Anna Paula Sheppard Guembes

Mapeamento de peptídeos da proteína de choque térmico 60 potencialmente imunorreguladores no modelo murino

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

Programa: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Verônica Coelho

São Paulo
2010

Anna Paula Sheppard Guembes

Mapeamento de peptídeos da proteína de choque térmico 60 potencialmente imunorreguladores no modelo murino

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

Programa: Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Verônica Coelho

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guembes, Anna Paula Sheppard
Mapeamento de peptídeos da proteína de choque térmico 60 potencialmente imunorreguladores no modelo murino / Anna Paula Sheppard Guembes. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora:Verônica Coelho.

Descritores: 1.Chaperonina 60 2.Tolerância imunológica 3.Transplante de pele 4.Mapeamento de peptídeos 5.Imunorregulaçao 6.Hsp60

USP/FM/DBD-491/10

Dedico este trabalho aos meus pais,
sem os quais nada disso seria possível...
Obrigada pelo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que participaram de alguma forma nessa etapa tão importante da minha vida. Não somente agora, durante o mestrado, mas por todo o percurso que me trouxe até este momento...

Antes de tudo, gostaria de agradecer aos meus pais. À Matilde e Guillermo, os quais sempre colocaram à minha irmã e eu em primeiro lugar, priorizando nossa formação apesar das dificuldades, e ensinando que se pode perder tudo, exceto a educação. Muito obrigada pelo amor, compreensão, apoio, pelas noites de discussão e aprendizado, e pela história de vida. Obrigada, mãe, por ser minha primeira formadora em ciência, por me ensinar a brincar com os kits de química e mais tarde, com o microscópio... Pelas férias no Laboratório, e pelas primeiras discussões científicas! Obrigada, pai, por me ensinar a história e geografia do mundo além da escola, por exigir sempre o melhor de mim... Por acreditar no meu mestrado, apesar de tentar explicá-lo sem sucesso para amigos e parentes! Enfim, Matilde e Guillermo, obrigada por fazerem parte do que sou hoje. Devo tudo à vocês!

Agradeço também aos meus irmãos (Maria Carolina, Erik, Karen e Giselle), que perto ou longe, mesmo sem entenderem bem o que eu estudo, sempre me apoiaram! Agradeço em particular à minha irmã caçula, Maria Carolina, a qual sempre acreditou na sua irmã-cientista e na possibilidade de uma descoberta inovadora!

Agradeço ao Marcelo Lilla, meu companheiro, pela sua paciência nos fins de semana e feriados... por seu apoio nos momentos difíceis, por acreditar em mim... Por me ajudar, mais do que ele imagina, em todo o processo. Obrigada por fazer parte da minha vida e me fazer uma pessoa melhor! Obrigada por todo amor e compreensão!

Agradeço aos meus formadores! Àqueles que me iniciaram na vida científica! Ao Dr. George Vande Woude, o qual me recebeu no Van Andel Research Institute quando eu estava apenas começando... Obrigada pelos papers, pela paciência, e por todo o apoio quando eu estava sozinha. Obrigada aos meus colegas de laboratório do VAI, Megan e Carrie, que me guiaram nos primeiros experimentos! Obrigada ao Dr. Luiz Roberto Kfoury, com qual fiz minha iniciação científica no LTIAM, na Faculdade de Veterinária da USP. Obrigada também à minha equipe de LTIAM, Rose, Jana, Lilian! Aprendi muito com vocês, meninas! Agradeço também à Dra. Elizabeth Martins, minha orientadora de minha iniciação científica no Laboratório de Salmonela, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan! Obrigada por toda a ajuda e energia, aprendi muito com você! Obrigada também às minhas colegas de Butantan, Érika, Luana, Tati, Paty, Dani, Camilla e Márcia! Saudades...

Agradeço, à minha orientadora de mestrado, a Dra. Verônica Coelho. Obrigada pelas discussões, pelo crescimento propiciado, pelo critério e pelo ensinamento do rigor das palavras! O mestrado foi um processo de

aprendizado e crescimento graças a você, e tenho certeza que o crescimento é sempre em ambos os lados. Obrigada por todo o apoio e compreensão!

Agradeço, com todo o coração, ao Prof. Dr. Jorge Kalil, o qual me recebeu no Laboratório de Imunologia do InCor, e sempre encontrou tempo para discutir com os alunos sobre nossos projetos, colaborando muito para o nosso crescimento científico.

Agradeço também à Dra. Luiza Guglielmi Guilherme e ao Dr. Edécio Cunha-Neto, os quais sempre colaboraram para o nosso crescimento científico com discussões e sugestões, sempre deixando as portas de seus laboratórios e equipes à nossa disposição.

Gostaria de agradecer à todos no laboratório e fora dele que ajudaram de alguma forma neste projeto. Aos colaboradores da Vacina, os primeiros a me receberem quando cheguei ao laboratório: Karen, Raquelzinha, Samar, Simoninha, Iolanda, muito obrigada pela ajuda! Aos meus queridos companheiros de Biotério, Edilberto, Luiz, Fabinho, Thiago, Débora, Dani, Susan, Rafael... Obrigada pela ajuda nos experimentos, reagentes, lanchinhos e risadas! Obrigada pelos fluxos divididos, anticorpos cedidos e sucos de groselha compartidos!

Obrigada aos companheiros do grupo de Transplante, que me ajudaram nas discussões científicas e experimentos. Obrigada à Evelyn e Lin, vocês são muito especiais para mim! Obrigada à Fernanda Martello,

amiga e companheira de projeto! Obrigada por dividir as alegrias e frustrações! Obrigada à Maísa, Hernandez e Pedro pelas discussões científicas e sugestões no projeto! Todas ajudaram no meu crescimento! Obrigada Carolzinha e Amanda, pelos fins de semana e feriados! Pela ajuda e pelos experimentos tão mais agradáveis! Obrigada às experts em citometria, Sandra Maria, Paty, Luciana e Carolzinha, pela ajuda sempre que necessária nos enormes experimentos. Obrigada Nathy, Vanessa, Karine pelas conversas, risadas e festinhas! Carol Borba, obrigada pelos jantares! Georgia e Carol Luque, obrigada pelas risadas e conversas! Rose, obrigada pelas discussões e conselhos, obrigada por sua amizade! Obrigada pelos jounal clubs à Georgia, Karen, Maristela, Carlo, Luciana e Bia Stolf! Não desistam! Ana Claudia, obrigada pela ajuda nos últimos experimentos! Espero que dê tudo certo para você! Priscilla, Maris, Keity, Carlo, Virgínia, obrigada pelas conversas e pelo apoio! Malu, Selminha, Márcio e Sandra Emiko, muitíssimo obrigada por tudo do dia a dia, pelos momentos agradáveis e por todo o apoio. Vocês são muito especiais! Andréia e Eliane, obrigada pelo apoio da Bioquímica, com os reagentes, equipamentos e técnicas! Claudio e Washington, obrigada por todos os peptídeos da HSP60, sem eles, esta tese não seria possível! Gostaria também de agradecer a todo o apoio da secretaria, do Sr. Jair, Gisele, Sônia, Silvano e Tânia, sem vocês seria tudo mais difícil! Obrigada!

Agradeço finalmente, a Deus. Obrigada pelas conquistas e alegrias.

Se

Se és capaz de manter a tua calma quando
Todo o mundo ao teu redor já a perdeu e te culpa;
De crer em ti quando estão todos duvidando,
E para esses no entanto achar uma desculpa;
Se és capaz de esperar sem te desesperares,
Ou, enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te esquivares,
E não parecer bom demais, nem pretensioso;

Se és capaz de pensar --sem que a isso só te atires,
De sonhar --sem fazer dos sonhos teus senhores.
Se encontrando a desgraça e o triunfo conseguires
Tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas
Em armadilhas as verdades que disseste,
E as coisas, por que deste a vida, estraçalhadas,
E refazê-las com o bem pouco que te reste;

Se és capaz de arriscar numa única parada
Tudo quanto ganhaste em toda a tua vida,
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
Resignado, tornar ao ponto de partida;
De forçar coração, nervos, músculos, tudo
A dar seja o que for que neles ainda existe,
E a persistir assim quando, exaustos, contudo
Resta a vontade em ti que ainda ordena: "Persiste!";

Se és capaz de, entre a plebe, não te corromperes
E, entre reis, não perder a naturalidade,
E de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes,
Se a todos podes ser de alguma utilidade,
E se és capaz de dar, segundo por segundo,
Ao minuto fatal todo o valor e brilho,
Tua é a terra com tudo o que existe no mundo
E o que mais --tu serás um homem, ó meu filho!

Rudyard Kipling

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS XII

RESUMO XIII

SUMMARY XIV

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 26

2.1 Objetivo geral 26

2.2 Objetivos específicos 26

3. MATERIAL E MÉTODOS 28

3.1 Desenho experimental 28

3.2 Síntese de peptídeos 29

3.3 Animais 29

3.4 Obtenção de células esplênicas 30

3.5 Cultura com esplenócitos 30

3.6 Extração de RNA para PCR em tempo real 31

3.7 Transcrição reversa para obtenção de cDNA 31

3.8 Desenho e validação dos primers 32

3.9 Critérios de validação das reações de PCR em tempo real 34

3.10 Reações de PCR de tempo real 34

3.11 Classificação das alterações de expressão gênica 36

3.12 Protocolos para a indução de tolerância ao aloenxerto de pele murino 37

3.13 Transplante de pele 39

3.14 Análise macroscópica do enxerto 40

3.15 Análise histopatológica do enxerto 41

3.16 Análise estatística dos dados 41

4. RESULTADOS 44

4.1 Efeitos dos peptídeos da HSP60 na expressão gênica – Resultados por gene estudado 44

4.2 Efeitos dos peptídeos da HSP60 na expressão gênica – Resultados por peptídeo estudado 60

4.3 Efeitos dos peptídeos da HSP60 na expressão gênica – Seleção dos peptídeos potencialmente imunorreguladores 77

4.4 Secreção de citocinas no sobrenadante- Resultados obtidos com os peptídeos N2, N3, N6, N7, I8 e C4 82

4.5 Protocolos para a indução de tolerância ao alotransplante de pele 88

4.6 Caracterização da rejeição - Análise histopatológica 99

4.7 Resumo dos principais resultados dos peptídeos selecionados 102

5. DISCUSSÃO **104**

6. CONCLUSÕES **134**

ANEXO 1- TABELAS COM AS SEQÜÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS ESTUDADOS 137

ANEXO 2- TABELAS COM AS SEQÜÊNCIAS DOS PRIMERS, CONCENTRAÇÃO DE USO, TM E EFICIÊNCIA 138

ANEXO 3- CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS PRIMERS 139

ANEXO 4- APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO 140

ANEXO 5- APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA CEP-IMT 141

7. REFERÊNCIAS **144**

LISTA DE ABREVIATURAS

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

IL: interleucina

Treg: célula T reguladora

Tr1: célula reguladora do tipo 1

Teff: célula T efetora

Th1: célula T auxiliar do tipo 1

Th2: célula T auxiliar do tipo 2

APC: célula apresentadora de antígenos

Hsp: proteína de choque térmico

LPS: lipopolissacarídeo

TLR: receptor do tipo toll

RNA: ácido ribonucléico

mRNA: RNA mensageiro

DNA: ácido desoxirribonucléico

cDNA: DNA complementar

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

μg: micrograma

pg: picograma

μl: microlitro

CN: controle negativo

MLR: reação linfocitária mista

N: peptídeos derivados da região N-terminal da HSP60

I: peptídeos derivados da região intermediária da HSP60

C: peptídeos derivados da região C-terminal da HSP60

αCD3: anticorpo anti-CD3

RESUMO

Guembes, APS. Mapeamento de peptídeos da proteína de choque térmico 60 potencialmente immunorreguladoras no modelo murino. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010

INTRODUÇÃO: As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas presentes em todos os seres vivos. Elas possuem dupla atividade imunológica, induzindo tanto respostas proinflamatórias quanto imunorreguladoras. Em nosso grupo, estudamos os efeitos imunológicos dos peptídeos da HSP60 nos sistemas humano e murino. OBJETIVOS: Identificar peptídeos da HSP60 potencialmente imunorreguladores no sistema murino, visando a indução de tolerância no contexto do alotransplante. MÉTODOS: Analisamos a capacidade dos diferentes peptídeos de modificar, *in vitro* a expressão de genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) ou inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17) por PCR de tempo real, em esplenócitos murinos de animais *naive.* Consideramos as modificações induzidas pelos peptídeos como REGULA (↑expressão de genes imunorreguladores ou ↓expressão de genes inflamatórios) ou INFLAMA (↓expressão de genes imunorreguladores ou ↑ expressão de genes inflamatórios). Selecionamos peptídeos que induziram predomínio de modificação da expressão gênica do tipo REGULA, mais promissores como imunorreguladores para ensaios *in vivo* de indução de tolerância ao aloenxerto de pele murino. RESULTADOS: Os peptídeos mais promissores foram N7, C4, N6, I8, N2 e N3. O peptídeo N7(n=9) induziu uma razão REGULA/INFLAMA=2,71 e induziu a redução da expressão gênica relativa de IL-17 e IL-12p40. O peptídeo C4 (n=6) induziu razão REGULA/INFLAMA=1,63 e induziu redução da expressão gênica relativa de IL-17 e IL-12p40. O peptídeo N6 (n=8) induziu uma razão REGULA/INFLAMA=1,60, induziu a redução da expressão gênica relativa de T-bet e IL-12p40 e aumentou a expressão de IL-10. O peptídeo I8 (n=5) induziu razão REGULA/INFLAMA=1,57 e induziu aumento da expressão gênica relativa de IL-17. O peptídeo N2 (n=8) induziu razão REGULA/INFLAMA=1,32 e induziu redução da expressão gênica relativa de IL-17 e aumento da expressão de IL-10, IL-4 e T-bet. O peptídeo N3 (n=7) induziu razão REGULA/INFLAMA=1,25 e não teve destaques na modificação gênica induzida. O peptídeo N7 foi testado em protocolos para indução de tolerância do alotransplante de pele murino. Não houve diferença estatística entre os diferentes grupos, a despeito do aumento de sobrevida do aloenxerto de 7 dias no protocolo em combinação com o anticorpo αCD3 (p=0,38, n=5). DISCUSSÃO E CONCLUSÃO: O forte impacto imunorregulador de alguns peptídeos da HSP60 na expressão gênica de moléculas imunológicas indica que eles podem ser explorados em imunoterapias. Apesar da existência de variabilidade individual, o peptídeo N7 da HSP60 parece ser um promissor peptídeo imunorregulador. O discreto aumento da sobrevida do aloenxerto de pele induzida pelo peptídeo N7 sugere que a sua combinação com imunossupressores em outros protocolos de indução de tolerância, pode ser uma estratégia útil para aumentar a sobrevida do aloenxerto.

Descritores: Chaperonina 60, Tolerância imunológica, Transplante de pele, Mapeamento de peptídeos, Imunorregulação, Hsp60

SUMMARY

Guembes, APS. Screening of potencially immunoregulatory heat shock protein 60 peptides in mice. [dissertation]. São Paulo: Medicine School, University of São Paulo; 2010

INTRODUCTION: Heat shock proteins (HSPs) are proteins present in all living beings. They have dual immunologic functional activity inducing both proinflammatory and regulatory responses. In our group, we study the immunological effects of HSP60 peptides in human and mice. OBJECTIVES: To identify potentially immunoregulatory HSP60 peptides in mice, aiming at tolerance induction in the context of alotransplantation. METHOD: We analyzed the capacity of different HSP60 peptides to modify *in vitro* the expression of predominantly immunoregulatory genes (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) or inflammatory (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17) by Real Time PCR, in naive mice splenocytes. We considered gene modifications induced by the peptides as REG (↑expression of immunoregulatory genes or ↓expression of inflammatory genes) or INFLAMMA (↓expression of immunoregulatory genes or ↑ expression of inflammatory genes). We selected some promising peptides that induced predominantly REG gene expression modifications as immunoregulatory peptides, to perform *in vivo* assays of tolerance induction to murine skin allograft. RESULTS: More promising peptides were N7, C4, N6, I8, N2 and N3. The N7 peptide (n=9) induced a REG/INFLAMMA ratio=2,71 and induced gene expression reduction of IL-17 and IL-12p40. The C4 peptide (n=6) induced a REG/INFLAMMA ratio =1,63 and induced gene expression reduction of IL-17 and IL-12p40. The N6 peptide (n=8) induced a REG/INFLAMMA ratio =1,60, induced gene expression reduction of T-bet and IL-12p40, and increased expression of IL-10. The I8 peptide (n=5) induced a REG/INFLAMMA ratio =1,57 and induced increased gene expression of IL-17. The N2 peptide (n=8) induced a REG/INFLAMMA ratio =1,32 and induced gene expression reduction of IL-17 and increase expression of IL-10, IL-4 and T-bet. The N3 peptide (n=7) induced a REG/INFLAMMA ratio =1,25 and induced no gene expression modification highlights. The N7 peptide was tested in tolerance mice allograft induction protocols. There was no statistical difference between different groups, despite the 7-day increase in allograft survival with the protocol in combination with the αCD3 antibody (p=0,38, n=5). DISCUSSION AND CONCLUSION: The strong immunoregulatory impact of some HSP60 peptides in the gene expression of immune molecules indicate that they may be explored for immune therapy. Despite the existence of some interindividual variability, the N7 HSP60 peptide seems to be a promising imunorregulatory peptide. The slight increase in graft survival with the N7 peptide suggests that the combination of HSP60 peptides with other immunosupressors and different tolerance induction protocols may be a way to improve graft survival.

Key words: Chaperonine 60, Immunological tolerance, Skin transplantation, Peptide mapping, Immunerregulation, Hsp60

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é um sistema complexo com alta plasticidade, capacidade de aprendizagem e memória, sendo um dos sistemas responsáveis pela manutenção da homeostase do organismo, não apenas no combate a agentes infecciosos, mas também na recuperação e cicatrização de tecidos danificados e na vigilância imunológica. O sistema imune atua em um delicado equilíbrio entre a tolerância ao próprio e a imunidade dirigida a patógenos e outros antígenos não próprios. Desequilíbrios persistentes entre respostas imunes proinflamatórias e antiinflamatórias podem resultar em condições patológicas como imunodeficiências e autoimunidades, alergias e no câncer.

A tolerância ao próprio é um processo complexo que se inicia durante o desenvolvimento dos linfócitos (tolerância central) e é mantido na periferia até o final de sua vida (tolerância periférica). Os linfócitos T crescem e amadurecem no timo, onde são expostos a uma gama de proteínas próprias, inclusive antígenos tecido específicos cuja expressão é induzida pelo fator de transcrição AIRE (do inglês, "*autoimmune regulator*" ou regulador de autoimunidade) nas células epiteliais tímicas (TECs, do inglês "*thymic epithelial cells*") (Derbinski *et al*, 2001). Os linfócitos T imaturos, ou timócitos assim expostos, podem ou não reconhecer peptídeos derivados de proteínas próprias complexadas às

moléculas do MHC. Linfócitos T incapazes de reconhecer complexos peptídeo-MHC morrem por negligência. Ao contrário, linfócitos T que reconhecem o complexo peptídeo-MHC são selecionados positivamente ou negativamente, de acordo com a avidez de seu reconhecimento (baixa, média ou alta afinidade). Linfócitos T que reconhecem tais complexos com alta ou muito baixa avidez são selecionados negativamente e morrem por apoptose. Uma das exceções são as células T reguladoras naturais (Tregs), que parecem ser selecionadas positivamente, a despeito de interagirem com maior afinidade com o complexo MHC-peptídeo no timo. Assim, apenas os linfócitos T CD4+ e CD8+ que reconhecem o complexo peptídeo-MHC com afinidade intermediária, e as células T reguladoras são liberados para a periferia. Esse processo de seleção que ocorre no timo é denominado **tolerância central**. Apesar do rigoroso processo de seleção tímica, ainda são liberados para a periferia linfócitos com autorreatividade, observados mesmo em indivíduos sadios (Danke *et al*, 2004). Há mecanismos periféricos de regulação da resposta imune capazes de manter um estado de não agressão ao próprio pelas células autorreativas potencialmente patológicas.

A **tolerância periférica** é mantida por diversos mecanismos, entre eles: **(i) anergia**, que é um fenômeno que ocorre em linfócitos T ativados e resulta na inibição da proliferação celular devido à privação de sinais coestimuladores (revisado por Macian *et al*, 2004). Ele ocorre quando uma célula T é estimulada na ausência de coestimulação ou pela ação da

molécula CTLA-4 (do inglês, "*cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4*" ou antígeno associado a linfócito T citotóxico 4) que compete com CD28, ligando-se às moléculas coestimuladoras CD80/CD86 e inibindo a atividade do linfócito. Na **(ii) ignorância da célula T**, que ocorre quando há uma barreira física entre a APC e o linfócito, impedindo sua ativação; **(iii) deleção periférica,** onde há morte por apoptose, quer pela interação Fas-FasL (expressos em linfócitos ativados), quer pela diminuição da concentração de IL-2 após a apresentação de antígenos (Greenwald *et al*, 2001) ; **(iv) modificação do tipo de resposta ou desvio imunológico,** onde ocorre uma mudança no padrão de produção de citocinas como por exemplo, de Th1 (próinflamatórias) para Th2 (reguladoras); e **(v) supressão/regulação** que é mediada por células T reguladoras (Tregs) (revisado por Kamradt & Mitchison, 2001).

Devido à importância das Tregs na regulação da resposta imune, nos últimos anos houve um aumento no número de pesquisas nas quais se tem visado a sua melhor caracterização imunofenotípica e funcional. Já foram descritos diversos tipos de células T reguladoras, dentre elas as células Th3 e Tr1, que atuam secretando principalmente citocinas como TGFβ e IL-10, respectivamente; NKT e CD8+CD28-, que atuam no contato célula a célula bloqueando as APCs; e células T CD4+CD25+^{high} Foxp3+, mais conhecidas como células T reguladoras naturais (nTregs), que saem do timo com esta função. As nTregs podem atuar no contato direto com as APCs, ou com as células T efetoras, bem como pela secreção de citocinas

imunorreguladoras. Destas, as células Treg $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3+$ naturais são as mais profundamente caracterizadas até o momento, e exercem um importante papel na regulação da resposta imune (revisado por Wing *et al*, 2006).

A população de células nTreg constitui aproximadamente 5 a 10% das células T periféricas em camundongos e de 2 a 5% em humanos. À semelhança dos linfócitos T efetores, as células Tregs recirculam no sangue e na linfa e se expandem nos linfonodos. No entanto, contrariamente aos linfócitos T efetores, sua sobrevivência independe de estimulação antigênica (Walker *et al*, 2003). Ao contrário das Tregs originadas na periferia, também chamadas de Tregs induzidas, as Treg naturais são originadas durante o processo de seleção tímica após a interação com as DCs medulares (Wing *et al*, 2006). Neste processo elas adquirem um fenótipo caracteristicamente supressor. Ainda que as moléculas envolvidas na regulação por Tregs tímicas não tenham sido totalmente caracterizadas, sabe-se que a sua atuação é dependente de contato *in vitro*, mas *in vivo* também pode ser mediada por citocinas.

As células Tregs periféricas formam um grupo heterogêneo com as células Tr1(Groux *et al*, 1997) e células Th3 (Chen *et al*, 1994). As células Tr1 secretam altos níveis de IL-10 em resposta a antígenos, enquanto que as células Th3 são altas produtoras de TGF-β. A despeito da secreção diferencial de citocinas reguladoras, ambos os tipos celulares podem ser gerados por ativação crônica, com pouca coestimulação (via CD80 e

CD86), na presença de IL-10. As Treg periféricas podem ser induzidas por diferentes mecanismos, os quais podem ser fisiológicos, como a indução periférica pelas células dendríticas imaturas (Verhasselt *et al*, 2004), ou artificiais como a indução farmacológica com alguns imunossupressores (Barrat *et al*, 2002). As Treg periféricas atuam tanto por mecanismos dependentes de contato, quanto por mecanismos dependentes da secreção de citocinas reguladoras. Tanto as Tregs naturais quanto as Tregs induzidas na periferia são TCR específicas, precisando ser inicialmente ativadas. No entanto, ambas atuam independentemente do reconhecimento antigênico e não são obrigatoriamente restritas ao MHC.

Apesar da carência do conhecimento de moléculas especificamente expressas em Tregs, o fator transcricional Foxp3 foi descrito como sendo crítico para o seu desenvolvimento e função. De fato, a linhagem de camundongos "Scurfy" apresenta uma mutação no gene de Foxp3 que leva a uma síndrome autoimune linfoproliferativa fatal (Blair *et al*, 1994). Em estudos posteriores observou-se que animais hemizigotos para Foxp3 também desenvolveram uma síndrome autoimune linfoproliferativa similar ao animal "Scurfy" (Fontenot *et al*, 2003). Esse estudo indicou a importância do gene Foxp3 no desenvolvimento do fenótipo imunorregulador, e na sua ausência, não há células Tregs naturais. No mesmo estudo, também se observou que a transfecção do gene Foxp3 foi capaz de conferir função supressora a células CD4+CD25-. De maneira similar aos camundongos "Scurfy", a doença IPEX em humanos (do inglês,

"*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*", ou, síndrome ligada ao X associada à desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia) consiste em uma síndrome associada a doenças autoimunes em múltiplos órgãos, dermatite atópica e infecções fatais (Gambineri *et al*, 2003).

A expressão Foxp3 induz maior expressão de moléculas presentes em células Tregs como CTLA-4, αEβ7-integrina (CD103), GITR (do inglês, "g*lucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor*" ou receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide) e neuropilina-1, em camundongos (revisado por Wing *et al*, 2006). Atualmente, são conhecidos pelo menos dois mecanismos de indução da expressão de Foxp3: um no timo e o outro na periferia. No timo, a indução da expressão de Foxp3 parece ser dependente da sinalização dos receptores de TCR, CD28 e via STAT5. No entanto, ainda não se sabem, ao certo, todos os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Na periferia, a expressão de Foxp3 parece ser dependente do estímulo crônico do TCR, do receptor de TGF-β e de CD28. Atualmente é discutido que, pelo menos em células humanas, a expressão de Foxp3 pode ocorrer de maneira transitória em células recém ativadas, mesmo sem adquirirem atividade imunossupressora (Mantel *et al*, 2006). Também é importante ressaltar que há diversos tipos de células Tregs periféricas que não expressam Foxp3, indicando que há vários caminhos para a atividade imunorreguladora de linfócitos T.

Na periferia, as citocinas TGFβ e IL-10 podem induzir a diferenciação das células T virgens em Tregs através da expressão de Foxp3 e STAT-5, enquanto que as citocinas TGFβ e IL-6 induzem a sua diferenciação em células Th17 por meio da expressão dos fatores de transcrição RORγT e STAT-3 (revisado por Awasthi *et al*, 2008). Estes linfócitos T auxiliares 17 (Th17) são produtores de citocinas predominantemente inflamatórias IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNFα (Figura 1), em contraste com as citocinas antiinflamatórias produzidas pelas Tregs (IL-10, TGFβ). As células Th17 possuem um papel importante na indução e propagação de diversas doenças autoimunes, como, por exemplo, na encefalite autoimune experimental (EAE) em camundongos (Komiyama *et al*, 2006). Assim, as Tregs possuem um papel importante em manter as células T efetoras (Th1 e Th2) e as Th17 sob controle, evitando o dano tecidual. Novos achados levam a acreditar que estas populações celulares tenham processos de diferenciação celular mutuamente excludentes. De fato, o fator de transcrição envolvido no direcionamento e diferenciação de células T virgens em células Th17, o receptor T órfão associado ao ácido retinóico RORt (do inglês, "*retinoic acid–related orphan receptor-t*"), quando ativado e associado a Runx1, ao invés de Foxp3, leva à perda do potencial de diferenciação em Tregs (Zhang *et al*, 2008) (Figura 2).

