 induziram produção dessa citocina mais frequentemente nas coculturas com iDC e iDC IL-10 (em 3 de 10 experimentos) (Tabelas 25 e 26) do que nas coculturas com mDC (em 2 de

10 experimentos) (Tabela 24). A produção de IL-5 induzida por antígenos da Hsp60 foi mais freqüente nas coculturas com as mDC e com as iDC (ambas em 3 de 10 experimentos) (Tabelas 27 e 28, respectivamente) e menor nas coculturas com as iDC IL-10 (2 de 10 experimentos) (Tabela 29). A produção de IL-2 induzida por antígenos da Hsp60 nas diferentes coculturas de DCs foi semelhante àquela observada para a IL-5, sendo mais freqüente nas mDC e iDC (ambas em 3 de 10 experimentos) (Tabelas 30 e 31, respectivamente) e menor nas coculturas com as iDC IL-10 (2 de 10 experimentos) (Tabela 32).

Vale destacar porém, que nas coculturas de LT com as mDC e antígenos da Hsp60, os níveis de IFN γ (103 a 1346 pg/ml em contraste com as DCs imaturas de 22 a 484pg/ml) TNF- α (40 a 767 pg/ml em contraste com as DCs imaturas de 27 a 296pg/ml), IL-5 (variando de 110 a 927 pg/ml em contraste com as DCs imaturas de 42 a 163pg/ml) e IL-2 (158 a 1010 pg/ml em contraste com as DCs imaturas de 22 a 484pg/ml) foram mais altos do que nas culturas com os dois tipos de DC imaturas (Tabelas 21, 24, 27 e 30 respectivamente).

Em resumo, observamos em nossos resultados a existência de auto-reatividade de linfócitos T contra células dendríticas em diferentes estágios de maturação tanto na resposta linfoproliferativa quanto pela produção de citocinas. Quanto à resposta linfoproliferativa, a freqüência de indução de auto-reatividade linfocitária pelos diferentes grupos de DC foi: mDC > iDC = iDC IL-10. Quanto à produção de citocinas o perfil detectado foi predominantemente inflamatório. Para a condição de estudo realizada nesse

trabalho (48 h de cocultura DC + LT na ausência de antígeno exógeno), a frequência de células produtoras das citocinas foi: (i) mDC> iDC> iDC IL-10 para IFN γ e TNF α ; (ii) mDC> iDC IL-10 para a IL-5 e (iii) mDC> iDC IL-10> iDC para a IL-2.

Os antígenos da Hsp60 foram capazes tanto de induzir quanto de inibir respostas linfoproliferativas autólogas dirigidas à DCs, independentemente do estágio de maturação das células dendríticas.

4.6 Regulação x inflamação: expressão de mRNA de fatores imunorreguladores (REG) e pró-inflamatórios (INFLAMA) em linfócitos T cocultivados com DC imaturas pulsadas com antígenos da Hsp60

O objetivo deste bloco experimental foi avaliar o perfil de um painel de genes imunoreguladores e inflamatórios expressos em linfócitos T, em resposta a antígenos da Hsp60. Inicialmente, planejamos realizar experimentos com os três grupos de DC. A nossa estratégia consistiu na cocultura dos linfócitos T purificados ($\geq 98\%$ de pureza) com células dendríticas previamente estimuladas com antígenos da Hsp60 por 24 h. Após 5 dias de cultura os linfócitos foram purificados ($\geq 98\%$ de pureza) e analisados quanto à expressão de genes predominantemente relacionados à imunorregulação (TGF β , receptor de TGF β , IL-10, Foxp3 e GATA3) ou predominantemente relacionados à inflamação (IFN- γ , TNF α e T-bet). A expressão desses genes foi avaliada por PCR em tempo real. Vale destacar que, em função de problemas técnicos não pudemos realizar experimentos com células dendríticas maduras, razão pela qual os dados apresentados

abaixo são referentes apenas a linfócitos cultivados com células dendríticas imaturas (iDC e iDC IL-10). Realizamos experimentos com células de 4 indivíduos diferentes (DC29, CD31, DC34 e DC35). Nos experimentos DC29, DC31 e DC34 foi possível analisar os resultados realizados com iDC e iDC IL-10, e, para o experimento DC35, apenas com as iDC IL-10 (Quadro 4).

Resultados

DC #	Estímulo	TGFβ	TGFβ R	IL-10	Foxp3	GATA3	IFNγ	TNFα	T-bet	Tipo DC	Predomínio REG/ INFLAMA
DC29	N3	2,4	4,5	0,2	0,9	1,0	0,8	0,3	1,2	iDC	
	N7	2,2	5,4	0,1	0,6	0,9	0,5	0,2	1,0		
	p277	3,2	5,9	0,2	0,5	1,0	0,4	0,1	1,3		
	C-Hsp60	1,7	nd	0,2	0,5	1,2	1,0	0,3	0,8		
	N3	0,3	1,9	6,9	0,9	3,5	2,1	4,6	1,6	iDC-IL-10	
	N7	0,6	2,0	2,2	2,0	3,2	3,9	3,4	1,4		
	p277	0,3	1,2	12,1	1,4	2,6	2,0	2,5	1,2		
	C-Hsp60	0,4	2,1	8,1	0,8	0,2	3,3	2,6	1,1		
DC31	N3	2,2	3,0	0,1	292,0	340,4	248,8	2,5	6807,9	iDC	equilíbrio
	N7	2,7	2,7	0,2	229,9	211,4	163,1	1,9	4028,4		
	p277	0,4	0,6	5,2	1,4	1,6	9,4	1,1	1,0		
	C-Hsp60	0,2	1,0	0,5	1,4	2,4	11,4	0,5	4,4		
	N3	0,2	1,1	0,3	0,0	0,0	0,9	0,9	0,0	iDC- IL-10	
	N7	1,2	0,7	8,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0		
	p277	1,0	0,9	5,6	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0		
	C-Hsp60	0,2	1,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3		
DC34	N3	1,4	1,5	0,1	1,5	1,2	3,2	0,9	0,5	iDC	
	N7	2,0	0,8	undet	0,4	0,6	1,1	0,5	0,2		
	p277	2,1	1,5	0,1	1,2	1,3	4,6	1,0	0,6		
	C-Hsp60	1,5	1,7	0,4	1,4	1,0	5,1	1,0	0,5		
	N3	1,2	1,3	0,4	1,0	0,8	0,9	0,9	1,6	iDC- IL-10	
	N7	1,5	0,9	6,2	0,7	0,9	0,6	0,7	1,4		
	p277	1,0	0,8	3,8	0,4	0,6	0,2	0,5	0,9		
	C-Hsp60	0,8	1,1	7,6	0,7	0,6	0,8	0,8	1,4		
DC35	N3	4,4	31,1	1,9	4,4	11,9	0,0	0,2	0,8	iDC- IL-10	
	N7	3,9	28,1	undet	4,9	8,7	0,0	0,2	0,9		
	p277	0,9	3,8	0,4	1,3	1,0	1,0	1,0	0,9		equilíbrio
	C-Hsp60	0,8	1,0	1,2	1,4	1,4	0,7	1,1	0,7		Sem modificação
Modificação REG		9,0	10,0	10,0	5,0	8,0	8,0	12,0	7,0		13
Modificação INFLAMA		7,0	0,0	16,0	8,0	5,0	11,0	5,0	3,0		12
Sem Modificação		12,0	17,0	2	15,0	15,0	9,0	11,0	18,0		1
No. Total condições		28,0	27,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0		28
Faixa ↑		2 a 4,4	2 a 21	2 a 12	4 a 383	2 a 340	2 a 249	2,4 a 4,6	2 a 4569		na
Faixa ↓		0,2 a 0,4	< 0,5	0,4 a 0,1	0,4 a 0,001	0,02 a 0,001	0,2 a 0,009	0,4 a 0,002	0,4 a 0,02		na

Quadro 4. Razão da expressão relativa de mRNA de fatores imunorreguladores e pró-inflamatórios em linfócitos T purificados após terem sido cocultivados com DC imaturas previamente incubadas com antígenos da Hsp60. As moléculas TGF β , IL-10, Foxp3 e GATA3 foram consideradas moléculas imunorreguladoras. IFN- γ , TNF- α e T-bet foram consideradas pró-inflamatórias. DC: células dendríticas. iDC: Células dendríticas imaturas. iDC IL-10: células dendríticas imaturas geradas com IL-10. Os resultados estão expressos como a razão entre a média dos resultados de amplificação na condição experimental com o antígeno da Hsp60 e a condição sem o antígeno, ambos relativos à expressão do gene endógeno de GAPDH. Os números em verde correspondem a resultados com aumento da expressão gênica e, em vermelho, diminuição. REG: quando houve modificação ou predomínio imunorregulador, seja com aumento de moléculas reguladoras, seja com diminuição das pró-inflamatórias. INFLAMA: quando houve modificação ou predomínio inflamatório, seja com aumento de moléculas pró-inflamatórias, seja com diminuição das reguladoras. Equilíbrio: quanto o número de modificações REG foi igual ao número de modificações INFLAMA. Os quadrantes em cinza correspondem a condições onde houve predomínio ou uma modificação REG e os em laranja quando houve predomínio ou uma modificação INFLAMA. na: não se aplica. No: número. Os números pretos em negrito correspondem à maior frequência encontrada na avaliação de modificação da expressão de mRNA para aquela molécula.

Afim de avaliar se o pulso das células dendríticas com antígenos da Hs60 era capaz de modular a expressão de cada um dos genes estudados, em linfócitos T, nós estabelecemos a razão da expressão de mRNA dos linfócitos T da condição de cultura com o antígeno, em relação à condição sem o antígeno, ambos em relação à expressão do gene controle endógeno, a enzima GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Os resultados, mostrados como índices de expressão relativa (IR) (números adimensionais) foram assim interpretados: $IR \geq 2$, aumento da expressão do gene em questão; $IR \leq 0,5$ diminuição da expressão do mRNA deste gene. As modificações na expressão gênica foram consideradas imunorreguladoras (REG) ou pró-inflamatórias (INFLAMA). Consideramos uma modificação como REG, quando detectamos IR da expressão de mRNA das moléculas imunorreguladoras ≥ 2 e / ou quando o IR das moléculas pró-inflamatórias foram $\leq 0,5$. Por outro lado, consideramos uma modificação como INFLAMA quando detectamos IR da expressão de mRNA de moléculas pró-inflamatórias ≥ 2 , e / ou quando o IR da expressão de mRNA das moléculas imunorreguladoras foram $\leq 0,5$.

Todos resultados apresentados aqui são oriundos de experimentos que preencheram os critérios de validação para PCR em tempo real (ver Material e Métodos) que incluem entre outros, (i) a eficiência dos *primers* para cada um dos genes estudados e (ii) a análise da curva de dissociação do produto amplificado. A curva de eficiência informa quão adequados são os *primers* utilizados para amplificar determinada sequência de nucleotídeos e se são capazes de amplificar amostras com baixa concentração de mRNA

para aquele gene. A curva de dissociação informa sobre a especificidade do par de *primers* para a amostra a ser amplificada. *Primers* específicos para uma única seqüência de nucleotídeos devem apresentar uma curva de dissociação do produto amplificado com pico único. Na Figura 13 mostramos a curva de dissociação para o gene do TGF- β . Todos os outros genes apresentaram curvas de dissociação semelhantes (vide anexo 4). A análise da eficiência dos *primers* usados para amplificação de cada gene específico mostrou-se adequada, com valores variando de 1,8 a 2,0: TGF β (1,8), TGF β R (1,8), IL-10 (1,8), Foxp3 (2,0), GATA3 (1,8), IFN γ (1,8), TNF α (1,8) e T-bet (1,9). Na Figura 14 mostramos a curva de eficiência dos *primers* para TGF β , construída a partir dos dados constantes no Quadro 5.

Figura 13. Curva de dissociação para *primers* TGF β . Dissociação do amplicon do TGF β com um pico único e com T_m de 75 °C.

Figura 14. Curva de eficiência para TGFβ. Relação diretamente proporcional entre o logaritmo da concentração do mRNA e o ciclo médio de amplificação para essa amostra (Ct), nessa concentração. Y= equação da reta.

Diluições	ng RNA	log ng RNA	média Ct
1:1250	0,8	-0,09691	31,373
1:250	4	0,60206	28,486
1:50	20	1,30103	25,872
1:10	100	2,00000	23,405
Eficiência			1,8
Slope			-3,7938

Quadro 5. Resultado da análise de eficiência para TGFβ em ensaio por PCR em tempo real. Diluições seriadas de mRNA das amostras de linfócitos T e as amplificações médias para cada diluição. Eficiência foi calculada conforme descrito na seção material e métodos.

De um modo geral, os linfócitos T cultivados com ambos os tipos de DCs imaturas, pulsadas com antígenos da Hsp60, apresentaram importantes modificações na expressão de mRNA dos genes estudados. Como podemos depreender do Quadro 4, existe uma variabilidade quanto ao tipo de modificação induzida pelo mesmo antígeno da Hsp60. Esta variabilidade,

que ocorreu tanto entre as células dos diferentes indivíduos como entre as iDC e iDC IL-10 de um mesmo indivíduo, não permitiu categorizar quaisquer dos antígenos da Hsp60 aqui utilizados como apenas indutor de modificações reguladoras ou apenas inflamatórias.

Comparando os experimentos com os dois tipos de iDCs imaturas (DC29, DC31, DC34), observamos modificações tanto na expressão dos genes do tipo REG quanto em genes do tipo INFLAMA. Em ambos os grupos de DC as modificações do tipo REG predominaram, ainda que discretamente, sobre as modificações do tipo INFLAMA (Figura 15)

Figura 15. Padrão de expressão gênica em linfócitos T cultivados iDC (a) e iDC IL-10 (b) pulsadas com antígenos da Hsp60. Porcentagem de modificações REG, INFLAMA e de não modificação analisada conforme a expressão de genes envolvidos predominantemente na regulação da resposta imune (REG) ou na inflamação (INFLAMA). n para iDC= 3; n para iDC IL-10= 4.

Comparando-se apenas os experimentos com as iDC IL-10, que foram realizados para as 4 células estudadas, houve predomínio de modificações REG no linfócito T em 2 dos 4 experimentos (DC34 e DC35). Na DC29 o predomínio foi de modificação INFLAMA e na DC31 foi equilibrada REG e INFLAMA (Quadro 4), coluna predomínio REG/INFLAMA).

Quando analisamos as modificações na expressão das diferentes moléculas estudadas, observamos que, na maioria dos ensaios, houve alguma modificação na expressão de mRNA, principalmente o aumento da condição REG, seja aumentando a expressão de moléculas REG, seja diminuindo moléculas pró-inflamatórias (Quadro 4 e Figura 16).

Figura 16 - Perfil de modificação de expressão REG x INFLAMA induzida pelos estímulos da Hsp60 em células dendríticas imaturas tratadas e não tratadas com IL-10. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações de expressão, REG ou INFLAMA, e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) em todas as condições de estímulo. iDC – células dendríticas imaturas, iDC IL-10 – células dendríticas imaturas tratadas com IL-10, REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias.

Considerando agora as oito moléculas estudadas, verificamos que para 5 moléculas (receptor de TGF β , TGF β , GATA3, TNF- α e T-bet) as modificações induzidas pelos diferentes antígenos da Hsp60 foram predominantemente do tipo REG e em 3 moléculas (IL-10, Foxp3 e IFN γ) as modificações foram mais do tipo INFLAMA (Quadro 4 e Figura 17).

Figura 17 – Quantidade relativa de expressão de mRNA induzida pelos antígenos da Hsp60. Cada ponto do gráfico representa um valor de expressão para o respectivo fator estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFNγ, TNFα e Tbet) obtido na reação de PCR em tempo real, frente aos peptídeos N3, N7, p277 da Hsp60 e à fração C-Hsp60. Os símbolos preenchidos representam os genes relacionados à regulação da resposta imune e, os vazios, os genes relacionados à inflamação. As linhas pontilhadas indicam os pontos de corte a partir dos quais consideramos indução (≥ 2) ou inibição ($\leq 0,5$) da expressão gênica. $n = 4$.

Olhando agora para Os IR encontrados para as diversas moléculas, constatamos que todas elas apresentaram grande variabilidade na magnitude de expressão. Considerando-se os antígenos como um todo, observamos as seguintes variabilidades: TGFβ (2 a 4,4), de TGFβ R (2 a 31), IL-10 (2,2 a 12,1), Foxp3 (2 a 292), GATA3 (2,4 a 340,4), IFNγ (2 a 248,8), TNFα (2,5 a 4,6) e Tbet (4,4 a 6807). Considerando agora a variabilidade na expressão de mRNA de moléculas REG e INFLAMA, observamos que em um mesmo indivíduo (DC31) ocorreram simultaneamente as maiores faixas de expressão e as maiores inibições. Nesse indivíduo, observamos aumento da expressão das moléculas REG Foxp3 (292 e 229) e GATA3 (340 e 211) e das moléculas INFLAMA INF-γ

(248 e 163) e T-bet (6807,9 e 4028,4). Foi interessante notar que (i) o aumento da expressão de ambos os tipos de moléculas ocorreram apenas nas iDC e que as inibições ocorreram apenas nas iDC IL-10 (ii) o aumento e a inibição da expressão de ambas as moléculas REG e INFLAMA ocorreram em resposta aos antígenos da região aminoterminal N3 e N7 (Quadro 4).

Comparando-se as iDC e as iDC IL-10 com relação à predominância de perfil REG e INFLAMA, observamos que, diferentemente das iDC, nas iDC IL-10 o perfil REG predominou sobre o perfil INFLAMA para a grande maioria das moléculas estudadas (Quadro 4 e Figura 18).

Figura 18- Perfil de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelos estímulos da Hsp60 em células dendríticas imaturas tratadas e não tratadas com IL-10. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações de expressão, REG ou INFLAMA, para o fator estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFNγ, TNFα e T-bet), e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal fator, em todas as condições de estímulo. iDC – células dendríticas imaturas, iDCIL-10 – células dendríticas imaturas tratadas com IL-10, REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias. n = 4.