Além da secreção de citocinas imunorreguladoras, as Tregs também podem converter células virgens em outras Tregs: após a ligação do TCR com seu ligante, o peptídeo associado à latência (LAP, do inglês "*latency-*

associated peptide") tem sua expressão aumentada na membrana da Tregs, formando o complexo LAP:TGF-β, o qual converte células T virgens em células Tregs Foxp3+ funcionais de maneira contato-dependente (Andersson *et al*, 2008).

Conforme mencionado anteriormente, também o equilíbrio entre as células Th1 e Th2 contribui para a regulação do sistema imune. As citocinas IFN-γ e IL-12 iniciam a diferenciação das células Th1 através da ativação de fatores de transcrição T-bet, STAT-1 e STAT-4, enquanto que a citocina IL-4 desencadeia a diferenciação em células Th2 através da ativação de GATA-3, STAT-3 e STAT-6 (Figura 1) (revisado por Awasthi *et al*, 2008). Assim, a diferenciação em Th2, por exemplo, pode impedir que as células T virgens se diferenciem em Th1 por um processo de retroalimentação pela IL-4, mantendo uma população com um perfil predominantemente antiinflamatório. Também foi descrito que as citocinas que levam à diferenciação Th1 ou Th2 também interferem na indução periférica de Tregs, uma vez que a ativação de T-bet ou GATA-3 leva à perda do potencial de diferenciação em Tregs Foxp3+ na periferia (Wei *et al*, 2007).

É importante mencionar que a IL-12, fator crucial para o desenvolvimento e manutenção das células Th1 é um dímero formado pelas subunidades IL-12p35 e IL-12p40. Cada unidade separadamente pode se unir a outra subunidade e formar outras citocinas. A IL-12p40 pode se unir à IL-23p19 e formar a citocina IL-23 que também possui um

perfil inflamatório e induz a ativação das células Th1, e a polarização e proliferação das células Th17. Já a IL-12p35 pode se unir a Ebi3 e formar a citocina IL-35, a qual, diferentemente dos outros membros da família IL-12, possui características imunorreguladoras por ser produzida pelas células Treg Foxp3+ induzidas e inibe a proliferação de células T (revisado por Collison & Vignali, 2008). Recentemente, também foi verificado que apesar de possuir características inflamatórias e estimular a proliferação de Th1, a citocina IL-27 (heterodímero da família da IL-12, com IL-27p28 e Ebi3) parece ter um papel importante para as Tregs. A IL-27 inibe a indução de Th17 e juntamente com TGFβ induz a diferenciação de células Tr1 secretoras de IL-10 (Awasthi *et al*, 2008). Desta forma, os níveis de expressão dos diferentes fatores envolvidos no comprometimento de subtipos de linfócitos T e suas citocinas serão muito relevantes em nossas análises, pois trazem importantes informações quanto ao direcionamento funcional dos linfócitos e sobre a regulação do sistema imune.

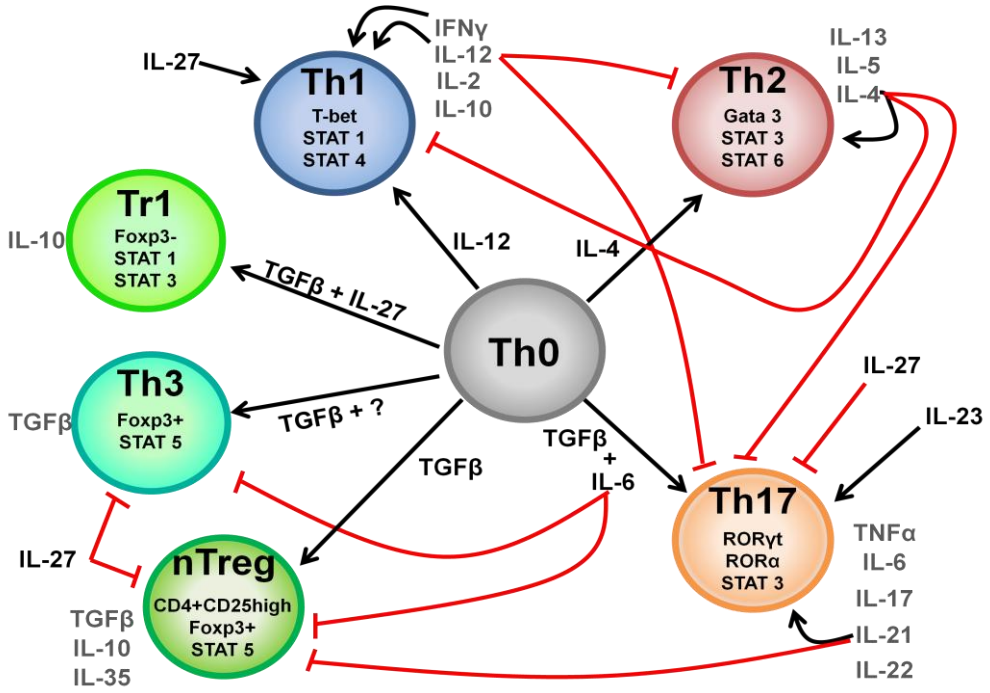


Figura 1 - Esquema simplificado da geração de células Th1, Th2, Th17, nTreg, Tr1 e Th3. Nesta figura mostramos a representação de citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos T e ativação dos fatores de transcrição das células T reguladoras (Foxp3), células Th-17 (RORγT, RORα e STAT-3), Th1 (T-bet, STAT-1, STAT-4) e Th2 (GATA3, STAT-3). As setas pretas contínuas são sinais estimuladores da expressão e as linhas vermelhas com final em T são inibitórias. Em cinza, as citocinas secretadas pelos diversos tipos celulares e, em preto, as citocinas necessárias para a diferenciação e manutenção destas células. Adaptado de Roncarolo, 2008 e Awasthi 2008.

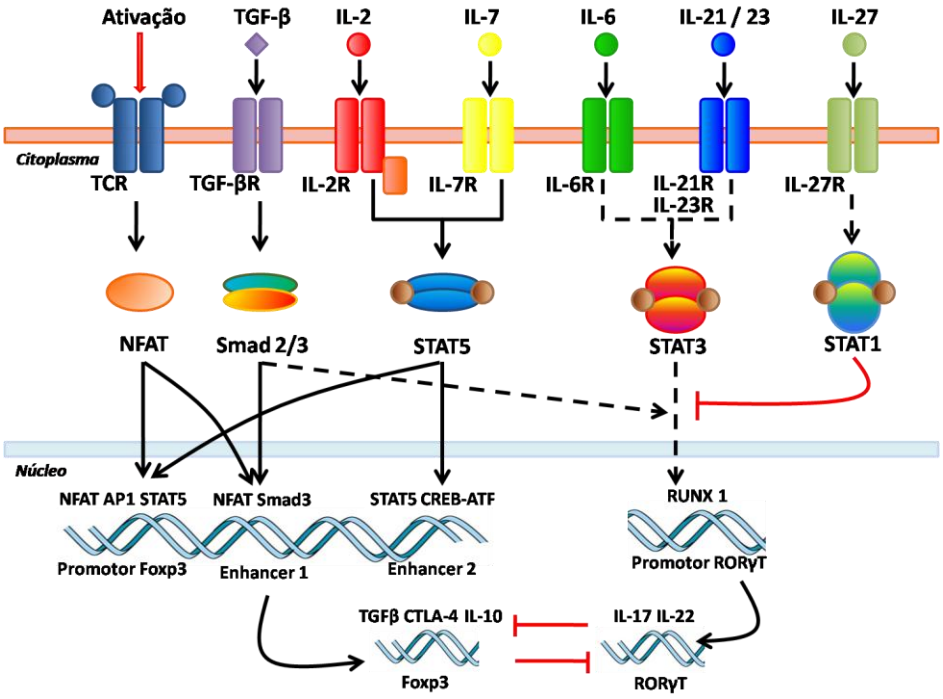


Figura 2- Esquema simplificado de indução da expressão de Foxp3 e RORγt. Nesta figura mostramos um esquema das citocinas importantes na ativação dos fatores de transcrição das células T reguladoras (Foxp3) e das células Th-17 (RORγt). As setas pretas contínuas induzem Foxp3, as pretas tracejadas induzem RORγT. Linhas em vermelho com final em T são inibitórias. Adaptado de Game, 2008.

Em ambientes altamente inflamatórios, há uma diminuição na quantidade de células Tregs e na qualidade das que restam, com perda de Foxp3 devido ao seu colapso por meio de diferentes vias, incluindo o bloqueio da indução de Tregs principalmente pela falta de IL-2, prevalecendo o ambiente Th1 induzido pela inflamação excessiva (Oldenhove *et al*, 2009). Novos estudos forneceram dados sobre a importância da IL-10 na manutenção da expressão de Foxp3 em Tregs nesses ambientes inflamados. A IL-10 liberada pelas células mielóides atua de maneira parácrina sobre as Tregs, interagindo com IL-10R e mantendo a expressão de Foxp3 no meio inflamado (Murai *et al*, 2009). Desta maneira, atuando diferentemente do TGFβ, o qual é importante para a homeostase das Tregs, IL-10 é necessária para a manutenção de Foxp3 em Tregs diferenciadas expostas à inflamação.

Em estudos recentes mostrou-se que a função reguladora de Foxp3 requer sua associação a outros fatores de transcrição, como NFAT (do inglês, "*nuclear factor of activated T cells*" ou fator nuclear de células T ativadas), NF-κB (do inglês, "*nuclear factor-κB*" ou fator nuclear κB), e Runx1 (do inglês, "*runt-related transcription factor 1*"ou fator de transcrição runt-relacionado 1), também conhecido como AML1 (do inglês, "*acute myeloid leukemia 1*") (revisado por Akdis, 2009). Foxp3 possui tanto atividade repressora sobre alguns genes (induz menor expressão de IL-7R e IL-2) e indutora sobre outros (induz alta expressão de CTLA-4 e CD25), dependendo do outro fator de transcrição ao qual se

ligue. Não se sabe ao certo a necessidade da ação direta ou indireta de cada molécula que se liga a Foxp3, uma vez que novas descobertas põem à prova os estudos mais recentes. Por exemplo, foi proposto que STAT5 seria essencial para a indução de Foxp3 (Burchill *et al*, 2007). No entanto verificou-se que a expressão forçada da molécula anti-apoptótica Bcl-2 teve a capacidade de restaurar a expressão de Foxp3 na ausência de STAT5 (Yao *et al*, 2007). Outro grupo demonstrou que a deficiência de Cbfβ em Tregs (um co-fator de todas as proteínas Runx) e que Runx1, mas não Runx3, induziu linfoproliferação, doença autoimune e hiperprodução de IgE. Esse mesmo grupo observou que células Cbfb- tiveram sua função supressora *in vitro* e *in vivo* prejudicada, com alteração de expressão gênica incluindo redução de Foxp3 e aumento de IL-4 (Klunker *et al*, 2009). Em outro trabalho, foi demonstrado que o heterodímero Runx1-Cbfβ controla a expressão de Foxp3 nas Tregs, sendo indispensável para a função celular das Tregs *in vivo* (Rudra *et al*, 2009).

Outra molécula recentemente descrita como importante na geração das Tregs é o Rel-c. O membro Rel-c da família NF-kappaB/Rel já foi descrito como necessário ao desenvolvimento das respostas Th1. Foi descrito que na ausência de c-Rel, a diferenciação, *in vitro,* das células Th17 era normal, mas a geração das Tregs induzidas era gravemente prejudicada e correlacionada à redução na quantidade de células Foxp3+ *in vivo*. O mecanismo de conversão, *in vitro,* das células CD4+ virgens em Tregs induzidas é altamente dependente da síntese endógena de IL-2

mediada por c-Rel (Visekruna *et al*, 2010), assim como o desenvolvimento no timo das Tregs naturais Foxp3+ (Isomura *et al*, 2009).

Outro mecanismo de supressão mediada pelas Treg está relacionado à expressão da molécula inibitória CTLA-4. Tregs de animais sem o gene de CTLA-4 não exibem atividade supressora *in vivo* ou *in vitro* (Wing *et al*, 2008). A interação de CTLA-4 com CD80/86 nas células dendríticas inibe a ligação dessas moléculas com CD28 nos linfócitos T e induz a expressão da IDO (do inglês, "*indoleamine 2,3-dioxygenase*" ou, indoleamina 2,3-dioxigenase) que é uma enzima de degradação do triptofano (revisado por Wing & Sakaguchi, 2010) (Figura 3). A enzima IDO é induzível em diferentes células (endotélio, trofoblasto, monócitos, células dendríticas, e outros), e sua expressão em DCs (do inglês, *"dendritic cells"* ou, células dendríticas) é considerada crucial na supressão da proliferação e sobrevivência das células T (Mellor & Munn, 2004).

Na "hipótese de depleção do triptofano" sugere-se a IDO como inibidora direta da atividade das células T efetoras (Mellor & Munn, 1999). Em outra hipótese é sugerido que metabólitos produzidos pela IDO (kineurina) juntamente com aqueles produzidos pelas APCs inibam a proliferação de células T, promovendo morte celular e exercendo diferentes efeitos na resposta de células T auxiliares, por alteração no equilíbrio entre linfócitos Th1/Th2 (Terness *et al*, 2002).

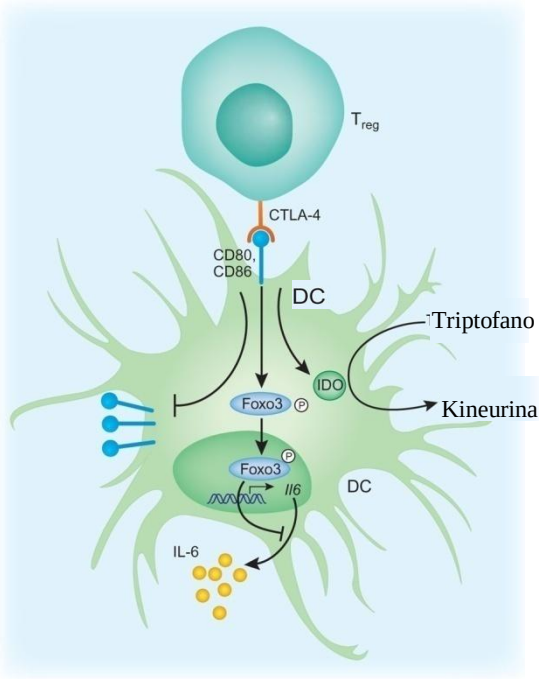


Figura 3 - CTLA-4 nas Tregs ao se ligar às moléculas CD80/CD86 nas APCs, pode acionar sinalização diferencial da molécula CD28, induzindo repressão do linfócito T. Junto à modulação direta ou indireta da expressão destas moléculas, estes sinais podem ativar a IDO, a qual gera o mediador imunossupressor kinoneurina. Adaptado de Wing e Sakaguchi, 2010 (ilustração Marina Corral).

Há outros mecanismos de indução da IDO: ela, assim como a TTS (do inglês, "*tryptophanyl-tRNA-synthetase*" ou, enzima sintetase do tRNA do triptofanil) são enzimas induzidas por IFNγ. Nos macrófagos, ela é induzida pela ativação do ligante de CD40 e IFNγ (Hwu *et al*, 2000). Nas DCs murinas que co-expressam B220 (uma forma de CD45) ou CD8α, a ligação de moléculas CTLA4 /CD28 a B7-1/ B7-2 atua de forma a aumentar a expressão de IDO, independentemente de IFNγ (Mellor *et al*, 2004). O aumento na expressão de IDO em DCs não inibe a ativação de células T, no entanto impede a sua expansão clonal. A IDO atua na manutenção da tolerância materno-fetal (Munn *et al*, 1998), além de ser capaz de regular negativamente diversas doenças autoimunes experimentais. No entanto, o camundongo mutante para o gene

codificador da enzima IDO não desenvolve autoimunidade patológica espontânea, mostrando que sua ação não é imprescindível no controle da tolerância ao próprio (Grohmann *et al*, 2003).

Foi mostrado que a IDO é capaz de inibir tanto células T CD4+ quanto CD8+. O bloqueio da IDO já mostrou estar relacionado à piora do quadro inflamatório no modelo murino de colite e em asma, apontando a sua importância na regulação da resposta imune (revisado por Munn, 2006).

Outras moléculas, além da IDO e citocinas predominantemente imunorreguladoras secretadas pelas células Th2 ou Tregs, também podem modular as respostas imunes através da regulação de diversos tipos celulares. Por exemplo, as proteínas de choque térmico (HSPs, do inglês, "*heat shock proteins*"), além de atuar com sinal de perigo (Matzinger, 1994), também possuem uma capacidade de desencadear uma resposta reguladora antiinflamatória. Além de seu importante papel como chaperonas, essas proteínas também são alvos importantes da resposta imune.

As HSPs fazem parte de um conjunto de autoantígenos imunodominantes descritos por Cohen na teoria do "homúnculo imunológico" (Cohen & Young, 1991). Nesta teoria, a autoimunidade também teria um papel fundamental na regulação da resposta imune, limitando e prevenindo o desenvolvimento de doenças autoimunes, ajudando na regeneração tissular removendo de células apoptóticas, na cicatrização e angiogênese (Cohen & Young, 1991). Isso explicaria, ao

menos em parte, a alta frequência de reconhecimento das HSPs em indivíduos sadios (Pockley *et al*, 1999).

É frequentemente relatado o efeito inflamatório da HSP60, mostrando seu envolvimento na sinalização celular para o desenvolvimento de uma resposta imune efetora através tanto da resposta imune adaptativa quanto da inata. As HSPs funcionam como ponte entre a imunidade inata e a adquirida ao realizar a apresentação cruzada de peptídeos através da ligação ao CD91 (presentes em DCs e macrófagos) e ativar APCs, sendo reapresentadas via moléculas de MHC para os linfócitos (processo de "cross-priming")(Binder & Srivastava, 2004). Estes dados sugerem um perfil proinflamatório das HSPs. Também é muito discutida a contaminação das HSPs utilizadas nos diferentes estudos: discute-se que o LPS contaminante, e não a HSP60, ativa células apresentadoras de antígeno via TLR4 e CD14, induzindo a secreção de IL-12, IL-6 e TNFα (Osterloh *et al*, 2008). Neste sentido, outros grupos mostraram que ao se eliminar o LPS das amostras de HSP, não era mais observada a indução de genes inflamatórios em linhagens de macrófagos (Tsan & Gao, 2004), porém, ainda existem controvérsias sobre a quantidade de LPS considerada "aceitável" nas HSPs utilizadas experimentalmente. Isso também exemplifica o quanto as HSPs são amplamente estudadas e seus efeitos antagônicos são intensamente discutidos no meio acadêmico.

Diversos grupos têm investigado a atuação da HSP na imunorregulação. É sugerido que a HSP60 atue na imunorregulação por

dois mecanismos diferentes: como um ligante de receptores da resposta imune inata, e como um antígeno reconhecido por receptores do sistema imune adaptativo. No sistema imune inato, a forma solúvel da HSP60 humana é capaz de sinalizar linfócitos T humanos diretamente via o receptor tipo toll TLR2 (do inglês, "*toll-like receptor 2*"). Essa ativação possui 2 consequências: **a)** ela inibe a migração das células T via a quimiocina SDF-1 independentemente de sua especificidade antigênica e, portanto, inibe a migração das células T para os sítios inflamatórios (Zanin-Zhorov *et al*, 2003); e **b)** ela regula negativamente T-bet, NF-κB, e NFAT, e regula positivamente GATA -3, levando à diminuição da secreção de TNFα e IFNγ e aumento na secreção de IL-10 pelas células T respondedoras (Zanin-Zhorov *et al*, 2005). Além desse efeito direto nas células T efetoras, a ligação de HSP60 ao TLR2 aumenta atividade supressora das células T CD4+CD25 high humanas (Zanin-Zhorov *et al*, 2006). A HSP60 também é capaz de ativar diretamente linfócitos B pela via TLR4-MyD88 (Cohen-Sfady *et al*, 2005). Desta forma, estes efeitos da HSP60 solúvel sobre receptores inatos podem regular negativamente a inflamação dependente da célula T. Já na resposta imune adaptativa, foi proposto que as células T reguladoras HSP60-específicas respondam à HSP60 apresentada via MHC, na forma de peptídeos, pelas células do tecido estressado nos sítios de inflamação. De acordo com esta hipótese, a regulação negativa da inflamação tecidual seria mediada por um efeito coordenado e balanceado: as citocinas Th2 produzidas localmente pelas

células T HSP60-específicas regulariam negativamente a resposta Th1 adjacente das células T efetoras reativas a outros antígenos teciduais (Cohen, 2007).

Mais recentemente, descreveu-se um mecanismo adicional através do qual a HSP60 regula negativamente a inflamação: células T efetoras ativadas regulam positivamente a expressão de HSP60 e apresentam seus próprios epítopos a células T reguladoras específicas para a HSP60, as quais regulam negativamente efeitos próinflamatórios de células T efetoras *in vitro* e *in vivo* (Quintana *et al*, 2008). Essas células Tregs reconhecem peptídeos derivados de moléculas expressas por células T primariamente quando elas são ativadas (Cohen *et al*, 2004; Mimran *et al*, 2004). Assim, foram definidas diversas moléculas reconhecidas como, por exemplo, a molécula CD25 e o receptor de TNFα (Mimran *et al*, 2004). Mais importante, foi demonstrado que essas células T regulam negativamente o dano da inflamação autoimune no modelo da encefalomielite autoimune, ou EAE (do inglês, "*experimental autoimmune encephalomyelitis*"), (Mor *et al*, 1996) e da artrite autoimune, ou AA (Mimran *et al*, 2004).

A HSP60 também foi descrita como uma molécula com atividade coestimuladora das Tregs, tanto CD4+CD25 intermediária quanto CD4+CD25 high (Quintana *et al*, 2008). Neste trabalho, foi observado que o tratamento das Tregs com a HSP60 ou seu peptídeo p277 antes da ativação anti-CD3 (αCD3) aumentou significativamente a habilidade de

baixos números de Tregs de regular negativamente as células-alvo CD4+CD25- ou CD8+ efetoras, detectado como uma inibição da proliferação das células T alvo e da secreção de IFNγ e TNFα. O efeito estimulador da coestimulação da HSP60 nas Tregs envolve sinalizaçãoda resposta imune inata via TLR2, ativação de PKC, PI3K e p38 que é ainda aumentado pela inibição de ERK. As Tregs tratadas com HSP60 suprimiram as células T alvo através de contato celular e secreção de TGFβ e IL-10. Além disso, a expressão de ERK, NF-κB, e T-bet pelas células-alvo reguladas negativamente foi inibida. Assim, uma molécula própria ou seus peptídeos podem regular negativamente as respostas imunes adaptativas através da regulação positiva de Tregs via mecanismos de resposta imune inatos como a sinalização de TLR2 (Zanin-Zhorov *et al*, 2006).

Em camundongos NOD, relatou-se que o tratamento com o peptídeo p277 da região C-terminal da HSP60 foi capaz de modificar o padrão de produção de citocinas de linfócitos Th1 para Th2 com produção de IL-4 e IL-13, prevenindo o aparecimento de diabetes autoimune (Elias *et al*, 1997). Atualmente, as intervenções clínicas imunorreguladoras baseadas em peptídeos da HSP60 e HSP70 são áreas de intenso estudo clínico (Van Eden, 2006). Hoje, o mesmo peptídeo p277, está registrado em 4 estudos clínicos: um de fase II para verificar a segurança, tolerabilidade e eficácia imunológica e clínica de doses múltiplas subcutâneas na diabetes autoimune latente em adultos (estudo NCT00058981)(Elias & Palmer,

2009); outro de fase III para estudar a eficácia do peptídeo em pacientes recém diagnosticados com diabetes autoimune do tipo 1 (estudo NCT00615264)(Elias, 2009a); outro também de fase III para estudar o efeito do tratamento a longo tempo da diabetes tipo 1 com o peptídeo (estudo NCT00644501)(Elias, 2009b) e o último de fase III para verificar a eficácia do tratamento em adultos recém diagnosticados com diabetes tipo I (NCT01103284)(Elias, 2010). Foram observadas segurança e atenuação na destruição de células β produtoras de insulina nos ensaios clínicos de fase II (Huurman *et al*, 2007). A imunização do peptídeo p277 (437-460 da região C-terminal da HSP60) inibiu a síndrome experimental autoimune de Sjögren (Delaleu *et al*, 2008), e também aumentou a quantidade de Tregs e reduziu a aterosclerose em murinos (Van Puijvelde *et al*, 2007).

Também em nosso grupo, verificou-se que o peptídeo N7 da região N-teminal induziu modificações de expressão gênica predominantemente imunorreguladoras, em linfócitos T, na presença de células dendríticas humanas (Socorro-Silva, 2007). Em linfócitos T de indivíduos saudáveis, nosso grupo observou a capacidade do peptídeo N2, N6 e N7 de induzir/aumentar consideravelmente a expressão gênica de moléculas imunorreguladoras como IL-10, TGFβ, e sustentada de Foxp3, capacidade de suprimir consideravelmente a resposta proliferativa alogeneica *in vitro*, assim como a alta razão de produção protéica IL-10/IFNγ para o peptídeo N7 (Martello, 2010).

No contexto do transplante, não só os aloantígenos do doador, mas também as proteínas de choque térmico possuem uma participação na resposta imune ao aloenxerto. Os primeiros dados sobre a resposta imune às HSPs no transplante vêm do grupo de Duquesnoy que, com base em estudos em modelos animais e em células humanas *in vitro,* sugeriu que a resposta à HSP amplificava a resposta inflamatória ao transplante (Duquesnoy *et al*, 1995). Estes pesquisadores observaram que no modelo de aloenxerto cardíaco em ratos, havia linfócitos T infiltrantes no enxerto reativos às HSP65 micobacteriana e à HSP70 humana, sugerindo seu envolvimento no processo de rejeição. Também observaram uma maior proliferação de linfócitos T infiltrantes do enxerto renal humano em rejeição na presença de HSP65, mais uma vez sugerindo a participação de linfócitos reativos à HSP65 na rejeição (Moliterno *et al*, 1995). No entanto, é importante mencionar que a HSP65 utilizada nos estudos era de origem bacteriana e não humana, de forma que neste caso não se pode falar em autoimunidade ou autoreatividade. Alguns outros grupos também estudaram a resposta imune às HSPs no transplante. Trieb e colaboradores observaram um aumento da expressão de HSP70 no aloenxerto renal humano com rejeição, e também a presença de linfócitos T infiltrantes no enxerto reativos à HSP70 humana associados ao processo de rejeição do enxerto (Trieb *et al*, 1996). Davis e colaboradores mostraram que o tratamento com imunossupressores inibiu parcialmente a expressão da HSP60 (Davis *et al*, 1996) e, mais recentemente, outro

grupo descreveu um aumento na expressão das HSPs no processo de rejeição do alotransplante murino e humano (Oltean *et al*, 2004). Estes relatos indicam a participação de linfócitos T reativos às HSPs na resposta ao transplante, e sugerem que essa reatividade esteja associada com o processo de rejeição.