A análise dos diferentes antígenos da Hsp60 em relação a cada experimento mostrou um predomínio de modificação REG em 13 das 28 análises (46%), modificação equilibrada (REG=INFLAMA) em 2 das 28

análises (7%), sem modificação com 1 antígeno (C-Hsp60) com as células DC35 (1 de 28, 3,5%) e predomínio de modificação INFLAMA em 12 das 28 condições (42%). O peptídeo N7 induziu mais modificações do tipo REG (em 26 das 56 condições em que foi testado: 46%) do que modificações do tipo INFLAMA (em 11 das 56 condições: 20%). Considerando agora o seu predomínio de modificação (REG ou INFLAMA) em relação a todas as moléculas estudadas, em todas as 7 células (DC29, 31, 34: iDC e iDC IL-10 e para a DC35 só iDC IL-10) o predomínio foi de modificação do tipo REGULA em todos os experimentos (Figura 19a). Para o peptídeo p277 o predomínio foi REG em 3 das 7 e, igualmente INFLAMA em 3 das 7, sendo equilibrada em 1 experimento (Figura 19c). Essas modificações REG ocorreram tanto por aumento da expressão dos genes mais imunorreguladores, como pela diminuição daqueles mais inflamatórios. Para o peptídeo N3, o predomínio foi de INFLAMA (2 de 7), sendo observado predomínio REGULA em apenas 2 de 7 casos (Figura 19b). Para a proteína C-Hsp60 o predomínio foi de modificação INFLAMA, em 5 das 7 condições, REGULA em apenas 1 e equilibrado em 1 (Figura 19d). Mais uma vez, o predomínio INFLAMA foi decorrente tanto do aumento quanto da diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios e imunorreguladores, respectivamente.

Figura 19a - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N7 da Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o gene estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFNγ, TNFα e Tbet) frente ao peptídeo N7 da Hsp60 e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal gene na presença do N7. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação.

Figura 19b - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo N3 da Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o gene estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFN-γ, TNF-α e Tbet) frente ao peptídeo p277 da Hsp60 e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal gene na presença do p277. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação.

Figura 19c - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pelo peptídeo p277 da Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o gene estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFNγ, TNFα e Tbet) frente ao peptídeo p277 da Hsp60 e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal gene na presença do N3. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatória, SM – sem modificação.

Figura 19d - Perfil geral de modificação de expressão REG x INFLAMA induzido pela fração C-Hsp60 por PCR em tempo real. Os valores percentuais foram obtidos pela razão do número de modificações REG ou INFLAMA, observadas para o fator estudado (TGFβ, TGFβ R, IL-10, Foxp3, GATA3, IFNγ, TNFα e Tbet) frente à fração C-Hsp60, em real time-PCR, e o número total de resultados de expressão (REG+INFLAMA+sem alteração) para tal fator na presença da C-Hsp60. REG – modificações potencialmente reguladoras, INFLAMA – modificações potencialmente inflamatórias, SM – sem modificação.

5. Discussão

No presente trabalho, tivemos como objetivo identificar antígenos da Hsp60 capazes de induzir atividade imunorreguladora na interação com células dendríticas e linfócitos T. Fundamentamos nossa investigação em dados experimentais nos quais foi mostrado que células dendríticas imaturas podem desempenhar papel tolerogênico e que determinadas regiões da Hsp60 podem induzir atividade imunorreguladora. Trabalhamos com a hipótese de que determinados antígenos da Hsp60 podem atuar em sinergismo com células dendríticas no direcionamento de uma resposta imunorreguladora.

No início deste trabalho lidamos com duas questões igualmente importantes: gerar eficientemente células dendríticas maduras e imaturas e estabilizar o fenótipo imaturo das células dendríticas imaturas. Quanto à primeira questão advogamos que deva ser considerada quando se trabalha com células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos para que os resultados obtidos com testes funcionais possam ser verdadeiramente atribuídos a DCs e não a monócitos não totalmente diferenciados. A fim de avaliar esta questão nós realizamos a imunofenotipagem das células dendríticas por nós geradas 7º dia de diferenciação. Fomos eficientes em gerar células dendríticas conforme mostrado pela perda do marcador de monócito CD14 e pela aquisição simultânea do marcador de DC, CD1a (expressos em 3% e 92% da população celular, respectivamente) (Figura 3). Com base nesses resultados assumimos que trabalhamos com células totalmente diferenciadas.

A fundamentação por trás da necessidade de estabilização do fenótipo imaturo das células dendríticas no nosso estudo foi o seguinte: (i) a atividade estimuladora das DC depende, em grande parte da apresentação de antígenos por estas células e tal apresentação é inversamente proporcional ao seu estágio de maturação da DC (Romani, Koide 1989); (ii) células dendríticas imaturas sofrem maturação em resposta a uma gama de estímulos entre os quais citocinas inflamatórias e o LPS microbiano; (iii) a região C-Hsp60 utilizada no presente trabalho foi produzida em bactérias, e, a despeito de ter sido tratada para a remoção completa de LPS, é possível que quantidades residuais dessa endotoxina presentes na proteína pudessem induzir maturação das IDC. Ademais, como trabalhamos com Hsp60, essa questão torna-se mais importante quando consideramos que a essa proteína tem sido atribuído o potencial de induzir maturação em células dendríticas (Bethke, Staib 2002, Flohe, Bruggemann 2003). Aqui vale a pena ressaltar que: (i) a maturação das células dendríticas induzida por Hsp60 ainda é uma questão em aberto pois pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao LPS residual (Gao and Tsan 2003, Gao and Tsan 2003) presente na Hsp60 utilizada pelos pesquisadores, uma HSP sabidamente produzida em bactérias; (ii) resultados da literatura apontando para uma atividade imunorreguladora, ao invés de pró-inflamatória da Hsp60 e de peptídeos dela derivados (Prakken et al, 2003. Van Eden; Van Der Zee; Prakken, 2005. Anderton et al, 1998) vão contra o papel unicamente pró-inflamatório da Hsp60.

No presente trabalho, mostramos que é possível estabilizar o fenótipo imaturo de células dendríticas derivadas de monócitos humanos, pelo tratamento destas com IL-10 exógena durante a sua diferenciação. Esse resultado, que corrobora os resultados de outros pesquisadores (Steinbrink et al 1997, Steinbrink et al 1999, Yang AS, Lattime EC, 2003), apóia-se em dados provenientes de experimentos tanto com imunofenotipagem como funcionais. A imunofenotipagem nos permitiu observar que as iDC IL-10, mesmo quando desafiadas com LPS (iDC IL-10 + LPS), apresentaram níveis de marcadores de maturação (CD80, CD86, CD83) semelhantes àqueles observados para as iDC e menores do que aqueles vistos para as mDC (Figuras 6 e 7). Estes resultados são semelhantes aos relatados em trabalhos de outros grupos onde se mostra que o tratamento com LPS não altera a expressão de moléculas coestimuladoras tais como CD40, CD80 e CD86 na superfície das iDC IL-10 (McBride JM et al., (Buelens, Verhasselt 1997, Adikari, Pettersson 2004). Os experimentos funcionais com reação linfocitária mista mostraram que as iDC IL-10 LPS induziram índices de estimulação iguais àqueles induzidos pelas iDC e iDC IL-10 e significativamente menores do que aqueles induzidos pelas mDC (Figura 8 e Tabela 4). Estes resultados também corroboram aqueles mostrados por outros pesquisadores tanto em indivíduos saudáveis (Buelens et al. 1997), quanto em indivíduos com esclerose múltipla (Adkari et al., 2004). Há relatos na literatura apontando para diferentes mecanismos pelos quais a IL-10 poderia induzir a geração de células dendríticas tolerogênicas. Estes vão desde a regulação

negativa de moléculas coestimuladoras e de moléculas MHC de classe II (Hsu et al, 1992; Willems et al, 1994) até a expressão de moléculas imunorreguladoras como ILT-3 e ILT-4 na superfície das DCs (Manavalan, Rossi 2003). Os mecanismos moleculares pelos quais essas moléculas exercem sua atividade reguladora ainda estão sob investigação, mas, a observação de que o bloqueio de ILT3 na superfície de iDC IL-10 por anticorpos antagonista foi capaz de inibir a regulação de linfócitos T, mediada por iDC IL-10, sugere a importância dessas moléculas na atividade imunorreguladora das iDC IL-10 (Manavalan, Rossi 2003). Sugerimos, neste trabalho, que um dos mecanismos pelos quais a IL-10 induz a geração de DC reguladora seja pela retenção intracitoplasmática ou pelo bloqueio da transcrição gênica do CD83. Essa relação, nunca antes relatada na literatura segue a seguinte linha de raciocínio: (i) vírus como Herpes vírus simples 1 (HSV-1) evadem-se da resposta imune ou por reter o CD83 no interior da célula superfície de DCs imaturas (Salio, Cella 1999) ou por regular negativa e especificamente a expressão dessa molécula na superfície de células dendríticas maduras (Kruse, Rosorius 2000); (ii) assim como no nosso trabalho, em todos os estudos supra citados, a ausência da expressão de CD83 teve igual impacto na redução de proliferação de linfócitos T em reação linfocitária mista. Assim, é possível que nas células dendríticas a IL-10 desempenhe um papel semelhante ao mecanismo de modulação da resposta explorado por vírus para se evadir do ataque de linfócitos T, a saber o silenciamento da expressão do CD83.

No presente trabalho, a análise da produção espontânea de citocinas pelas células dendríticas, um parâmetro potencialmente útil na discriminação de atividades funcionais, não permitiu uma discriminação clara entre células dendríticas maduras e células dendríticas imaturas (iDC e iDC IL-10). Todavia, essa análise permitiu observar algumas semelhanças entre as DCs imaturas e diferenças destas com relação às DCs maduras. Com base nesse parâmetro funcional, o principal “diferencial” entre as diferentes populações celulares foi a produção da interleucina IL-10, observada nas DCs imaturas (iDC e iDC IL-10) mas não nas DCs maduras (mDC) (Tabela 5). Vale destacar, porém, que a frequência de produção desta citocina foi baixa (iDC: 2 de 15 e iDC IL-10: 3 de 15 experimentos) (Tabela 4), indicando haver variabilidade entre as DC dos diferentes experimentos. Também houve variabilidade de produção espontânea de citocinas nas mDC dos diferentes experimentos. Isto indica que apesar das mesmas condições de cultura, ocorre geração de DC com diferenças interindividuais em relação à produção espontânea de citocinas. Não obstante, vale à pena destacar como outra diferença funcional entre os dois tipos de DC imaturas e as mDC, a frequência de produção espontânea de IFN γ que foi maior nas mDC (6 dos 15 experimentos). Essas diferenças no perfil de citocinas podem refletir diferenças no binômio imunidade/tolerância, com mDCs induzindo imunidade e iDC e iDC IL-10 induzindo mais uma resposta de tolerância. No entanto, os nossos dados de produção espontânea de citocinas não explicam esses dois pólos funcionais. Vale a pena destacar a produção

de IFN γ por células mielóides, especialmente em DC, é um ponto de discussão recente entre os imunologistas. A citocina IFN γ é classicamente considerada uma citocina inflamatória, e sua produção tem sido atribuída principalmente a linfócitos T. No entanto, em um estudo recente Fricke e colaboradores (Fricke et al., 2006) mostraram a produção de IFN- γ por DC, quando feita uma análise com células individuais (*single cell analysis*). Embora esses autores não tenham relatado a produção espontânea dessa citocina, foi mostrado que as DCs são capazes de produzi-la frente ao estímulo com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin).

Em relação a esta variabilidade, é possível que haja também diferenças em relação à cinética de produção de citocinas, mesmo entre os mesmos tipos de DC, como já descrita para monócitos (Nordskog, Fields 2005). Vale destacar que duas outras citocinas polarizadoras, TGF β e IL-12, que seriam importantes serem analisadas neste painel não puderam ser estudadas, por problemas de ordem técnica. É importante destacar que não há dados claros na literatura a respeito da produção espontânea de citocinas pelas iDC, iDC IL-10 e mDC, uma vez que a maioria dos estudos analisam a produção de citocinas em resposta a algum estímulo.

Em conclusão, em relação ao fenótipo das diferentes DCs analisadas, no presente trabalho, podemos dizer que fomos bem sucedidos na geração de DC maduras e imaturas, e na obtenção de um fenótipo estável de imaturidade nas iDC IL-10. Ademais, as células dendríticas maduras e as células dendríticas imaturas tiveram uma

expressão diferencial de moléculas de superfície e diferentes atividades funcionais, em relação à capacidade de induzir proliferação de linfócitos T alorreativos. Porém, se a produção de citocinas é capaz de discriminar os grupos de DCs maduras e imaturas, o nosso painel de citocinas não foi completo a ponto de fazê-lo.

Existem relatos na literatura por parte de diferentes pesquisadores sugerindo um potencial papel regulador da Hsp60 no sistema imune. Um dos possíveis mecanismos pelos quais a Hsp60 pode induzir seus efeitos reguladores é pela interação com as células dendríticas. Assim, uma questão abordada no nosso trabalho foi verificar qual o efeito da interação direta da Hsp60 sobre células dendríticas em diferentes estágios de maturação. A análise da questão abordada é interessante porque pode contribuir para a caracterização de mecanismos potencialmente reguladores.

A análise da produção de citocinas pelas diferentes células dendríticas pulsadas com os antígenos da Hsp60 revelou haver tanto produção quanto inibição da produção de citocinas pelas diferentes DC. Embora não tenhamos detectado um padrão de produção de citocinas direcionado a nenhum peptídeo ou região preferencial da Hsp60, nós pudemos detectar inibição da produção espontânea de citocinas tanto inflamatórias ($\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$) quanto da IL-10, uma citocina predominantemente reguladora nas células dendríticas pelos antígenos da Hsp60. Com esses experimentos fomos capazes de mapear o

peptídeo N7 como um potencial inibidor da produção espontânea de IFN γ nos três tipos de DC (mDC, iDC e iDC IL-10).

Tomados em conjunto nossos resultados indicam que a Hsp60 não só tem efeito direto sobre as células dendríticas como também tem o potencial de induzir diferentes tipos de resposta nesse tipo de células. Mais ainda, o efeito induzido na célula dendrítica parece ser independente do seu estado de maturação, pois os mesmos tipos de citocinas foram produzidos e/ou inibidos em resposta a antígenos da Hsp60 nos três tipos de DCs.

Para avaliar o potencial sinérgico entre Hsp60 e células dendríticas no direcionamento de uma resposta imune reguladora, *in vitro*, nós analisamos o efeito da combinação de antígenos dessa proteína com os diferentes tipos de DC (mDC, iDC e iDC IL-10) sobre a resposta de linfócitos T autólogos. A importância desses experimentos justifica-se pela crescente discussão, na comunidade científica, sobre o papel da auto-reatividade na imunorregulação, não apenas com base na teoria do homúnculo imunológico, proposta por Irun Cohen (Cohen 1992), como também com base nos achados mais recentes de que determinados tipos de células T reguladoras são auto-reativas (de Kleer, Vastert 2006, Fisson, Darrasse-Jeze 2003). No presente trabalho, analisamos se as DC maduras e imaturas têm efeito diferencial na auto-reatividade de linfócitos T.

Nós detectamos auto-reatividade linfoproliferativa de linfócitos T induzida pelos 3 tipos de DC sem outros estímulos antigênicos. Entretanto, nesses experimentos, observamos que as células dendríticas maduras

induziram respostas linfoproliferativas autólogas mais freqüentes (7 de 10 experimentos) e mais potentes (índices de estimulação de 2,4 a 7,6) do que aquelas induzidas pelas células imaturas (iDC e iDC IL-10) (freqüência de 4 de 10 experimentos; índices de estimulação: 2,1 a 5,6). As iDCs induziram respostas linfoproliferativas semelhantes às induzidas pelas iDC IL-10. Neste caso, valorizamos as características morfofuncionais das células dendríticas maduras, caracterizadas pela alta expressão das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD58, possibilitando a transdução de sinais coestimuladores necessários para permitir a entrada dos linfócitos T no ciclo celular como já descrito na literatura ([Flores-Romo 2001](#)). Além disso, essas células expressam moléculas de MHC de classe II na sua superfície celular, o que facilita a apresentação antigênica, a ativação de linfócitos T CD4 e a produção de citocinas e de fatores de crescimento que facilitariam a indução da resposta imune ([Sallusto and Lanzavecchia 1994](#)). Nossa interpretação desses dados é que a auto-reatividade induzida pelas DC imaturas possa ser uma forma de controlar a resposta imune efetora. Aqui vale a pena ressaltar que o fato de as mDC induzirem maior auto-reatividade linfoproliferativa de linfócitos T autólogos não deve ser interpretada como sinônimo de resposta inflamatória. De nota, pelo menos dois relatos recentes provocam a visão de que o aumento de moléculas MHC e coestimuladoras na superfície das mDC sejam suficientes para a ativação ótima de linfócitos T. No primeiro relato, feito por Pasare e Medzhitov no sistema murino, mostrou-se que a maturação e a migração das células dendríticas para os órgão linfóides não são suficientes para ativar linfócitos T na ausência de

citocinas inflamatórias induzidas por TLR (Pasare and Medzhitov 2004). No segundo relato, também em camundongos, Sporri e Reis e Sousa mostram que células dendríticas ativadas por mediadores inflamatórios são capazes de regular positivamente a expressão de moléculas MHC e coestimuladoras e dirigir a expansão clonal de linfócitos T (Sporri and Reis e Sousa 2005). Entretanto, tais células dendríticas são incapazes de direcionar a diferenciação das células T CD4+ para Th1 efetoras, *in vivo*. Em contraste, a exposição das DCs a componentes de patógenos resultou em maturação completa que promoviam respostas de células Th1. Podemos imaginar que células dendríticas ativadas por mediadores inflamatórios ou por componentes de patógenos podem ter papéis complementares na indução e manutenção da imunidade.

A análise da auto-reatividade aos antígenos da Hsp60 nos permitiu identificar alguns antígenos da Hsp60 como aqueles mais freqüentemente implicados na indução de proliferação celular. Entretanto, ao contrário do que foi visto para a auto-reatividade às DCs, na auto-reatividade à Hsp60 as células dendríticas imaturas foram aquelas que mais induziram respostas proliferativas. Também foram as iDCs que induziram as maiores índices de estimulação. Este é um dado inédito, pois não temos conhecimento de trabalhos na literatura analisando esta questão. Uma hipótese para explicar esse resultado é que os antígenos da Hsp60 tenham um efeito sobre a linfoproliferação, como o resultado direto da apresentação desses para os linfócitos T, no contexto de moléculas MHC. Porque as células dendríticas imaturas são mais eficientes em fagocitar antígenos do que as células

dendríticas maduras haveria maior endocitose e apresentação de tais antígenos pelas DC imaturas. Nesse sentido, vale a pena mencionar que a apresentação de peptídeos derivados de moléculas Hsp60 autólogas foi relatada estar presente na composição de peptídeos eluídos de moléculas MHC humanas e murinas, em condições fisiológicas (Michaelsson, Teixeira de Matos 2002).