Além do potencial proinflamatório das HSPs no transplante, outros grupos de pesquisa, inclusive o nosso, têm estudado o seu papel imunorregulador e também citoprotetor. Em nosso grupo, estudando a resposta imune celular sequencial à HSP60 em pacientes transplantados renais, sugerimos a existência tanto de populações de linfócitos T autorreativos à HSP60 próinflamatórias como potencialmente reguladoras. Observamos uma associação entre a resposta proliferativa às HSP60 e HSP70 humanas no período pré-transplante e rejeição e, em contrapartida, uma associação entre a produção de IL-4 induzida pela HSP60, *in vitro,* e ausência de rejeição (Granja *et al*, 2004). Como continuidade desta linha de pesquisa, temos investido na busca de peptídeos ou regiões da HSP60 que tenham papel imunorregulador para a indução de tolerância no contexto do alotransplante. Explorando a hipótese de que diferentes regiões da HSP60 podem induzir respostas imunes funcionalmente distintas, analisamos a produção de IFNγ e IL-10 induzidos por peptídeos de diferentes regiões da HSP60. Observamos que a produção de IL-10 foi mais induzida por peptídeos da região C-terminal, principalmente no período mais tardio do pós-transplante (maior do que

1 ano) (Caldas *et al*, 2004). Observamos também em outros trabalhos que os peptídeos N3, N4 (região N-terminal), C4 (C-terminal) e I9 (região Intermediária) também induziram maior produção de IL-10 nas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos transplantados renais, obtidas no pós-transplante, quando comparados aos indivíduos sadios (Caldas *et al*, 2006). Apesar dos peptídeos da HSP60 utilizados, em nosso laboratório, terem sido desenhados baseados na predição de sua ligação às moléculas HLA-DR humanas e não com moléculas MHC murinas, sabemos que eles também são reconhecidos por células murinas, e que o tratamento com o peptídeo p277 foi capaz de promover o aumento da sobrevida do aloenxerto de pele murino e do transplante cardíaco vascularizado alogéneico (Luna *et al*, 2007). Neste trabalho, as células esplênicas dos animais estimulados com o peptídeo p277 pela via intranasal tiveram um reconhecimento dirigido à região C-terminal da HSP60, com proliferação de células CD4+ produtoras de IFN-γ (em camundongos C57BL/6) e produtoras de IL-10 (em camundongos BALB/c) (Luna *et al*, 2007). Todos esses estudos indicam um grande potencial terapêutico da proteína e seus peptídeos, também no contexto do alotransplante.

Em conjunto, esses estudos indicam a existência de duas populações responsivas à HSP60, uma com características imunorreguladoras e outra próinflamatória. É provável que a proteína possua diferentes regiões e peptídios que modulem a resposta imune de maneiras distintas. Desta

forma, torna-se importante o mapeamento dos peptídeos da HSP60 estudados em nosso grupo visando a seleção de candidatos imunorreguladores para sua utilização em ensaios, *in vivo,* para indução de tolerância. Os mecanismos envolvidos na imunorregulação da HSP60 ainda não foram bem elucidados. Neste projeto, investigamos o potencial imunorregulador da HSP60 e seus peptídeos *in vitro e in vivo*. Realizamos inicialmente um mapeamento de peptídeos capazes de induzir a produção de moléculas imunorreguladoras e, posteriormente, em conjunto com os resultados obtidos no sistema humano, *in vitro*, selecionamos alguns peptídeos os quais estão sendo utilizados em protocolos para a indução de tolerância no modelo de alotransplante de pele murino.

Objetivos

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Nosso objetivo, neste projeto, foi identificar peptídeos da proteína HSP60 com atividade imunorreguladora em esplenócitos murinos, visando a sua utilização para indução de tolerância ao alotransplante de pele murino e futura aplicação na clínica.

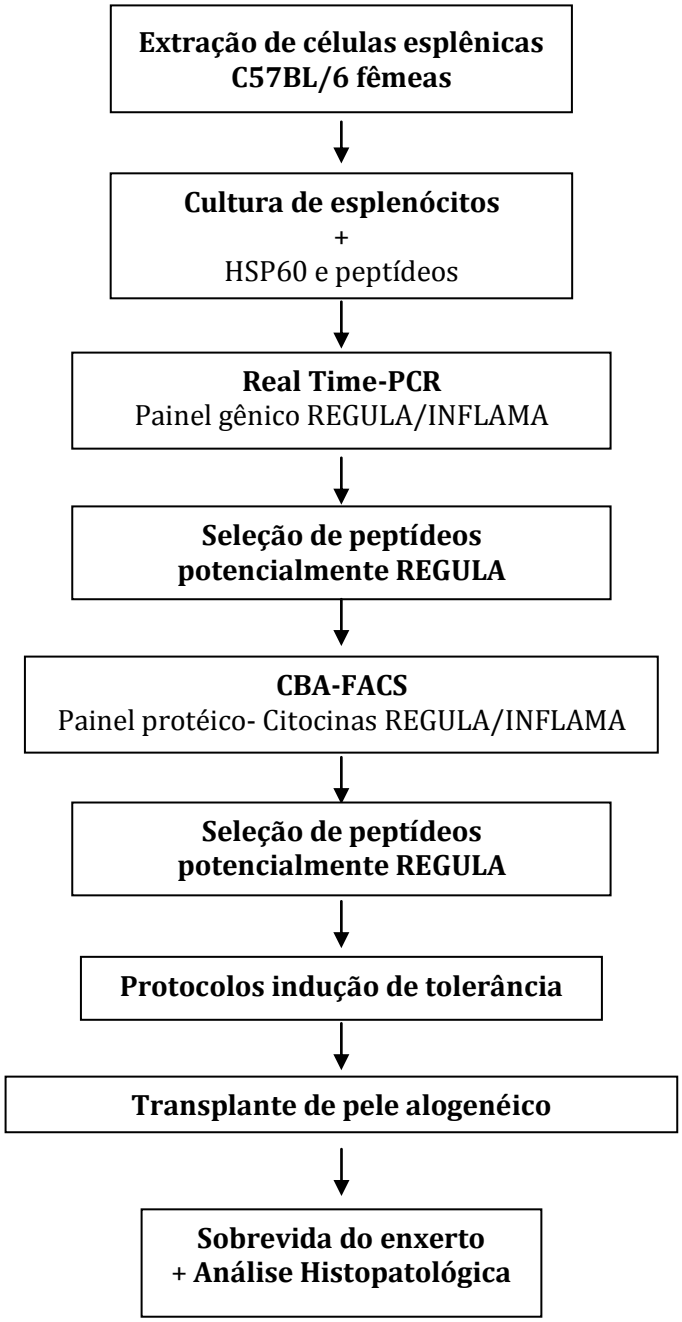
2.2 Objetivos específicos

1. Verificar a expressão gênica de moléculas imunorreguladoras, comparativamente com moléculas próinflamatórias induzida por peptídeos e fragmentos da HSP60 em esplenócitos murinos;
2. Selecionar os peptídeos potencialmente imunorreguladores para estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*;
3. Testar se os peptídeos da HSP60 selecionados *in vitro* como potencialmente imunorreguladores têm atividade tolerogênica, *in vivo*, no contexto do transplante de pele murino.

Material e Métodos

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental



3.2 Síntese de peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados a partir da sequência de aminoácidos da HSP60 humana segundo o método Fmoc (Fluorenilmetiloxicarbonil) de síntese em fase sólida em sintetizador múltiplo (Shimadzu, modelo PSSM-8, Japão) (Jindal *et al*, 1989). Os peptídeos sintetizados foram: N2, N3, N6, N7 (região N-terminal), I2, I4, I5, I6, I8, (região Intermediária), p277, C3, C4 e C8 (região C-terminal) (Tabela 1). Cada peptídeo foi analisado por RP-HPLC semi preparativo, usando-se uma coluna C-18, e caracterizado por espectrometria de massa (MALDI-TOF, Micromass/TofSpec SE, Inglaterra)(Tabela com os peptídeos no anexo 1).

3.3 Animais

Utilizamos camundongos isogênicos, com 8 a 12 semanas de idade, das linhagens C57BL/6 (H-2b, Qa-1b, Ly-92), 129/B6 (H-2b, Qa-1-/b, Ly-92/1), Balb/c (H-2d, CD52, CD8a2) e DBA/2 (H-2d, CD51, CD8a1), que foram obtidos do Biotério de camundongos isogênicos do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Todos os animais foram mantidos em microisoladores estéreis, no Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP) onde também está localizado o nosso laboratório de experimentação animal do Laboratório de Imunologia do Instituto de Coração (InCor-FMUSP, Brasil). Os animais foram alimentados com ração e água autoclavadas. Todas as manipulações foram feitas em experimentos de esterilidade, em fluxo

laminar. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de bioética da COBEA.

3.4 Obtenção de células esplênicas

Os camundongos (fêmeas das linhagens C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade) foram eutanasiados em câmara de CO_2. Os baços retirados dos animais foram colocados em placas de Petri com 5 ml de meio de cultura (RPMI 5% soro fetal bovino). A seguir, o órgão foi macerado com auxílio de um êmbolo de seringa em cima de uma membrana de nylon, obtendo-se, desta forma, os linfócitos. A suspensão de linfócitos foi transferida para um tubo Falcon contendo 15 ml do meio anteriormente utilizado e foi centrifugada a 1500 RPM a 4ºC, durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o botão celular foi ressuspendido no meio e recentrifugado a 1500 RPM a 4ºC, por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e o botão celular novamente ressuspendido em 10 ml de meio para a contagem das células em câmara de Neubauer (Geoquímica, Brasil). A seguir, as células foram utilizadas nos diferentes ensaios.

3.5 Cultura com esplenócitos

Os esplenócitos foram cultivados a uma concentração de $4x10^6$ células/ml de células esplênicas em placas de 24 poços de fundo chato (Corning) em 1ml de meio de cultura celular RPMI completo (Gibco) com ou sem estímulo. As culturas foram mantidas em estufa úmida com 5% de

CO_2 por 96 horas a 37º C. Durante esse período, eles foram estimulados com os peptídeos da HSP60 na concentração de 10μg/ml. As células foram coletadas para a extração de seu RNA mensageiro para posterior análise por PCR de tempo real e o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de citocinas por FACS-CBA e ELISA.

3.6 Extração de RNA para PCR em tempo real

O RNA mensageiro foi extraído das células cultivadas na presença dos estímulos com Trizol®, clorofórmio e ácido propílico, segundo protocolo já estabelecido no laboratório. A seleção das amostras de RNA de boa qualidade para a síntese de cDNA foi realizada através da eletroforese em mini-gel analítico de agarose a 1%, no qual as amostras apresentaram os RNAs ribossômicos (28S e 18S) preservados, e da quantificação do RNA por espectrofotômetro do tipo NanoDrop nd-1000 (Thermo Scientific) a 260nm, no qual as amostras apresentaram uma boa quantidade de RNA (mais que 1μg) e uma boa razão 260/280 (entre 1,7 e 2,0).

3.7 Transcrição reversa para obtenção de cDNA

Após a constatação da integridade e pureza do RNA, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com 3μg de RNA total utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para este protocolo, foram adicionados ao RNA 1μl de oligo dT (500 μg/ml), 1μl de dNTP (2,5mM de dATP, dCTP,

dGTP e dTTP, resultando numa concentração final de 10mM) e água DEPC q.s.p. 20µl. Esta mistura foi aquecida a 65ºC 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 42ºC por 2 minutos; nessa etapa fez-se uma pausa para a adição da enzima transcriptase reversa (200U/µl) (Superscript II™, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após essa pausa a reação continuou a 42ºC por 50 minutos seguidos de 70ºC por 15 minutos.

3.8 Desenho e validação dos primers

Os primers (iniciadores) utilizados nas reações de amplificação foram desenhados utilizando-se o programa Primer Express (Applied Biosystems). Os primers foram desenhados de forma a permanecerem em dois exons distintos para evitar a amplificação errônea de DNA genômico no lugar do cDNA. O tamanho dos primers variou de 18 a 26 bases, a temperatura de anelamento de 59-61ºC e o conteúdo de GC de 40-65% .O tamanho dos produtos de amplificação gerados variou de 86 a 119pb e 75-85°C de Tm (temperatura de anelamento).

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

60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio, que mantêm as duplas fitas unidas, se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR-Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura, significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento (Tm) do produto de amplificação (amplicon).

A concentração de uso de cada par de sequências de iniciadores foi padronizada em reações de RT-PCR em tempo real, utilizando-se as amostras de esplenócitos de camundongos Balb/c estimulados com os diferentes peptídeos. Os pares de primers foram testados nas concentrações de 100nM, 200nM e 300nM. Após as reações de RT-PCR em tempo real foi observado o valor de Ct de cada reação em cada concentração de iniciadores e escolheu-se a concentração que apresentava o menor valor de Ct. O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é quantidade de mRNA presente na amostra. Dessa forma, a concentração de uso de cada 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.

As sequências tiveram sua eficiência mensurada a partir de reações de RT-PCR em tempo real, utilizando-se os primers nas concentrações escolhidas com diluições seriadas das amostras de esplenócitos de camundongos Balb/c estimulados com os diferentes peptídeos. A partir do cálculo da reta formada pelos Ct's em cada diluição (formando uma equação de 1º grau do tipo y = $\boldsymbol{a}$x + $\boldsymbol{b}$), calculamos a eficiência de cada par de primers utilizando a fórmula da eficiência (eficiência= $10^{-1/\boldsymbol{a}}$)(Pfaffl, 2001).

3.9 Critérios de validação das reações de PCR em tempo real

Os critérios de validação interna das reações de PCR em tempo real foram: (i) presença de controles brancos adequados, sem amplificação ou considerada indetectável, (ii) curva de amplificação com padrão exponencial e platô, e com o seu início de aumento antes de CT de 30, (iii) curva de dissociação adequada com pico único, (iv) ocorrência de amplificação do gene de interesse com CT de até 35, (v) triplicatas do ensaio com diferenças entre elas < 1 CT. Nos casos em que uma das triplicatas não atendeu os critérios de validação, ela foi excluída e as análises realizadas com as médias dos outros dois Cts, desde que dentro dos critérios de validação.

3.10 Reações de PCR de tempo real

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

poços, usando o reagente "SYBR-Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems) e o equipamento "Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System". A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94ºC e 1 minuto a 60ºC, 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 (ΔRn = Rn+ - Rn-), onde Rn+ = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e Rn- = intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre o acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, foi estabelecido um valor de ΔRn, que 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. Foi realizada uma análise usando-se o ΔCt para uma comparação entre os indivíduos. Nesse caso, quanto menor o valor, maior a expressão do RNAm. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi realizado utilizando-se como gene de

referência o GAPDH (D-gliceraldeído 3-fostato desidrogenase) (Pfaffl, 2001). Consideramos significante todo o valor de QR ≥ 2 (expressão relativa aumentada) ou QR ≤ 0,5 (expressão relativa diminuída).

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

$$QR = \frac{(\text{E alvo})^{\Delta\text{Ct alvo (controle}-\text{amostra)}}}{(\text{E referência})^{\Delta\text{Ct referência (controle}-\text{amostra)}}}$$

Equação 1 – Quantificação relativa (QR). *A equação mostra a quantificação relativa do gene alvo. São tomadas razões entre as eficiências de cada par de primers (E) para o gene alvo e o gene de referência (GAPDH), elevados à diferença entre seus Cts entre o controle não estimulado e a amostra estimulada. Adaptado de Pfaffl, 2001.*

3.11 Classificação das alterações de expressão gênica

Para facilitar a análise das modificações gênicas, classificamos os genes analisados em predominantemente imunorreguladores (Gata3, Foxp3, IDO, IL-4, IL-10 e TGFβ), e em predominantemente proinflamatórios (T-bet, IL-12, IL-17, TNFα). Em seguida, de acordo com o valor da quantificação relativa (QR ≥ 2 expressão relativa aumentada ou QR ≤ 0,5 expressão relativa diminuída) classificamos as modificações gênicas como sendo REGULA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente imunorreguladoras ou diminuição da expressão de moléculas próinflamatórias) e INFLAMA (aumento da expressão relativa de moléculas predominantemente próinflamatórias ou diminuição da expressão de moléculas imunorreguladoras). Também classificamos qualitativamente as alterações de expressão gênica quando não pudemos calcular a QR (amostra ou controle indetectável – Ct >35).

As alterações qualitativas foram classificadas como indução não quantificada (quando na amostra o Ct foi <35 e no controle o Ct foi >35) ou inibição não quantificada (quando na amostra o Ct foi >35 e no controle o Ct foi <35).

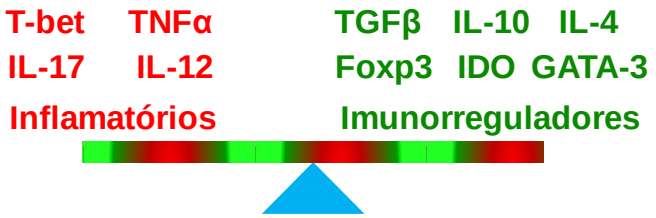


Figura 4 - Painel de genes analisados. Gene predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17, TNFα) e imunorreguladores (Gata3, Foxp3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ).

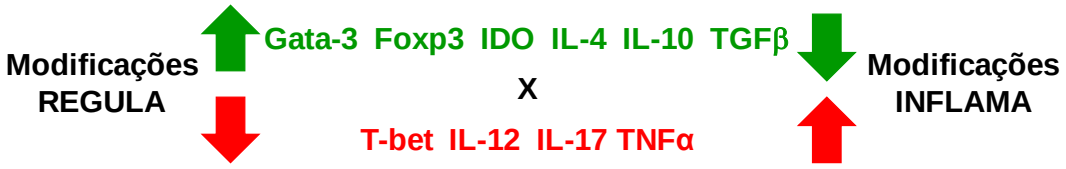


Figura 5 - Classificação das modificações em REGULA ou INFLAMA. Modificações tipo REGULA: aumento na expressão de genes imunorreguladores ou diminuição na expressão de genes inflamatórios; e INFLAMA: aumento na expressão de genes inflamatórios ou diminuição na expressão de genes imunorreguladores.

3.12 Protocolos para a indução de tolerância ao aloenxerto de pele murino

Para a indução de tolerância intranasal, instilamos os peptídeos selecionados pela via intranasal. Cada grupo experimental foi composto por no mínimo 4 camundongas, sendo o grupo controle instilado com PBS. Os grupos estudados sempre foram subdivididos em subgrupos contendo animais dos diversos grupos experimentais, e os experimentos sempre foram conduzidos pelas mesmas pessoas a fim de diminuir ao máximo a variabilidade experimental. Foram realizados diferentes protocolos, todos com 5 ou mais instilações intranasais dos peptídeos

diluídos (20 ou 50ug/dose), com intervalos de 2 a 3 dias, antes ou após o alotransplante de pele. O peptídeo foi dado em conjunto ou não com αCD3.

Protocolo I: No primeiro protoloco, foi dado o peptídeo N7 sozinho (20ug/dose), 5 vezes com intervalos de 2 dias e o transplante de pele (transplante de F1 C57BL/6 x Balb/c para C57BL/6) foi realizado 2 dias após a última instilação (instilação nos dias -10, -8, -6, -4, -2, e transplante no dia 0).

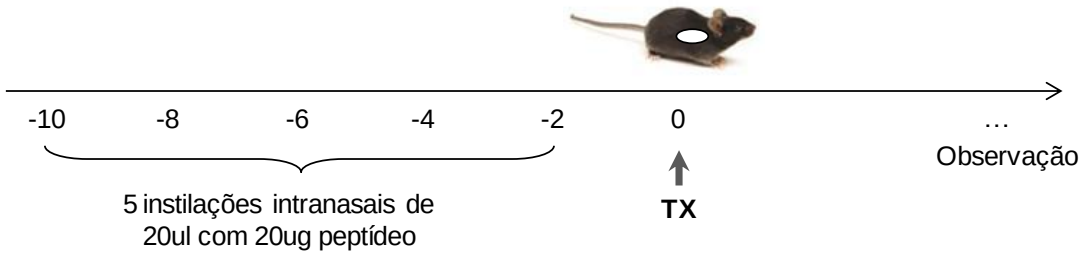


Figura 6 – Protocolo I de indução de tolerância ao alotransplante. Esquema experimental para indução de tolerância ao aloenxero de pele murino.

Protocolo II: No segundo protocolo os peptídeos (100ug) foram injetados pela via subcutânea na região inguinal com Adjuvante Incompleto de Freund (IFI), e no 14º dia foi realizado o transplante de pele (DBA/2 para Balb/c).

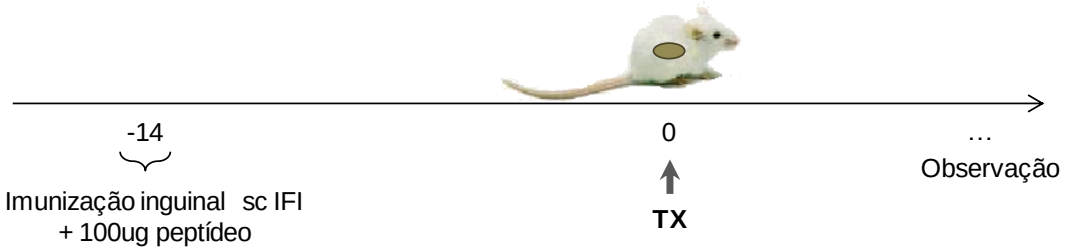


Figura 7 – Protocolo II de indução de tolerância ao alotransplante de pele. Esquema experimental para indução de tolerância ao aloenxero de pele murino.

Protocolo III: No terceiro protocolo, foram administradas 5 doses intravenosas seguidas de αCD3 (10ug/dose), e 5 doses de N7 intranasal com intervalos de 3 dias (50ug/dose), sendo o transplante de pele (DBA/2 para Balb/c) realizado no 5º dia (αCD3 nos dias -5, -4, -3, -2, -1; instilação nos dias -5, -3, 0, 3, 6 e transplante no dia 0).

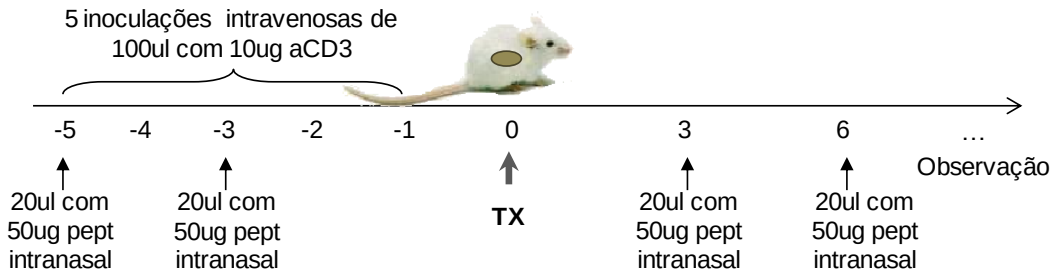


Figura 8 – Protocolo III de indução de tolerância ao alotransplante de pele. Esquema experimental para indução de tolerância ao aloenxero de pele murino.

Os animais de cada grupo experimental foram eutanasiados no momento de detecção macroscópica da rejeição e perda do enxerto (perda ≥65%).

3.13 Transplante de pele

O transplante de pele foi realizado conforme adaptação do método descrito originalmente por Billingham et al (1951). Fragmentos de pele da cauda dos animais doadores (1.5 cm X 0.9 cm ≈ 1.35 cm2) foram retirados e mantidos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, até o momento do transplante. Os camundongos receptores foram anestesiados pela via intraperitoneal, com uma mistura de 1,45 mg (100mg/kg) de Dopalem (Agibrand, Paulina, SP, Brasil), acrescida de 0,17 mg (100 mg/kg) de Anasedam (Agibrand, Paulina, SP, Brasil) num volume de 250

μl de PBS. Após a anestesia, foi retirado um fragmento da região dorsal da pele do receptor de tamanho semelhante ao enxerto, e o fragmento de pele do doador foi implantado no receptor. Os enxertos foram cobertos com papel celofane estéril e "Band-Aid" (Johnson & Johnson, SP, Brasil), que foram retirados no sexto dia pós-transplante. A partir deste dia, o enxerto foi analisado diariamente em relação a alterações macroscópicas

3.14 Análise macroscópica do enxerto

Analisamos o enxerto diariamente até o dia do eutanásia dos animais, o qual foi ocorreu no momento de detecção macroscópica da rejeição e perda do enxerto. Essa detecção foi realizada baseada na observação diária das características morfológicas do enxerto. Observamos a pigmentação (normal, a qual é o ideal; escurecida, o que indica uma possível rejeição; ou amarelada, a qual indica infecção); a presença de calor e edema locais (sugerem uma possível reação inflamatória); a presença de exudato; o grau de desidratação e retração do enxerto com a presença de crostas e consistência e espessura aumentados. Além da observação dessas características, também medimos diariamente o tamanho do enxerto, para verificar se há a retração e a perda do mesmo. Caracterizamos como perda do enxerto quando houve a retração e diminuição de pêlo, com perda maior ou igual a 65% da área total do enxerto. Na ocasião do eutanásia foram coletados soro, células do baço para estudos funcionais, e tecido do enxerto para o estudo

histopatológico.

3.15 Análise histopatológica do enxerto

Fragmentos dos enxertos de pele foram fixados em formalina tamponada, imersos em parafina, e os cortes obtidos com auxílio de micrótomo. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e submetidas à análise histopatológica por patologistas do Departamento de Patologia, InCor, USP quanto a avaliação de rejeição seguindo os critérios descritos a seguir.

•Não rejeição: Ausência de infiltrado inflamatório, não agressão a epiderme e derme, tendo ela espessura normal, sem evidência de necrose o fibrose;

•Rejeição aguda:Proeminente infiltrado inflamatório linfocitário ou misto com nítida agressão da epiderme e folículos pilosos, com necrose;

•Rejeição aguda (em cronificação): Infiltrado inflamatório discreto, com agressão discreta ou focal da camada basal da epiderme e folículos pilosos;

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

3.16 Análise estatística dos dados

Para a análise dos resultados, utilizamos o teste ANOVA Kruskal-

Wallis e as análises estatísticas foram feitas com o programa Prism 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos dos peptídeos da HSP60 na expressão gênica – Resultados por gene estudado

Cada alteração observada na expressão gênica, induzida pelos peptídeos da HSP60 foi classificada como imunorreguladora (alterações REGULA – aumento da expressão de genes predominantemente imunorreguladores como Foxp3, IL-10, TGFβ, Gata-3, IL-4 e IDO ou diminuição da expressão de genes predominantemente inflamatórios como T-bet, TNFα, IL-17, IL-12p35 e IL-12p40); ou inflamatórias (alterações INFLAMA – aumento da expressão de genes predominantemente inflamatórios ou diminuição da expressão de genes predominantemente imunorreguladores). Esta classificação foi utilizada como ferramenta para analisar qualitativamente as alterações e auxiliar na escolha de um peptídeo mais imunorregulador para ser utilizado nos ensaios *in vivo*. Em alguns momentos ocorreram induções e inibições da expressão de alguns genes que não puderam ser quantificadas devido a valores de Ct ≥ 35 (seja na condição de cultura sem antígeno seja na condição com antígeno) e, portanto, não mostradas no gráfico. Essas alterações só foram mostradas nas tabelas com o resumo das modificações de expressão gênica.

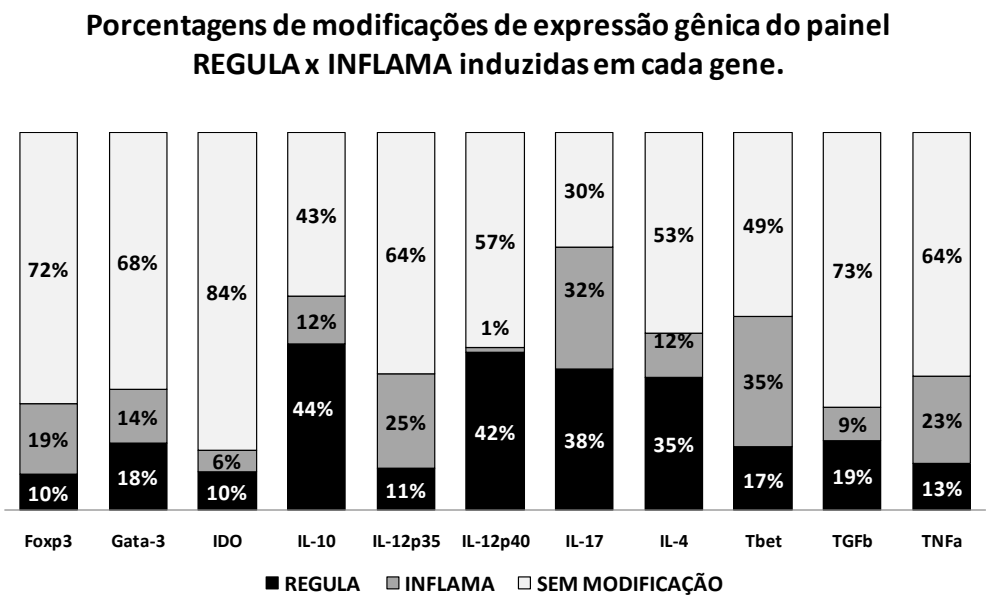


Figura 9 - Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de experimentos sem modificação induzidas em cada gene. O gráfico mostra a porcentagem de modificações REGULA (preto), INFLAMA (cinza escuro) e experimentos em que não houve modificação (SEM MODIFICAÇÃO – cinza claro) para cada gene, considerando-se todas as experimentos analisadas. Os experimentos foram realizados com diferentes peptídeos da HSP60 cultivados por 4 dias com esplenócitos murinos de C57BL/6 fêmas (culturas induviduais). Foram analisados 13: Foxp3 (n=7), Gata-3 (n=7), IDO (n=7), IL-10(n=7), IL-12p35 (n=7), IL-12p40 (n=6), IL-17 (n=7), IL-4 (n=8), T-bet (n=8), TGFβ (n=7), TNFα (n=8).

Primeiro, optamos por analisar as modificações na expressão gênica relativa (quantificação gênica relativa - QR) induzidas em cada uma das 13 moléculas estudadas (Figura 9). De maneira geral, verificamos que todos os genes estudados sofreram algum tipo de modificação em sua expressão gênica relativa induzida pelos diversos peptídeos da HSP60 estudados. Os genes mais alterados foram da IL-17 (65% de modificações entre REGULA e INFLAMA), da IL-10 (56% de modificações entre REGULA e INFLAMA) e de T-bet (52% de modificações, entre REGULA e INFLAMA), o que pode sugerir uma ação mais intensa dos peptídeos da HSP60 sobre estes genes. O gene mais alterado foi o da IL-17, onde a maior parte de suas modificações foi do tipo REGULA, (em 38% das condições), e em

seguida INFLAMA (32%). Em seguida veio o gene da IL-10 (maioria das modificações REGULA em 44% das condições, e em 12% INFLAMA), seguido por T-bet (maioria das modificações INFLAMA em 35% das condições, e em 17% REGULA). O gene que teve maior quantidade de modificações de expressão do tipo REGULA foi o da IL-10 (em 44% das condições) e o que teve maior quantidade de INFLAMA foi o de T-bet (em 35% das condições). O gene que menos teve modificação da sua expressão foi o da IDO (em 84% das condições não induziu alteração), e possivelmente não faz parte das principais vias de atuação dos peptídeos estudados, no sistema murino. Foi também possível notar que, dos genes estudados, a maioria teve mais de 50% dos ensaios sem modificação de sua expressão (quantificação relativa entre 0,5 e 2,0).

Em seguida, optamos por realizar uma análise mais minuciosa das modificações na expressão gênica induzidas em cada molécula, verificando o predomínio de modificações induzidas por cada peptídeo estudado em cada ensaio animal individual (Figura 10 a 14).

Verificamos na Figura 10 que dos fatores de transcrição estudados (Foxp3, Gata-3 e T-bet), o que mais apresentou modificações em sua QR relativa foi o gene T-bet (Figura 10 C), confome mencionado anteriormente. Das QRs alteradas de T-bet, 25% foram com aumento da sua expressão gênica relativa (outros 10% foram aumento da expressão não quantificável - Figura 14) e 17%, com diminuição da expressão gênica relativa. Na maioria das modificações houve o aumento da QR, o que as

classifica como modificações de expressão do tipo INFLAMA (em 35% das condições), pois T-bet é considerado um gene predominantemente inflamatório. Para T-bet, também foi possível notar que apesar dele ser um dos genes cuja expressão foi mais modificada pelos peptídeos da HSP60, a maioria das medianas da QR induzidas pelos diferentes peptídeos encontraram-se dentro da faixa sem modificação (entre 0,5 e 2,0), à exceção da condição com o peptídeo I4 (QR=2,09 ocorrendo aumento).

Para o gene do fator de transcrição Foxp3, observamos poucas modificações da sua expressão pelos peptídeos da HSP60. (Figura 10 A). Para o gene Foxp3, 10% foram aumento de QR enquanto que em 19% das condições ocorreu diminuição da QR, sendo consideradas modificações INFLAMA. Dos peptídeos testados, destacaram-se o N3 pelo predomínio REGULA (1 de 7 experimentos – 14%), o N6 (2 de 8 experimentos – 25%) e o C10 (2 de 5 experimentos – 40%). Todos os outros peptídeos induziram modificações predominantemente INFLAMA, à exceção de I8 e I9 que não induziram modificação da expressão de Foxp3. O peptídeo que induziu maior quantidade de experimentos com modificações INFLAMA foi C3 (3 de 7 experimentos – 43%).

Com Gata-3 (Figura 10 B), houve um predomínio de modificações REGULA (em 18% das condições) com aumento na QR de Gata-3, enquanto em apenas 14% das condições houve modificações INFLAMA.

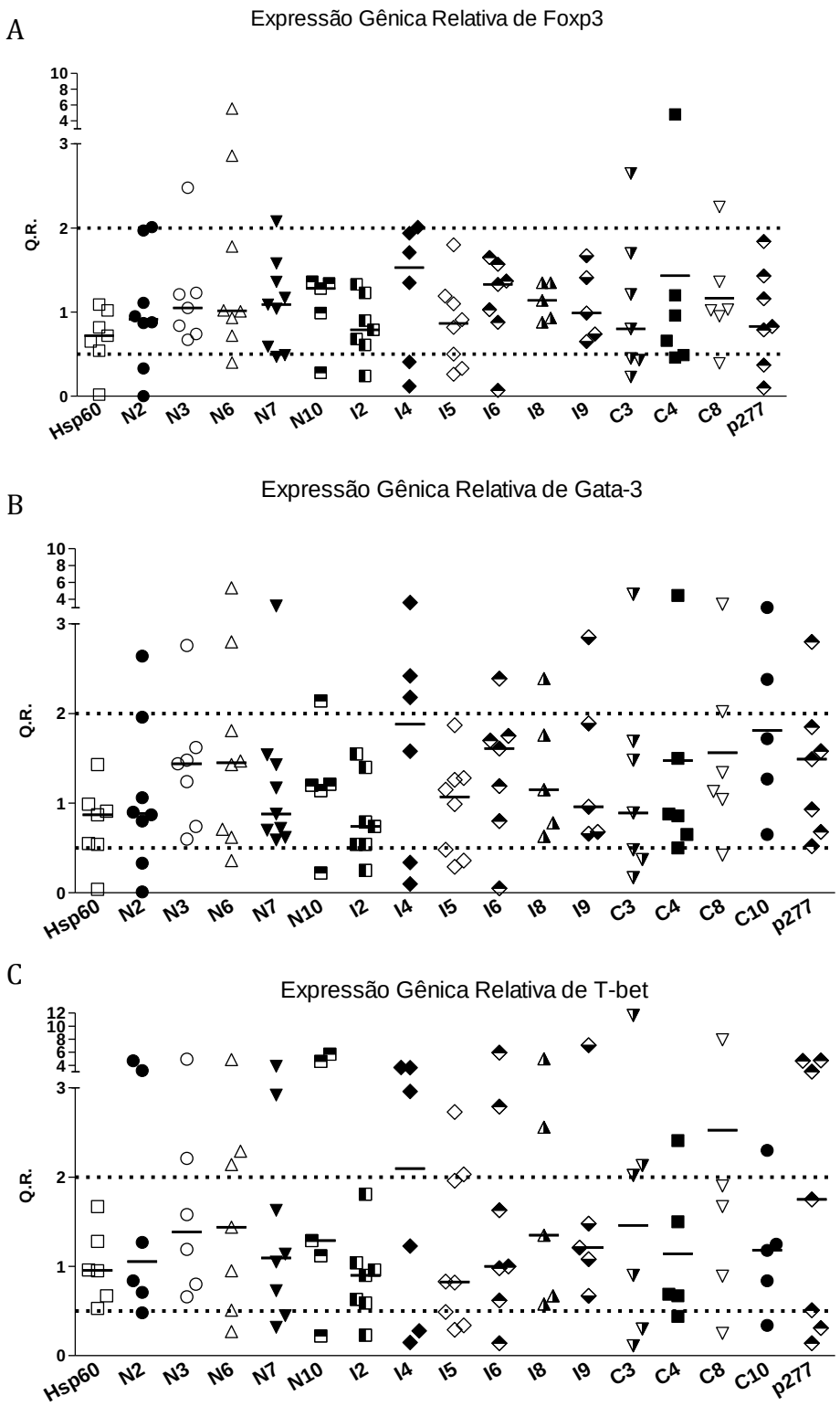


Figura 10 - Quantificação relativa da expressão de cada gene induzida pelos diferentes peptídeos da HSP60. Para verificar o efeito dos peptídeos da HSP60 sobre a expressão gênica dos esplenócitos murinos C57BL/6 fêmeas, estes (n=6 a 8 animais) foram estimulados individualmente *in vitro* com 10µg/ml de peptídeos durante 4 dias a e analisamos as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2). A) Foxp3, B) Gata-3; C) T-bet.

O gene da IDO teve pouca modificação da sua expressão com os peptídeos da HSP60 (Figura 11 A). Observamos 4 aumentos nas QRs de IDO (e outras 8 modificações com aumento não quantificável - Figura 14), e 6 diminuições das QRs, o que faz que tenha um predomínio de alterações do tipo REGULA (em 10% das condições) sobre INFLAMA (em 6% das condições).

As alterações de expressão gênica induzidas em TNFα (Figura 11 C) foram em sua maioria INFLAMA (26 aumentos de QR e mais 2 induções não quantificadas, o que somam 23% de todas as condições estudadas). Somente em 13% das condições houve alterações do tipo REGULA.

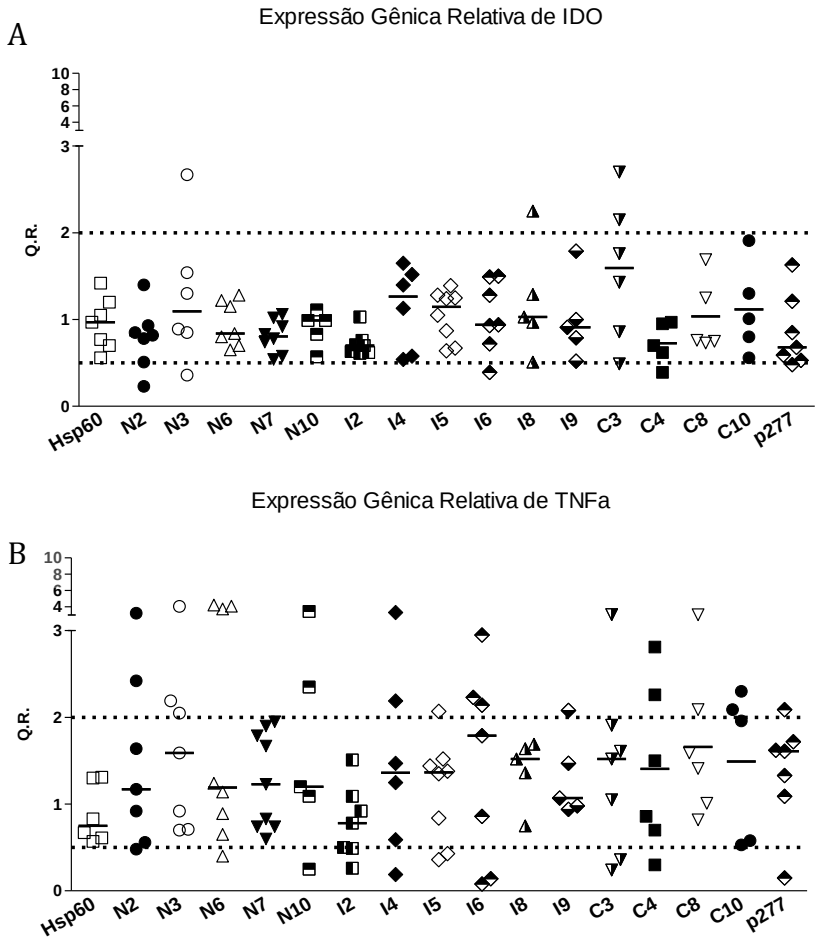


Figura 11 - Quantificação relativa da expressão de cada gene induzida pelos diferentes peptídeos da HSP60. Para verificar o efeito dos peptídeos da HSP60 sobre a expressão gênica dos esplenócitos murinos C57BL/6 fêmeas, estes (n=7 animais) foram estimulados individualmente *in vitro* com 10µg/ml de peptídeos durante 4 dias a e analisamos as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2). A) IDO, B) TNFα.

O gene da IL-10 (Figura 12 A) foi um dos que mais teve modificação de sua expressão pelos peptídeos da HSP60 (em 56% das condições testadas). A maioria das modificações foram com aumento da QR, sendo consideradas alterações do tipo REGULA (41 aumentos de QR mais 10 aumentos não quantificáveis, os quais somam 44% de modificações REGULA, de todas as condições). Os peptídeos que induziram modificações REGULA foram: I9 (3,21), C3 (2,61), C8(2,90), I8 (2,38) e p277 (2,02).

O gene da IL-17 foi o que mais teve modificações de expressão dentre todos (em 65% de todas as condições), sendo que a maioria foi do tipo REGULA (em 38% das condições REGULA e em 32%, INFLAMA). Os peptídeos que induziram a redução da QR medianas da IL-17 foram: I6 (0,13), N2 e C4 (0,39), N6 (0,40), N7 (0,42), I5 (0,43) e I9 (0,45).

As alterações de expressão gênica induzidas em TGFβ também foram em sua maioria do tipo REGULA (em 19% das condições, contra apenas 9% das condições do tipo INFLAMA), caracterizada pelo aumento de suas QRs dadas as propriedades predominantemente imunorreguladoras do TGFβ. No entanto, não houve modificação na QR mediana com os diferentes peptídeos da HSP60.

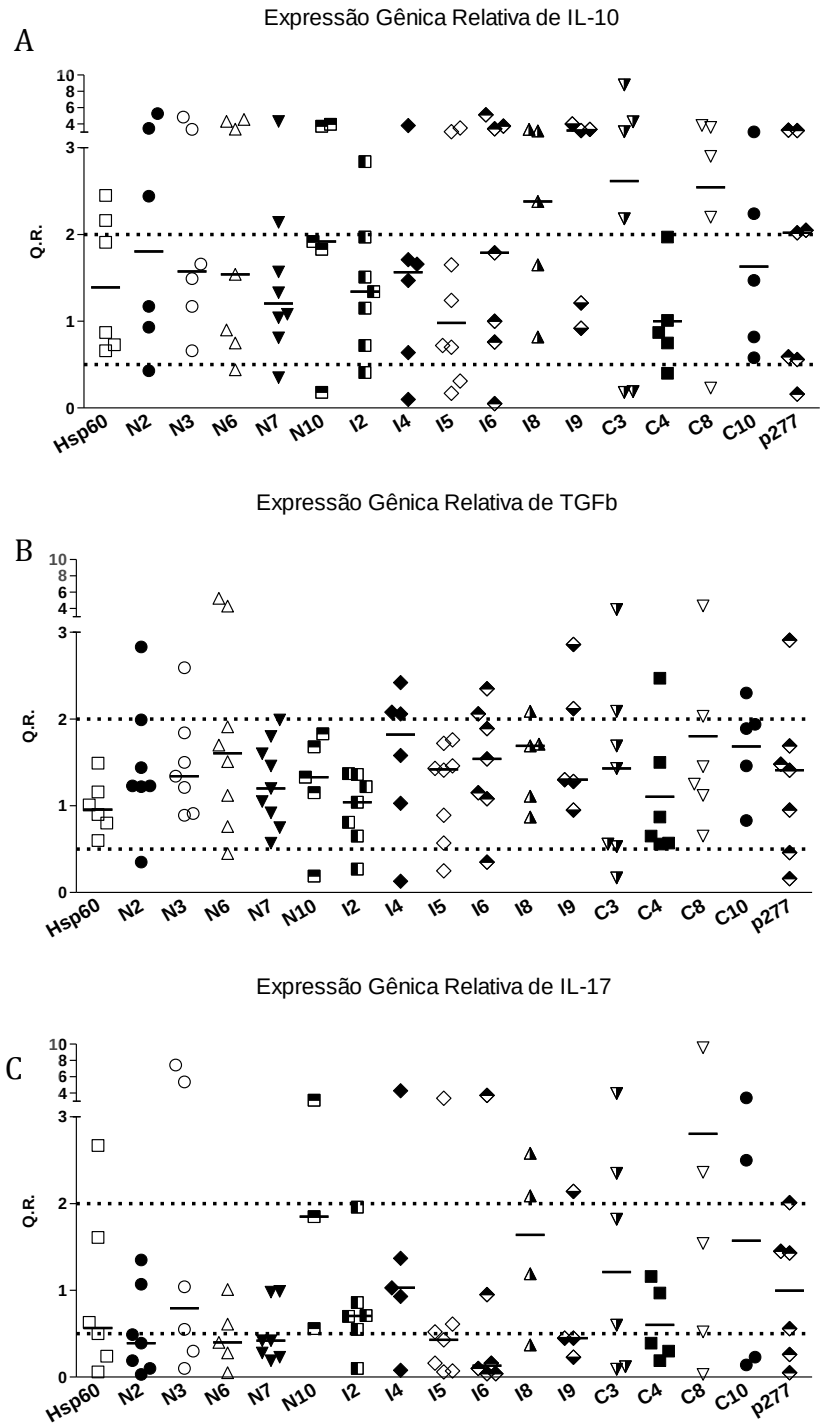


Figura 12 - Quantificação relativa da expressão de cada gene induzida pelos diferentes peptídeos da HSP60. Para verificar o efeito dos peptídeos da HSP60 sobre a expressão gênica dos esplenócitos murinos C57BL/6 fêmeas (n=6 a 8 animais), estes foram estimulados individualmente *in vitro* com 10µg/ml de peptídeos durante 4 dias a e analisamos as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2). A) IL-10, B) TGFβ; C) IL-17.

Ao analisarmos o gene da IL-4 (Figura 13 A), verificamos que ele foi o 4º gene com maior porcentagem de modificações REGULA (33 aumentos de QR mais 10 aumentos não quantificáveis, somando 35% de todas as condições).

Como a citocina IL-12 é formada por 2 subunidades, analisamos também a expressão gênica das subunidades IL-12p35 e IL-12p40. Verificamos que a ação dos peptídeos da HSP60 sobre as 2 subunidades caminharam em direções opostas. Enquanto que a IL-12p35 teve em sua maioria modificações INFLAMA (em 25% das condições, com aumento das QRs), a IL-12p40 teve modificações REGULA (em 42% das condições com diminuição das QRs). Na IL-12p35 também ocorreram diversas reduções das QRs (em 11% das condições- REGULA). Já para a subunidade IL-12p40 houve somente 1 alteração com redução da QR (não quantificável e indeterminada – em apenas 1% das condições houve modificação INFLAMA). Houve redução das QRs medianas induzidas por: I8(0,35), N6(0,37), p277(0,38), N10(0,42), I5(0,43) e C4(0,47); todos induziram modificações do tipo REGULA.

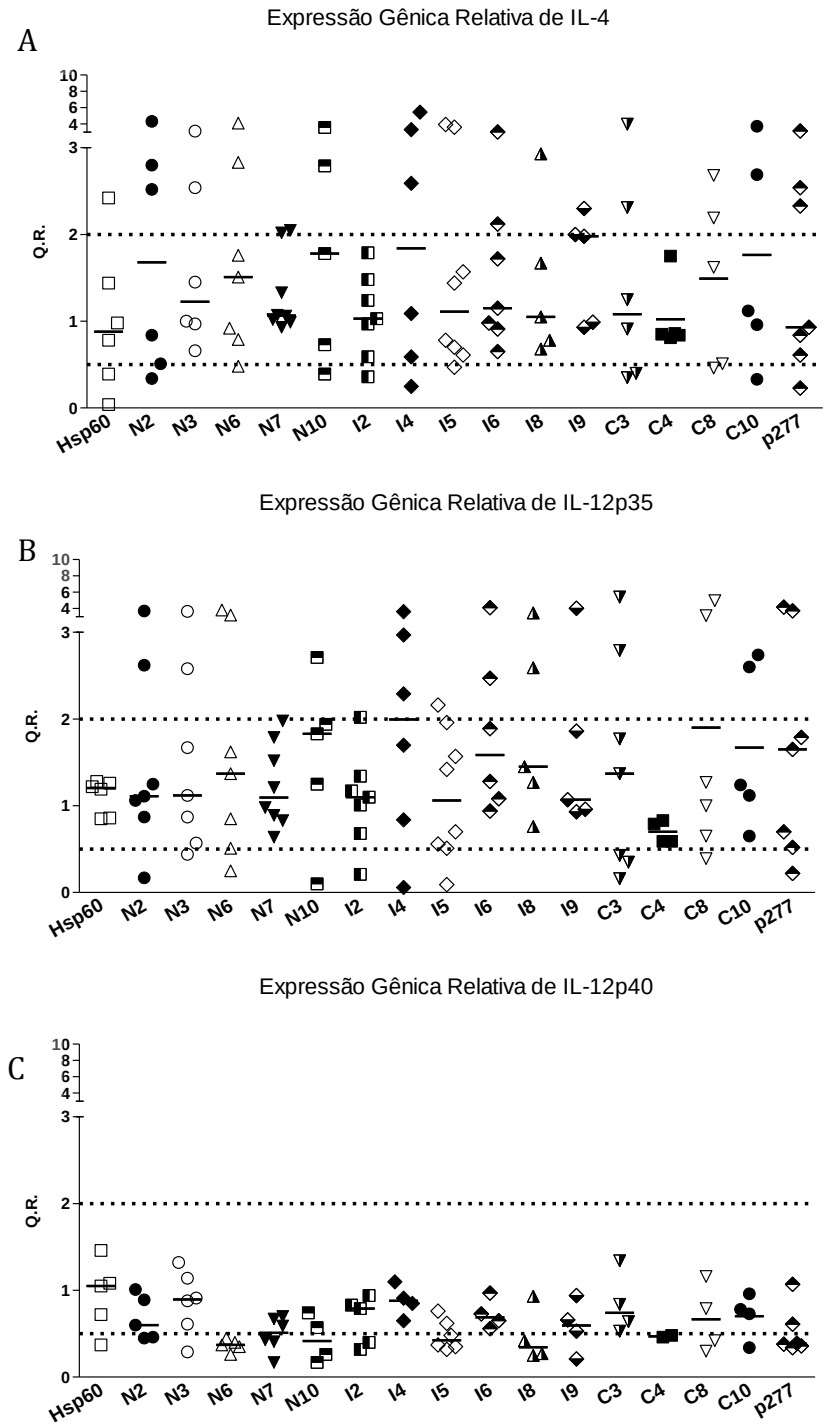


Figura 13 - Quantificação relativa da expressão de cada gene induzida pelos diferentes peptídeos da HSP60. Para verificar o efeito dos peptídeos da HSP60 sobre a expressão gênica dos esplenócitos murinos C57BL/6 fêmeas, estes (n=5 a 8 animais) foram estimulados individualmente *in vitro* com 10µg/ml de peptídeos durante 4 dias a e analisamos as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2). A) IL-4, B) IL-12p35 e C) IL-12p40.

Para facilitar a visualização das alterações na expressão gênica relativa induzida pelos peptídeos em cada gene, compilamos os dados em uma tabela (Figura 14). Nela mostramos todos os genes estudados, o que cada peptídeo utilizado nos diferentes experimentos alterou na QR, e a classificação das alterações em INFLAMA ou REGULA. Aumentos na QR foram marcadas em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações do tipo REGULA em verde (↑expressão gene predominantemente imunorregulador ou ↓expressão gene predominantemente inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene predominantemente inflamatório ou ↓expressão gene predominantemente imunorregulador). Conforme mencionado, classificamos os genes em predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17, e TNFα).

É possível notar que, apesar de serem da mesma linhagem e serem submetidas às mesmas condições experimentais, as células dos animais utilizados nos estudos nem sempre responderam de maneira igual ao mesmo estímulo. O resumo das modificações induzidas em cada gene está na Figura 14.