O peptídeo C3 foi imunodominante na indução de proliferação (6 de 10 experimentos) nas coculturas com as iDC, e o p277 mais freqüente nas mDC. Chama a atenção que, considerando todos os experimentos em conjunto, o número de estímulos capazes de induzir proliferação foi bem maior nas coculturas com as iDC. Também foram observadas maiores intensidades de respostas proliferativas nas coculturas com iDC. Isto pode indicar uma maior capacidade de processamento e apresentação antigênica dos antígenos da Hsp60 pelas DC imaturas do que pelas maduras. Ademais, considerando que as iDC podem induzir respostas tolerogênicas, é possível que a auto-reatividade proliferativa a antígenos da Hsp60 no contexto de iDC possa ter atividade imunorreguladora. Em contraste com a alta freqüência de auto-reatividade proliferativa a antígenos da Hsp60 nas iDC, a freqüência de auto-reatividade de linfócitos T dirigida unicamente às DC (sem antígenos da Hsp60) foi maior nas DCs maduras, que são descritas como potentes indutoras de resposta efetora. Para uma avaliação funcional desta auto-reatividade diferencial às diferentes DC versus à Hsp60, é importante analisar também a produção de citocinas desses ensaios.

Em um estudo recente, nosso grupo mostrou que esplenócitos de

camundongos BALB/c, não sensibilizados, também apresentam resposta proliferativa a antígenos da região carboxiterminal, especialmente ao peptídeo C3 (Luna et al, 2007). Vale ressaltar, que no nosso trabalho a frequência de reconhecimento do peptídeo C3 diferiu em relação ao estado de maturação da célula dendrítica, com as iDC sendo o grupo celular que mais induziu estas respostas (6 de 10 experimentos). No grupo das mDC observamos respostas proliferativas apenas em 2 de 10 experimentos. Essa baixa frequência de reconhecimento do peptídeo C3 por linfócitos T autólogos nos grupo mDC pode ser, mais uma vez, o reflexo da ineficiência desse grupo celulares de fagocitar e apresentar antígenos. Também é possível que o antígeno não seja endocitado, mas, ao invés disso, se ligue a alguma molécula na superfície da célula dendrítica e que por ocasião da formação da sinapse imunológica contacte moléculas tais como TLR na superfície dos linfócitos T. Esse mecanismo, que já foi relatado na interação da Hsp60 com linfócitos T reguladores (Zanin-Zhorov, Cahalon 2006), pode representar uma característica comum de células com atividade reguladora. Nossos resultados favorecem visão corrente de que o estágio de maturação da célula dendrítica (de Heusch, Oldenhove 2004) e a natureza do antígeno (Boonstra, Asselin-Paturel 2003) podem ser determinantes do desfecho da resposta imune. Vale ressaltar que não testamos a capacidade endocítica dos diferentes grupos de DC no nosso trabalho. Podemos dizer com base nesses resultados que tanto humanos como camundongos apresentam no seu repertório linfócitos T capazes de reconhecer antígenos da região carboxiterminal da Hsp60, com a sequência 449 a 469 aa sendo

freqüentemente reconhecida.

Em adição a antígenos da Hsp60 envolvidos na indução de respostas linfoproliferativas autólogas, nós também detectamos seqüências inibidoras de proliferação de linfócitos T. Dentre os antígenos envolvidos na inibição da auto-reatividade autóloga chama a atenção o peptídeo da região aminoterminal N7 (aa 87 a 110). Esse peptídeo foi capaz de inibir a auto-reatividade proliferativa em todos os grupos de células dendríticas, o que implica que o seu efeito é independente do estado de maturação dessas células. Este é um dado interessante pois aponta para um potencial papel regulador deste peptídeo sobre a proliferação celular e incentiva estudos posteriores explorando os mecanismos de ação desse peptídeo, visando o seu uso como ferramenta terapêutica a ser utilizado como anti-proliferativo.

Em geral as seqüências da região N-terminal da Hsp60/65 têm sido associadas com efeito imune inflamatório em modelos de artrite experimental (Moudgil, Chang 1997), embora vacinas de DNAHsp60, utilizando a seqüência gênica da região N-terminal da molécula também tenham inibido o desenvolvimento da artrite induzida por adjuvante, em ratos (Quintana, Carmi 2003). No nosso laboratório, Caldas e colaboradores estudando PBMC de indivíduos saudáveis e transplantados renais mapearam o peptídeo N3 como um antígeno potencialmente regulador (Tese, doutorado de Cristina Caldas, aluna de doutorado do nosso laboratório. Tomados juntos estes dados apontam uma seqüência interessante a ser estudada por seu efeito inibidor da resposta proliferativa.

Em adição às respostas proliferativas, nós também analisamos o

perfil de produção de citocinas em coculturas de linfócitos T autólogos com as diferentes células dendríticas, pulsadas ou não com antígenos da Hsp60. Neste bloco de experimentos detectamos as citocinas IL-2, IL-5, IFN- γ e TNF- α nos diferentes grupos de DCs. O padrão de auto-reatividade por esse parâmetro, no entanto, não foi homogêneo, não permitindo a identificação de um único antígeno com atividade apenas reguladora ou inflamatória. Entretanto, olhamos o perfil global de produção destas citocinas, predominantemente pró-inflamatórias, e achamos dados interessantes. Vale a pena destacar que embora estas citocinas sejam descritas como pertencentes a um padrão inflamatório alguns autores destacam alguns fenótipos de células T com função reguladora que também produzem IFN- γ e IL-5 (Roncarolo and Levings 2000). No entanto, esse não é um dado totalmente esclarecido na literatura exigindo, portanto, para definir o fenótipo e o padrão de citocinas de cada tipo de célula T reguladora.

Os peptídeos da região C-terminal (C3, C4, C9) e a proteína C-Hsp60 induziram todas as citocinas referidas nos diferentes grupos de células dendríticas. Além disso, o peptídeo p277, também pertencente à região carboxiterminal da Hsp60, induziu TNF α , IL-5 e IL-2. Tomados juntos com os resultados de proliferação celular, estes dados sugerem uma função potencial nesta região relacionada com atividades pró-inflamatórias provavelmente pela ligação com receptores indutores de resposta inflamatória, como os descritos para ligação com macrófagos que mapeiam principalmente nesta região (Habich, Kempe 2004, Habich, Kempe 2006). Em contraste com os nossos achados, Durai e

colaboradores (Durai, Gupta 2004) relataram que o tratamento de animais saudáveis com peptídeos da região C-terminal da Hsp60 foi capaz de inibir o desenvolvimento da artrite em modelo animal, induzindo produção de IFN γ . Adicionalmente, o p277 um peptídeo descrito como anti-inflamatório e indutor de IL-4 e IL-10 e que inibe o desenvolvimento de diabetes auto-imune tanto em modelos animais (Elias, Meilin 1997) não mostrou o mesmo padrão de resposta pelos nossos dados. No entanto vale ressaltar que esse peptídeo tem sido usado em ensaios clínicos de fase II e III (Raz, Elias 2001, Huurman, Decochez 2007) e “parece preservar a produção de insulina” sem trazer efeitos adversos. Uma possível explicação para estes resultados contrastantes é que a resposta induzida à região carboxiterminal da Hsp60, no contexto da doença auto-imune, seja diferente daquela observada em células de indivíduos saudáveis, cultivadas *in vitro*.

Outra possível interpretação para esses resultados é que a região carboxiterminal da Hsp60 tenha dupla atividade funcional no que diz respeito à resposta imune, elicitando tanto respostas inflamatórias quanto anti-inflamatórias. Esta questão não foi abordada no presente trabalho de modo que serão necessários estudos posteriores de mapeamentos moleculares precisos desta região molecular para determinar perfis funcionais desencadeados por peptídeos dela derivados.

Ainda com relação à análise da produção de citocinas em coculturas de linfócitos T autólogos e células dendríticas em diferentes estados de maturação, foi possível identificar o peptídeo N7 como um daqueles mais

freqüentemente envolvidos na inibição da produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-5 e IL-2, nos três grupos de DCs. Chama a atenção que entre os antígenos com função inibidora destas citocinas pró-inflamatórias também estejam peptídeos derivados da região intermediária da Hsp60 (I4, I8, I9). A região intermediária da Hsp60 é conhecida por apresentar um sítio de ligação ao LPS (Habich, Kempe 2005), sugerindo também um papel inflamatório. Entretanto, foi descrita a utilização de um peptídeo da região intermediária p336-351 da Hsp60 humana capaz de induzir um processo de tolerância ativa, em modelo de uveíte auto-imune em ratos (Phipps, Stanford 2003) e também em ensaio clínico com pacientes portadores de doença de Behçet, uma doença auto-imune (Phipps, Stanford 2003). Nestes dois relatos, a sequência p336-351 foi capaz de inibir a resposta inflamatória, a produção de IFN γ e a expressão de moléculas coestimuladoras como CD40 e CD86. Vale a pena salientar que recentemente foram publicados trabalhos mostrando que o LPS, normalmente tido como um componente pró-inflamatório, pode ativar células T reguladoras (Siepmann, Biester 2006). Isso ilustra a dificuldade de se prever o resultado biológico frente ao tratamento com qualquer componente e que existe uma potencial multiplicidade de ação no sistema imune e, sobretudo, num modelo experimental artificialmente induzido, no qual outros fatores variados podem influenciar o resultado. Tomando estes resultados como referência, ensaios futuros utilizando peptídeos da região I da Hsp60 e mesmo a proteína I-Hsp60 poderiam ser ferramentas úteis pra controlar a resposta inflamatória no contexto de doenças auto-imunes e mesmo na rejeição ao aloenxerto.

Complementando os estudos de auto-reatividade analisamos o perfil de expressão gênica de um painel de moléculas reguladoras (TGF- β , receptor de TGF- β , Foxp3, IL-10) e inflamatórias (INF- γ , TNF- α e T-bet), em linfócitos T cultivados com células dendríticas previamente pulsadas com antígenos da Hsp60. Novamente, observamos o envolvimento da Hsp60 tanto na indução quanto na inibição da expressão dessas moléculas. Esta análise nos permitiu identificar o peptídeo N7 como um antígeno potencialmente imunoregulador, uma vez que mostrou um predomínio de modificações do tipo REGULA em 100% das vezes em que foi testado.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos funcionalmente nos experimentos de auto-reatividade e se somam a eles no sentido de indicar o peptídeo N7 como um potencial antígeno regulador.

Dados recentes gerados no nosso laboratório apontam um papel para o peptídeo N7 também na indução de auto-anticorpos, como mostrado pela presença de anticorpos IgM, dirigidos para esse peptídeo, no soro de indivíduos saudáveis (Hui Tzu Lin et al., trabalho em andamento). Assim, o peptídeo N7 parece ser um antígeno imunodominante alvo da resposta imune celular e humoral, em indivíduos saudáveis e, portanto, um candidato a regulador fisiológico da resposta imune.

Nossos resultados sobre o efeito dos antígenos da Hsp60 na auto-reatividade e na expressão gênica em linfócitos T cultivados com

diferentes DCs, previamente pulsadas com esses antígenos, indicam que existe a diversidade resposta dirigida a essa proteína.

Os nossos resultados mostrando a capacidade de antígenos Hsp60 de induzir tanto atividade imunoreguladora quanto inflamatória encontra subsídios na literatura. As bases moleculares que apóiam essa diversidade da indução de resposta começaram a ser elucidadas. Sabese, por exemplo, que a Hsp60 pode ligar-se diretamente em TLR, tanto em DCs (Zanin-Zhorov, Tal 2005) quanto em linfócitos T reguladores (Zanin-Zhorov, Cahalon 2006). Foi mostrado pelo grupo do Iru Cohen que em linfócitos T reguladores a ligação da Hsp60 ao receptor TLR2 induziu a expressão de GATA3 e IL-10 e diminuição de IFN γ e T-bet, sugerindo o direcionamento da resposta T para um perfil T2 (Zanin-Zhorov, Bruck 2005). No nosso trabalho, nós também detectamos um aumento na expressão de GATA3, principalmente em resposta a antígenos da região amino terminal da Hsp60. Porém, diferentemente dos trabalhos citados acima, esse aumento na expressão de GATA3 nos linfócitos T, provavelmente não pode ser atribuída à interação direta da Hsp60 ao TLR2, uma vez que não houve contato direto dos antígenos com os linfócitos. Assim, o aumento da expressão dessa molécula pode ter sido decorrente da interação do TCR dos linfócitos com moléculas de HLA complexadas a esses antígenos, ou de um efeito modulador das células dendríticas induzido pelos antígenos. Esta via diferente de reconhecimento da Hsp60 pode ser um dos motivos pelos quais nós não detectamos IL-10 nem no sobrenadante das coculturas de DC com

linfócitos T, nem mesmo expressão de mRNA para IL-10 dos linfócitos purificados dessas coculturas. Não podemos descartar, no entanto, que a não detecção dessa citocina seja o resultado da escolha de um ponto único (48 h para cultura de sobrenadante e 5 dias para a extração de mRNA) para a realização dos experimentos.

O fato de que a apresentação de peptídeos da Hsp60 no contexto de células dendríticas imaturas induziu a expressão de GATA3, principalmente por antígenos da região aminoterminal, é sugestivo de que esses antígenos tenham o potencial de direcionar a resposta imune para um perfil mais imunorregulador. Esta idéia aumenta em dimensão à medida que constatamos que o peptídeo N7 é capaz de induzir a expressão de TGF β , IL-10 e até mesmo do fator de transcrição associados a células reguladoras Foxp3 (Quadro 4). O aumento da expressão do nível de mRNA das citocinas TGF β e IL-10 induzido pela Hsp60 já foi relatado em um modelo de uveíte (Phipps, Stanford 2003). No seu trabalho, no entanto, o antígeno responsável pela indução da expressão de mRNA para TGF β e IL-10 foi o peptídeo p336-351, derivado da região intermediária da Hsp60.

Foi interessante observar, no nosso trabalho, que o aumento na expressão de mRNA para o TGF β foi acompanhado de um aumento concomitante da expressão para mRNA do seu receptor. Isso sugere que a auto-reatividade à Hsp60 foi capaz de sincronizar a expressão dessas moléculas.

Como referido em parágrafo anterior, o aumento na expressão de mRNA para o TGF β foi acompanhado do aumento na expressão de IL-10, uma citocina predominantemente antiinflamatória e produzida por células T reguladoras Tr1 (Gregori, Bacchetta 2005, Zeller, Panoskaltsis-Mortari 1999) e células T CD4+CD25+ (Fehervari and Sakaguchi 2004). A produção de IL-10 em resposta à Hsp60 humana foi recentemente relatada por nosso grupo (Tese de Cristina Caldas, aluna de doutorado do nosso laboratório, 2005). Nesse trabalho, o peptídeo da região aminoterminal N3 induziu alta frequência de células produtoras de IL-10 analisada células do sangue periférico de indivíduos transplantados renais e de indivíduos saudáveis, por ELISPOT. Além disso, foi possível detectar IL-10 solúvel no sobrenadante de culturas de PBMC de transplantados renais em resposta a esse peptídeo (Caldas, Luna 2006). Porém, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, a produção de IL-10 em pacientes transplantados renais deu-se, principalmente, em resposta a antígenos da região carboxiterminal. É possível que a diferença encontrada entre nossos resultados e aqueles de Caldas e colaboradores (2007) seja explicada, pelo menos em parte, pelo tipo de células usadas em cada estudo. Enquanto Caldas e colaboradores trabalharam com PBMC diretamente estimuladas com os antígenos da Hsp60, nós trabalhamos com linfócitos T purificados após incubação com as DCs. Assim, é possível que diferentes células e diferentes vias de sinalização estejam envolvidas na produção de IL-10 nestes dois diferentes sistemas.

Devemos destacar que em alguns casos o aumento dos mRNAs para TGF β e para IL-10 foram acompanhados do aumento simultâneo de mRNAs de TNF- α e IFN- γ . A interpretação desses dados deve ser feita com cautela e ponderando-se que nenhuma citocina é produzida isoladamente e que o desfecho da resposta imune pode depender do equilíbrio entre os vários tipos de citocinas presentes em um determinado microambiente. Em linha com estes resultados, recentemente mostramos a produção de IL-10 e IFN- γ induzida pelos diferentes antígenos da Hsp60, no sistema murino (Tese de Ernesto Luna, aluno de doutorado do nosso laboratório, 2005). Da mesma forma, outros autores mostraram que, em doses repetidas, a Hsp60 humana pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, bem como diminuir a expressão das moléculas TLR4, CD80, CD86 e HLA-DR, em macrófagos de indivíduos saudáveis, *in vitro* (Kilmartin and Reen 2004). Esses dados reforçam o papel da Hsp60 na indução da resposta imune e põem em evidência a sua plasticidade funcional.

Consideramos importante a análise de um painel de genes envolvidos nas atividades funcionais dos linfócitos em resposta a Hsp60, pois acreditamos que um balanço da expressão de genes reguladores e imunorreguladores pode determinar o resultado da resposta imune induzida. A análise do nosso painel nos permitiu apreciar a expressão de genes inflamatórios e reguladores e nos deixou otimistas quanto ao papel imunorregulador do peptídeo N7, incitando-nos a explorar esse peptídeo em protocolos de tolerância.

Vale a pena comentar que é possível que microorganismos se utilizem da propriedade imunorreguladora da Hsp60 para manipular a resposta imune e se evadirem dos processos inflamatórios, a elas potencialmente danosos. Pode-se pensar, por exemplo, que as bactérias, que também têm Hsp65, valham-se das propriedades reguladoras da região aminoterminal dessa proteína para diminuir a produção de IFN- γ , inibir clones de linfócitos T inflamatórios, e, assim, garantir a sua persistência.