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom	REG/ INFL
Hsp60	Foxp3	1,09	0,65	1,02	0,82	0,72	0,02	.	0,54	.	.	.	0,72	0	1	6	7	14%	
N2	Foxp3	1,11	0,88	2,01	1,97	0,87	0,00	0,33	0,95	.	.	.	0,92	1	2	5	8	25%	
N3	Foxp3	1,23	1,21	2,48	0,84	1,05	0,67	.	0,74	.	.	.	1,05	1	0	6	7	14%	
N6	Foxp3	1,02	1,01	1,78	0,93	0,72	.	0,40	2,86	.	.	5,55	1,01	2	1	5	8	25%	
N7	Foxp3	1,58	1,17	1,36	1,09	0,47	0,49	.	0,59	1,04	.	2,08	1,09	1	2	6	9	22%	
N10	Foxp3	0,99	1,34	1,36	1,28	.	.	0,28	.	.	.	.	1,28	0	1	4	5	20%	
I2	Foxp3	1,33	0,61	1,23	0,90	0,79	.	0,24	0,68	.	.	.	0,79	0	1	6	7	14%	
I4	Foxp3	1,94	1,71	2,01	1,35	.	.	0,12	0,41	.	.	.	1,53	1	2	3	6	33%	
I5	Foxp3	1,80	0,91	1,10	0,82	0,50	0,26	0,33	1,19	.	.	.	0,86	0	2	6	8	25%	
I6	Foxp3	1,65	1,03	1,57	1,33	.	.	.	0,88	1,37	0,07	.	1,33	0	1	6	7	14%	
I8	Foxp3	1,35	1,35	0,93	1,14	.	.	.	0,88	.	.	.	1,14	0	0	5	5	0%	
I9	Foxp3	1,41	0,65	0,74	1,67	.	.	.	0,99	.	.	.	0,99	0	0	5	5	0%	
C3	Foxp3	1,70	1,21	0,80	2,65	.	0,45	0,23	0,43	.	.	.	0,80	1	3	3	7	43%	
C4	Foxp3	.	.	.	.	0,66	0,46	.	0,96	1,20	0,49	4,82	0,81	1	2	3	6	33%	
C8	Foxp3	1,03	0,95	1,36	2,25	.	0,39	.	1,02	.	.	.	1,03	1	1	4	6	0%	
C10	Foxp3	2,88	2,06	1,74	1,11	.	.	.	0,92	.	.	.	1,74	2	0	3	5	40%	
p277	Foxp3	1,43	1,16	0,83	1,84	0,79	0,37	.	0,10	.	.	.	0,83	0	2	5	7	29%	
													Total Foxp3	10%	19%	72%		19%	0,52
Hsp60	Gata-3	0,99	0,91	0,87	1,43	0,54	0,04	.	0,55	.	.	.	0,87	0	1	6	7	14%	
N2	Gata-3	0,90	1,06	1,96	2,64	0,80	0,01	0,33	0,87	.	.	.	0,88	1	2	5	8	25%	
N3	Gata-3	1,24	1,62	2,76	1,44	1,48	0,60	.	0,74	.	.	.	1,44	1	0	6	7	14%	
N6	Gata-3	1,43	0,71	1,81	1,47	0,62	.	0,36	2,80	.	.	5,37	1,45	2	1	5	8	25%	
N7	Gata-3	1,54	0,72	1,17	1,43	0,62	0,70	.	0,59	0,88	.	3,22	0,88	1	0	8	9	11%	
N10	Gata-3	1,20	1,14	1,21	2,14	.	.	0,22	.	.	.	.	1,20	1	1	3	5	0%	
I2	Gata-3	1,55	0,54	0,74	1,40	0,79	.	0,25	0,54	.	.	.	0,74	0	1	6	7	14%	
I4	Gata-3	1,58	3,64	2,18	2,42	.	.	0,10	0,34	.	.	.	1,88	3	2	1	6	50%	
I5	Gata-3	1,28	1,87	1,26	1,15	0,48	0,36	0,29	0,99	.	.	.	1,07	0	3	5	8	38%	
I6	Gata-3	1,70	1,75	1,61	2,39	.	.	.	0,80	1,19	0,05	.	1,61	1	1	5	7	0%	
I8	Gata-3	1,15	1,76	0,63	2,39	.	.	.	0,78	.	.	.	1,15	1	0	4	5	20%	
I9	Gata-3	1,89	0,68	0,66	2,85	.	.	.	0,96	.	.	.	0,96	1	0	4	5	20%	
C3	Gata-3	1,69	1,48	0,89	4,60	.	0,48	0,17	0,37	.	.	.	0,89	1	3	3	7	43%	
C4	Gata-3	.	.	.	.	0,65	0,50	.	0,86	0,88	1,50	4,46	0,87	1	0	5	6	17%	
C8	Gata-3	1,34	2,02	1,13	3,42	.	0,42	.	1,04	.	.	.	1,23	2	1	3	6	33%	
C10	Gata-3	2,38	3,04	1,72	1,27	.	.	.	0,65	.	.	.	1,72	2	0	3	5	40%	
p277	Gata-3	1,49	1,58	0,93	2,80	0,68	0,52	.	1,85	.	.	.	1,49	1	0	6	7	14%	
													Total Gata-3	18%	14%	68%		18%	1,27
Hsp60	IDO	0,77	1,05	1,42	0,97	0,70	0,56	.	1,20	.	.	.	0,97	0	0	7	7	0%	
N2	IDO	0,93	0,51	1,40	0,78	0,82	0,23	0,85	indet	.	.	.	0,82	1	1	6	8	0%	
N3	IDO	0,89	1,30	2,67	0,85	0,36	1,54	.	indet	.	.	.	1,10	2	1	4	7	29%	
N6	IDO	1,22	0,70	1,28	0,84	0,65	.	0,80	indet	.	.	1,15	0,84	1	0	7	8	13%	
N7	IDO	0,83	0,54	0,78	1,06	0,92	1,02	.	indet	0,74	.	0,58	0,80	1	0	8	9	11%	
N10	IDO	0,99	0,99	1,11	0,83	.	.	0,57	.	.	.	.	0,99	0	0	5	5	0%	
I2	IDO	0,63	1,03	0,62	0,61	0,71	.	0,70	0,76	.	.	.	0,70	0	0	7	7	0%	
I4	IDO	1,40	1,13	1,52	1,65	.	.	0,54	0,58	.	.	.	1,27	0	0	6	6	0%	
I5	IDO	1,05	1,24	1,39	1,25	0,64	0,87	0,67	1,28	.	.	.	1,14	0	0	8	8	0%	
I6	IDO	0,94	0,93	1,49	1,50	.	.	.	0,72	1,28	0,39	.	0,94	0	1	6	7	14%	
I8	IDO	0,97	1,29	1,03	2,25	.	.	.	0,51	.	.	.	1,03	1	0	4	5	20%	
I9	IDO	0,79	1,00	0,52	1,79	.	.	.	0,91	.	.	.	0,91	0	0	5	5	0%	
C3	IDO	2,15	1,76	1,43	2,70	.	0,86	0,49	indet	.	.	.	1,60	3	1	3	7	43%	
C4	IDO	.	.	.	.	0,39	0,70	.	indet	0,97	0,62	0,95	0,70	1	1	4	6	0%	
C8	IDO	0,73	0,75	0,76	1,69	.	1,25	.	indet	.	.	.	0,76	1	0	5	6	17%	
C10	IDO	0,56	1,91	1,30	1,01	.	.	.	0,80	.	.	.	1,01	0	0	5	5	0%	
p277	IDO	0,53	1,63	0,85	1,21	0,59	0,48	.	0,68	.	.	.	0,68	0	1	6	7	14%	
													Total IDO	10%	5%	85%		10%	1,83

Figura 14 - Resumo das modificações da expressão de cada gene induzidas pelos peptídeos da HSP60 estudados. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57BL/6 fêmeas individuais (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeos por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-17, IL-12p35, IL-12p40, e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vinho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações do tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou do tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom	REG/ INFL
Hsp60	IL-10	2,16	0,66	2,45	1,91	0,73	indet	.	0,87	.	.	.	1,39	3	0	4	7	43%	
N2	IL-10	2,44	1,17	5,28	3,47	0,93	indet	0,43	indet	.	.	.	1,81	5	1	2	8	63%	
N3	IL-10	3,35	1,17	4,85	1,66	0,66	1,49	.	indet	.	.	.	1,58	3	0	4	7	43%	
N6	IL-10	3,38	0,90	4,56	1,54	0,75	.	0,44	indet	.	.	4,32	1,54	4	1	3	8	50%	
N7	IL-10	4,32	1,33	2,14	1,57	0,35	0,81	.	indet	1,08	.	1,04	1,20	3	1	5	9	33%	
N10	IL-10	1,92	1,83	3,96	3,72	.	.	0,18	.	.	.	.	1,92	2	1	2	5	40%	
I2	IL-10	2,84	1,34	1,97	1,51	1,15	.	0,41	0,72	.	.	.	1,34	1	1	5	7	0%	
I4	IL-10	1,66	1,47	3,82	1,71	.	.	0,10	0,64	.	.	.	1,57	1	1	4	6	0%	
I5	IL-10	3,07	1,65	3,52	1,24	0,31	0,72	0,17	0,70	.	.	.	0,98	2	2	4	8	0%	
I6	IL-10	3,42	1,79	5,14	3,74	.	.	.	0,76	1,00	0,05	.	1,79	3	1	3	7	43%	
I8	IL-10	3,35	1,65	2,38	3,15	.	.	.	0,82	.	.	.	2,38	3	0	2	5	60%	
I9	IL-10	4,00	1,21	3,21	3,34	.	.	.	0,92	.	.	.	3,21	3	0	2	5	60%	
C3	IL-10	8,79	2,18	3,05	4,27	.	0,19	0,18	indet	.	.	.	2,61	5	2	0	7	71%	
C4	IL-10	.	.	.	.	0,75	1,01	.	indet	0,87	0,40	1,97	0,87	1	1	4	6	0%	
C8	IL-10	3,58	2,20	2,90	3,81	.	0,23	.	indet	.	.	.	2,90	5	1	0	6	83%	
C10	IL-10	3,04	1,47	2,24	0,82	.	.	.	0,58	.	.	.	1,47	2	0	3	5	40%	
p277	IL-10	3,26	2,05	2,02	3,20	0,56	0,59	.	0,16	.	.	.	2,02	4	1	2	7	57%	
													Total IL-10	44%	12%	43%		44%	3,57
Hsp60	IL-12p35	1,26	0,86	1,22	1,19	0,85	indet	.	1,28	.	.	.	1,20	0	1	6	7	14%	
N2	IL-12p35	1,06	1,25	2,62	3,70	1,11	indet	0,17	0,87	.	.	.	1,11	1	3	4	8	38%	
N3	IL-12p35	1,12	2,58	3,66	1,67	0,44	0,57	.	0,87	.	.	.	1,12	1	2	4	7	29%	
N6	IL-12p35	1,37	0,85	3,20	1,62	0,51	.	0,25	3,82	.	.	.	1,37	1	2	4	7	29%	
N7	IL-12p35	1,98	1,52	1,21	1,79	0,83	0,64	.	0,98	0,89	.	.	1,09	0	0	8	8	0%	
N10	IL-12p35	1,25	1,94	2,71	1,83	.	.	0,10	.	.	.	.	1,83	1	1	3	5	0%	
I2	IL-12p35	2,02	1,17	1,10	1,34	0,68	.	0,21	1,01	.	.	.	1,10	1	1	5	7	0%	
I4	IL-12p35	1,70	2,97	3,63	2,29	.	.	0,06	0,84	.	.	.	1,99	1	3	2	6	50%	
I5	IL-12p35	1,96	2,16	1,57	1,42	0,56	0,51	0,09	0,70	.	.	.	1,06	1	1	6	8	0%	
I6	IL-12p35	1,28	1,89	2,47	4,10	.	.	.	0,94	1,08	.	.	1,59	0	2	4	6	33%	
I8	IL-12p35	1,27	3,47	1,45	2,59	.	.	.	0,76	.	.	.	1,45	0	2	3	5	40%	
I9	IL-12p35	1,07	1,86	0,96	4,03	.	.	.	0,93	.	.	.	1,07	0	1	4	5	20%	
C3	IL-12p35	1,77	2,79	1,37	5,42	.	0,35	0,16	0,43	.	.	.	1,37	3	2	2	7	43%	
C4	IL-12p35	.	.	.	.	0,59	0,59	.	0,83	0,79	.	.	0,69	0	0	4	4	0%	
C8	IL-12p35	0,65	3,14	1,27	4,96	.	0,39	.	1,00	.	.	.	1,13	1	2	3	6	33%	
C10	IL-12p35	1,24	2,60	2,74	1,12	.	.	.	0,65	.	.	.	1,24	0	2	3	5	40%	
p277	IL-12p35	1,79	4,19	1,65	3,72	0,70	0,52	.	0,22	.	.	.	1,65	1	2	4	7	29%	
													Total IL-12p35	11%	25%	64%		25%	0,44
Hsp60	IL-12p40	0,72	1,08	1,05	1,46	0,37	indet	.	.	.	.	.	1,05	1	1	4	6	0%	
N2	IL-12p40	0,60	0,45	0,89	0,46	1,01	.	.	.	.	.	.	0,60	2	0	3	5	40%	
N3	IL-12p40	0,61	1,14	0,91	0,29	1,32	0,88	.	.	.	.	.	0,89	1	0	5	6	17%	
N6	IL-12p40	0,35	0,45	0,26	0,37	0,40	.	.	.	.	.	.	0,37	5	0	0	5	100%	
N7	IL-12p40	0,17	0,41	0,43	0,59	0,67	0,70	.	.	.	.	.	0,51	3	0	3	6	50%	
N10	IL-12p40	0,26	0,57	0,74	0,17	.	.	.	.	.	.	.	0,42	2	0	2	4	50%	
I2	IL-12p40	0,79	0,32	0,40	0,83	0,94	.	.	.	.	.	.	0,79	2	0	3	5	40%	
I4	IL-12p40	0,85	0,91	1,10	0,65	.	.	.	.	.	.	.	0,88	0	0	4	4	0%	
I5	IL-12p40	0,62	0,76	0,37	0,32	0,35	0,48	.	.	.	.	.	0,43	4	0	2	6	67%	
I6	IL-12p40	0,56	0,65	0,73	0,97	.	.	.	.	.	.	.	0,69	0	0	4	4	0%	
I8	IL-12p40	0,42	0,93	0,27	0,25	.	.	.	.	.	.	.	0,35	3	0	1	4	75%	
I9	IL-12p40	0,66	0,53	0,21	0,94	.	.	.	.	.	.	.	0,59	1	0	3	4	25%	
C3	IL-12p40	0,64	0,84	0,53	1,34	.	.	.	.	.	.	.	0,74	0	0	4	4	0%	
C4	IL-12p40	.	.	.	.	0,48	0,46	.	.	.	.	.	0,47	2	0	0	2	100%	
C8	IL-12p40	0,30	0,79	0,42	1,16	.	.	.	.	.	.	.	0,61	2	0	2	4	50%	
C10	IL-12p40	0,96	0,34	0,78	0,73	.	.	.	.	.	.	.	0,76	1	0	3	4	25%	
p277	IL-12p40	0,39	1,07	0,34	0,61	0,38	0,36	.	.	.	.	.	0,38	4	0	2	6	67%	
													Total IL-12p40	42%	1%	57%		42%	33,00

Figura 14 – (continuação) Resumo das modificações da expressão de cada gene induzidas pelos peptídeos da HSP60 estudados. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57BL/6 fêmeas individuais (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeos por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-17, IL-12p35, IL-12p40, e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vinho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações do tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou do tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom	REG/ INFL
Hsp60	IL-17	0,06	0,63	0,24	1,61	2,67	indet	.	0,50	.	.	.	0,56	3	2	2	7	43%	
N2	IL-17	0,10	0,49	1,07	indet	0,39	0,03	0,19	1,35	.	.	.	0,39	5	1	2	8	63%	
N3	IL-17	0,55	1,04	5,38	indet	0,30	7,45	.	0,10	.	.	.	0,80	2	3	2	7	43%	
N6	IL-17	0,28	0,61	1,01	indet	0,05	.	indet	0,40	.	.	.	0,40	2	2	2	6	0%	
N7	IL-17	0,28	0,99	0,19	indet	0,98	0,42	.	0,23	0,42	.	.	0,42	5	1	2	8	63%	
N10	IL-17	3,14	0,56	1,85	indet	.	.	indet	.	.	.	.	1,85	0	3	2	5	60%	
I2	IL-17	0,71	0,55	0,86	indet	0,70	.	0,10	1,96	.	.	.	0,70	1	1	5	7	0%	
I4	IL-17	1,03	0,93	4,30	indet	.	.	0,08	1,37	.	.	.	1,03	1	2	3	6	33%	
I5	IL-17	0,16	0,06	0,61	indet	3,38	0,43	0,07	0,52	.	.	.	0,43	4	2	2	8	50%	
I6	IL-17	0,16	0,04	3,72	indet	.	.	.	0,10	0,95	0,04	.	0,13	4	2	1	7	57%	
I8	IL-17	2,58	1,19	0,37	indet	.	.	.	2,09	.	.	.	1,64	1	3	1	5	60%	
I9	IL-17	2,14	0,23	0,45	indet	.	.	.	0,45	.	.	.	0,45	3	2	0	5	60%	
C3	IL-17	0,09	2,35	3,97	indet	.	1,82	0,12	0,60	.	.	.	1,21	2	3	2	7	43%	
C4	IL-17	.	.	.	.	0,19	0,39	.	1,16	0,30	0,97	.	0,39	3	0	2	5	60%	
C8	IL-17	1,54	2,36	9,57	indet	.	0,03	.	0,52	.	.	.	1,54	1	3	2	6	50%	
C10	IL-17	0,14	3,42	2,50	indet	.	.	.	0,23	.	.	.	1,37	2	3	0	5	60%	
p277	IL-17	0,56	1,43	2,01	indet	1,45	0,26	.	0,05	.	.	.	1,00	2	2	3	7	0%	
													Total IL-17	38%	32%	30%		38%	1,17
Hsp60	IL-4	0,04	1,44	2,42	0,98	0,78	indet	.	0,39	.	.	.	0,88	2	2	3	7	0%	
N2	IL-4	0,34	2,52	4,33	2,80	0,84	indet	0,51	indet	.	.	.	1,68	5	1	2	8	63%	
N3	IL-4	0,66	2,54	3,14	1,00	1,45	0,97	.	indet	.	.	.	1,22	3	0	4	7	43%	
N6	IL-4	1,76	0,92	4,10	1,51	0,79	.	0,48	indet	.	.	2,83	1,51	3	1	4	8	38%	
N7	IL-4	1,07	2,02	2,05	1,33	1,02	0,93	.	indet	0,99	.	1,06	1,06	3	0	6	9	33%	
N10	IL-4	0,73	1,78	2,79	3,59	.	.	0,39	.	.	.	.	1,78	2	1	2	5	40%	
I2	IL-4	1,03	1,24	1,79	1,48	0,59	.	0,36	0,97	.	.	.	1,03	0	1	6	7	14%	
I4	IL-4	1,09	5,46	3,33	2,59	.	.	0,25	0,59	.	.	.	1,84	3	1	2	6	50%	
I5	IL-4	0,70	3,61	3,94	1,57	1,44	0,47	0,61	0,78	.	.	.	1,11	2	1	5	8	25%	
I6	IL-4	0,91	2,12	3,03	1,72	.	.	.	0,98	1,15	0,65	.	1,15	2	0	5	7	29%	
I8	IL-4	0,78	2,93	1,05	1,67	.	.	.	0,68	.	.	.	1,05	1	0	4	5	20%	
I9	IL-4	0,99	2,30	1,98	2,00	.	.	.	0,93	.	.	.	1,98	2	0	3	5	40%	
C3	IL-4	0,91	3,99	1,25	2,31	.	0,35	0,40	indet	.	.	.	1,08	3	2	2	7	43%	
C4	IL-4	.	.	.	.	0,81	0,86	.	indet	0,85	0,84	1,75	0,85	1	0	5	6	17%	
C8	IL-4	0,46	2,68	1,62	2,19	.	0,51	.	indet	.	.	.	1,62	3	1	2	6	50%	
C10	IL-4	1,12	3,72	2,69	0,96	.	.	.	0,33	.	.	.	1,12	2	1	2	5	40%	
p277	IL-4	0,84	3,16	2,33	2,54	0,93	0,61	.	0,23	.	.	.	0,93	3	1	3	7	43%	
													Total IL-4	35%	12%	53%		35%	3,08
Hsp60	Tbet	0,96	0,95	1,28	1,67	0,67	indet	.	0,53	.	.	.	0,96	0	1	6	7	14%	
N2	Tbet	0,84	1,27	3,21	4,70	0,71	indet	0,48	indet	.	.	.	1,05	1	4	3	8	50%	
N3	Tbet	0,66	2,21	4,95	1,58	1,19	0,80	.	indet	.	.	.	1,39	0	3	4	7	43%	
N6	Tbet	1,44	0,95	4,87	2,14	0,51	.	0,27	indet	.	.	2,29	1,44	1	4	3	8	50%	
N7	Tbet	1,63	1,05	2,92	3,87	0,45	0,32	.	indet	0,73	.	1,14	1,10	2	3	4	9	33%	
N10	Tbet	1,12	1,29	5,72	4,62	.	.	0,22	.	.	.	.	1,29	1	2	2	5	40%	
I2	Tbet	0,96	0,90	1,81	1,04	0,63	.	0,23	0,59	.	.	.	0,90	1	0	6	7	14%	
I4	Tbet	1,23	2,96	3,70	3,67	.	.	0,15	0,28	.	.	.	2,09	2	3	1	6	50%	
I5	Tbet	0,83	1,96	2,03	2,73	0,49	0,34	0,29	0,82	.	.	.	0,82	3	2	3	8	38%	
I6	Tbet	1,00	1,63	2,79	5,94	.	.	.	0,62	0,98	0,14	.	1,00	1	2	4	7	29%	
I8	Tbet	0,67	2,56	1,35	4,99	.	.	.	0,58	.	.	.	1,35	0	2	3	5	40%	
I9	Tbet	1,48	1,08	1,21	7,08	.	.	.	0,67	.	.	.	1,21	0	1	4	5	20%	
C3	Tbet	2,02	2,13	0,90	11,64	.	0,11	0,30	indet	.	.	.	1,46	2	4	1	7	57%	
C4	Tbet	.	.	.	.	0,67	0,44	.	indet	0,69	1,50	2,41	0,69	1	2	3	6	33%	
C8	Tbet	0,89	1,67	1,90	7,92	.	0,25	.	indet	.	.	.	1,67	1	2	3	6	33%	
C10	Tbet	1,18	2,30	1,25	0,84	.	.	.	0,34	.	.	.	1,18	1	1	3	5	0%	
p277	Tbet	1,75	4,77	3,06	4,69	0,51	0,31	.	0,14	.	.	.	1,75	2	3	2	7	43%	
													Total Tbet	17%	35%	49%		35%	0,49

Figura 14 – (continuação) Resumo das modificações da expressão de cada gene induzidas pelos peptídeos da HSP60 estudados. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57BL/6 fêmeas individuais (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeos por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-17, IL-12p35, IL-12p40, e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vinho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações do tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou do tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom	REG/ INFL
Hsp60	TGFb	1,01	0,80	1,16	1,49	0,60	indet	.	0,90	.	.	.	0,95	1	0	6	7	14%	
N2	TGFb	1,23	1,22	1,99	2,83	1,23	indet	0,35	1,44	.	.	.	1,23	2	1	5	8	25%	
N3	TGFb	1,34	1,84	2,59	1,50	0,89	0,91	.	1,21	.	.	.	1,34	1	0	6	7	14%	
N6	TGFb	1,12	1,51	1,91	1,70	0,76	.	0,45	5,26	.	.	4,29	1,60	2	1	5	8	25%	
N7	TGFb	1,46	1,60	1,20	1,80	0,75	0,57	.	1,05	0,92	.	1,99	1,20	0	0	9	9	0%	
N10	TGFb	1,15	1,83	1,68	1,33	.	.	0,19	.	.	.	.	1,33	0	1	4	5	20%	
I2	TGFb	1,36	0,81	1,04	1,37	0,65	.	0,27	1,22	.	.	.	1,04	0	1	6	7	14%	
I4	TGFb	1,58	2,08	2,42	2,06	.	.	0,13	1,03	.	.	.	1,82	3	1	2	6	50%	
I5	TGFb	1,72	1,76	1,46	1,43	0,89	0,57	0,25	1,41	.	.	.	1,42	0	1	7	8	13%	
I6	TGFb	1,54	1,89	2,35	2,06	.	.	.	1,15	1,08	0,35	.	1,54	2	1	4	7	29%	
I8	TGFb	1,69	2,09	1,11	1,71	.	.	.	0,87	.	.	.	1,69	1	0	4	5	20%	
I9	TGFb	2,12	0,95	1,28	2,86	.	.	.	1,30	.	.	.	1,30	2	0	3	5	40%	
C3	TGFb	2,09	1,69	1,43	3,89	.	0,56	0,17	0,53	.	.	.	1,43	2	1	4	7	29%	
C4	TGFb	.	.	.	.	0,56	0,57	.	0,87	0,65	1,50	2,47	0,76	1	0	5	6	17%	
C8	TGFb	1,25	2,03	1,45	4,32	.	0,65	.	1,12	.	.	.	1,35	2	0	4	6	33%	
C10	TGFb	1,94	2,30	1,89	1,46	.	.	.	0,83	.	.	.	1,89	1	0	4	5	20%	
p277	TGFb	1,48	1,69	1,41	2,91	0,95	0,46	.	0,16	.	.	.	1,41	1	2	4	7	29%	
													Total TGFb	19%	9%	73%		19%	2,10
Hsp60	TNFa	1,31	0,57	1,30	0,67	0,61	indet	.	0,83	.	.	.	0,75	0	1	6	7	14%	
N2	TNFa	1,64	1,17	3,22	2,42	0,92	indet	0,48	0,56	.	.	.	1,17	1	3	4	8	38%	
N3	TNFa	1,59	2,05	4,05	0,70	0,92	2,19	.	0,71	.	.	.	1,59	0	3	4	7	43%	
N6	TNFa	1,14	0,65	4,22	1,24	0,89	.	0,40	3,75	.	.	4,08	1,19	1	2	4	7	29%	
N7	TNFa	1,95	0,74	1,79	1,23	0,60	1,90	.	0,74	0,83	.	1,67	1,23	0	0	9	9	0%	
N10	TNFa	1,20	1,09	3,44	2,35	.	.	0,25	.	.	.	.	1,20	1	2	2	5	40%	
I2	TNFa	1,51	0,49	1,09	0,92	0,50	.	0,26	0,78	.	.	.	0,78	2	0	5	7	29%	
I4	TNFa	1,47	2,19	3,32	1,25	.	.	0,19	0,59	.	.	.	1,36	1	2	3	6	33%	
I5	TNFa	1,44	1,38	2,07	0,84	0,43	1,52	0,36	1,35	.	.	.	1,36	2	1	5	8	25%	
I6	TNFa	1,79	2,14	2,95	2,23	.	.	.	0,86	0,14	0,08	.	1,79	2	3	2	7	43%	
I8	TNFa	1,36	1,69	1,52	1,64	.	.	.	0,75	.	.	.	1,52	0	0	5	5	0%	
I9	TNFa	1,47	0,94	0,98	2,08	.	.	.	1,07	.	.	.	1,07	0	1	4	5	20%	
C3	TNFa	1,61	1,52	1,91	3,06	.	1,05	0,24	0,36	.	.	.	1,52	2	1	4	7	29%	
C4	TNFa	.	.	.	.	0,30	2,26	.	0,70	0,86	1,50	2,81	1,18	1	2	3	6	33%	
C8	TNFa	1,01	2,09	1,41	3,03	.	1,59	.	0,82	.	.	.	1,50	0	2	4	6	33%	
C10	TNFa	1,96	2,09	2,30	0,53	.	.	.	0,58	.	.	.	1,96	0	2	3	5	40%	
p277	TNFa	1,62	1,61	1,72	2,09	1,09	1,33	.	0,15	.	.	.	1,61	1	1	5	7	0%	
													Total TNFa	13%	23%	64%		23%	0,54

Figura 14 – (continuação) Resumo das modificações da expressão de cada gene induzidas pelos peptídeos da HSP60 estudados. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57BL/6 fêmeas individuais (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeos por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-17, IL-12p35, IL-12p40, e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações do tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou do tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

De todos os genes estudados, somente IL-12p35 (razão REGULA/INFLAMA=0,44), T-bet (razão REGULA/INFLAMA=0,49), Foxp3 (razão REGULA/INFLAMA=0,52) e TNFα (razão REGULA/INFLAMA=0,54) tiveram predomínio de modificações INFLAMA induzidas pelos diferentes peptídeos da HSP60 e, portanto, tiveram razões REGULA/INFLAMA menores que 1. Já os genes IL-17 (razão REGULA/INFLAMA=1,17), Gata-

3 (razão REGULA/INFLAMA=1,27), IDO (razão REGULA/INFLAMA=1,83), TGFβ (razão REGULA/INFLAMA=2,10), IL-4 (razão REGULA/INFLAMA=3,08), IL-10 (razão REGULA/INFLAMA=3,57), e IL-12p40 (razão REGULA/INFLAMA=33) tiveram predomínio de modificações REGULA, e portanto, tiveram razões REGULA/INFLAMA maiores que 1.

4.2 Efeitos dos peptídeos da HSP60 na expressão gênica – Resultados por peptídeo estudado

Também analisamos a expressão gênica relativa induzida pelos peptídeos de cada região (N-terminal, Intermediária e C-terminal) e cada peptídeo individualmente.

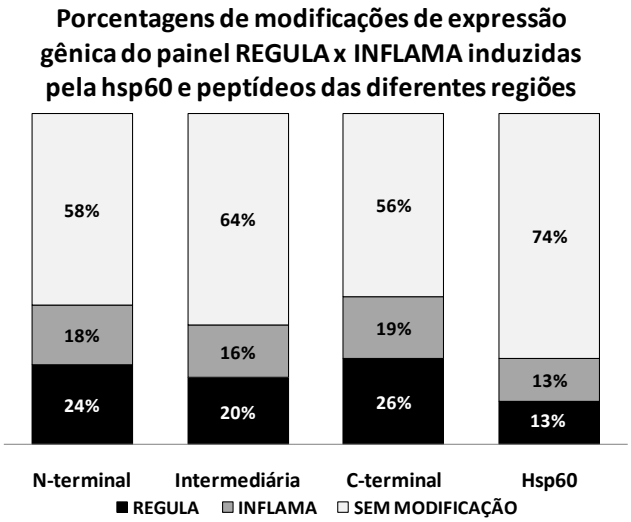


Figura 15 – Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de experimentos sem modificação induzidas pela HSP60 e peptídeos das diferentes regiões. O gráfico mostra as porcentagens de modificações REGULA (preto), INFLAMA (cinza escuro) e experimentos em que não houve modificação (NDA – cinza claro) para cada região e para a HSP60 inteira, considerando-se todos os experimentos analisados (todos os genes, peptídeos e animais).

A análise conjunta do efeito de todos os peptídeos na expressão de todos os genes em relação aos tipos de modificação da expressão gênica, não mostrou diferença importante entre as 3 regiões (Figura 15).

Ao analisarmos a HSP60 (n=7) individualmente (Figura 16 e Figura 17), verificamos que na maioria dos experimentos (74%) não houve modificação da expressão gênica (QRs entre 0,5 e 2) (Figura 15). Das modificações induzidas, houve um equilíbrio entre as do tipo REGULA (em 13% das condições) e INFLAMA (em 13% das condições), e desta forma, a razão REGULA/INFLAMA ficou igual a 1. No quadro sumário das modificações induzidas pela HSP60, destacam-se o aumento das QRs da IL-10 em 3 condições (43%) e a diminuição da IL-17 em 3 condições (43%). Não houve alteração das QRs medianas (Figura 17).

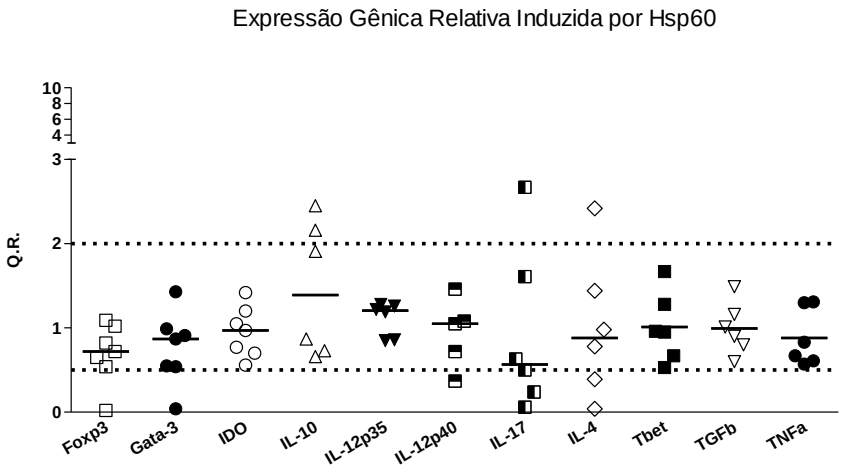


Figura 16 – Alterações na expressão gênica induzidas pela HSP60. Esplenócitos murinos (n= 7 animais) foram estimulados com 10µg/ml de peptídeos durante 4 dias a fim de analisar as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
Hsp60	Foxp3	1,09	0,65	1,02	0,82	0,72	0,02	.	0,54	.	.	.	0,72	0	1	6	7	14%
	Gata-3	0,99	0,91	0,87	1,43	0,54	0,04	.	0,55	.	.	.	0,87	0	1	6	7	14%
	IDO	0,77	1,05	1,42	0,97	0,70	0,56	.	1,20	.	.	.	0,97	0	0	7	7	0%
	IL-10	2,16	0,66	2,45	1,91	0,73	indet	.	0,87	.	.	.	1,39	3	0	4	7	43%
	IL-12p35	1,26	0,86	1,22	1,19	0,85	indet	.	1,28	.	.	.	1,20	0	1	6	7	14%
	IL-12p40	0,72	1,08	1,05	1,46	0,37	indet	.	.	.	.	.	1,05	1	1	4	6	0%
	IL-17	0,06	0,63	0,24	1,61	2,67	indet	.	0,50	.	.	.	0,56	3	2	2	7	43%
	IL-4	0,04	1,44	2,42	0,98	0,78	indet	.	0,39	.	.	.	0,88	2	2	3	7	0%
	Tbet	0,96	0,95	1,28	1,67	0,67	indet	.	0,53	.	.	.	0,96	0	1	6	7	14%
	TGFb	1,01	0,80	1,16	1,49	0,60	indet	.	0,90	.	.	.	0,95	1	0	6	7	14%
	TNFa	1,31	0,57	1,30	0,67	0,61	indet	.	0,83	.	.	.	0,75	0	1	6	7	14%
													Hsp60	13%	13%	74%		0%
	REG	2	0	3	0	1	3		1				10	Razão REGULA/INFLAMA 1,00				
	INFL	1	0	0	0	1	7		1				10					
	NDA	8	11	8	11	9	1		8				56					
	Total	11	11	11	11	11	11	0	10	0	0	0	76					
	Predom	18%	0%	27%	0%	0%	64%	0%	0%	0%	0%	0%	0%					

Figura 17 - Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pela HSP60. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=7 animais) estimulados com 10µg/ml de HSP60 por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

O peptídeo N7 (testado em 9 animais) induziu um predomínio de alterações REGULA (em 20% das condições testadas) sobre as INFLAMA (em 7% das condições testadas - menor valor da região), o que levou a uma alta razão REGULA/INFLAMA (2,71), maior razão dentre todos os peptídeos testados. Também se destacou a QR mediana reduzida de IL-17 (0,42).

Em seguida, na região N-terminal, o peptídeo N6 (testado em 8 animais) foi o que mais chamou a atenção, pois também induziu um predomínio de modificações REGULA (em 30% das condições testadas - 2º maior da região) sobre as INFLAMA (em 19% das condições testadas), o que levou à 2ª maior razão REGULA/INFLAMA da região (razão=1,60). O peptídeo N6 também se destacou por ter algumas QRs medianas

reduzidas em relação aos controles não estimulados, sendo consideradas em sua maioria REGULA (IL-12p40 QR=0,37 e IL-17 QR=0,40). É interessante notar que em 100% dos experimentos, o peptídeo induziu redução da QR de IL-12p40.

O terceiro peptídeo a se destacar foi N2 (testado em 8 animais), com 29% de modificações REGULA de todas as condições testadas (maior quantidade da região) contra 22% INFLAMA. Isso levou à 3ª maior razão REGULA/INFLAMA da região (razão=1,32). Vale a pena ressaltar que com o peptídeo N2 houve redução na QR mediana para o gene de IL-17 (QR=0,39), o que é considerada uma modificação REGULA.

Em seguida, vem o peptídeo N3 (testado em 7 animais), o qual foi predominantemente imunorregulador por esta análise (REGULA em 20% das condições testadas contra INFLAMA em 16%), e possui uma razão REGULA/INFLAMA=1,25.

O peptídeo N10 (testado em 5 animais) foi predominantemente INFLAMA (em 24% das condições) sobre REGULA (em 19% das condições), o que levou a uma razão REGULA/INFLAMA abaixo de 1 (razão=0,77). O peptídeo induziu apenas a alteração mediana da QR do gene da IL-12p40 (QR=0,42, considerada modificação REGULA).

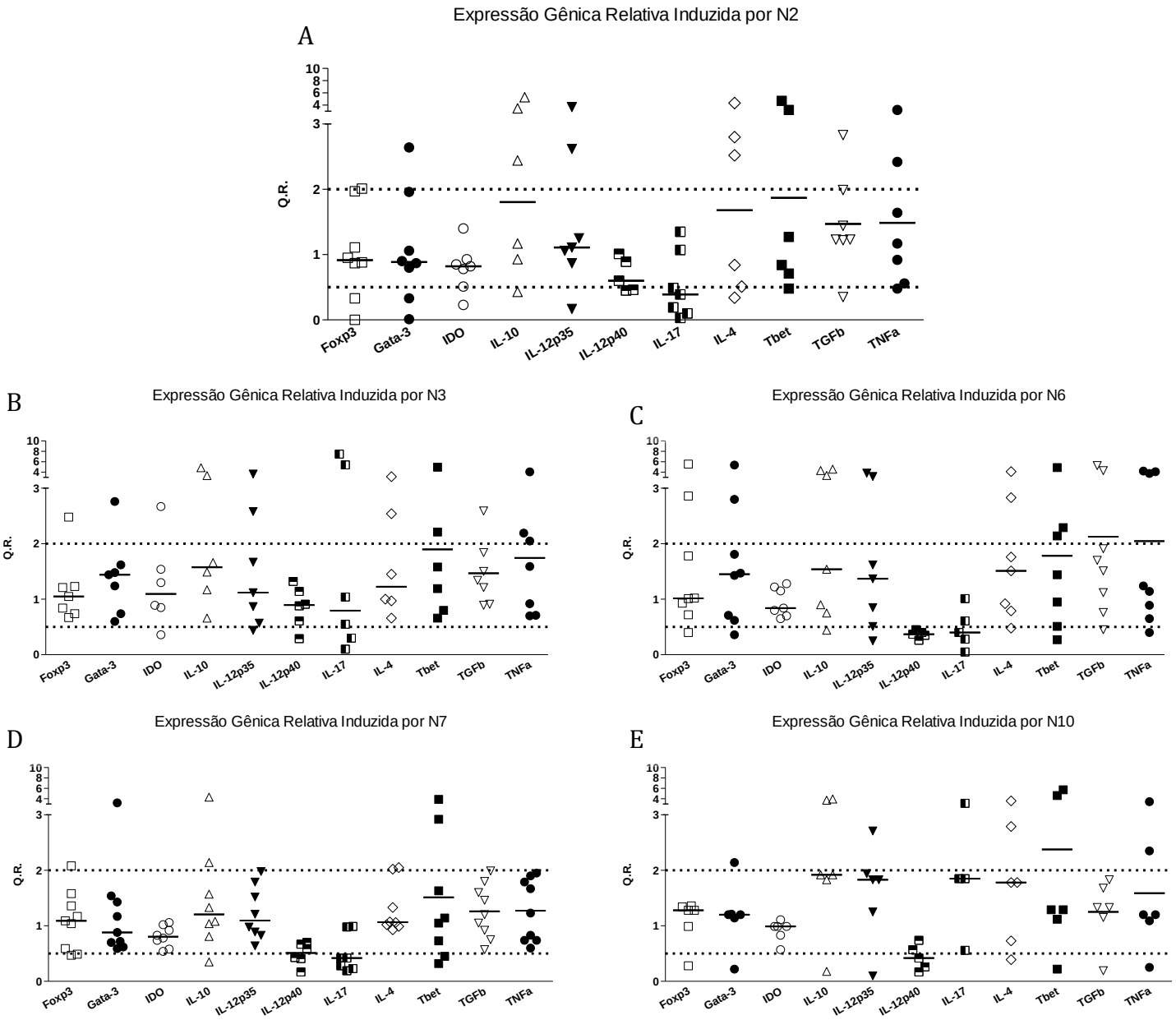


Figura 18 - Alterações na expressão gênica induzidas pela pelos peptídeos da região N-terminal da HSP60. Esplenócitos murinos (n=6 a 9 animais) foram estimulados com 10µg/ml de peptídeos (N2, N3, N6, N7 ou N10) durante 4 dias a fim de analisar as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2).A) N2; B) N3; C) N6; D) N7, E) N10.

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
N2	Foxp3	1,11	0,88	2,01	1,97	0,87	0,00	0,33	0,95	.	.	.	0,92	1	2	5	8	25%
	Gata-3	0,90	1,06	1,96	2,64	0,80	0,01	0,33	0,87	.	.	.	0,88	1	2	5	8	25%
	IDO	0,93	0,51	1,40	0,78	0,82	0,23	0,85	indet	.	.	.	0,82	1	1	6	8	0%
	IL-10	2,44	1,17	5,28	3,47	0,93	indet	0,43	indet	.	.	.	1,81	5	1	2	8	63%
	IL-12p35	1,06	1,25	2,62	3,70	1,11	indet	0,17	0,87	.	.	.	1,11	1	3	4	8	38%
	IL-12p40	0,60	0,45	0,89	0,46	1,01	.	.	.	.	.	.	0,60	2	0	3	5	40%
	IL-17	0,10	0,49	1,07	indet	0,39	0,03	0,19	1,35	.	.	.	0,39	5	1	2	8	63%
	IL-4	0,34	2,52	4,33	2,80	0,84	indet	0,51	indet	.	.	.	1,68	5	1	2	8	63%
	Tbet	0,84	1,27	3,21	4,70	0,71	indet	0,48	indet	.	.	.	1,05	1	4	3	8	50%
	TGFb	1,23	1,22	1,99	2,83	1,23	indet	0,35	1,44	.	.	.	1,23	2	1	5	8	25%
	TNFa	1,64	1,17	3,22	2,42	0,92	indet	0,48	0,56	.	.	.	1,17	1	3	4	8	38%
													N2	29%	22%	48%		29%
	REG	2	3	3	5	1	4	4	3				25	Razão REGULA/INFLAMA 1,32				
	INFL	1	0	3	4	0	6	4	1				19					
	NDA	8	8	5	2	10	0	2	6				41					
	Total	11	11	11	11	11	10	10	10	0	0	0	85					
	Predom	18%	27%	0%	45%	9%	60%	0%	30%	0%	0%	0%	29%					
N3	Foxp3	1,23	1,21	2,48	0,84	1,05	0,67	.	0,74	.	.	.	1,05	1	0	6	7	14%
	Gata-3	1,24	1,62	2,76	1,44	1,48	0,60	.	0,74	.	.	.	1,44	1	0	6	7	14%
	IDO	0,89	1,30	2,67	0,85	0,36	1,54	.	indet	.	.	.	1,10	2	1	4	7	29%
	IL-10	3,35	1,17	4,85	1,66	0,66	1,49	.	indet	.	.	.	1,58	3	0	4	7	43%
	IL-12p35	1,12	2,58	3,66	1,67	0,44	0,57	.	0,87	.	.	.	1,12	1	2	4	7	29%
	IL-12p40	0,61	1,14	0,91	0,29	1,32	0,88	.	.	.	.	.	0,89	1	0	5	6	17%
	IL-17	0,55	1,04	5,38	indet	0,30	7,45	.	0,10	.	.	.	0,80	2	3	2	7	43%
	IL-4	0,66	2,54	3,14	1,00	1,45	0,97	.	indet	.	.	.	1,22	3	0	4	7	43%
	Tbet	0,66	2,21	4,95	1,58	1,19	0,80	.	indet	.	.	.	1,39	0	3	4	7	43%
	TGFb	1,34	1,84	2,59	1,50	0,89	0,91	.	1,21	.	.	.	1,34	1	0	6	7	14%
	TNFa	1,59	2,05	4,05	0,70	0,92	2,19	.	0,71	.	.	.	1,59	0	3	4	7	43%
													N3	20%	16%	64%		20%
	REG	1	1	6	1	2	0		4				15	Razão REGULA/INFLAMA 1,25				
	INFL	0	3	4	1	1	2		1				12					
	NDA	10	7	1	9	8	9		5				49					
	Total	11	11	11	11	11	11	0	10	0	0	0	76					
	Predom	9%	27%	55%	0%	18%	18%	0%	40%	0%	0%	0%	20%					
N6	Foxp3	1,02	1,01	1,78	0,93	0,72	.	0,40	2,86	.	.	5,55	1,01	2	1	5	8	25%
	Gata-3	1,43	0,71	1,81	1,47	0,62	.	0,36	2,80	.	.	5,37	1,45	2	1	5	8	25%
	IDO	1,22	0,70	1,28	0,84	0,65	.	0,80	indet	.	.	1,15	0,84	1	0	7	8	13%
	IL-10	3,38	0,90	4,56	1,54	0,75	.	0,44	indet	.	.	4,32	1,54	4	1	3	8	50%
	IL-12p35	1,37	0,85	3,20	1,62	0,51	.	0,25	3,82	.	.	.	1,37	1	2	4	7	29%
	IL-12p40	0,35	0,45	0,26	0,37	0,40	.	.	.	.	.	.	0,37	5	0	0	5	100%
	IL-17	0,28	0,61	1,01	indet	0,05	.	indet	0,40	.	.	.	0,40	2	2	2	6	0%
	IL-4	1,76	0,92	4,10	1,51	0,79	.	0,48	indet	.	.	2,83	1,51	3	1	4	8	38%
	Tbet	1,44	0,95	4,87	2,14	0,51	.	0,27	indet	.	.	2,29	1,44	1	4	3	8	50%
	TGFb	1,12	1,51	1,91	1,70	0,76	.	0,45	5,26	.	.	4,29	1,60	2	1	5	8	25%
	TNFa	1,14	0,65	4,22	1,24	0,89	.	0,40	3,75	.	.	4,08	1,19	1	2	4	7	29%
													N6	30%	19%	52%		30%
	REG	3	1	3	1	2		3	7			4	24	Razão REGULA/INFLAMA 1,60				
	INFL	0	0	3	2	0		5	3			2	15					
	NDA	8	10	5	8	9		1	0			1	42					
	Total	11	11	11	11	11	0	9	10	0	0	7	81					
	Predom	27%	9%	0%	18%	18%	0%	56%	70%	0%	0%	57%	30%					

Figura 19 - Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região N-terminal. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeo por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
N7	Foxp3	1,58	1,17	1,36	1,09	0,47	0,49	.	0,59	1,04	.	2,08	1,09	1	2	6	9	22%
	Gata-3	1,54	0,72	1,17	1,43	0,62	0,70	.	0,59	0,88	.	3,22	0,88	1	0	8	9	11%
	IDO	0,83	0,54	0,78	1,06	0,92	1,02	.	indet	0,74	.	0,58	0,80	1	0	8	9	11%
	IL-10	4,32	1,33	2,14	1,57	0,35	0,81	.	indet	1,08	.	1,04	1,20	3	1	5	9	33%
	IL-12p35	1,98	1,52	1,21	1,79	0,83	0,64	.	0,98	0,89	.	.	1,09	0	0	8	8	0%
	IL-12p40	0,17	0,41	0,43	0,59	0,67	0,70	.	.	.	.	.	0,51	3	0	3	6	50%
	IL-17	0,28	0,99	0,19	indet	0,98	0,42	.	0,23	0,42	.	.	0,42	5	1	2	8	63%
	IL-4	1,07	2,02	2,05	1,33	1,02	0,93	.	indet	0,99	.	1,06	1,06	3	0	6	9	33%
	Tbet	1,63	1,05	2,92	3,87	0,45	0,32	.	indet	0,73	.	1,14	1,10	2	3	4	9	33%
	TGFb	1,46	1,60	1,20	1,80	0,75	0,57	.	1,05	0,92	.	1,99	1,20	0	0	9	9	0%
	TNFa	1,95	0,74	1,79	1,23	0,60	1,90	.	0,74	0,83	.	1,67	1,23	0	0	9	9	0%
													N7	20%	7%	72%		20%
	REG	3	2	4	0	1	2		4	1		2	19	Razão REGULA/INFLAMA 2,71				
	INFL	0	0	1	2	2	1		1	0		0	7					
	NDA	8	9	6	9	8	8		5	9		6	68					
	Total	11	11	11	11	11	11	0	10	10	0	8	94					
	Predom	27%	18%	36%	18%	18%	18%	0%	40%	10%	0%	25%	20%					
N10	Foxp3	0,99	1,34	1,36	1,28	.	.	0,28	.	.	.	.	1,28	0	1	4	5	20%
	Gata-3	1,20	1,14	1,21	2,14	.	.	0,22	.	.	.	.	1,20	1	1	3	5	0%
	IDO	0,99	0,99	1,11	0,83	.	.	0,57	.	.	.	.	0,99	0	0	5	5	0%
	IL-10	1,92	1,83	3,96	3,72	.	.	0,18	.	.	.	.	1,92	2	1	2	5	40%
	IL-12p35	1,25	1,94	2,71	1,83	.	.	0,10	.	.	.	.	1,83	1	1	3	5	0%
	IL-12p40	0,26	0,57	0,74	0,17	.	.	.	.	.	.	.	0,42	2	0	2	4	50%
	IL-17	3,14	0,56	1,85	indet	.	.	indet	.	.	.	.	1,85	0	3	2	5	60%
	IL-4	0,73	1,78	2,79	3,59	.	.	0,39	.	.	.	.	1,78	2	1	2	5	40%
	Tbet	1,12	1,29	5,72	4,62	.	.	0,22	.	.	.	.	1,29	1	2	2	5	40%
	TGFb	1,15	1,83	1,68	1,33	.	.	0,19	.	.	.	.	1,33	0	1	4	5	20%
	TNFa	1,20	1,09	3,44	2,35	.	.	0,25	.	.	.	.	1,20	1	2	2	5	40%
													N10	19%	24%	57%		24%
	REG	1	0	2	4			3					10	Razão REGULA/INFLAMA 0,77				
	INFL	1	0	3	3			6					13					
	NDA	9	11	6	4			1					31					
	Total	11	11	11	11	0	0	10	0	0	0	0	54					
	Predom	0%	0%	27%	36%	0%	0%	60%	0%	0%	0%	0%	24%					

Figura 19 (continuação)- Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região N-terminal. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeo por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Das modificações induzidas pelos peptídeos da região Intermediária da HSP60 (I2, I4, I5, I6, I8 e I9) (Figura 21), verificamos que a maioria das alterações de expressão gênica foi do tipo REGULA (em 19% das condições testadas), enquanto que INFLAMA foi em 16% das condições testadas.

Dentre os peptídeos predominantemente imunorreguladores destacam-se: Em primeiro lugar, o peptídeo I9 (testado em 5 animais), o

qual teve em 23% das condições testadas, modificações do tipo REGULA contra apenas 9% INFLAMA. Isso fez com que o peptídeo I9 tivesse uma razão REGULA/INFLAMA=2,40, com 22% REGULA e 19% INFLAMA. Ele teve sua QR mediana reduzida para IL-17 (0,45), aumentada para IL-10 (3,21), as quais são alterações REGULA. Para IL-10, a modificação da expressão gênica induzida pelo peptídeo I9 ocorreu em 3 dos 5 animais testados, com aumento da QR.

O segundo peptídeo mais interessante da região intermediária foi o peptídeo I8 (testado em 5 animais), o qual teve em 20% das condições testadas, alterações do tipo REGULA, e em apenas 13% das condições testadas, foram do tipo INFLAMA, obtendo uma razão REGULA/INFLAMA= 1,57.

De maneira similar ao I9, o peptídeo I8 (razão REGULA/INFLAMA=1,57 com 20% das condições testadas REGULA e 13% INFLAMA) teve 2 QRs medianas REGULA (IL-10=2,38 e IL-12p40=0,35). É interessante notar que em 75% das condições testadas, houve redução da QR de IL-12p40.

Em seguida, veio o peptídeo I5 (testado em 8 animais), com 21% das condições testadas com modificações REGULA e 17% com INFLAMA (razão REGULA/INFLAMA de 1,20). Ele teve redução das QRs medianas de IL-17 (0,43) e IL-12p40 (0,43).

Os peptídeos I6 (testado em 7 animais), I2 (testado em 7 animais) e I4 (testado em 6 animais) vieram depois, sendo que I6 (razão

REGULA/INFLAMA=1,07) e I2 (razão REGULA/INFLAMA=1,14) mostraram razão REGULA/INFLAMA próximos de 1. O peptídeo I6 induziu modificação da QR mediana de IL-17 (0,13). Já o peptídeo I4, foi o único da região que apresentou um predomínio INFLAMA (em 27% das condições testadas contra 25% REGULA), com uma razão REGULA/INFLAMA=0,94. Ele teve a QR mediana aumentada para T-bet (2,09), a qual é modificação do tipo INFLAMA.

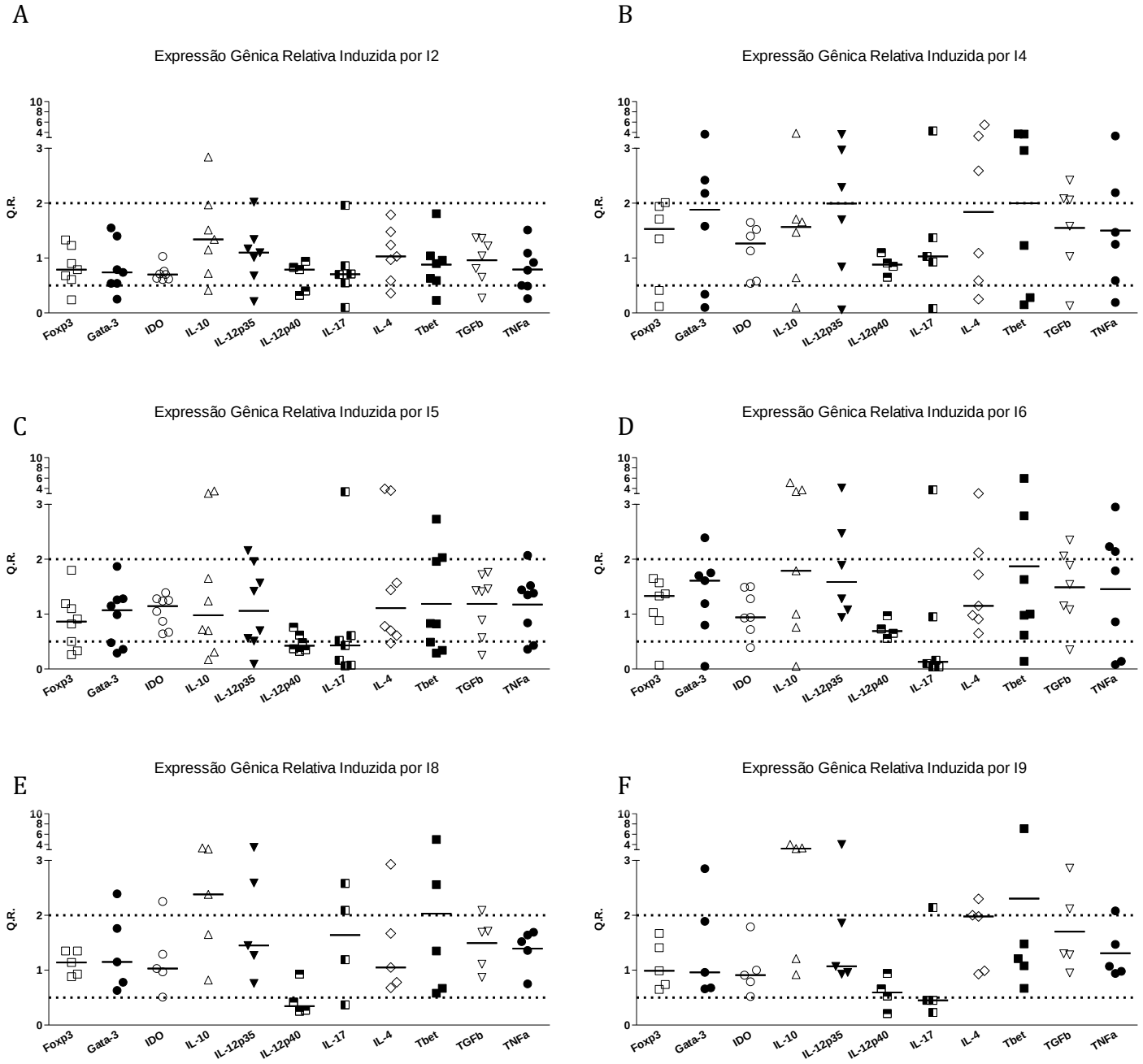


Figura 20 - Alterações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região Intermediária da HSP60. Esplenócitos murinos (n=5 a 9 animais) foram estimulados com 10µg/ml de peptídeos (I2, I4, I5, I6, I8 ou I9) durante 4 dias a fim de analisar as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2).A) I2; B) I4; C) I5; D) I6; E)I8 e F)I9.