Em resumo, observamos nesse trabalho que células dendríticas maduras e imaturas apresentam diferenças fenotípicas e funcionais importantes. Observamos que estas têm o potencial de induzir resposta proliferativas autóloga de linfócitos T, porém as mDCs são mais potentes a esse respeito. Observamos que a Hsp60 é capaz de exercer efeito direto nas DCs mudando inclusive o padrão de secreção de citocinas. Vimos que estas células são capazes de induzir respostas de linfócitos T autólogos na ausência de antígenos exógenos. Em adição, vimos que os antígenos da Hsp60 são capazes de alterar o padrão de auto-reatividade fisiológica observado nas coculturas de DC +LT, tanto induzindo quando inibindo respostas linfoproliferativas e produção de citocinas. Dentro do nosso objetivo de procurar antígenos da Hsp60 como potencial regulador da resposta imune, mapeamos o peptídeo N7 como um antígeno potencialmente regulador. Esse peptídeo foi capaz de inibir a resposta de linfócitos T autólogos a células dendríticas maduras e de induzir um perfil

de genes predominantemente reguladores em células dendríticas imaturas.

6. Conclusões

1. A produção espontânea de citocinas pelas DCs foi variável nos diferentes experimentos, não sendo possível estabelecer um perfil diferencial constante entre as DC maduras e imaturas. Isto sugere que os perfis funcionais imunogênico e tolerogênico, descritos para as DC maduras e imaturas, respectivamente, não devem depender dessas citocinas estudadas.
2. A interação direta de antígenos da Hsp60 com as DCs levou tanto à indução quanto à inibição de citocinas com atividades inflamatória e imunorreguladora, indicando diversidade funcional da Hsp60 na interação com as DC.
3. O peptídeo N7 teve um efeito dominante na inibição da auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às mDCs. Uma vez que as mDCs são predominantemente indutoras de respostas imunes efectoras, podemos considerar o peptídeo N7 como um potencial imunrregulador.
4. Em contraste com a auto-reatividade de linfócitos T dirigida às DCs, a auto-reatividade a antígenos da Hsp60, de um modo geral, foi maior com as DC imaturas. Considerando que as DCs imaturas induzem, principalmente, respostas imunes tolerogênicas, interpretamos que a auto-reatividade a antígenos da Hsp60 possa favorecer a imunorregulação.
5. Na análise molecular de genes pró-inflamatórios e reguladores, observamos que os antígenos da Hsp60 induziram tanto modificações

inflamatórias como reguladoras. Esses resultados indicam que a Hsp60 tem a capacidade de ativar, simultaneamente, genes funcionalmente antagônicos, reafirmando a diversidade funcional da Hsp60.

6. Na análise da expressão de mRNA do painel de genes pró-inflamatórios e reguladores, em linfócitos T, identificamos o peptídeo N7 como indutor de modificações predominantemente reguladoras, em todas as condições em que ele foi testado. Com esses resultados, reafirmamos o potencial imunorregulador do peptídeo N7 da Hsp60.
7. Em conjunto, as observações de que o peptídeo N7 foi capaz de inibir a auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às células dendríticas maduras, assim como de induzir modificações gênicas, predominantemente reguladoras, nos permitem apontar este peptídeo como potencialmente imunorregulador e, nos estimulam a utilizá-lo em protocolos para indução de tolerância.

7. Referências Bibliográficas

1. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*. 1991;12(9):322-6.
2. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*. 2002;23(6):291-6.
3. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
4. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(2):135-45.
5. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17406-9.
6. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
7. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999;162(7):3749-52.
8. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):1099-103.
9. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-5.
10. Zanin-Zhorov A, Nussbaum G, Franitza S, Cohen IR, Lider O. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *Faseb J*. 2003;17(11):1567-9.
11. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*. 1998;19(9):395-404.
12. Borowski C, Martin C, Gounari F, Haughn L, Aifantis I, Grassi F, et al. On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(2):200-6.

13. Aljurf M, Ezzat A, M OM. Emerging role of gammadelta T-cells in health and disease. *Blood Rev.* 2002;16(4):203-6.
14. Burnet F, editor. The clonal selection theory of acquired immunity. London: Cambridge University Press; 1959.
15. Ellmeier W, Sawada S, Littman DR. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:523-54.
16. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17(3):138-46.
17. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996;383(6603):787-93.
18. Woodland DL, Dutton RW. Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(3):336-42.
19. Filaci G, Suciu-Foca N. CD8+ T suppressor cells are back to the game: are they players in autoimmunity? *Autoimmun Rev.* 2002;1(5):279-83.
20. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):116-26.
21. Berard M, Tough DF. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology.* 2002;106(2):127-38.
22. Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, et al. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(15):4917-21.
23. Granja C. Estudo seqüencial da resposta celular anti-proteínas de choque térmico humanas no transplante renal - Tese (Doutorado). 239p. *Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.* 2000.
24. Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW, Young RA, Kaufmann SH. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J Immunol.* 1989;143(9):2844-9.

25. Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H, Cohen IR. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun.* 1999;12(2):121-9.
26. Ramage JM, Young JL, Goodall JC, Gaston JS. T cell responses to heat-shock protein 60: differential responses by CD4+ T cell subsets according to their expression of CD45 isotypes. *J Immunol.* 1999;162(2):704-10.
27. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med.* 2001;344(9):655-64.
28. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 1969;166(906):753-5.
29. Tung KS, Smith S, Teuscher C, Cook C, Anderson RE. Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. Immunopathology. *Am J Pathol.* 1987;126(2):293-302.
30. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970;18(5):723-37.
31. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(2):108-17.
32. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195(6):695-704.
33. Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G, Liu Z, Smith D, Berlocco P, et al. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J Immunol.* 1998;161(10):5193-202.
34. Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol.* 2001;166(1):42-50.

35. Taylor A, Namba K. In vitro induction of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol.* 2001;79(4):358-67.
36. 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(3):1151-64.
37. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:423-49.
38. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12(4):431-40.
39. Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J Immunol.* 2000;165(6):3105-10.
40. Howarth GS, Xian CJ, Read LC. Predisposition to colonic dysplasia is unaffected by continuous administration of insulin-like growth factor-I for twenty weeks in a rat model of chronic inflammatory bowel disease. *Growth Factors.* 2000;18(2):119-33.
41. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4⁺ T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001;166(5):3008-18.
42. Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P. CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8832-7.
43. Taguchi O, Nishizuka Y. Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance. *J Exp Med.* 1987;165(1):146-56.

44. Taguchi O, Kontani K, Ikeda H, Kezuka T, Takeuchi M, Takahashi T, et al. Tissue-specific suppressor T cells involved in self-tolerance are activated extrathymically by self-antigens. *Immunology*. 1994;82(3):365-9.
45. Smith H, Lou YH, Lacy P, Tung KS. Tolerance mechanism in experimental ovarian and gastric autoimmune diseases. *J Immunol*. 1992;149(6):2212-8.
46. McCullagh P. The significance of immune suppression in normal self tolerance. *Immunol Rev*. 1996;149:127-53.
47. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003;197(4):403-11.
48. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*. 2006;116(7):2022-32.
49. Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2433-7.
50. Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, Wilkinson JE, Ziegler SF, Ramsdell F. Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol*. 1999;162(5):2546-54.
51. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337-42.
52. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
53. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998;160(3):1212-8.
54. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.

55. Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):21-3.
56. Kasprowicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol.* 2003;171(3):1216-23.
57. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3276-84.
58. Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(11):4103-8.
59. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
60. Cohen I, editor. *Tending Adam's Garden*: Academic Press; 2000.
61. Coutinho A, Hori S, Carvalho T, Caramalho I, Demengeot J. Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and "quality control" of immune responses. *Immunol Rev.* 2001;182:89-98.
62. Cohen IR, Young DB. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today.* 1991;12(4):105-10.
63. Caldas C, Luna E, Spadafora-Ferreira M, Porto G, Iwai LK, Oshiro SE, et al. Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(1):66-75.
64. Csermely P. Water and cellular folding processes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001;47(5):791-800.
65. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):185-94.
66. Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:243-82.

67. Srivastava PK, Das MR. The serologically unique cell surface antigen of Zajdela ascitic hepatoma is also its tumor-associated transplantation antigen. *Int J Cancer*. 1984;33(3):417-22.
68. Roman E, Moreno C. Delayed-type hypersensitivity elicited by synthetic peptides complexed with *Mycobacterium tuberculosis* hsp 70. *Immunology*. 1997;90(1):52-6.
69. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med*. 1997;186(8):1315-22.
70. de Kleer I, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP, et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood*. 2006;107(4):1696-702.
71. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. 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*. 2000;164(1):13-7.
72. 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*. 1999;162(6):3212-9.
73. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
74. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*. 2003;362(9382):469-76.
75. van Eden W, van der Zee R, Paul AG, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, et al. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today*. 1998;19(7):303-7.
76. Chen BP, Galy AM, Fraser C, Hill B. Delineation of the human hematolymphoid system: potential applications of defined cell populations in cellular therapy. *Immunol Rev*. 1997;157:41-51.

77. Chien CT, Chen CF, Hsu SM, Lee PH, Lai MK. Protective mechanism of preconditioning hypoxia attenuates apoptosis formation during renal ischemia/reperfusion phase. *Transplant Proc.* 1999;31(5):2012-3.
78. Trieb K, Dirnhofer S, Krumbock N, Blahovec H, Sgonc R, Margreiter R, et al. Heat shock protein expression in the transplanted human kidney. *Transpl Int.* 2001;14(5):281-6.
79. Moliterno R, Woan M, Bentelejewski C, Qian J, Zeevi A, Pham S, et al. Heat shock protein-induced T-lymphocyte propagation from endomyocardial biopsies in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14(2):329-37.
80. Granja C, Moliterno RA, Ferreira MS, Fonseca JA, Kalil J, Coelho V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. *Hum Immunol.* 2004;65(2):124-34.
81. Cohen IR. Peptide therapy for Type I diabetes: the immunological homunculus and the rationale for vaccination. *Diabetologia.* 2002;45(10):1468-74.
82. Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J Immunol.* 2002;169(6):3422-8.
83. Santos-Junior RR, Sartori A, De Franco M, Filho OG, Coelho-Castelo AA, Bonato VL, et al. Immunomodulation and protection induced by DNA-hsp65 vaccination in an animal model of arthritis. *Hum Gene Ther.* 2005;16(11):1338-45.
84. Elias D, Avron A, Tamir M, Raz I. DiaPep277 preserves endogenous insulin production by immunomodulation in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1079:340-4.
85. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. 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.* 2001;358(9295):1749-53.

86. Moudgil KD, Chang TT, Eradat H, Chen AM, Gupta RS, Brahn E, et al. Diversification of T cell responses to carboxy-terminal determinants within the 65-kD heat-shock protein is involved in regulation of autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 1997;185(7):1307-16.
87. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
88. Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*. 2001;22(12):691-700.
89. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
90. Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, et al. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol*. 1997;159(5):2222-31.
91. Galy A, Christopherson I, Ferlazzo G, Liu G, Spits H, Georgopoulos K. Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood*. 2000;95(1):128-37.
92. Ryan DH, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Insel RA. Expression of interleukin-7 receptor by lineage-negative human bone marrow progenitors with enhanced lymphoid proliferative potential and B-lineage differentiation capacity. *Blood*. 1997;89(3):929-40.
93. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995;3(4):459-73.
94. Ardavin C, Wu L, Ferrero I, Shortman K. Mouse thymic dendritic cell subpopulations. *Immunol Lett*. 1993;38(1):19-25.
95. Kadowaki N. [Human dendritic cells--DC1 and DC2]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2003;92(10):2047-52.
96. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like

- receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194(6):863-9.
97. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2001;194(8):1171-8.
98. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Durand I, Banchereau J. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1996;87(6):2376-85.
99. Canque B, Camus S, Yagello M, Gluckman JC. IL-4 and CD40 ligation affect differently the differentiation, maturation, and function of human CD34+ cell-derived CD1a+CD14- and CD1a-CD14+ dendritic cell precursors in vitro. *J Leukoc Biol.* 1998;64(2):235-44.
100. Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D, Stingl G. A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med.* 1997;185(6):1131-6.
101. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood.* 1997;90(4):1458-70.
102. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature.* 1996;384(6607):364-7.
103. Dubois B, Barthelemy C, Durand I, Liu YJ, Caux C, Briere F. Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J Immunol.* 1999;162(6):3428-36.
104. Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol.* 1992;149(8):2681-8.

105. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998;92(12):4778-91.
106. Knight SC, Farrant J, Bryant A, Edwards AJ, Burman S, Lever A, et al. Non-adherent, low-density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocytes, both with veiled morphology. *Immunology*. 1986;57(4):595-603.
107. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature*. 1992;360(6404):593-7.
108. Kasinrerk W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 1993;150(2):579-84.
109. Flores-Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology*. 2001;102(3):255-62.
110. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179(4):1109-18.
111. Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Hellstrom KE, Hellstrom I, Ledbetter JA. CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol*. 2001;166(6):3865-72.
112. Viney JL. Immune fate decided by dendritic cell provocateurs. *Trends Immunol*. 2001;22(1):8-10.
113. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67.
114. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.

115. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 1989;169(3):1169-78.
116. Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinksy J, Atassi B, Steinman RM. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J Exp Med*. 1986;164(2):605-13.
117. Maldonado-Lopez R, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol*. 2001;167(8):4345-50.
118. Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res*. 2005;3(3):166-75.
119. Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166(8):4884-90.
120. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(3):1036-41.
121. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*. 1999;189(3):587-92.
122. Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol*. 2000;164(9):4507-12.
123. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):423-34.

124. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):411-6.
125. Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett*. 2004;94(1-2):11-26.
126. Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996;183(4):1789-96.
127. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*. 1999;93(5):1634-42.
128. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol*. 1993;151(5):2390-8.
129. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;192(9):1213-22.
130. Rea D, Laface D, Hutchins B, Kwappenberg K, Melief CJ, Hoebe RC, et al. Recombinant adenovirus-transduced human dendritic cells engineered to secrete interleukin-10 (IL-10) suppress Th1-type responses while selectively activating IL-10-producing CD4+ T cells. *Hum Immunol*. 2004;65(11):1344-55.
131. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;198(2):235-47.
132. Lohr J, Knoechel B, Jiang S, Sharpe AH, Abbas AK. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol*. 2003;4(7):664-9.
133. Moser M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity*. 2003;19(1):5-8.

134. Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shapero MH, Dupuis M, van Schooten WC, et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14(7):551-60.
135. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*. 2000;18(23):3894-903.
136. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, et al. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*. 2002;99(5):1517-26.
137. Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(12):1111-8.
138. Clare-Salzler MJ, Brooks J, Chai A, Van Herle K, Anderson C. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J Clin Invest*. 1992;90(3):741-8.
139. Feili-Hariri M, Dong X, Alber SM, Watkins SC, Salter RD, Morel PA. Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells. *Diabetes*. 1999;48(12):2300-8.
140. Papaccio G, Nicoletti F, Pisanti FA, Bendtzen K, Galdieri M. Prevention of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by transferring in vitro antigen-pulsed syngeneic dendritic cells. *Endocrinology*. 2000;141(4):1500-5.
141. Faunce DE, Terajewicz A, Stein-Streilein J. Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2004;172(4):1991-5.
142. Yarilin D, Duan R, Huang YM, Xiao BG. Dendritic cells exposed in vitro to TGF-beta1 ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol*. 2002;127(2):214-9.
143. Verginis P, Li HS, Carayanniotis G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of

- thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* 2005;174(11):7433-9.
144. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol.* 2000;30(7):1813-22.
145. Gao JX, Madrenas J, Zeng W, Cameron MJ, Zhang Z, Wang JJ, et al. CD40-deficient dendritic cells producing interleukin-10, but not interleukin-12, induce T-cell hyporesponsiveness in vitro and prevent acute allograft rejection. *Immunology.* 1999;98(2):159-70.
146. Gandy KL, Domen J, Aguila H, Weissman IL. CD8+TCR+ and CD8+TCR- cells in whole bone marrow facilitate the engraftment of hematopoietic stem cells across allogeneic barriers. *Immunity.* 1999;11(5):579-90.
147. Ali A, Garrovillo M, Jin MX, Hardy MA, Oluwole SF. Major histocompatibility complex class I peptide-pulsed host dendritic cells induce antigen-specific acquired thymic tolerance to islet cells. *Transplantation.* 2000;69(2):221-6.
148. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity.* 2003;18(3):367-79.
149. Adorini L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;987:258-61.
150. Caldas C. Estudo seqüencial da auto-reatividade celular à proteína de choque térmico 60 em pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis: busca de epitopos potencialmente reguladores - Tese (Doutorado). 239p. *Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, .* 2005.
151. Bethke K, Staib F, Distler M, Schmitt U, Jonuleit H, Enk AH, et al. Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human

- monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. *J Immunol.* 2002;169(11):6141-8.
152. Flohe SB, Bruggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol.* 2003;170(5):2340-8.
153. Gao B, Tsan MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(1):174-9.
154. Gao B, Tsan MF. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22523-9.
155. Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol.* 1997;27(3):756-62.
156. Adikari SB, Pettersson A, Soderstrom M, Huang YM, Link H. Interleukin-10-modulated immature dendritic cells control the proinflammatory environment in multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 2004;59(6):600-6.
157. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yarilina A, Cortesini R, et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol.* 2003;11(3-4):245-58.
158. Salio M, Cella M, Suter M, Lanzavecchia A. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol.* 1999;29(10):3245-53.
159. Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Stelz G, Kuhnt C, Schuler G, et al. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol.* 2000;74(15):7127-36.

160. Nordskog BK, Fields WR, Hellmann GM. Kinetic analysis of cytokine response to cigarette smoke condensate by human endothelial and monocytic cells. *Toxicology*. 2005;212(2-3):87-97.
161. Cohen IR. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today*. 1992;13(12):490-4.
162. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, et al. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*. 2003;198(5):737-46.
163. Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 2004;21(5):733-41.
164. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005;6(2):163-70.
165. Michaelsson J, Teixeira de Matos C, Achour A, Lanier LL, Karre K, Soderstrom K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med*. 2002;196(11):1403-14.
166. de Heusch M, Oldenhove G, Urbain J, Thielemans K, Maliszewski C, Leo O, et al. Depending on their maturation state, splenic dendritic cells induce the differentiation of CD4(+) T lymphocytes into memory and/or effector cells in vivo. *Eur J Immunol*. 2004;34(7):1861-9.
167. Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*. 2003;197(1):101-9.
168. Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J Immunol*. 2003;171(7):3533-41.

169. Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(6):676-83.
170. Habich C, Kempe K, Burkart V, Van Der Zee R, Lillicrap M, Gaston H, et al. Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. *FEBS Lett.* 2004;568(1-3):65-9.
171. Habich C, Kempe K, Gomez FJ, Lillicrap M, Gaston H, van der Zee R, et al. Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. *FEBS Lett.* 2006;580(1):115-20.
172. Durai M, Gupta RS, Moudgil KD. The T cells specific for the carboxyl-terminal determinants of self (rat) heat-shock protein 65 escape tolerance induction and are involved in regulation of autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2004;172(5):2795-802.
173. Elias D, Meilin A, Ablamunits V, Birk OS, Carmi P, Konen-Waisman S, et al. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. *Diabetes.* 1997;46(5):758-64.
174. Huurman VA, Decochez K, Mathieu C, Cohen IR, Roep BO. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23(4):269-75.
175. Habich C, Kempe K, van der Zee R, Rumenapf R, Akiyama H, Kolb H, et al. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2005;174(3):1298-305.
176. Phipps PA, Stanford MR, Sun JB, Xiao BG, Holmgren J, Shinnick T, et al. Prevention of mucosally induced uveitis with a HSP60-derived peptide linked to cholera toxin B subunit. *Eur J Immunol.* 2003;33(1):224-32.
177. Siepmann K, Biester S, Pliskova J, Muckersie E, Duncan L, Forrester JV. CD4(+)CD25 (+) T regulatory cells induced by LPS-activated bone marrow dendritic cells suppress experimental autoimmune uveoretinitis in vivo. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006.
178. Zanin-Zhorov A, Tal G, Shvitiel S, Cohen M, Lapidot T, Nussbaum G, et al. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator

- suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J Immunol.* 2005;175(1):276-85.
179. Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, Hershkovich R, et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol.* 2005;174(6):3227-36.
180. Gregori S, Bacchetta R, Hauben E, Battaglia M, Roncarolo MG. Regulatory T cells: prospective for clinical application in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2005;12(6):451-6.
181. Zeller JC, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG, et al. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol.* 1999;163(7):3684-91.
182. Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(2):203-8.
183. Kilmartin B, Reen DJ. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol.* 2004;34(7):2041-51.

ANEXO 1: PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Produção de citocinas

	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
31 iDC N3 LT	-2,1	-0,4	0,8	1,2	-1,1	-2,6
31 iDC N7 LT	-0,3	-1,1	-0,1	1,0	-0,8	-0,4
31 iDC C9	-0,4	-0,9	-0,3	1,2	0,0	-1,5
31 iDC P277	-0,9	-1,2	-0,2	0,0	-1,1	-0,3
31 iDC C-HSP60	0,1	-0,5	0,9	0,0	-1,4	5,0
31 iDC LT	2,1	2,4	2,2	0,0	3,2	2,6
31 iDC LT PHA	804,7	38,9	10,1	3,2	1,1	154,3
31 DC-IL10 N3 LT	0,0	1,4	2,6	1,1	-2,0	5,1
31 DC-IL10 N7 LT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
31 DC-IL10 C9 LT	0,0	0,6	4,0	1,0	-1,5	-1,8
31 DC-IL10 p277 LT	0,0	0,1	0,4	1,1	-1,8	2,0
31 DC-IL10 C-HSP60 LT	0,0	0,3	0,4	1,2	1,0	-0,1
31 DC IL-10 LT	0,0	1,2	1,7	0,0	3,8	1,8
31 DC IL10 PHA	429,1	31,4	5,9	2,3	-0,3	75,9
31 mDC N3	0,0	1,0	3,0	1,1	-0,2	2,1
31 mDC N7	1,4	2,1	4,0	1,2	0,2	4,1
31 mDC C9	0,0	2,1	4,4	0,0	0,1	3,4
31 mDC p277	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
31 mDC C-Hsp60 LT	0,0	0,2	0,4	0,0	-0,1	-1,1
31 mDC LT	0,0	1,1	1,0	0,0	1,7	1,1
31 mDC PHA	1250,0	1248,9	241,2	60,4	48,0	1248,9

Anexo A- Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta.

Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
32 IDC LT	0,0	-0,8	-1,5	1,0	-1,7	0,7
32 iDC N7 LT	0,0	-0,7	-1,9	0,0	-1,7	-1,0
32 IDC C9 LT	1,9	0,0	-1,3	0,0	-2,0	-0,6
32 iDCp277 LT	47,7	11,8	0,5	2,1	-0,6	25,7
32 IDC C-Hsp60 LT	0,0	0,8	-0,2	0,0	-2,1	-1,0
32 IDC LT	0,0	2,2	3,1	0,0	3,3	2,4
32 IDC PHA	1250,0	1247,8	142,0	86,1	74,3	1247,6
32 DC-IL10 N3 LT	-2,7	11,6	1,6	0,0	3,2	0,2
32 DC-IL10 N7 LT	-2,7	0,2	2,2	1,0	7,0	-1,0
32 DC-IL10 C9 LT	-2,7	19,9	1,7	0,0	5,0	-0,7
32 DC IL-10 p277 LT	-2,7	9,9	3,3	1,1	3,4	3,6
32 DC IL-10 C-HSP60	-1,3	24,1	2,0	0,0	6,1	1,3
32 DC IL-10 LT	2,7	2,3	0,0	0,0	0,0	2,0
32 DC IL-10 PHA	186,8	781,3	18,2	31,8	29,3	656,7
32 mDC N3 LT	-2,4	1,1	-372,1	0,0	-2,9	-1,6
32 mDC N7 LT	-2,4	0,0	-440,0	0,0	-2,7	-0,1
32 mDC C9 LT	-0,8	0,0	-302,7	0,0	0,6	-0,5
32 mDC p277 LT	-0,8	0,0	-73,0	0,0	-1,4	-0,4
32 mDC C-Hsp LT	-0,2	3,1	216,8	0,0	-3,2	2,6
32 MDC LT	2,4	0,0	1033,2	0,0	5,1	1,6
32 mDC PHA	57,4	460,0	216,8	10,0	6,2	76,1

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
33 iDC N3 LT	0,5	-165,3	0,3	0,0	-2,7	-12,8
33 iDC N7 LT	1,4	-26,2	-2,3	0,0	-1,8	-1,9
33 iDC C9 LT	-0,8	-78,5	-2,3	0,0	0,8	-10,5
33 iDCp277 LT	-0,7	-73,7	-0,4	0,0	-1,2	-7,0
33 iDC C-Hsp60 LT	18,6	14,3	0,8	1,6	-2,4	27,2
33 iDC LT	3,5	241,7	3,9	0,0	3,9	12,8
33 iDC PHA	1200,6	1008,3	9,1	41,4	37,0	1237,2
33 iDC IL-10 N3 LT	-0,5	-2,5	2,0	0,0	0,0	-6,1
33 iDC IL-10 N7 LT	0,5	-1,7	0,0	0,0	0,0	-1,4
33 iDC IL-10 C9 LT	1,0	-3,4	0,0	0,0	0,0	-3,7
33 iDC IL-10p277 LT	2,0	-0,8	0,0	0,0	0,0	-2,8
33 iDC IL-10 C-Hsp60 LT	2,1	5,3	2,0	0,0	0,0	13,5
33 iDC IL-10 LT	2,4	5,4	0,0	0,0	0,0	6,1
33 iDC IL-10 PHA	992,0	531,4	368,5	325,9	119,7	591,0
33 mDC N3 LT	-546,7	-37,0	-4,1	-5,3	0,0	-7,5
33 mDC N7 LT	-546,7	-37,9	-5,0	-4,6	-0,5	-2,2
33 mDC C9 LT	-546,7	-39,6	-5,4	-5,4	0,4	-5,1
33 mDCp277 LT	-546,7	-77,6	-7,3	-5,4	0,6	-6,4
33 mDC C-Hsp60 LT	-544,0	-39,6	-4,9	-6,5	-1,0	-4,2
33 mDCLT	546,7	81,7	9,2	6,5	3,4	8,9
33 mDC LT +PHA	703,3	186,9	97,4	98,2	44,4	212,9

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
34 iDC N3 LT	-1,9	-0,6	-0,2	0,0	-1,1	-2,4
34 iDC N7 LT	0,0	0,0	-1,5	1,2	-1,3	5,9
34 iDC C9 LT	-1,9	-0,6	-1,5	0,0	-0,5	-1,0
34 iDCp277 LT	-1,9	-0,1	-1,5	1,1	-1,1	3,2
34 iDC C-Hsp60 LT	1,2	2,5	-1,5	3,0	-0,9	23,3
34 iDC LT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
34 iDC PHA	1248,1	1248,1	251,8	627,0	185,4	1247,6
34 DC IL-10 N3 LT	0,0	2,4	-0,4	0,0	0,0	-1,4
34 DC IL-10 N7 LT	0,0	0,0	-1,0	0,0	0,0	-1,4
34 DC IL-10 C9 LT	0,0	1,1	-0,6	1,1	1,0	-0,2
34 DC IL-10p277 LT	0,0	0,0	-1,0	0,0	0,0	-0,3
34 DC IL-10 C-Hsp60 LT	0,0	0,0	-2,5	0,0	0,0	-1,4
34 DC IL-10 LT	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	1,4
34 DC IL-10 PHA	1,4	4,3	1,9	5,5	3,7	10,9
34 mDC N3 LT	-15,2	-34,8	-2,6	-7,7	-1,1	-14,8
34 mDC N7 LT	-15,2	-36,7	-4,0	-8,9	-2,3	-14,9
34 mDC C9 LT	-13,9	-35,3	-3,0	-8,9	0,0	-16,1
34 mDCp277 LT	-15,2	-36,7	-2,9	-8,9	-1,3	-14,9
34 mDC C-Hsp60 LT	-15,2	-36,7	-3,8	-8,9	-1,5	-16,1
34 mDC LT	15,2	36,7	5,4	8,9	3,4	16,1
34 mDC LT PHA	1234,8	42,0	10,2	40,3	9,6	10,4

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 31						
	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
31 iDC N3	13,2	-5,5	-1,4	0,0	-3,7	0,4
31 iDC N7	0,0	-6,8	-1,0	0,0	-2,2	-0,3
31 iDC C9	0,0	-6,8	-1,1	0,0	1,1	0,1
31 iDC P277	0,0	-5,5	-1,3	0,0	0,4	0,3
31 iDC C-HSP60	2,2	-3,5	2,2	0,0	-0,6	0,4
31 iDC	0,0	6,8	2,5	0,0	5,4	1,3
31 DC-IL10 N3	0,0	-0,1	-0,2	0,0	-2,3	-0,2
31 DC-IL10 N7	0,0	-2,0	-1,0	0,0	-3,1	-0,2
31 DC-IL10 C9	0,0	-2,0	-1,1	0,0	2,8	0,0
31 DC-IL10 P277	0,0	-2,0	-0,8	0,0	2,0	0,4
31 DC-IL10 C-HSP60	0,0	-2,0	0,9	0,0	-2,7	0,3
31 DC-IL10	1,4	2,0	7,8	0,0	17,5	1,3
31 mDC N3	0,0	-26,8	-7,3	0,0	-0,5	0,0
31 mDC N7	0,0	-37,0	-6,7	0,0	0,1	0,0
31 mDC C9	1,9	-36,4	-7,8	0,0	1,8	-0,1
31 mDC P277	0,0	-37,2	-7,9	0,0	2,6	-1,2
31 mDC C-HSP60	0,0	-35,9	-5,6	0,0	-1,7	0,2
31 mDC	2,3	38,3	13,5	0,0	10,6	1,2
31 iDC I4	0,0	-5,3	-0,7	0,0	-3,3	0,3
31 iDC I8	0,0	-6,8	-1,4	0,0	-3,3	-0,3
31 iDC I9	0,0	-6,8	-2,5	0,0	-3,2	-0,2
31 iDC N2	0,0	-6,8	-2,5	0,0	-3,0	0,0
31 iDC N4	0,0	-6,8	-2,5	0,0	-3,2	0,0
31 iDC N6	0,0	-6,8	-2,5	1,0	-3,5	-0,1
31 iDC C3	0,0	7,5	1,0	0,0	-3,2	-0,1
31 iDC C4	0,0	-5,0	-0,8	0,0	-3,9	0,4
31 DC IL10 I4	-1,4	-0,9	-6,7	0,0	-15,5	-0,1
31 DC IL10 I8	-1,4	-2,0	-6,3	0,0	-15,7	0,4
31 DC IL 10 I9	-1,4	-2,0	-6,6	0,0	-16,1	-0,1
31 DC IL10 N2	-1,4	-2,0	-6,2	0,0	-15,7	0,2
31 DC IL10 N4	-1,4	-2,0	-6,5	0,0	-15,7	0,2
31 DC IL10 N6	-1,4	53,1	16,6	0,0	-15,4	0,4
31 DC IL10 C3	-1,4	-2,0	-7,8	0,0	-16,4	-0,1
31 DC IL10 C4	-1,4	-2,0	-7,8	0,0	-16,0	-0,1
31 mDC I4	-2,3	-37,3	-13,5	0,0	-8,6	0,0
31 mDC I8	-2,3	-38,3	-13,5	0,0	-9,1	-1,2
31 mDC I9	-2,3	-38,3	-13,5	0,0	-9,1	0,3
31 mDC N2	-2,3	-38,3	-13,5	0,0	-9,3	0,2
31 mDC N4	-2,3	-37,0	-12,3	0,0	-9,0	0,6
31 mDC N6	-2,3	-38,3	-12,0	0,0	-9,4	0,1
31 mDC C3	-2,3	-38,3	-13,5	0,0	-8,3	0,4
31 mDC C4	-2,3	-38,3	-12,1	0,0	-7,5	0,6

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 32						
	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
32 iDC N3	8,7	-10,3	-3,0	0,0	-0,3	-0,3
32 iDC N7	0,0	-9,2	-1,9	0,0	0,9	-0,1
32 iDC C9	1,6	-10,3	-3,0	0,0	0,7	-0,3
32 iDC P277	31,2	-8,8	-3,0	0,0	-0,3	0,3
32 iDC C-HSP60	8,2	-8,9	-3,0	0,0	0,0	0,0
32 iDC	0,0	10,3	3,0	0,0	2,9	1,6
32 DC-IL10 N3	0,0	-0,9	0,5	0,0	-1,1	1,6
32 DC-IL10 N7	0,0	-3,4	-1,7	0,0	-0,9	1,5
32 DC-IL10 C9	0,0	-3,2	-0,2	1,2	0,0	1,4
32 DC-IL10 P277	0,0	-4,5	-0,2	0,0	-0,5	1,4
32 DC-IL10 C-HSP60	0,0	-1,4	0,0	0,0	-0,7	1,8
32 DC-IL10	0,0	4,5	1,7	0,0	4,2	0,0
32 mDC N3	0,0	-5,3	-0,3	0,0	-1,9	-0,4
32 mDC N7	0,0	-6,7	-1,6	0,0	-1,7	0,0
32 mDC C9	0,0	-6,7	-2,2	0,0	0,1	-1,4
32 mDC P277	0,0	-6,7	-2,0	0,0	0,4	-0,3
32 mDC C-HSP60	0,0	-3,3	-0,7	0,0	-1,8	0,1
32 mDC	0,0	6,7	3,6	0,0	5,6	1,4
32 iDC I4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	1,6
32 iDC I8	0,0	1,0	1,4	0,0	2,1	1,3
32 iDC I9	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	1,8
32 iDC N2	0,0	11,8	4,6	0,0	1,9	1,8
32 iDC N4	0,0	2,6	2,2	0,0	1,5	1,3
32 iDC N6	0,0	0,0	1,7	0,0	1,6	1,4
32 iDC C3	0,0	0,0	1,0	0,0	1,9	1,5
32 iDC C4	0,0	0,0	1,6	0,0	1,9	1,2
32 DC IL10 I4	0,0	-3,4	-0,2	0,0	-2,1	1,5
32 DC IL10 I8	0,0	-4,5	-0,2	0,0	-1,9	1,3
32 DC IL 10 I9	0,0	52,4	21,2	0,0	-1,6	1,3
32 DC IL10 N2	0,0	-4,5	-0,5	0,0	-2,7	1,3
32 DC IL10 N4	0,0	-3,3	-0,2	0,0	-2,0	1,9
32 DC IL10 N6	0,0	-4,5	-0,5	0,0	-2,2	1,5
32 DC IL10 C3	0,0	-4,5	-1,7	0,0	-2,6	1,6
32 DC IL10 C4	0,0	-3,3	-0,4	0,0	-2,2	1,6
32 mDC I4	0,0	-6,7	-2,4	0,0	-3,8	0,0
32 mDC I8	0,0	-5,0	-2,1	0,0	-3,5	-0,2
32 mDC I9	2,5	-4,3	-1,4	1,0	-4,0	-1,4
32 mDC N2	2,4	-5,4	-1,7	1,2	-3,7	0,2
32 mDC N4	1,2	-5,1	-2,0	0,0	-3,0	0,5
32 mDC N6	1,5	-4,8	-1,8	0,0	-2,2	0,3
32 mDC C3	2,5	-5,5	-2,4	0,0	-3,3	0,4
32 mDC C4	0,0	-5,4	-3,6	1,0	-3,3	0,1