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
I2	Foxp3	1,33	0,61	1,23	0,90	0,79	.	0,24	0,68	.	.	.	0,79	0	1	6	7	14%
	Gata-3	1,55	0,54	0,74	1,40	0,79	.	0,25	0,54	.	.	.	0,74	0	1	6	7	14%
	IDO	0,63	1,03	0,62	0,61	0,71	.	0,70	0,76	.	.	.	0,70	0	0	7	7	0%
	IL-10	2,84	1,34	1,97	1,51	1,15	.	0,41	0,72	.	.	.	1,34	1	1	5	7	0%
	IL-12p35	2,02	1,17	1,10	1,34	0,68	.	0,21	1,01	.	.	.	1,10	1	1	5	7	0%
	IL-12p40	0,79	0,32	0,40	0,83	0,94	.	.	.	.	.	.	0,79	2	0	3	5	40%
	IL-17	0,71	0,55	0,86	indet	0,70	.	0,10	1,96	.	.	.	0,70	1	1	5	7	0%
	IL-4	1,03	1,24	1,79	1,48	0,59	.	0,36	0,97	.	.	.	1,03	0	1	6	7	14%
	Tbet	0,96	0,90	1,81	1,04	0,63	.	0,23	0,59	.	.	.	0,90	1	0	6	7	14%
	TGFb	1,36	0,81	1,04	1,37	0,65	.	0,27	1,22	.	.	.	1,04	0	1	6	7	14%
	TNFa	1,51	0,49	1,09	0,92	0,50	.	0,26	0,78	.	.	.	0,78	2	0	5	7	29%
													I2	11%	9%	80%		11%
	REG	1	2	1	0	0		4	0				8	Razão REGULA/INFLAMA 1,14				
	INFL	1	0	0	1	0		5	0				7					
	NDA	9	9	10	10	11		1	10				60					
	Total	11	11	11	11	11	0	10	10	0	0	0	75					
	Predom	0%	18%	9%	9%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	11%					
I4	Foxp3	1,94	1,71	2,01	1,35	.	.	0,12	0,41	.	.	.	1,53	1	2	3	6	33%
	Gata-3	1,58	3,64	2,18	2,42	.	.	0,10	0,34	.	.	.	1,88	3	2	1	6	50%
	IDO	1,40	1,13	1,52	1,65	.	.	0,54	0,58	.	.	.	1,27	0	0	6	6	0%
	IL-10	1,66	1,47	3,82	1,71	.	.	0,10	0,64	.	.	.	1,57	1	1	4	6	0%
	IL-12p35	1,70	2,97	3,63	2,29	.	.	0,06	0,84	.	.	.	1,99	1	3	2	6	50%
	IL-12p40	0,85	0,91	1,10	0,65	.	.	.	.	.	.	.	0,88	0	0	4	4	0%
	IL-17	1,03	0,93	4,30	indet	.	.	0,08	1,37	.	.	.	1,03	1	2	3	6	33%
	IL-4	1,09	5,46	3,33	2,59	.	.	0,25	0,59	.	.	.	1,84	3	1	2	6	50%
	Tbet	1,23	2,96	3,70	3,67	.	.	0,15	0,28	.	.	.	2,09	2	3	1	6	50%
	TGFb	1,58	2,08	2,42	2,06	.	.	0,13	1,03	.	.	.	1,82	3	1	2	6	50%
	TNFa	1,47	2,19	3,32	1,25	.	.	0,19	0,59	.	.	.	1,36	1	2	3	6	33%
													I4	25%	27%	48%		27%
	REG	0	3	5	3			4	1				16	Razão REGULA/INFLAMA 0,94				
	INFL	0	3	4	3			5	2				17					
	NDA	11	5	2	5			1	7				31					
	Total	11	11	11	11	0	0	10	10	0	0	0	64					
	Predom	0%	0%	45%	0%	0%	0%	50%	20%	0%	0%	0%	27%					
I5	Foxp3	1,80	0,91	1,10	0,82	0,51	0,26	0,33	1,19	.	.	.	0,86	0	2	6	8	25%
	Gata-3	1,28	1,87	1,26	1,15	0,48	0,36	0,29	0,99	.	.	.	1,07	0	3	5	8	38%
	IDO	1,05	1,24	1,39	1,25	0,64	0,87	0,67	1,28	.	.	.	1,14	0	0	8	8	0%
	IL-10	3,07	1,65	3,52	1,24	0,31	0,72	0,17	0,70	.	.	.	0,98	2	2	4	8	0%
	IL-12p35	1,96	2,16	1,57	1,42	0,56	0,51	0,09	0,70	.	.	.	1,06	1	1	6	8	0%
	IL-12p40	0,62	0,76	0,37	0,32	0,35	0,48	.	.	.	.	.	0,43	4	0	2	6	67%
	IL-17	0,16	0,06	0,61	indet	3,38	0,43	0,07	0,52	.	.	.	0,43	4	2	2	8	50%
	IL-4	0,70	3,61	3,94	1,57	1,44	0,47	0,61	0,78	.	.	.	1,11	2	1	5	8	25%
	Tbet	0,83	1,96	2,03	2,73	0,49	0,34	0,29	0,82	.	.	.	0,82	3	2	3	8	38%
	TGFb	1,72	1,76	1,46	1,43	0,89	0,57	0,25	1,41	.	.	.	1,42	0	1	7	8	13%
	TNFa	1,44	1,38	2,07	0,84	0,43	1,52	0,36	1,35	.	.	.	1,36	2	1	5	8	25%
													I5	21%	17%	62%		21%
	REG	2	2	3	1	3	3	4	0				18	Razão REGULA/INFLAMA 1,20				
	INFL	0	1	2	2	3	3	4	0				15					
	NDA	9	8	6	8	5	5	2	10				53					
	Total	11	11	11	11	11	11	10	10	0	0	0	86					
	Predom	18%	18%	27%	18%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	21%					

Figura 21 - Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região Intermediária. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=5 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeo por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
I6	Foxp3	1,65	1,03	1,57	1,33	.	.	.	0,88	1,37	0,07	.	1,33	0	1	6	7	14%
	Gata-3	1,70	1,75	1,61	2,39	.	.	.	0,80	1,19	0,05	.	1,61	1	1	5	7	0%
	IDO	0,94	0,93	1,49	1,50	.	.	.	0,72	1,28	0,39	.	0,94	0	1	6	7	14%
	IL-10	3,42	1,79	5,14	3,74	.	.	.	0,76	1,00	0,05	.	1,79	3	1	3	7	43%
	IL-12p35	1,28	1,89	2,47	4,10	.	.	.	0,94	1,08	.	.	1,59	0	2	4	6	33%
	IL-12p40	0,56	0,65	0,73	0,97	.	.	.	.	.	.	.	0,69	0	0	4	4	0%
	IL-17	0,16	0,04	3,72	indet	.	.	.	0,10	0,95	0,04	.	0,13	4	2	1	7	57%
	IL-4	0,91	2,12	3,03	1,72	.	.	.	0,98	1,15	0,65	.	1,15	2	0	5	7	29%
	Tbet	1,00	1,63	2,79	5,94	.	.	.	0,62	0,98	0,14	.	1,00	1	2	4	7	29%
	TGFb	1,54	1,89	2,35	2,06	.	.	.	1,15	1,08	0,35	.	1,54	2	1	4	7	29%
	TNFa	1,79	2,14	2,95	2,23	.	.	.	0,86	0,14	0,08	.	1,79	2	3	2	7	43%
													I6	21%	19%	60%		21%
	REG	2	2	3	3				1	1	3		15	Razão REGULA/INFLAMA 1,07				
	INFL	0	1	4	4				0	0	5		14					
	NDA	9	8	4	4				9	9	1		44					
	Total	11	11	11	11	0	0	0	10	10	9	0	73					
	Predom	18%	18%	36%	36%	0%	0%	0%	10%	10%	56%	0%	21%					
I8	Foxp3	1,35	1,35	0,93	1,14	.	.	.	0,88	.	.	.	1,14	0	0	5	5	0%
	Gata-3	1,15	1,76	0,63	2,39	.	.	.	0,78	.	.	.	1,15	1	0	4	5	20%
	IDO	0,97	1,29	1,03	2,25	.	.	.	0,51	.	.	.	1,03	1	0	4	5	20%
	IL-10	3,35	1,65	2,38	3,15	.	.	.	0,82	.	.	.	2,38	3	0	2	5	60%
	IL-12p35	1,27	3,47	1,45	2,59	.	.	.	0,76	.	.	.	1,45	0	2	3	5	40%
	IL-12p40	0,42	0,93	0,27	0,25	.	.	.	.	.	.	.	0,35	3	0	1	4	75%
	IL-17	2,58	1,19	0,37	indet	.	.	.	2,09	.	.	.	1,64	1	3	1	5	60%
	IL-4	0,78	2,93	1,05	1,67	.	.	.	0,68	.	.	.	1,05	1	0	4	5	20%
	Tbet	0,67	2,56	1,35	4,99	.	.	.	0,58	.	.	.	1,35	0	2	3	5	40%
	TGFb	1,69	2,09	1,11	1,71	.	.	.	0,87	.	.	.	1,69	1	0	4	5	20%
	TNFa	1,36	1,69	1,52	1,64	.	.	.	0,75	.	.	.	1,52	0	0	5	5	0%
													I8	20%	13%	67%		20%
	REG	2	2	3	4				0				11	Razão REGULA/INFLAMA 1,57				
	INFL	1	2	0	3				1				7					
	NDA	8	7	8	4				9				36					
	Total	11	11	11	11	0	0	0	10	0	0	0	54					
	Predom	18%	0%	27%	36%	0%	0%	0%	10%	0%	0%	0%	20%					
I9	Foxp3	1,41	0,65	0,74	1,67	.	.	.	0,99	.	.	.	0,99	0	0	5	5	0%
	Gata-3	1,89	0,68	0,66	2,85	.	.	.	0,96	.	.	.	0,96	1	0	4	5	20%
	IDO	0,79	1,00	0,52	1,79	.	.	.	0,91	.	.	.	0,91	0	0	5	5	0%
	IL-10	4,00	1,21	3,21	3,34	.	.	.	0,92	.	.	.	3,21	3	0	2	5	60%
	IL-12p35	1,07	1,86	0,96	4,03	.	.	.	0,93	.	.	.	1,07	0	1	4	5	20%
	IL-12p40	0,66	0,53	0,21	0,94	.	.	.	.	.	.	.	0,59	1	0	3	4	25%
	IL-17	2,14	0,23	0,45	indet	.	.	.	0,45	.	.	.	0,45	3	2	0	5	60%
	IL-4	0,99	2,30	1,98	2,00	.	.	.	0,93	.	.	.	1,98	2	0	3	5	40%
	Tbet	1,48	1,08	1,21	7,08	.	.	.	0,67	.	.	.	1,21	0	1	4	5	20%
	TGFb	2,12	0,95	1,28	2,86	.	.	.	1,30	.	.	.	1,30	2	0	3	5	40%
	TNFa	1,47	0,94	0,98	2,08	.	.	.	1,07	.	.	.	1,07	0	1	4	5	20%
													I9	22%	9%	69%		22%
	REG	2	2	3	4				1				12	Razão REGULA/INFLAMA 2,40				
	INFL	1	0	0	4				0				5					
	NDA	8	9	8	3				9				37					
	Total	11	11	11	11	0	0	0	10	0	0	0	54					
	Predom	18%	18%	27%	0%	0%	0%	0%	10%	0%	0%	0%	22%					

Figura 21 (continuação) - Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região Intermediária. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=5 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeo por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador). Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Ao analisarmos os peptídeos da região C-terminal (C3, C4, C8, C10 e p277) (Figura 22), observamos que houve um predomínio das alterações REGULA (em 24% das condições testadas), com 18% das condições testadas com modificações INFLAMA.

O peptídeo C4 (testado em 6 animais) foi o que mais se destacou da região, com 22% das condições testadas com modificações do tipo REGULA contra apenas 14% de INFLAMA, o que gera uma razão REGULA/INFLAMA de 1,63. Ele induziu a redução de duas QRs medianas, a da IL-12p40 (0,47) e IL-17 (0,39), o que são consideradas modificações REGULA.

Em seguida, está o peptídeo C8 (testado em 6 animais), com 30% das condições testadas com modificações do tipo REGULA e em apenas 20% das condições testadas com INFLAMA, o que gera uma razão REGULA/INFLAMA 1,46. É interessante que em 83% das condições testadas, houve indução de IL-10, gerando uma QR mediana de 2,90.

O próximo peptídeo que se destacou foi o peptídeo C10 (testado em 5 animais), com 24% das condições testadas com modificações do tipo REGULA e em apenas 17% das condições testadas, INFLAMA, o que gerou uma razão REGULA/INFLAMA de 1,44.

Em seguida veio o p277 (testado em 7 animais), com 25% das condições testadas com modificações tipo REGULA e 20%, tipo INFLAMA, gerando uma razão REGULA/INFLAMA de 1,27. As QRs medianas apresentaram alteração para a expressão gênica de IL-10 (2,02) e de IL-

12p40 (0,38), as quais são consideradas modificações REGULA.

Depois veio o peptídeo C3 (testado em 7 animais), com 32% das condições testadas com modificações tipo REGULA e em 30%, tipo INFLAMA (razão REGULA/INFLAMA 1,09). Houve alteração da QR mediana de IL-10 (2,61 – REGULA).

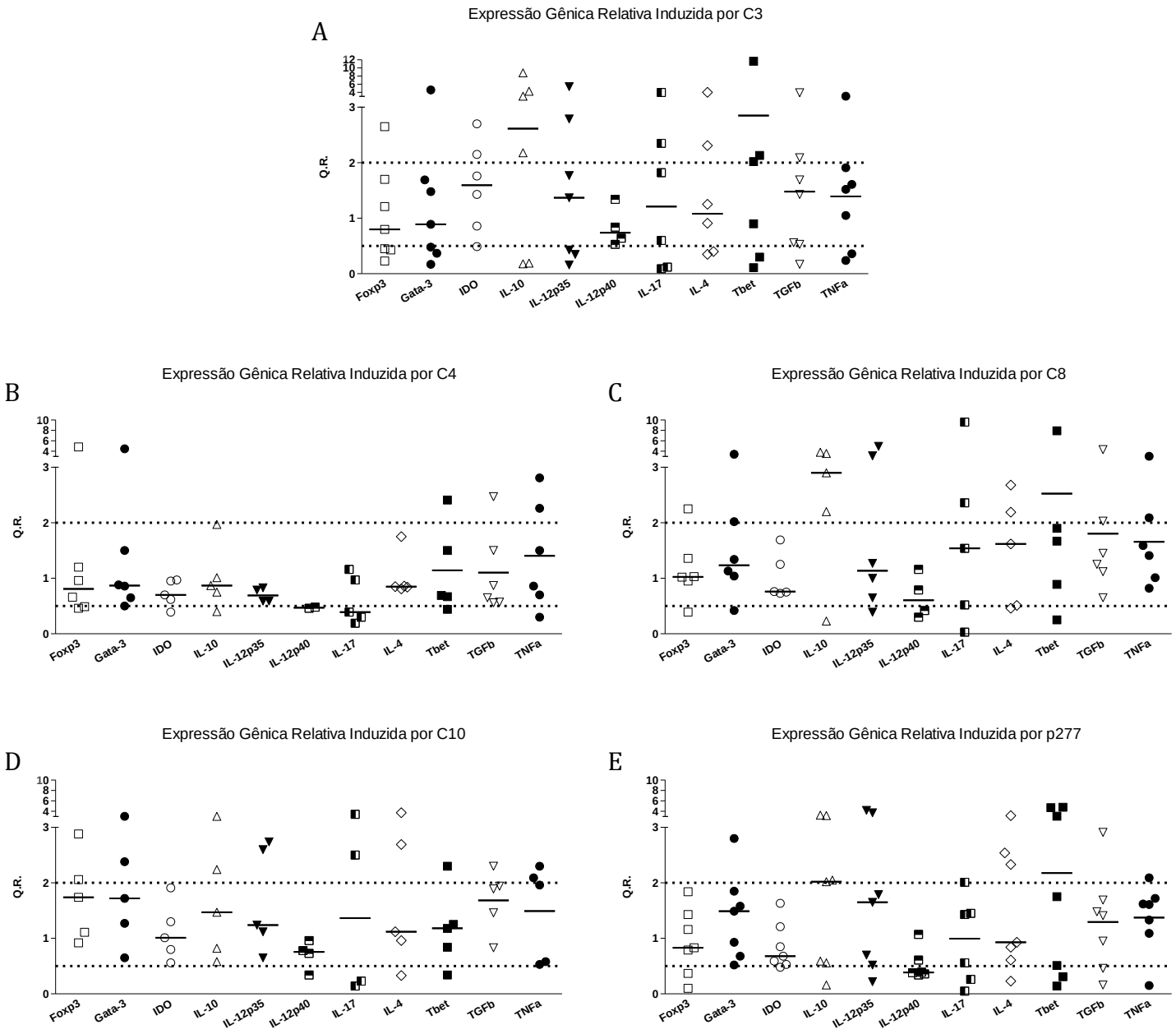


Figura 22 - Alterações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região C-terminal da HSP60. Esplenócitos murinos (n=6 a 9 animais) foram estimulados com 10µg/ml de peptídeos (C3, C4, C8, C10 e p277) durante 4 dias a fim de analisar as alterações na quantificação relativa dos diferentes genes estudados. Abaixo da linha tracejada inferior houve diminuição da expressão gênica (QR≤0,5) e acima da linha tracejada superior houve aumento da expressão gênica relativa (QR≥2,0). Não houve alteração da expressão gênica relativa entre as linhas tracejadas (QR: >0,5; <2).A) C3; B) C4; C) C8; D) C10 e E) p277.

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
C3	Foxp3	1,70	1,21	0,80	2,65	.	0,45	0,23	0,43	.	.	.	0,80	1	3	3	7	43%
	Gata-3	1,69	1,48	0,89	4,60	.	0,48	0,17	0,37	.	.	.	0,89	1	3	3	7	43%
	IDO	2,15	1,76	1,43	2,70	.	0,86	0,49	indet	.	.	.	1,60	3	1	3	7	43%
	IL-10	8,79	2,18	3,05	4,27	.	0,19	0,18	indet	.	.	.	2,61	5	2	0	7	71%
	IL-12p35	1,77	2,79	1,37	5,42	.	0,35	0,16	0,43	.	.	.	1,37	3	2	2	7	43%
	IL-12p40	0,64	0,84	0,53	1,34	.	.	.	.	.	.	.	0,74	0	0	4	4	0%
	IL-17	0,09	2,35	3,97	indet	.	1,82	0,12	0,60	.	.	.	1,21	2	3	2	7	43%
	IL-4	0,91	3,99	1,25	2,31	.	0,35	0,40	indet	.	.	.	1,08	3	2	2	7	43%
	Tbet	2,02	2,13	0,90	11,64	.	0,11	0,30	indet	.	.	.	1,46	2	4	1	7	57%
	TGFb	2,09	1,69	1,43	3,89	.	0,56	0,17	0,53	.	.	.	1,43	2	1	4	7	29%
	TNFa	1,61	1,52	1,91	3,06	.	1,05	0,24	0,36	.	.	.	1,52	2	1	4	7	29%
													C3	32%	30%	38%		32%
	REG	4	2	1	6		2	4	5				24	Razão REGULA/INFLAMA 1,09				
	INFL	1	3	1	4		4	6	3				22					
	NDA	6	6	9	1		4	0	2				28					
	Total	11	11	11	11	0	10	10	10	0	0	0	74					
	Predom	36%	27%	0%	55%	0%	40%	60%	50%	0%	0%	0%	32%					
C4	Foxp3	.	.	.	.	0,66	0,46	.	0,96	1,20	0,49	4,82	0,81	1	2	3	6	33%
	Gata-3	.	.	.	.	0,65	0,50	.	0,86	0,88	1,50	4,46	0,87	1	0	5	6	17%
	IDO	.	.	.	.	0,39	0,70	.	indet	0,97	0,62	0,95	0,70	1	1	4	6	0%
	IL-10	.	.	.	.	0,75	1,01	.	indet	0,87	0,40	1,97	0,87	1	1	4	6	0%
	IL-12p35	.	.	.	.	0,59	0,59	.	0,83	0,79	.	.	0,69	0	0	4	4	0%
	IL-12p40	.	.	.	.	0,48	0,46	.	.	.	.	.	0,47	2	0	0	2	100%
	IL-17	.	.	.	.	0,19	0,39	.	1,16	0,30	0,97	.	0,39	3	0	2	5	60%
	IL-4	.	.	.	.	0,81	0,86	.	indet	0,85	0,84	1,75	0,85	1	0	5	6	17%
	Tbet	.	.	.	.	0,67	0,44	.	indet	0,69	1,50	2,41	0,69	1	2	3	6	33%
	TGFb	.	.	.	.	0,56	0,57	.	0,87	0,65	1,50	2,47	0,76	1	0	5	6	17%
	TNFa	.	.	.	.	0,30	2,26	.	0,70	0,86	1,50	2,81	1,18	1	2	3	6	33%
													C4	22%	14%	64%		22%
	REG					3	3		3	1	0	3	13	Razão REGULA/INFLAMA 1,63				
	INFL					1	2		1	0	2	2	8					
	NDA					7	6		6	9	7	3	38					
	Total	0	0	0	0	11	11	0	10	10	9	8	59					
	Predom	0%	0%	0%	0%	27%	27%	0%	30%	10%	22%	38%	22%					
C8	Foxp3	1,03	0,95	1,36	2,25	.	0,39	.	1,02	.	.	.	1,03	1	1	4	6	0%
	Gata-3	1,34	2,02	1,13	3,42	.	0,42	.	1,04	.	.	.	1,23	2	1	3	6	33%
	IDO	0,73	0,75	0,76	1,69	.	1,25	.	indet	.	.	.	0,76	1	0	5	6	17%
	IL-10	3,58	2,20	2,90	3,81	.	0,23	.	indet	.	.	.	2,90	5	1	0	6	83%
	IL-12p35	0,65	3,14	1,27	4,96	.	0,39	.	1,00	.	.	.	1,13	1	2	3	6	33%
	IL-12p40	0,30	0,79	0,42	1,16	.	.	.	.	.	.	.	0,61	2	0	2	4	50%
	IL-17	1,54	2,36	9,57	indet	.	0,03	.	0,52	.	.	.	1,54	1	3	2	6	50%
	IL-4	0,46	2,68	1,62	2,19	.	0,51	.	indet	.	.	.	1,62	3	1	2	6	50%
	Tbet	0,89	1,67	1,90	7,92	.	0,25	.	indet	.	.	.	1,67	1	2	3	6	33%
	TGFb	1,25	2,03	1,45	4,32	.	0,65	.	1,12	.	.	.	1,35	2	0	4	6	33%
	TNFa	1,01	2,09	1,41	3,03	.	1,59	.	0,82	.	.	.	1,50	0	2	4	6	33%
													C8	30%	20%	50%		30%
	REG	2	4	2	5		3		3				19	Razão REGULA/INFLAMA 1,46				
	INFL	1	3	1	4		3		1				13					
	NDA	8	4	8	2		4		6				32					
	Total	11	11	11	11	0	10	0	10	0	0	0	64					
	Predom	18%	36%	18%	45%	0%	0%	0%	30%	0%	0%	0%	30%					

Figura 23 - Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região C-terminal. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeo por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador. Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

Estímulo	Gene	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5	An 6	An 7	An 8	An 9	An 10	An 11	Mediana	REG	INFL	NDA	Total	Predom
C10	Foxp3	2,88	2,06	1,74	1,11	.	.	.	0,92	.	.	.	1,74	2	0	3	5	40%
	Gata-3	2,38	3,04	1,72	1,27	.	.	.	0,65	.	.	.	1,72	2	0	3	5	40%
	IDO	0,56	1,91	1,30	1,01	.	.	.	0,80	.	.	.	1,01	0	0	5	5	0%
	IL-10	3,04	1,47	2,24	0,82	.	.	.	0,58	.	.	.	1,47	2	0	3	5	40%
	IL-12p35	1,24	2,60	2,74	1,12	.	.	.	0,65	.	.	.	1,24	0	2	3	5	40%
	IL-12p40	0,96	0,34	0,78	0,73	.	.	.	.	.	.	.	0,76	1	0	3	4	25%
	IL-17	0,14	3,42	2,50	indet	.	.	.	0,23	.	.	.	1,37	2	3	0	5	60%
	IL-4	1,12	3,72	2,69	0,96	.	.	.	0,33	.	.	.	1,12	2	1	2	5	40%
	Tbet	1,18	2,30	1,25	0,84	.	.	.	0,34	.	.	.	1,18	1	1	3	5	0%
	TGFb	1,94	2,30	1,89	1,46	.	.	.	0,83	.	.	.	1,89	1	0	4	5	20%
	TNFa	1,96	2,09	2,30	0,53	.	.	.	0,58	.	.	.	1,96	0	2	3	5	40%
													C10	24%	17%	59%		24%
	REG	4	5	2	0				2				13	Razão REGULA/INFLAMA 1,44				
	INFL	0	4	3	1				1				9					
	NDA	7	2	6	10				7				32					
	Total	11	11	11	11	0	0	0	10	0	0	0	54					
	Predom	36%	45%	27%	9%	0%	0%	0%	20%	0%	0%	0%	24%					
p277	Foxp3	1,43	1,16	0,83	1,84	0,79	0,37	.	0,10	.	.	.	0,83	0	2	5	7	29%
	Gata-3	1,49	1,58	0,93	2,80	0,68	0,52	.	1,85	.	.	.	1,49	1	0	6	7	14%
	IDO	0,53	1,63	0,85	1,21	0,59	0,48	.	0,68	.	.	.	0,68	0	1	6	7	14%
	IL-10	3,26	2,05	2,02	3,20	0,56	0,59	.	0,16	.	.	.	2,02	4	1	2	7	57%
	IL-12p35	1,79	4,19	1,65	3,72	0,70	0,52	.	0,22	.	.	.	1,65	1	2	4	7	29%
	IL-12p40	0,39	1,07	0,34	0,61	0,38	0,36	.	.	.	.	.	0,38	4	0	2	6	67%
	IL-17	0,56	1,43	2,01	indet	1,45	0,26	.	0,05	.	.	.	1,00	2	2	3	7	0%
	IL-4	0,84	3,16	2,33	2,54	0,93	0,61	.	0,23	.	.	.	0,93	3	1	3	7	43%
	Tbet	1,75	4,77	3,06	4,69	0,51	0,31	.	0,14	.	.	.	1,75	2	3	2	7	43%
	TGFb	1,48	1,69	1,41	2,91	0,95	0,46	.	0,16	.	.	.	1,41	1	2	4	7	29%
	TNFa	1,62	1,61	1,72	2,09	1,09	1,33	.	0,15	.	.	.	1,61	1	1	5	7	0%
													p277	25%	20%	55%		25%
	REG	2	2	3	4	1	3		4				19	Razão REGULA/INFLAMA 1,27				
	INFL	0	2	2	4	0	3		4				15					
	NDA	9	7	6	3	10	5		2				42					
	Total	11	11	11	11	11	11	0	10	0	0	0	76					
	Predom	18%	0%	27%	0%	9%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	25%					

Figura 23 (continuação) - Resumo das modificações na expressão gênica induzidas pelos peptídeos da região C-terminal. Análise da expressão gênica de esplenócitos de camundongos B57Bl/6 fêmeas (n=6 a 9 animais) estimulados com 10µg/ml de peptídeo por 4 dias. Genes predominantemente imunorreguladores (Foxp3, Gata-3, IDO, IL-4, IL-10, TGFβ) e predominantemente inflamatórios (T-bet, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e TNFα). Aumentos no QR foram marcados em negrito e vermelho (QR≥2,0) e reduções foram marcadas em negrito e azul (QR≤0,5). Modificações tipo REGULA em verde (↑expressão gene imunorregulador ou ↓expressão gene inflamatório) ou tipo INFLAMA em laranja (↑expressão gene inflamatório ou ↓expressão gene imunorregulador. Razão REGULA/INFLAMA= quantidade de modificações REGULA dividida pela quantidade de modificações INFLAMA (em verde houve o predomínio REGULA com razão >1; e em laranja, predomínio INFLAMA com razão<1; em branco, sem predomínio com razão=1).