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 33						
	IFNg	TNFa	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
33 iDC N3	0,0	1,4	1,2	0,0	-0,4	1,4
33 iDC N7	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,3	1,4
33 iDC C9	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0
33 iDC P277	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
33 iDC C-HSP60	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	0,0
33 iDC	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0
33 DC-IL10 N3	0,0	-32,3	1,2	0,0	-17,8	0,0
33 DC-IL10 N7	0,0	-33,2	0,4	0,0	-19,5	1,1
33 DC-IL10 C9	0,0	-47,0	-0,7	0,0	2,7	1,3
33 DC-IL10 P277	0,0	-5,3	-0,4	0,0	-6,3	1,1
33 DC-IL10 C-HSP60	0,0	-26,2	0,7	0,0	-10,5	2,3
33 DC-IL10	0,0	48,9	2,0	0,0	28,8	0,0
33 mDC N3	0,0	1,0	0,0	0,1	-5,3	0,3
33 mDC N7	0,0	-1,2	-811,7	-1,2	-4,0	-0,1
33 mDC C9	0,0	-1,2	-811,7	-1,2	2,9	0,0
33 mDC P277	0,0	-1,2	-157,2	-1,2	-1,3	-0,3
33 mDC C-HSP60	0,0	0,4	0,0	-0,1	-5,6	-0,3
33 mDC	0,0	1,2	4306,7	0,0	22,9	1,3
33 iDC I4	0,0	1,1	1,5	0,0	0,0	1,6
33 iDC I8	0,0	1,7	1,3	1,1	0,1	1,5
33 iDC I9	1,8	1,7	2,0	1,1	-0,1	1,6
33 iDC N2	0,0	12,2	3,6	1,2	14,1	1,6
33 iDC N4	1,8	7,2	3,7	1,2	14,2	1,5
33 iDC N6	0,0	2,1	2,4	1,3	10,1	1,9
33 iDC C3	0,0	1,6	2,4	0,0	20,3	1,2
33 iDC C4	0,0	1,7	2,8	1,1	15,8	0,0
33 DC IL10 I4	0,0	-37,2	1,1	0,0	-1,3	1,4
33 DC IL10 I8	0,0	-4,2	5,1	0,0	-7,1	1,3
33 DC IL 10 I9	4,9	-30,3	0,8	1,2	-14,8	2,4
33 DC IL10 N2	0,0	-2,9	1,7	1,1	-14,5	1,5
33 DC IL10 N4	0,0	-47,3	0,7	1,1	-12,0	1,7
33 DC IL10 N6	0,0	-48,9	0,6	1,1	-10,1	0,0
33 DC IL10 C3	0,0	-48,9	0,1	1,0	-8,6	1,2
33 DC IL10 C4	1,5	-47,6	0,5	0,0	-10,0	1,6
33 mDC I4	0,0	1,2	-4304,8	-0,1	-9,9	0,2
33 mDC I8	1,4	2,5	-4304,9	-0,1	-6,2	0,8
33 mDC I9	2,2	0,5	-4306,7	0,0	-11,6	0,1
33 mDC N2	1,7	0,3	-4305,5	0,3	-5,9	-0,1
33 mDC N4	2,2	0,2	-4306,7	-1,2	0,5	0,0
33 mDC N6	0,0	0,0	-4305,0	-1,2	-3,0	0,3
33 mDC C3	0,0	1,6	-4305,3	-1,2	-4,4	-0,3
33 mDC C4	1,2	12,7	-4304,1	-1,2	-7,2	0,1

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 34						
	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
34 iDC N3	3,3	102,4	5,9	0,0	-9,6	0,3
34 iDC N7	0,0	-246,5	-4,3	0,0	-8,6	-0,1
34 iDC C9	1,7	-171,1	-4,9	1,1	-2,2	0,3
34 iDC P277	0,0	-176,5	-1,1	0,0	-4,2	-0,6
34 iDC C-HSP60	4,9	110,9	2,4	0,0	-7,9	0,6
34 iDC	0,0	704,0	9,2	0,0	23,4	1,9
34 DC-IL10 N3	0,0	-6,0	1,4	0,0	-5,8	0,7
34 DC-IL10 N7	0,0	-8,1	1,4	0,0	-4,2	0,5
34 DC-IL10 C9	0,0	-7,8	0,0	0,0	1,4	0,6
34 DC-IL10 P277	0,0	-8,0	1,4	0,0	-0,1	0,8
34 DC-IL10 C-HSP60	0,0	-9,2	0,0	0,0	-0,5	0,7
34 DC-IL10	0,0	9,2	0,0	0,0	13,8	1,0
34 mDC N3	0,0	3,6	0,0	0,0	-12,0	-0,6
34 mDC N7	0,0	-2,8	-1,1	0,0	-10,2	-0,1
34 mDC C9	0,0	-2,9	-1,0	0,0	-6,6	-0,4
34 mDC P277	0,0	-4,9	-0,2	0,0	-7,8	0,0
34 mDC C-HSP60	0,0	10,4	-0,2	0,0	-10,6	-0,1
34 mDC	0,0	7,0	3,5	0,0	20,3	1,8
34 iDC I4	2,1	-701,3	-9,2	0,0	-12,5	0,0
34 iDC I8	0,0	-702,3	-9,2	0,0	-11,3	-0,3
34 iDC I9	1,8	-702,2	-8,0	1,2	0,3	0,0
34 iDC N2	0,0	-702,4	-7,8	1,3	-3,6	-0,7
34 iDC N4	2,0	-702,6	-9,2	1,1	-6,6	-0,7
34 iDC N6	1,1	-702,1	-7,9	1,1	-7,2	-1,9
34 iDC C3	1,4	-701,2	-8,1	0,0	-10,4	-0,5
34 iDC C4	0,0	-701,0	-7,0	1,1	-23,4	-0,9
34 DC IL10 I4	0,0	-8,0	1,7	1,0	-13,8	0,1
34 DC IL10 I8	0,0	-8,0	1,7	1,1	-12,5	0,3
34 DC IL10 I9	0,0	-9,2	0,0	0,0	-13,8	0,7
34 DC IL10 N2	0,0	-7,8	1,3	0,0	-13,8	0,3
34 DC IL10 N4	2,6	-7,9	1,6	0,0	-12,6	0,9
34 DC IL10 N6	2,5	-7,6	2,8	0,0	-13,8	1,3
34 DC IL10 C3	2,0	-6,7	1,9	1,1	-12,3	1,0
34 DC IL10 C4	0,0	-8,0	1,6	1,1	-12,5	0,7
34 mDC I4	6,8	0,2	2,3	11,6	-14,2	15,1
34 mDC I8	2,2	-4,9	-0,4	1,1	-17,9	0,2
34 mDC I9	1,6	-5,8	-1,8	1,0	-18,2	-0,7
34 mDC N2	1,4	-5,7	-1,7	0,0	-17,9	-1,8
34 mDC N4	1,5	-5,8	-1,1	0,0	-17,2	-0,5
34 mDC N6	2,1	-5,6	-1,8	1,0	-18,8	0,0
34 mDC C3	1,8	-1,9	0,8	1,0	-17,3	-0,1
34 mDC C4	0,0	-1,7	44,3	1,2	-17,4	-0,3

Anexo A(continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 35						
	IFN γ	TNF α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
35 iDC N3	0,0	1,4	-1,9	0,0	6,1	-0,5
35 iDC N7	0,0	0,0	-1,9	0,0	9,9	-0,4
35 iDC C9	0,0	1,5	-0,5	0,0	16,1	-0,3
35 iDC P277	0,0	1,3	-0,5	0,0	13,8	-0,5
35 iDC C-HSP60	0,0	1,4	-1,9	0,0	5,3	-0,2
35 iDC Q-sox	0,0	1,4	-1,9	0,0	9,3	-0,7
35 iDC F-7	0,0	1,8	0,1	0,0	0,6	-0,3
35 iDC	0,0	0,0	1,9	0,0	1,5	1,8
35 DC-IL10 N3	0,0	-5,2	-1,5	1,3	-2,1	0,3
35 DC-IL10 N7	0,0	-6,6	-1,2	0,0	-2,1	-0,1
35 DC-IL10 C9	0,0	-5,3	-1,4	0,0	-2,7	0,1
35 DC-IL10 P277	0,0	-4,1	-0,8	0,0	-2,4	0,1
35 DC-IL10 C-HSP60	0,0	-5,2	0,8	0,0	-2,6	-1,3
35 DC IL10 Q-sox	0,0	-4,6	-0,8	0,0	-2,7	0,2
35 DC-IL10	6,6	6,6	3,0	6,6	4,0	1,3
35 mDC N3	0,0	-1,2	0,1	0,0	1,3	0,0
35 mDC N7	0,0	-1,2	0,3	0,0	3,0	0,1
35 mDC C9	0,0	-0,1	0,3	0,0	2,4	0,4
35 mDC P277	0,0	4,3	2,5	0,0	2,3	0,1
35 mDC C-HSP60	0,0	4,3	2,1	0,0	1,6	0,4
35 mDC Q-sox	0,0	20,1	93,6	0,0	2,5	0,2
35 mDC	0,0	1,2	2,0	0,0	2,6	1,4
35 iDC I4	2,2	1,7	1,3	0,0	0,6	-0,4
35 iDC I8	12,6	70,7	13,8	40,1	10,9	18,5
35 iDC I9	2,2	2,8	-1,9	2,4	1,2	0,6
35 iDC N2	1,8	1,3	-0,5	1,3	-0,1	-0,3
35 iDC N4	1,6	1,2	-1,9	1,1	0,6	-0,4
35 iDC N6	0,0	1,1	-0,6	1,1	0,0	0,3
35 iDC C3	2,2	0,0	-1,9	1,2	0,1	-0,1
35 iDC C4	0,0	0,0	-1,9	0,0	0,4	0,0
35 DC IL-10 I4	0,0	-4,6	-1,9	1,1	-4,0	4,2
35 DC IL-10 I8	0,0	-5,2	-3,0	1,3	-2,7	3,2
35 DC IL-10 I9	2,0	-4,4	-1,5	1,2	-2,6	3,5
35 DC IL-10 N2	3,7	-2,2	-1,0	1,6	4,6	0,9
35 DC IL-10 N4	3,2	-5,4	-1,1	1,3	1,9	-1,3
35 DC IL-10 N6	3,2	-5,4	-1,1	1,3	1,9	-1,3
35 DC IL-10 C3	2,3	-5,1	-1,3	1,2	8,6	0,8
35 DC IL-10 C4	1,6	-6,6	-1,2	1,1	3,8	0,8
35 mDC IL-10 I4	4,3	0,0	-0,2	1,2	6,4	0,6
35 mDC IL-10 I8	0,0	-1,2	-2,0	0,0	-2,6	-1,4
35 mDC IL-10 I9	3,3	3,4	-0,1	1,1	7,4	0,4
35 mDC IL-10 N2	4,2	1,8	0,0	0,0	4,0	1,6
35 mDC IL-10 N4	112,2	60,5	19,6	29,2	11,0	88,3
35 mDC IL-10 N6	2,2	2,0	0,1	0,0	1,7	0,3
35 mDC IL-10 C3	0,0	1,1	-0,1	0,0	0,5	0,6
35 mDC IL-10 C4	0,0	0,0	0,1	0,0	10,5	-0,3

Anexo A (continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 36						
	IFNg	TNFa	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
36 iDC N3	0,0	-1,1	1,8	0,0	0,3	0,1
36 iDC N7	0,0	-1,1	1,7	0,0	0,5	-1,4
36 iDC C9	0,0	-1,1	1,9	0,0	-0,1	0,4
36 iDC P277	0,0	-1,1	1,8	0,0	-0,1	-1,4
36 iDC C-HSP60	0,0	-1,1	1,1	0,0	-0,2	-0,4
36 iDC Q-sox	0,0	1,7	2,2	0,0	0,6	0,1
36 iDC	0,0	1,1	0,0	0,0	2,0	1,4
36 DC-IL10 N3	0,0	0,0	-1,6	0,0	0,4	0,4
36 DC-IL10 N7	0,0	1,2	-1,6	0,0	1,1	-0,1
36 DC-IL10 C9	0,0	0,0	-0,4	0,0	0,4	0,3
36 DC-IL10 P277	0,0	1,2	-1,6	0,0	0,4	0,4
36 DC-IL10 C-HSP60	0,0	0,0	-1,6	0,0	-0,2	-1,1
36 DC-IL10 Q-Sox	0,0	0,0	-1,6	0,0	0,2	0,4
36 DC-IL10	0,0	0,0	1,6	0,0	1,8	1,1
36 mDC N3	0,0	-6,9	-0,6	0,0	2,0	-0,2
36 mDC N7	1,8	-7,4	0,3	1,6	4,8	0,5
36 mDC C9	0,0	-8,3	-0,6	0,0	9,0	0,1
36 mDC P277	0,0	-9,6	-0,7	1,1	10,2	0,0
36 mDC C-HSP60	0,0	-9,6	-1,8	0,0	-1,2	-0,3
36 mDC Q-sox	0,0	-7,4	-1,8	0,0	2,1	0,3
36 mDC	0,0	9,6	1,8	0,0	12,8	1,4
36 iDC I4	1,8	0,1	1,6	1,0	5,9	-0,1
36 iDC I8	2,8	0,4	1,8	1,1	5,7	0,7
36 iDC I9	0,0	0,7	1,9	1,1	8,4	0,0
36 iDC N2	1,8	11,9	2,3	1,0	4,2	0,2
36 iDC N4	1,8	5,6	2,2	0,0	1,0	0,5
36 iDC N6	2,6	1,0	1,6	1,5	3,4	0,3
36 iDC C3	2,0	0,4	1,3	1,2	3,3	0,6
36 iDC C4	0,0	-1,1	1,3	0,0	8,6	-0,2
36 DC IL-10 I4	2,2	1,3	-0,6	0,0	8,1	0,3
36 DC IL-10 I8	1,9	1,1	-0,1	1,1	6,9	0,5
36 DC IL-10 I9	0,0	1,1	-0,4	0,0	6,4	0,2
36 DC IL-10 N2	2,3	3,8	-0,3	1,3	8,2	3,0
36 DC IL-10 N4	2,0	2,5	-1,6	1,1	3,1	2,5
36 DC IL-10 N6	0,0	2,8	0,0	0,0	-0,7	0,1
36 DC IL-10 C3	2,0	3,2	0,2	1,0	-0,7	0,4
36 DC IL-10 C4	1250,0	670,7	19,3	1,2	4,4	0,8
36 mDC I4	2,6	-6,9	-0,1	1,0	-11,3	-0,3
36 mDC I8	0,0	-2,6	-0,1	1,0	-12,8	-1,4
36 mDC I9	0,0	-2,6	-0,1	1,0	-12,8	-1,4
36 mDC N2	0,0	-5,9	-0,4	0,0	-12,8	-0,3
36 mDC N4	0,0	2,9	-1,8	0,0	-12,8	-1,4
36 mDC N6	1,2	-8,3	-0,1	0,0	-12,8	-1,4
36 mDC C3	5,6	-7,1	-0,7	1,2	-11,6	-0,2
36 mDC C4	1113,5	4,6	2,2	7,2	-11,0	14,4

Anexo A (continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

Painel DC 37						
	IFNg	TNFa	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
37 iDC N3	0,0	0,0	-4,2	0,0	-9,8	0,4
37 iDC N7	0,0	-1,7	-3,9	0,0	-7,4	0,4
37 iDC C9	0,0	-5,2	-3,9	0,0	-3,9	0,3
37 iDC P277	0,0	-4,0	-4,2	0,0	-4,0	-0,2
37 iDC C-HSP60	0,0	-3,8	-3,8	0,0	-2,0	0,3
37 iDC Q-Sox	0,0	0,0	-3,9	1,1	0,2	0,1
37 iDC	0,0	23,1	6,0	0,0	18,2	1,3
37 DC-IL10 N3	0,0	14,3	0,3	0,0	2,6	0,0
37 DC-IL10 N7	0,0	3,0	-0,1	0,0	0,0	-0,1
37 DC-IL10 C9	0,0	0,0	-0,5	0,0	2,5	-0,2
37 DC-IL10 P277	0,0	0,0	-0,1	0,0	2,6	-0,2
37 DC-IL10 C-HSP60	0,0	0,0	-0,4	0,0	5,0	0,0
37 DC-IL10 Q-sox	0,0	0,0	-0,1	0,0	3,3	0,0
37 DC-IL10	0,0	1,3	0,0	0,0	10,6	1,5
37 mDC N3	0,0	0,5	1,4	0,0	-6,9	0,8
37 mDC N7	0,0	-0,3	1,3	0,0	-3,7	0,2
37 mDC C9	0,0	0,1	0,0	0,0	8,5	0,1
37 mDC P277	0,0	-1,3	0,0	0,0	-0,1	0,2
37 mDC C-HSP60	0,0	-1,3	1,1	0,0	0,9	0,1
37 mDC Q-sox	0,0	0,0	1,3	0,0	-2,2	0,3
37 mDC	0,0	2,1	0,0	0,0	14,4	1,2
37 iDC I4	0,0	-4,2	-4,0	0,0	-18,2	0,7
37 iDC I8	2,2	-0,4	23,8	0,0	-16,5	-1,3
37 iDC I9	2,9	75,7	-1,8	2,5	-15,2	6,9

Anexo B (continuação) - Dados brutos de produção ou inibição de citocinas para os diferentes tipos de DCs pulsadas com a Hsp60 ou antígenos derivados desta. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC-L10) e maduras (mDC), após 48h de cultura. Dosagem por CBA (*Cytometric Beads Array*) e análise por citometria de fluxo. Valores de detecção mínimo= 20pg/ml e máximo=5000pg/ml. ConA= valor bruto menos valor espontânea em pg/ml.

ANEXO 2: REAÇÃO LINFOCITÁRIA MISTA

Reação linfocitária mista

MLR DC27 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	3053,7	3942,9	6483,5	4493,4	3498,3	8,8
DC IL10 + LT	10800,8	12867,2	11691,1	11786,4	11786,4	29,7
DC IL10 LPS + LT	7730,5	11980,8	6002,4	8571,2	6866,5	17,3
mDC + LT	15635,7	14439,1	20609,7	16894,8	16894,8	42,6
LT	384,5	396,4	408,6	396,5	396,5	
MLR DC27 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	34331,1	25706	33457,1	31164,7	31164,7	78,6
DC IL10 + LT PHA	38263,8	39174,2	37333,3	38257,1	38257,1	96,5
DC IL10 LPS + LT PHA	34400,3	32528	29948,1	32292,1	32292,1	81,4
mDC + LT PHA	262010,1	225061,6	155820,4	214297,4	214297,4	540,5
LT	384,5	396,4	408,6	396,5	396,5	

MLR DC28 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	10222,5	11215,9	9013,3	10150,6	10150,6	35,8
DC IL10 + LT	16804,2	16070	17173,8	16682,7	16682,7	58,9
DC IL10 LPS + LT	3871,5	16536,1	4326,2	8244,6	4098,9	14,5
mDC + LT	19096,3	19117,5	20007,5	19407,1	19407,1	68,5
LT	316,5	263,8	269,3	283,2	283,2	
MLR DC28 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	11578,1	19050,3	17881,4	16169,9	16169,9	57,1
DC IL10 + LT PHA	28045,8	29236,3	34410,4	30564,2	30564,2	107,9
DC IL10 LPS + LT PHA	19440,1	23523,4	18707,8	20557,1	20557,1	72,6
mDC + LT PHA	38399,6	37708,3	30286	35464,6	35464,6	125,2
LT	316,5	263,8	269,3	283,2	283,2	

Anexo C- Dados brutos da proliferação em MLR (Cultura Mista) para as diferentes DCs cocultivadas com linfócitos T alogênicos. iDC= células dendrítica imatura; iDC IL-10= célula dendrítica imatura tratada com IL-10; mDC= célula dendrítica madura. IP= índice de proliferação. Proliferação ≥ 2 . N=3.

Reação linfocitária mista

MLR DC29 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	3020,2	3040,8	4414,3	3491,8	3491,8	11,0
DC IL10 + LT	18836,3	110,1	14498,4	11148,3	16667,4	52,6
DC IL10 LPS + LT	6190,4	15005,4	6193,8	9129,9	6192,1	19,6
mDC + LT	27533,1	27870,5	28139,3	27847,6	27847,6	87,9
LT	284,4	351,7	313,9	316,7	316,7	
MLR DC29 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	28196,5	21086,9	19475,9	22919,8	22919,8	72,4
DC IL10 + LT PHA	24004,2	30020,2	31206,7	28410,4	28410,4	89,7
DC IL10 LPS + LT PHA	18161,8	10912,1	19394,1	16156,0	16156,0	51,0
mDC + LT PHA	41576,7	35457,7	34018,2	37017,5	37017,5	116,9
LT	284,4	351,7	313,9	316,7	316,7	

MLR DC31 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	12418,42	13463,7	12296,46	12726,2	12726,2	38,8
DC IL10 + LT	9022,95	9010,66	8979,17	9004,3	9004,3	27,5
DC IL10 LPS + LT	43740	46547,2	50124,8	46804,0	46804,0	142,8
mDC + LT	122076,3	107807	116994,1	115625,9	115625,9	352,8
LT	243,97	376,4	362,91	327,8	327,8	
MLR DC31 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	112232,3	103487,3	150805,9	122175,2	122175,2	372,8
DC IL10 + LT PHA	133113,6	139795,7	167230,8	146713,4	146713,4	447,6
DC IL10 LPS + LT PHA	64368,9	74616,9	76268,6	71751,5	71751,5	218,9
mDC + LT PHA	180911,2	183798,2	197665	187458,1	187458,1	571,9
LT	243,97	376,4	362,91	327,8	327,8	

Anexo C (continuação)- Dados brutos da proliferação em MLR (Cultura Mista) para as diferentes DCs cocultivadas com linfócitos T alogênicos. iDC= células dendrítica imatura; iDC IL-10= célula dendrítica imatura tratada com IL-10; mDC= célula dendrítica madura. IP= índice de proliferação. Proliferação ≥ 2 . N=3.

Reação linfocitária mista

MLR DC32 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	100911,2	113798	117665	110791,5	110791,5	167,6
DC IL10 + LT	123113,6	139796	157230,8	140046,7	140046,7	211,8
DC IL10 LPS + LT	64368,9	74616,9	76268,6	71751,5	71751,5	108,5
mDC + LT	192232,3	203487	220805,9	205508,5	205508,5	310,9
LT	543,9	776,4	662,9	661,1	661,1	
MLR DC32 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	224184,2	234637	222964,6	227261,9	227261,9	343,8
DC IL10 + LT PHA	250229,5	270106,6	239791,7	253375,9	253375,9	383,3
DC IL10 LPS + LT PHA	283740	276547,2	300124,8	286804,0	286804,0	433,9
mDC + LT PHA	422076,3	467807,3	496994,1	462292,6	462292,6	699,3
LT	543,9	776,4	662,9	661,1	661,1	

MLR DC33 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	67469,2	50813,4	66399,1	61560,6	61560,6	158,0
DC IL10 + LT	62306,2	55129,9	64346,8	60594,3	60594,3	155,5
DC IL10 LPS + LT	59708,3	23746	48709,5	44054,6	54208,9	139,1
mDC + LT	94006,6	97851,9	84941,8	92266,8	92266,8	236,8
LT	348,7	492,4	327,8	389,6	389,6	
MLR DC33 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	28860,3	24516,5	30128,9	27835,2	27835,2	71,44
DC IL10 + LT PHA	34808,9	36619,2	49701,1	40376,4	40376,4	103,63
DC IL10 LPS + LT PHA	43865,8	42449,3	52215	46176,7	46176,7	118,51
mDC + LT PHA	100526,1	130660,3	169192,9	133459,8	133459,8	342,53
LT	348,7	492,4	327,8	389,6	389,6	

Anexo 2 (continuação)- Dados brutos da proliferação em MLR (Cultura Mista) para as diferentes DCs cocultivadas com linfócitos T alogênicos. iDC= células dendrítica imatura; iDC IL-10= célula dendrítica imatura tratada com IL-10; mDC= célula dendrítica madura. IP= índice de proliferação. Proliferação ≥ 2 . N=3.

Reação linfocitária mista

MLR DC34 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	33999,3	35989,6	36919,7	35636,2	35636,2	81,6
DC IL10 + LT	83606,5	75986,8	79492,8	79695,4	79695,4	182,6
DC IL10 LPS + LT	27022,5	27135,1	25887,7	26681,8	26681,8	61,1
mDC + LT	112974,8	79472,6	94843,4	95763,6	95763,6	219,4
LT	387,3	512,5	409,6	436,5	436,5	
MLR DC34 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	20381,9	28130	33012,4	27174,8	27174,8	62,3
DC IL10 + LT PHA	44346,9	52714	41477,9	46179,6	46179,6	105,8
DC IL10 LPS + LT PHA	25927,8	25894,9	23295	25039,2	25039,2	57,4
mDC + LT PHA	88917	67960	47858,4	68245,1	78438,5	179,7
LT	387,3	512,5	409,6	436,5	436,5	

MLR DC35 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	511,2	774,5	626,6	637,4	637,4	4,2
DC IL10 + LT	545,1	558,4	552,3	551,9	551,9	3,6
DC IL10 LPS + LT	276,4	533,6	381,1	397,0	328,8	2,2
mDC + LT	5742,7	5328,1	5664,3	5578,4	5578,4	36,6
LT	média de doze poços				152,3	
MLR DC35 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	17171,8	16271,6	17155,1	16866,2	16866,2	110,7
DC IL10 + LT PHA	16206	12741,9	19077,8	16008,6	16008,6	105,1
DC IL10 LPS + LT PHA	13702,2	12317,8	12551,6	12857,2	12857,2	84,4
mDC + LT PHA	21179,9	21339,7	21457,9	21325,8	21325,8	140,0
LT	média de doze poços				152,3	

Anexo 2 (continuação)- Dados brutos da proliferação em MLR (Cultura Mista) para as diferentes DCs cocultivadas com linfócitos T alogênicos. iDC= células dendrítica imatura; iDC IL-10= célula dendrítica imatura tratada com IL-10; mDC= célula dendrítica madura. IP= índice de proliferação. Proliferação ≥ 2 . N=3.

Reação linfocitária mista

MLR DC36 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	1096,70	1110,60	933,70	1047,00	1047,00	4,09
DC IL10 + LT	1069,20	1352,60	1177,20	1199,67	1199,67	4,68
DC IL10 LPS + LT	1114,80	1228,00	1429,40	1257,40	1257,40	4,91
mDC + LT	6610,00	6289,00	6169,80	6356,27	6356,27	24,82
LT	média de doze poços				256,10	
MLR DC36 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	17194,80	17115,90	19787,70	18032,80	18032,80	70,41
DC IL10 + LT PHA	25813,00	27038,70	27572,20	26807,97	26807,97	104,68
DC IL10 LPS + LT PHA	26037,80	29479,70	23634,30	26383,93	26383,93	103,02
mDC + LT PHA	42686,10	43130,60	41289,70	42368,80	42368,80	165,44
LT	média de doze poços				256,1	

MLR DC37 sem PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
iDC + LT	10249,8	13355,2	18121,9	13909,0	13909,0	63,4
DC IL10 + LT	13011	14318	14788	14039	14039	64,0
DC IL10 LPS + LT	12223	13053	12954	12743	12743	58,1
mDC + LT	23245	23371	24397	23671	23671	108,0
LT	229,7	251,2	176,9	219	219	
MLR DC37 com PHA						
Condições	A	B	C	Média	Média Corrigida	IP
DC + LT PHA	33115,9	33072,4	43422,4	36536,9	36536,9	166,6
DC IL10 + LT PHA	39538,2	43030,9	40442,1	41003,7	41003,7	187,0
DC IL10 LPS + LT PHA	49881,2	44735,5	42046,3	45554,3	45554,3	207,8
mDC + LT PHA	72430,6	68532,2	71329	70763,9	70763,9	322,7
LT	229,7	251,2	176,9	219,3	219,3	

Anexo 2 (continuação)- Dados brutos da proliferação em MLR (Cultura Mista) para as diferentes DCs cocultivadas com linfócitos T alogenícos. iDC= células dendrítica imatura; iDC IL-10= célula dendrítica imatura tratada com IL-10; mDC= célula dendrítica madura. IP= índice de proliferação. Proliferação ≥ 2 . N=3.

ANEXO 3: AUTO-REATIVIDADE PROLIFERATIVA

Auto-reatividade : proliferação

iDC27						
COND	B	C	D	média	M, corr	IP
DC	589,50	402,30	304,10		353,20	
N2	1427,10	9671,40	904,10	4000,87	1165,60	3,25
N3	977,10	2567,70	1633,40	1726,07	2100,55	5,86
N4	1193,30	496,40	1043,80	911,17	1118,55	3,12
N6	123,54	476,48	801,76	467,26	639,12	1,78
N7	257,70	161,65	138,80	186,05	150,23	0,42
I4	2484,40	8521,40	2638,20	4548,00	2561,30	7,14
I8	705,03	1742,50	1894,21	1818,36	1818,36	5,07
I9	2109,50	1898,00	1505,10	1837,53	1837,53	5,12
C3	1432,59	1374,81	2285,74	1697,71	1697,71	4,73
C4	3466,70	2750,20	1860,60	2692,50	3108,45	8,67
C9	1799,84	1001,00	676,60	1159,17	512,33	1,43
p277	589,50	402,30	304,10	431,97	431,97	1,20
C-Hsp60	1299,55	1036,92	962,38	1099,62	1099,62	3,07
PHA	18739,60	21399,20	20919,80	20352,87	20352,87	56,76
DC+LT	385,30	431,30	259,20	358,60	358,60	1,02
LT	86,90	164,40	60,20	103,83	73,55	

DC IL10 27						
COND	B	C	D	média	M, corr	IP
DC	193,10	429,1	5409,3	2010,5	311,10	
N2	2619,5	2134,3	557,3	1770,4	2376,93	3,0
N3	1195,9	603,4	2386,5	1395,3	899,71	1,1
N4	1171,2	1588,0	216,7	927,0	1379,67	1,7
N6	4183,8	3658,3	5160,9	4334,3	4334,37	5,5
N7	283,6	790,3	266,6	446,8	275,14	0,3
I4	triplicata ruim					
I8	848,7	2839,1	462,3	1383,3	655,5	0,8
I9	5543,4	36460,0	7318,3	16440,6	6430,8	8,2
N10	2136,7	1934,1	2129,1	2132,9	2132,9	2,7
C3	2803,4	3632,9	3824,5	23304,1	3420,2	4,3
C4	2726,9	1826,2	1516,3	15682,6	2023,1	2,5
C9	3249,1	2898,0	2434,1	2860,4	2860,4	3,6
p277	3173,5	2457,0	1908,5	2513,0	2513,0	3,2
C-Hsp60	2746,3	2748,3	2482,0	2658,8	2658,8	3,4
PHA	88123,0	86183,0	67380,0	80562,0	80562,0	103,0
DC+LT	sextuplicata				782,0	2,0
LT	sextuplicata				381,0	

mDC 27						
COND	B	C	D	média	M, corr	IP
DC	158,50	379,50	188,00	242,00	173,25	
N2	1457,61	1899,04	1510,87	1622,51	1622,51	0,82
N3	2833,41	2759,9,	2786,16	2793,17	2793,17	1,41
N4	2097,91	1382,16	1589,19	1689,75	1689,75	0,85
N6	1702,46	2624,65	2269,94	2199,02	2199,02	1,11
N7	339,90	837,70	302,00	493,20	320,95	0,16
I4	1616,81	523,40	3601,09	1913,77	2608,95	1,32
I8	2354,49	2996,05	407,80	17971,07	2675,27	1,35
I9	1969,12	3215,62	1974,91	2386,55	2386,55	1,21
N10	1997,46	1855,57	2596,84	2149,96	2149,96	1,09
C3	339,90	837,70	302,00	493,20	320,95	0,16
C4	2666,93	2017,45	343,10	1572,90	2342,19	1,18
C9	2043,10	3579,94	3101,06	2908,03	2908,03	1,47
p277	3240,69	2484,59	1016,34	2247,21	2862,64	1,45
C-Hsp60	2941,54	660,60	1664,75	1557,45	2303,15	1,16
PHA	84545,00	87545,00	89054,00	87048,00	87048,00	43,96
DC+LT	2436,45	1791,20	1713,13	1980,26	1980,26	5,92
LT	348,10	321,10	1293,64	654,28	334,60	

iDC 28						
COND	B	C	D	média	M, corr	IP
DC	1947,0	947,0	732,0	1208,7	970,3	
I4	10855,8	12784,1	20651,7	14763,9	11820,0	5,2
I8	26281,1	2177,0	6750,8	11736,3	4463,9	2,0
I9	3372,6	11578,1	2011,9	5654,2	2692,3	1,2
N2	12443,0	10291,2	10053,2	10929,1	10929,1	4,8
N3	11704,6	6276,9	9479,3	9153,6	10592,0	4,6
N4	2671,4	7332,1	13250,9	7751,5	10291,5	4,5
N6	21345,2	18858,1	17671,2	19291,5	19291,5	8,5
N7	941,3	618,5	1523,6	1027,8	779,9	0,3
N10	7057,9	9433,7	7437,7	7976,4	7976,4	3,5
C3	15556,6	19029,8	14501,7	16362,7	16362,7	7,2
C4	24055,2	19522,8	22584,9	22054,3	22054,3	9,7
C9	24904,2	11185,0	19021,6	18370,3	21962,9	9,6
p277	13344,0	4916,0	13059,0	10439,0	13201,0	5,8
C-Hsp60	12453,0	9469,0	9035,0	10319,0	10319,0	4,5
PHA	59511,0	71294,0	85876,0	72227,0	72227,0	31,7
DC+LT	média sextuplicata				2282,0	2,4
LT	média sextuplicata				220,0	

DC IL10 28						
COND	B	C	D	média	M, corr	IP
DC	10729,70	269,90	226,00	3741,87	247,95	
I4	14339,00	3788,00	2589,20	6905,40	3188,60	2,90
I8	4529,20	8021,50	3087,30	5212,67	3808,25	3,47
I9	531,90	247,20	477,80	418,97	504,85	0,46
N2	13541,60	3618,00	2585,90	6581,83	3101,95	2,82
N3	9438,90	2965,00	7516,80	6640,23	8477,85	7,71
N4	1298,37	1139,50	4086,30	2174,72	1218,94	1,11
N6	1468,71	1930,77	850,37	1416,62	1699,74	1,55
N7	657,06	566,16	389,30	537,51	537,51	0,49
N10	6570,60	5661,60	389,30	4207,17	6116,10	5,56
C3	800,40	435,40	471,60	569,13	569,13	0,52
C4	1419,45	888,60	3595,00	1967,68	1154,03	1,05
C9	1659,12	1281,61	2837,29	1926,01	1470,37	1,34
p277	10729,70	269,90	226,00	3741,87	247,95	0,23
C-Hsp60	3413,50	1145,00	1904,30	2154,27	1524,65	1,39
PHA	32768,30	55978,30	72388,10	53711,57	64183,20	58,40
DC+LT	1900,80	1205,80	992,30	1366,30	1099,05	4,43
LT	204,20	141,10	129,30	158,20	158,20	

mDC 28						
COND	B	C	D	média	M, corr	IP
DC	162,60	198,50	156,10	172,40	172,40	
I8	1965,29	1867,30	1289,60	1707,40	1707,40	1,45
I9	2071,41	1790,18	1962,12	1941,24	1941,24	1,65
N2	1097,08	1526,73	1680,66	1434,82	1434,82	1,22
N3	1149,47	1142,69	1100,23	1130,80	1130,80	0,96
N6	1349,06	1748,81	1865,03	1654,30	1654,30	1,41
N7	529,41	1388,59	445,80	787,93	487,61	0,42
N10	2136,8	1934,2	2129,2	2133,0	2133,0	1,82
C3	360,40	394,30	108,60	287,77	377,35	0,32
C4	2527,74	1763,83	469,40	1446,17	2145,79	1,83
C9	2045,07	2368,75	1942,59	2118,80	2118,80	1,80
p277	1360,25	756,62	883,87	1000,25	1000,25	0,85
C-Hsp60	1198,52	615,50	1155,11	989,71	989,71	0,84
PHA	89510,80	91294,40	95876,10	92227,10	92227,10	78,52
DC+LT	1243,49	1105,56	696,50	8062,33	1174,53	3,33
LT	289,90	416,30	142,70	282,97	353,10	

IDC 29						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC	388,20	337,10	412,90	379,40	379,40	
I4	711,50	376,30	490,20	526,00	433,25	0,66
I8	927,90	563,60	291,70	594,40	745,75	1,13
I9	551,30	984,80	459,20	665,10	505,25	0,77
N2	1493,10	1601,90	1287,10	1460,70	1460,70	2,22
N3	1207,46	1813,60	7044,70	6977,63	1510,53	2,29
N4	402,50	439,50	254,70	365,57	365,57	0,55
N6	8861,40	3176,58	2562,07	2208,26	2869,33	4,36
N7	16493,90	1594,70	1313,90	6467,50	1454,30	2,21
C3	3181,60	2846,18	6939,10	4322,29	3013,89	4,58
C4	1666,96	1231,60	6281,90	8061,03	1666,96	2,53
C9	1116,58	1562,40	3986,10	2221,69	1339,49	2,03
p277	1897,14	2861,69	1665,26	2141,36	2141,36	3,25
C-Hsp60	4457,40	1221,10	1024,05	2234,18	1122,58	1,70
PHA	39719,00	61332,20	62562,10	54537,77	54537,77	82,80
DC+LT	6516,70	25348,40	9990,30	13951,80	658,70	1,74
LT	238,90	254,20	135,50	209,53	246,55	

DC IL10 29						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC	157,50	155,10	133,50	148,70	148,70	
I4	3195,90	213,20	2759,90	2056,33	2977,90	2,55
I8	979,80	568,70	220,80	589,77	774,25	0,66
I9	308,30	244,20	143,80	232,10	276,25	0,24
N2	1130,20	265,70	345,10	580,33	305,40	0,26
N3	160,30	276,20	362,00	266,17	319,10	0,27
N4	249,00	167,50	221,90	212,80	212,80	0,18
N6	553,30	192,10	305,10	350,17	248,60	0,21
N7	178,90	236,80	213,70	209,80	209,80	0,18
C3	1555,90	690,60	5445,40	2563,97	1123,25	0,96
C4	222,60	311,20	384,20	306,00	306,00	0,26
C9	1781,60	1411,20	2352,30	1848,37	1848,37	1,58
p277	152,40	437,40	319,40	303,07	378,40	0,32
C-Hsp60	328,70	384,30	389,90	367,63	367,63	0,31
PHA	47427,50	39967,50	58193,30	48529,43	48529,43	41,55
DC+LT	1168,00	1168,00	1168,00	1168,00	1168,00	1,18
LT	1285,70	840,70	832,00	986,13	986,13	

mDC 29						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC	224,60	93,10	267,10	194,93	245,85	
I4	1529,90	319,30	920,05	1224,98	1224,98	0,82
I8	720,07	2987,05	2650,00	2818,53	2818,53	1,88
I9	1143,60	1800,7,3	989,78	1311,37	1311,37	0,88
N2	1947,70	1922,94	3177,10	2349,25	2349,25	1,57
N3	2314,09	2432,19	2383,78	2376,69	2376,69	1,59
N4	2407,04	1089,65	5217,40	13394,77	8056,95	5,39
N6	805,97	2290,61	2524,64	1873,74	2407,63	1,61
N7	518,54	1661,38	1350,11	1176,68	1505,75	1,01
N10	3195,7	6460,7	3353,9	2398,6	3274,8	2,19
C3	3195,66	6460,70	3353,93	4336,76	4336,76	2,90
C4	856,92	2846,77	1989,59	1897,76	2418,18	1,62
C9	2271,35	2661,46	3907,84	2946,88	2946,88	1,97
p277	2215,81	2151,60	3156,14	2507,85	2507,85	1,68
C-Hsp60	1799,08	556,50	762,60	1039,39	659,55	0,44
PHA	73321,50	89626,10	54252,80	72400,13	72400,13	48,39
DC+LT	1762,24	1772,66	953,30	1496,07	1496,07	2,37
LT	710,60	171,10	551,70	477,80	631,15	

iDC 31						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
iDC	128,2	130,7	163,4	140,77	140,77	
N3	268,5	357,3	284,4	303,40	303,40	0,40
N7	439,10	408,40	329,70	392,40	392,40	0,52
C9	4522,60	3932,10	3710,80	4055,17	4055,17	5,35
p277	387,20	535,60	333,80	418,87	418,87	0,55
C-Hsp60	729,90	540,40	389,90	553,40	553,40	0,73
iDC+LT	786,10	825,70	660,90	757,57	757,57	1,82
PHA	21408,80	24132,90	14483,60	20008,43	20008,43	26,41
LT	465,50	410,30	370,30	415,37	415,37	

DC IL10 31						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC IL10	111,3	160,0	135,8	135,70	135,7	
N3	348,6	277,5	377,7	334,6	334,6	0,6
N7	282,7	460,3	343,5	362,2	362,2	0,6
C9	604,1	550,8	639,4	598,1	598,1	1,1
p277	777,4	1156,3	765,6	899,8	899,8	1,6
C-Hsp60	462,4	388,4	223,7	358,2	425,4	0,7
PHA	46990,7	51128,1	54904,0	51007,6	51007,6	93,8
DC IL-10+LT	551,4	416,4	663,5	543,8	543,8	1,3
LT	465,5	410,3	370,3	390,3	415,4	

mDC 31						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
mDC	302,40	354,10	298,30	318,27	318,27	
N3	941,30	1069,60	1245,00	1085,30	1085,30	0,35
N7	10787,40	7279,10	10682,30	9582,93	9582,93	3,05
C9	8513,70	8729,30	9763,90	9002,30	9002,30	2,87
p277	8376,50	8271,90	7773,70	8140,70	8140,70	2,59
C-Hsp60	6773,40	7837,60	7468,20	7359,73	7359,73	2,34
PHA	59760,80	60189,00	53683,00	57877,60	57877,60	18,43
mDC+LT	2471,10	3413,10	3537,80	3140,67	3140,67	7,56
LT	465,50	410,30	370,30	415,37	415,37	

iDC 32						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
iDC	161,60	99,30	151,00	137,30	137,30	
N3	400,20	699,60	479,90	526,60	526,60	1,63
N7	162,60	162,30	176,70	167,20	167,20	0,52
C9	665,60	948,80	1241,20	951,90	1095,00	3,39
p277	455,66	396,86	410,76	421,09	421,09	1,30
C-Hsp60	212,30	266,20	232,70	237,10	237,10	0,73
PHA	51058,00	51627,00	44819,00	49168,30	49168,30	152,35
iDC +LT	364,90	330,90	304,00	333,27	322,72	1,19
LT	1652,80	286,20	257,50	732,17	271,90	

DC IL10 32						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC IL10	166,7	158,2	129,4	151,4	151,4	
N3	611,5	786,6	366,1	588,1	699,1	2,2
N7	131,1	201,6	254,7	195,8	228,2	0,7
C9	793,2	557,4	785,0	711,9	711,9	2,2
p277	2275,8	2881,3	2189,1	2448,7	2448,7	7,8
C- Hsp60	326,70	224,2	251,3	267,4	267,4	0,8
PHA	49520,0	47552,0	33404,0	43491,8	43491,8	139,7
DC IL10 + LT	394,4	277,4	262,0	311,33	311,3	1,1
LT	1652,8	286,2	257,5	732,17	271,9	

mDC 32						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
mDC	254,10	138,60	129,40	174,00	134,00	
N3	223,60	214,20	173,80	203,90	203,90	0,61
N7	255,10	204,70	173,60	211,10	211,10	0,63
C9	427,70	280,20	419,90	375,90	375,90	1,13
p277	896,40	432,20	416,00	581,50	424,10	1,27
C-Hsp60	120,50	134,10	94,10	116,20	116,20	0,35
PHA	41826,00	58728,00	65113,00	55222,30	55222,30	165,68
mDC + LT	364,90	330,90	304,00	333,30	333,30	1,23
LT	1652,80	286,20	257,50	732,17	271,90	

iDC 33						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
iDC	158,2	203,5	197,3	186,33	186,33	
N3	246,80	294,30	210,80	250,60	250,60	0,96
N7	319,10	205,80	253,70	259,50	259,50	0,99
C9	354,30	223,20	235,80	271,10	271,10	1,04
p277	443,10	460,20	577,30	493,50	493,50	1,89
C-Hsp60	259,30	254,20	165,50	226,30	226,30	0,87
PHA	25891,70	23214,70	35783,90	28296,80	28296,80	108,17
iDC +LT	267,30	311,00	206,50	261,60	261,60	1,40
LT	125,00	148,90	166,40	146,77	146,80	

DC IL10 33						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC IL10	245,0	210,0	290,0	248,3	249,4	
N3	205,2	214,2	159,3	192,9	192,9	0,6
N7	271,4	218,2	154,1	214,6	214,6	0,7
C9	146,0	135,1	292,7	191,3	140,6	0,5
p277	420,8	261,6	228,0	303,5	244,8	0,8
C- Hsp60	188,9	99,1	165,5	151,2	177,2	0,6
PHA	12287,3	8900,6	9143,0	10110,3	10110,3	36,4
DC IL10 + LT	264,3	264,7	304,1	277,7	277,7	1,1
LT	125,0	148,9	166,4	146,7	146,8	

mDC 33						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC	372,50	318,10	483,70	391,43	391,43	
N3	1771,40	2096,00	1669,50	1845,60	1845,60	1,95
N7	533,60	485,00	249,60	422,70	509,30	0,54
C9	512,50	628,50	1266,10	802,40	570,50	0,60
p277	3635,30	2526,60	3308,30	3156,70	3156,70	3,33
C-Hsp60	233,80	155,10	284,40	224,40	224,40	0,24
PHA	25891,70	23214,70	35783,90	28296,77	28296,77	29,82
mDC + LT	1119,10	2269,10	778,60	290,00	948,85	2,42
LT	125,00	148,90	166,40	146,77	146,80	

iDC 33						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
iDC	117,90	107,50	89,40	104,93	104,93	
N3	4179,50	4645,10	5902,60	4909,10	4909,10	2,67
N7	3661,70	4182,80	4076,00	3973,50	3973,50	2,16
C9	7585,80	6497,20	7317,00	7133,30	7133,30	3,88
p277	1501,14	1319,41	1504,39	1441,65	1441,65	0,78
C-Hsp60	6649,70	4144,40	4845,00	5213,00	5213,00	2,83
PHA	108571,10	96853,80	92905,20	99443,40	99443,40	54,02
iDC +LT	2078,70	1827,60	1615,70	1840,70	1840,70	5,09
LT	315,10	387,80	381,10	361,33	361,30	

DC IL10 34						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
iDC	83,3	166,5	155,1	134,9	134,9	
N3	911,5	838,1	894,2	881,3	881,3	1,4
N7	642,8	588,6	761,4	664,2	664,2	1,0
C9	848,9	695,7	805,3	783,3	783,3	1,2
p277	1380,0	1374,0	1598,9	1450,9	1450,9	2,3
C- Hsp60	2209,4	1947,8	2473,3	2210,2	2210,2	3,6
PHA	72796,3	75251,1	75300,5	74449,3	74449,3	121,7
DC IL10 + LT	510,2	737,3	586,5	611,3	611,	1,6
LT	315,1	387,8	381,1	361,3	361,3	

mDC 34						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
DC	378,60	380,30	403,80	387,57	387,57	
N3	7041,20	5786,80	8229,30	7019,10	7019,10	9,67
N7	3392,20	3113,00	3286,50	3263,90	3263,90	4,50
C9	1172,27	939,05	892,19	1001,17	1001,17	1,38
p277	2471,57	2359,08	2546,84	2459,16	2459,16	3,39
C-Hsp60	1375,20	1243,00	1590,80	1403,00	1403,00	1,93
PHA	115495,90	116366,10	119284,80	117048,90	117048,90	161,25
mDC + LT	697,20	697,60	783,00	725,90	725,90	1,87
LT	315,10	387,80	381,10	361,33	361,30	

iDC 35						
COND	A	B	C	média	M. corr	IP
iDC	96,60	182,00	179,80	152,80	152,80	
N3	300,10	196,20	98,30	198,20	248,15	1,18
N7	197,20	324,70	351,30	291,07	291,07	1,38
C9	221,50	289,20	168,60	226,43	226,43	1,08
p277	225,60	282,30	308,10	272,00	272,00	1,29
C-HSP	152,10	155,10	108,60	138,60	138,60	0,66
Q-SOX	292,70	387,80	323,50	334,67	334,67	1,59
F7	412,40	444,30	431,30	429,33	429,33	2,04
PHA		26150,40	26308,50	25629,37	25629,37	121,89
DC+LT	212,40	214,00	204,40	210,27	210,27	1,38
LT	117,40	153,10	148,90	139,80	139,80	

DC IL10 35						
COND	A	B	C	média	M. corr	IP
DC-IL10	112,80	194,40	140,70	149,30	149,30	
N3	176,60	172,10	120,00	156,23	156,23	0,80
N7	171,80	197,50	170,50	179,93	179,93	0,92
C9	345,00	176,10	206,80	242,63	191,45	0,98
p277	206,30	206,80	226,00	213,03	213,03	1,09
C-HSP	143,90	165,10	156,20	155,07	155,07	0,79
Q-SOX	337,40	371,20	316,40	341,67	341,67	1,74
PHA	26733,10	21478,80	25588,00	24599,97	24599,97	125,42
DC+LT	192,90	236,20	159,30	196,13	196,13	1,31
LT	117,40	153,10	148,90	139,80	139,80	

mDC 35						
COND	A	B	C	média	M. corr	IP
mDC	184,80	122,10	138,60	148,50	148,50	
N3	223,60	240,90	210,60	225,03	225,03	0,31
N7	245,00	118,10	141,70	168,27	129,90	0,18
C9	257,10	375,40	257,80	296,77	296,77	0,41
p277	268,50	333,30	247,20	283,00	283,00	0,39
C-HSP	97,60	153,00	116,10	122,23	122,23	0,17
Q-SOX	799,30	829,70	742,60	790,53	790,53	1,08
F7	664,70	1120,90	1009,70	931,77	931,77	1,28
PHA	19069,70	21218,80	19670,80	19986,43	19986,43	27,39
DC+LT	730,90	726,60	731,20	729,57	729,57	2,81
LT	345,00	188,10	246,10	259,73	259,73	

iDC 36						
COND	B	C	D	média	M. corr	IP
iDC	99,60	127,20	150,00	125,60	125,60	
N3	163,30	196,10	116,90	158,77	158,77	0,12
N7	415,70	295,70	320,50	196,10	343,97	0,26
C9	221,50	191,10	143,80	185,47	185,47	0,14
p277	204,30	297,80	255,80	252,63	252,63	0,19
Chsp60	226,60	213,20	184,10	207,97	207,97	0,16
Q-SOX	390,30	511,80	513,60	471,90	471,90	0,35
PHA	25875,40	26748,20	26731,60	26451,73	26451,73	19,72
DC+LT	1337,40	1290,10	1397,40	1341,63	1341,63	5,56
LT	220,50	262,20	128,20	203,63	241,35	

DC IL10 36						
COND	1,00	2,00	3,00	média	M. corr	IP
DC IL10						
LPS	86,40	118,90	204,40	136,57	102,65	
N3	679,90	631,50	428,20	579,87	579,87	0,58
N7	108,70	195,40	147,90	150,67	150,67	0,15
C9	233,80	337,30	299,90	290,33	290,33	0,29
p277	250,00	184,10	210,60	214,90	214,90	0,21
Chsp60	134,70	131,10	112,70	126,17	126,17	0,13
Q-SOX	395,30	412,60	391,30	399,73	399,73	0,40
PHA	33498,00	1448,80	35247,60	23398,13	34372,80	34,35
DC+LT	1077,00	945,80	979,50	1000,77	1000,77	4,15
LT	220,50	262,20	128,20	203,63	241,35	

mDC 36						
COND	A	B	C	média	M. corr	IP
mDC	167,70	110,60	180,80	153,03	153,03	
N3	198,00	251,20	246,10	231,77	231,77	0,26
N7	180,90	374,30	264,00	251,20	319,15	0,35
C9	287,90	273,20	244,10	268,40	268,40	0,30
p277	325,20	411,50	373,90	370,20	370,20	0,41
Chsp60	195,00	165,10	173,80	177,97	177,97	0,20
Q-SOX	519,30	563,50	584,40	555,73	555,73	0,61
PHA	16466,50	20125,80	20411,30	19001,20	19001,20	20,95
DC+LT	1055,60	912,70	752,90	907,07	907,07	3,80
LT		média de nove poços			238,50	

mDC 36

CONDIÇÃO S	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	122,00	426,20	143,80	230,67	132,90	
N3	505,50	253,30	191,40	316,73	222,35	0,43
iDC N7	210,40	510,90	692,50	471,27	601,70	1,17
iDC C9	452,30	391,40	262,80	368,83	368,83	0,72
p277	428,90	732,20	472,60	544,57	544,57	1,06
C-Hsp60	352,20	340,30	252,40	314,97	314,97	0,61
Q-SOX	1097,80	1522,40	1425,00	1348,40	1348,40	2,63
iDC PHA	48668,90	48432,60	50912,20	49337,90	49337,90	96,30
iDC + LT	956,70	875,90	717,90	850,17	850,17	2,59
LT	312,7	327,2	343,8	328	328	

mDC 36

CONDIÇÃO S	B	C	D	média	média corrigida	IP
DC IL10	196,2	367,1	335,9	299,7	351,5	
N3	425,7	531,5	580,3	512,5	512,5	0,4
N7	291,7	361,9	377,0	343,5	343,5	0,3
C9	344,0	433,4	432,4	403,3	403,3	0,3
p277	448,2	431,2	577,3	485,6	485,6	0,4
C-Hsp60	217,4	231,2	206,9	218,5	218,5	0,2
Q-SOX	1502,3	1597,8	1581,0	1560,4	1560,4	1,3
DC PHA	36262,9	36556,5	37669,1	36829,5	36829,5	30,6
DC + LT	1265,0	1170,1	1176,1	1203,7	1203,7	3,4
LT	312,7	327,2	343,8	327,9	327,9	

mDC 36

COND	B	C	C	média	M, corr	IP
mDC	112,8	341,2	333,8	262,6	337,5	
N3	611,5	677,6	892,7	727,3	727,3	1,8
N7	356,7	416,7	391,4	388,3	388,3	1,0
C9	1128,1	1118,0	941,3	1062,5	1062,5	2,7
p277	883,2	746,6	988,2	872,7	872,7	2,2
C-Hsp60	379,8	333,3	328,9	347,3	347,3	0,9
Q-SOX	727,7	827,3	765,3	773,4	773,4	2,0
PHA	18668,9	18432,6	10912,2	16004,6	16004,6	40,5
DC + LT	384,6	395,7	404,9	395,1	395,1	1,1
LT	312,7	327,2	343,8	327,9	327,9	

ANEXO 4: CURVAS REAL TIME

Foxp3 dissociação

Foxp3 eficiência

Gata 3 dissociação

Gata 3 eficiência

IFN- γ dissociação

IFN- γ eficiência

IL 10 dissociação

IL 10 eficiência

TGFβ dissociação

TGFβ eficiência

TGF β R dissociação

TGF β R eficiência

TNF- α dissociação

TNF- α eficiência