4.3 Efeitos dos peptídeos da HSP60 na expressão gênica – Seleção dos peptídeos potencialmente imunorreguladores

Ao analisarmos todas as razões REGULA/INFLAMA obtidas pelos diferentes peptídeos temos como resumo:

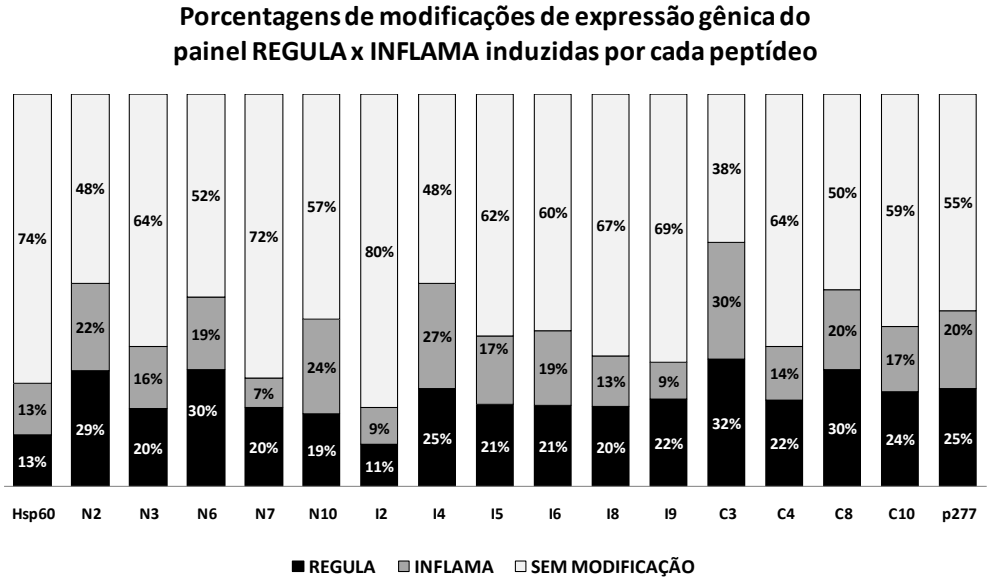


Figura 24 - Porcentagens de modificações de expressão gênica do painel REGULA x INFLAMA e de experimentos sem modificação induzidas por cada peptídeo. O gráfico mostra a porcentagem de modificações REGULA (preto), INFLAMA (cinza escuro) e experimentos em que não houve modificação (NDA – cinza claro) para cada peptídeo, considerando-se todos os experimentos analisados. Os experimentos foram realizados com diferentes peptídeos da HSP60 cultivados por 4 dias com esplenócitos murinos de C57BL/6 fêmas (culturas induviduais). Foram analisados 16 peptídeos e a proteína: HSP60 (n=7), N2 (n=8), N3 (n=7), N6 (n=8), N7 (n=9), N10 (n=5),I2 (n=6), I4 (n=6), I5 (n=8), I6 (n=7), I8 (n=5), I9 (n=5), C3 (n=7), C4 (n=6), C8 (n=6), C10 (n=5), p277 (n=7).

Ao analisarmos as razões REGULA/INFLAMA dos peptídeos estudados, verificamos que a maioria dos peptídeos estudados tiveram razão acima de 1, o que sugere que sejam em sua maioria predominantemente reguladores. Os peptídeos N7, I9, C4, N6, I8, C8, C10, N2, p277, N3, I5, I2, C3 e I6 tiveram razão REGULA/INFLAMA maior que 1, sendo essa a ordem dos mais reguladores. Na região N-terminal, ao

considerarmos as maiores razões REGULA/INFLAMA, os peptídeos mais reguladores foram N7 (2,71) e N6 (1,60), sendo seguidos por N2 (1,32) e N3 (1,25). Na região C-terminal, ao considerarmos as maiores razões REGULA/INFLAMA, os peptídeos mais reguladores foram C4 (1,63), seguido por C8 (1,46) e C10 (1,44). Os peptídeos mais reguladores da região Intermediária, ao considerarmos as maiores razões REGULA/INFLAMA, foram: I9 (2,40), seguido por I8 (1,57) e I5 (1,20). Então, sob essa análise, ao considerarmos mais promissores os peptídeos com razão superior a 1,5; os peptídeos selecionados da região N-terminal são N7, N6, da região C-terminal é C4 e da região Intermediária são I9 e I8.

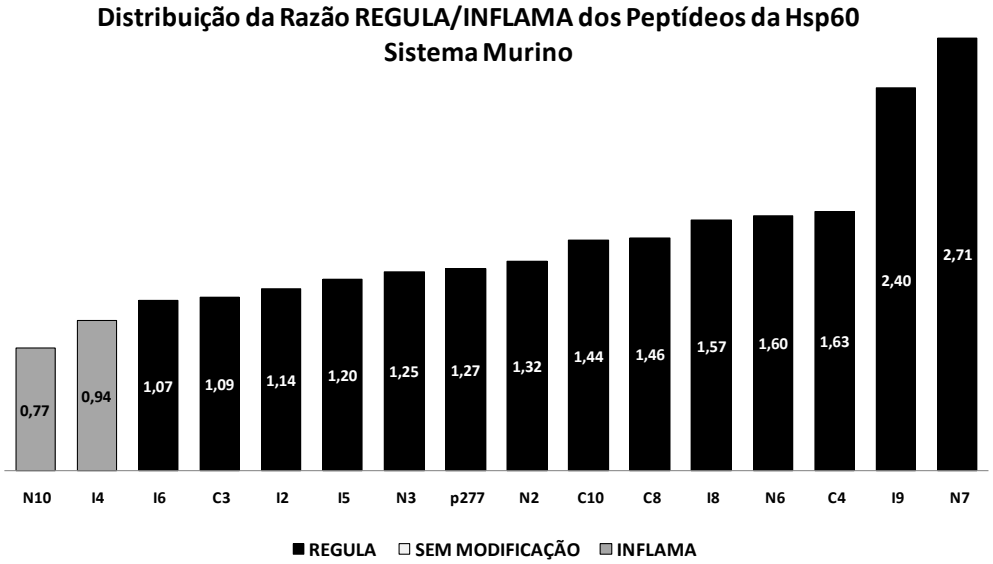


Figura 25 – Distribuição das razões REGULA/INFLAMA dos peptídeos da HSP60 no sistema murino. A figura mostra a distribuição das razões REGULA/INFLAMA em relação às modificações da expressão gênica, do mais INFLAMA (cinza escuro) para o mais REGULA (preto), e os peptídeos neutros com razão igual a um (cinza claro). Os experimentos foram realizados com diferentes peptídeos da HSP60 cultivados por 4 dias com esplenócitos murinos de C57BL/6 fêmas (culturas induviduais). Foram analisados 16 peptídeos e a proteína: HSP60 (n=7), N2 (n=8), N3 (n=7), N6 (n=8), N7 (n=9), N10 (n=5),I2 (n=6), I4 (n=6), I5 (n=8), I6 (n=7), I8 (n=5), I9 (n=5), C3 (n=7), C4 (n=6), C8 (n=6), C10 (n=5), p277 (n=7).

Considerando que nosso objetivo, a médio prazo, é testar peptídeos potencialmente imunorreguladores na clínica, compararmos os nossos

resultados àqueles obtidos no nosso grupo como células humanas (Projeto Fapesp 06/58720-5, Martello et al, 2010, manuscrito submetido), visando selecionar os melhores candidatos, também para o sisitema humano. Então, optamos por selecionar pelo menos 1 peptídeo de cada região para prosseguir nossos estudos.

Da região N-terminal, os peptídeos N6, N7, e também N2 e N3 foram bastante promissores como potencialmente imunorreguladores, sendo os mais bem cotados no sistema murino, e também no sistema humano. Assim eles foram selecionados para prosseguirem no estudo. Na região Intermediária, como os peptídeos I9 e I8 foram bem cotados no sistema murino como potencialmente imunorreguladores, no entanto somente o peptídeo I8 teve razão REGULA/INFLAMA acima de 1 no sistema humano. Assim, foi selecionado o peptídeo I8 para continuar nas próximas estapas do estudo. Na região C-terminal, o melhor cotado no sistema murino como potencialmente imunorregulador foi o peptídeo C4, o qual foi o único que teve razão REGULA/INFLAMA acima de 1 no sistema humano. Desta forma, os peptídeos escolhidos considerando-se os sistemas murino e humano foram: N2, N3, N6, N7, C4 e I8, com predomínio de alterações REGULA em ambos os sistemas (Figura 26).

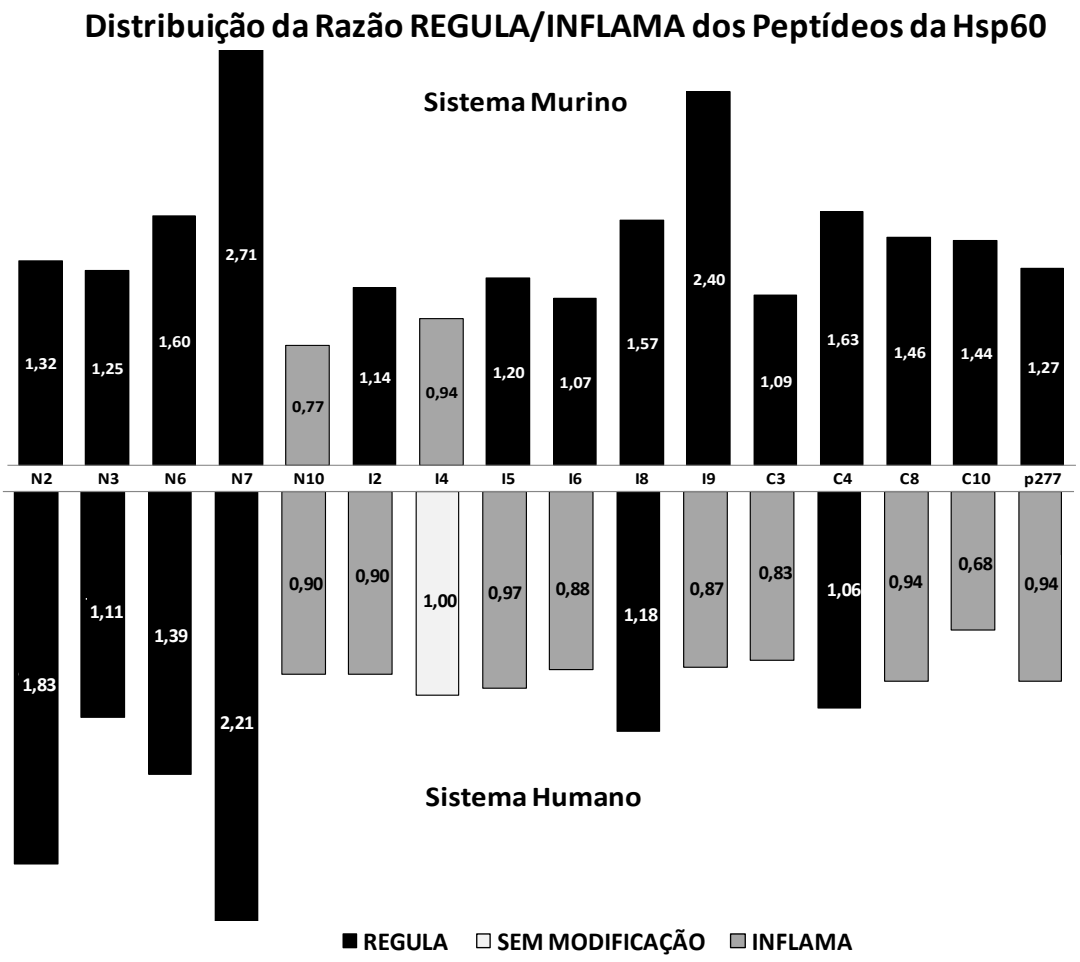


Figura 26 – Distribuição das razões REGULA/INFLAMA dos peptídeos da HSP60 no sistema murino e no humano. A figura mostra a distribuição das razões REGULA/INFLAMA em relação às modificações da expressão gênica, do mais INFLAMA (cinza escuro) para o mais REGULA (preto), e os peptídeos neutros com razão igual a um (cinza claro). Os experimentos foram realizados com diferentes peptídeos da HSP60 cultivados por 4 dias com esplenócitos murinos de C57BL/6 fêmas (culturas induviduais). Dados do sistema humano adaptados de Martello, 2010.

Ao estudarmos as alterações induzidas por cada um dos peptídeos escolhidos nos animais estudados, verificamos que o peptídeo N7 induziu modificações REGULA em uma maior quantidade de animais (em 7, dos 9 estudados – 73%). Entre as modificações induzidas por N7, destacaram-se a redução da expressão gênica relativa de IL-17 (em 63% das condições estudadas – em 5 de 8 animais) e a redução de IL-12p40 (em 50% das condições estudadas e em 3 de 6 animais).

Os peptídeos N6, N3 e N2 também se destacaram, apesar de terem induzido uma menor quantidade de modificações REGULA do que o peptídeo N7.

O peptídeo N2 induziu predominantemente modificações do tipo REGULA em 50% dos animais (em 4 de 8 animais). Destas modificações, as que mais se destacaram foram o aumento da expressão relativa de IL-10 e IL-4 (em 63% dos animais estudados- em 5 de 8) e a diminuição da expressão relativa de IL-17 (em 63% dos animais estudados – em 5 de 8). Também se destacou o aumento da expressão relativa de T-bet (em 50% dos animais estudados- em 4 dos 8 animais).

O peptídeo N3 induziu modificações predominantemente REGULA em 43% dos animais estudados (em 3 de 7). Destas modificações, nenhum gene teve sua expressão alterada em mais de 50% dos animais.

Já o peptídeo N6 induziu modificações da expressão gênica com predomínio REGULA em 62% dos animais estudados (em 5 de 8). Ele induziu a redução de IL-12p40 em todos os animais estudados (em 5 animais), e em 50% dos animais estudados (em 4 de 8), ele induziu aumento de IL-10 e redução de T-bet.

Ao analisarmos a frequência dos animais com predomínio de alteração de expressão gênica do tipo REGULA induzido pelos peptídeos I8 e C4, verificamos que o peptídeo C4 induziu predomínio de modificações REGULA em uma maior quantidade de animais (83% - em 5 dos 6 animais estudados) e o peptídeo I8 em 40% dos animais (em 2 dos

5 animais estudados). A expressão gênica alterada pelo peptídeo C4 foi da IL-12p40 (em todos os animais), seguida pela IL-17 (em 65% dos animais estudados), ocorrendo em ambos os casos sua redução. Por outro lado, o peptídeo I8 induziu aumento de IL-17 em 65% dos animais estudados.

Com base nesses resultados, escolhemos os peptídeos N7, N6, N3, N2, I8 e C4 para prosseguir nossos estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*.

4.4 Secreção de citocinas no sobrenadante- Resultados obtidos com os peptídeos N2, N3, N6, N7, I8 e C4

Foi possível detectar produção acima do limite de deteção para as citocinas IFNγ, TNFα, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-17. As citocinas IL-4, IL-5 e IL-12p70 ficaram abaixo do limite mínimo de 1,25pg/ml detectado pela técnica, sendo consideradas indetectáveis. Não houve muita diferença na secreção induzida de IL-6, IL-10 e TNFα pelos diferentes peptídeos estudados. Tampouco houve grande variabilidade entre os animais estudados (n=3). Por outro lado, a secreção de IFNγ, IL-2 e IL-17 foi mais afetada pelos peptídeos estudados (N2, N3, N6, N7, I8 e C4) e teve maior variabilidade entre os animais estudados (Figura 27). Desta forma, optamos por realizar a análise da secreção relativa de citocinas descontando-se os níveis detectados nos controles de produção basal nos ensaios sem peptídeos (Figura 28).

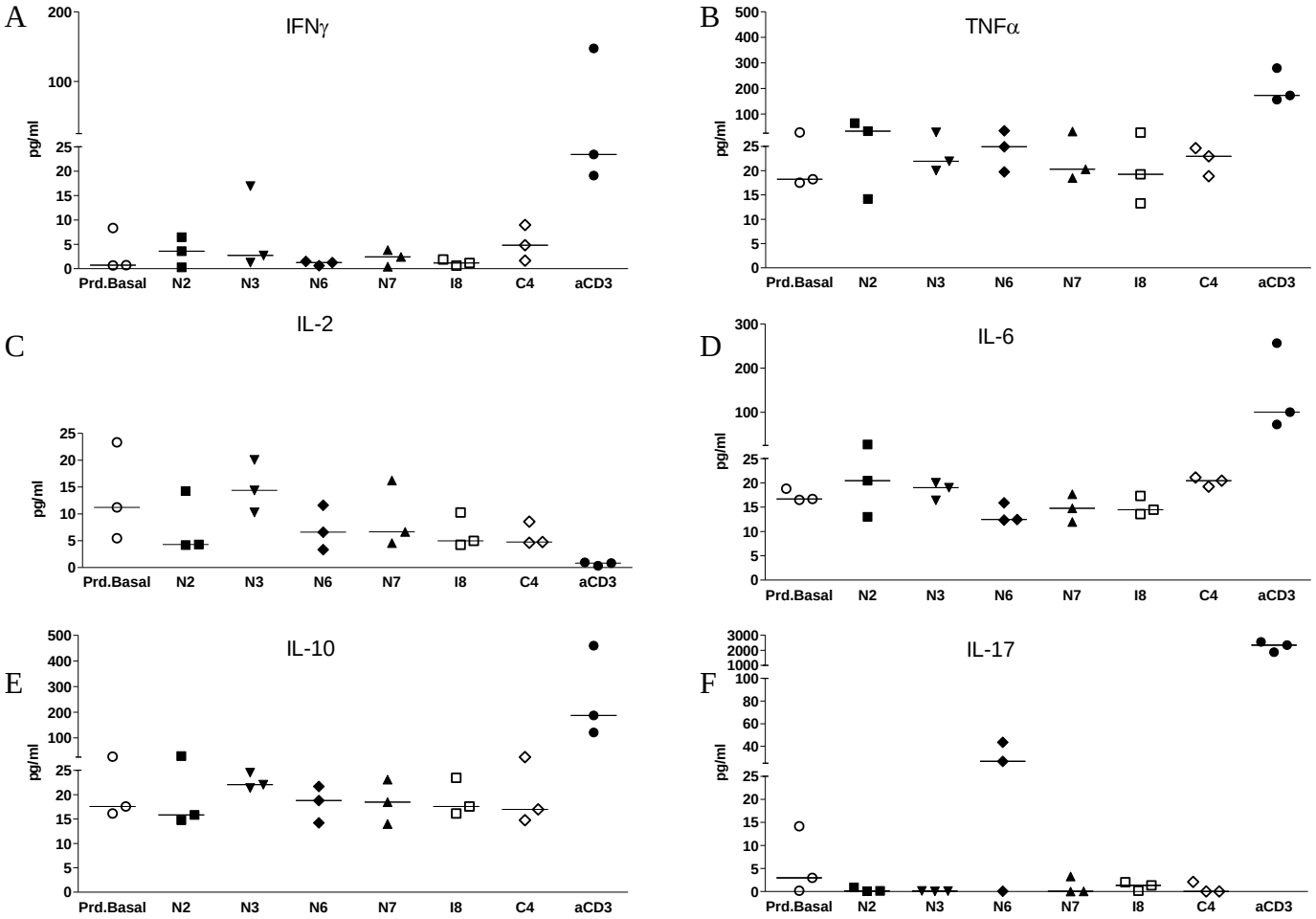


Figura 27 - Produção de citocinas espontânea (produção basal) e induzida pelos diferentes peptídeos da HSP60 (N2, N3, N6, N7, I8 e C4). As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes no 4º dia de cultura de esplenócitos murinos com os diferentes peptídeos pela técnica de CBA-FACS (n=3). As citocinas dosadas foram: IFNγ, TNFα, IL-2, IL-4 (não mostrada – níveis indetectáveis), IL-5 (não mostrada – níveis indetectáveis), IL-6, IL-10, IL-17, e IL-12p70 (não mostrada – níveis indetectáveis). Controle positivo αCD3. Limite de detecção da técnica foi de 1,25pg/ml.

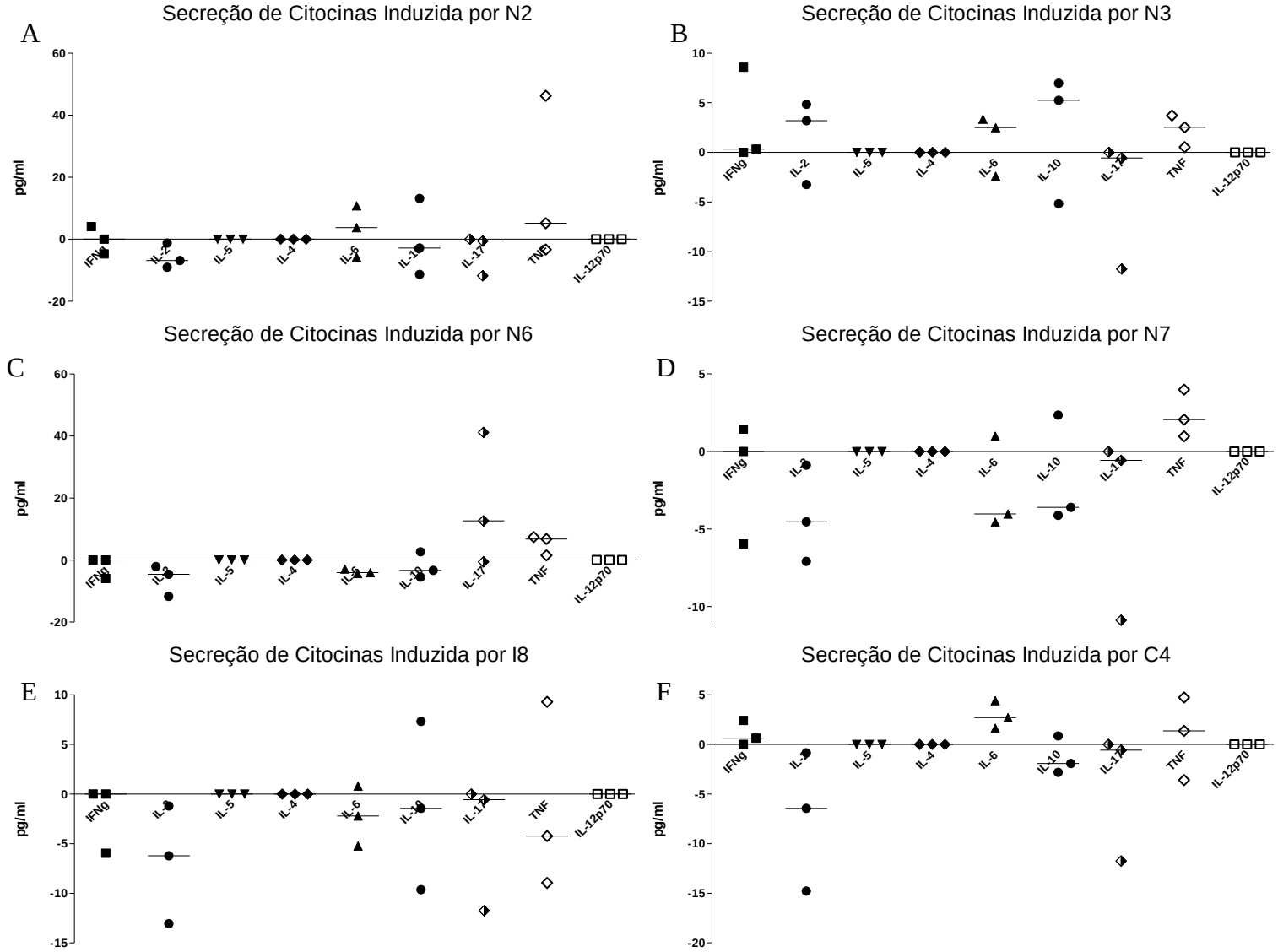


Figura 28 – Efeito dos peptídeos da HSP60 (N2, N3, N6, N7, I8 e C4) sobre a produção de citocinas. As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes no 4º dia de cultura de esplenócitos com os diferentes peptídeos pela técnica de CBA-FACS (n=3). As citocinas dosadas foram IFNγ, TNFα, IL-2, IL-4 (não mostrada – níveis indetectáveis), IL-5 (não mostrada – níveis indetectáveis), IL-6, IL-10, IL-17, e IL-12p70 (não mostrada – níveis indetectáveis). Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (produção basal) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. A inibição não foi considerada quando a produção basal foi menor do que o limite de detecção da técnica (1,25pg/ml). Os valores de produção basal entre 0 e 1,25 foram arredondados para 1,24. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina pelos peptídeos, ou seja, a produção da citocina foi menor na presença do estímulo do que no controle negativo sem estímulo.

A fim de facilitar nossas análises, de maneira semelhante à classificação das alterações de expressão gênica em REGULA e INFLAMA de acordo com os genes estudados, optamos por classificar as alterações

na secreção relativa de citocinas em REGULA e INFLAMA (Figura 29). Nós estabelecemos um limite de + ou – 5pg/ml como considerável aumento ou diminuição da produção de citocinas, a fim de classificar como INFLAMA (aumento da secreção citocina predominantemente imunorreguladora ou diminuição da secreção de citocina predominantemente inflamatória) ou tipo INFLAMA (aumento da secreção de citocina predominantemente inflamatória ou diminuição da secreção de citocina predominantemente imunorreguladora). Consideramos citocinas predominantemente imunorreguladoras IL-4, e IL-10 e predominantemente inflamatórias IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, TNFα e IFNγ.

Dos peptídeos testados para produção protéica das citocinas, o que mais se destacou pela quantidade de modificações REGULA foi o peptídeo I8, que induziu 7 modificações REGULA (26% das condições testadas) contra apenas 2 INFLAMA (7% das condições testadas) (razão REGULA/INFLAMA=3,50). O peptídeo I8 também induziu medianas de secreção predominantemente REGULA (IL-2=-6,22). O peptídeo N2 induziu 5 modificações REGULA (19% das condições testadas) e apenas 4 INFLAMA (15% das condições testadas) (razão REGULA/INFLAMA=1,25). Os peptídeos C4 e N7 induziram 3 modificações REGULA (11% das condições testadas) e nenhuma INFLAMA, enquanto que o peptídeo N3 também induziu 3 modificações REGULA e outras 2 modificações INFLAMA. O único peptídeo com predomínio de modificações INFLAMA

foi o N6, com 6 modificações (19% das condições testadas) contra apenas 1 REGULA (7% das condições testadas).

Se considerarmos o resumo daquelas modificações que ocorreram em mais de 50% dos animais testados, temos:

Tabela 1- Resumo dos principais resultados de citocinas: N2, N3, N6, N7, I8 e C4.

Pept.	Citocinas com produção alterada*	Razão REGULA/INFLAMA (citocinas)
N2	↑IL-2, ↑TNFα	1,25
N3	↑IL-10	1,50
N6	↑IL-17 ↑TNFα	0,40
N7	Nenhum destaque	Somente Regula
I8	↓IL-2	3,5
C4	↓IL-2	Somente Regula

*Citocinas cuja produção foi mais alterada (secreção pelo menos 5pg/ml a mais ou a menos do que a produção basal sem os peptídeos da HSP60, em 50% ou mais dos animais estudados).

Estímulo	Proteína	An 1	An 2	An 3	Mediana	REG	INFL	NDA	Predom	REG/INFL
N2	IFNg	-4,76	0	4,07	0	0	0	3	0%	
	IL-2	-9,07	-6,89	-1,26	-6,89	2	0	1	67%	
	IL-5	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-4	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-6	3,76	-5,79	10,78	3,76	1	1	1	0%	
	IL-10	-2,82	-11,37	13,11	-2,82	1	1	1	0%	
	IL-17	-0,57	-11,75	0	-0,57	1	0	2	33%	
	TNF	5,15	-3,34	46,23	5,15	0	2	1	67%	
	IL-12p70	0	0	0	0	0	0	3	0%	
					Total N2	19%	15%	67%	19%	1,25
N3	IFNg	8,58	0	0,33	0,33	0	1	2	33%	
	IL-2	-3,25	3,19	4,84	3,19	0	0	3	0%	
	IL-5	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-4	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-6	3,34	-2,39	2,5	2,5	0	0	3	0%	
	IL-10	6,96	-5,17	5,24	5,24	2	1	0	67%	
	IL-17	-0,57	-11,75	0	-0,57	1	0	2	33%	
	TNF	0,52	2,52	3,71	2,52	0	0	3	0%	
	IL-12p70	0	0	0	0	0	0	3	0%	
					Total N3	11%	7%	81%	11%	1,50
N6	IFNg	-5,96	0	0	0	1	0	2	33%	
	IL-2	-11,71	-4,61	-2,1	-4,61	1	0	2	33%	
	IL-5	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-4	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-6	-4,34	-2,9	-4,04	-4,04	0	0	3	0%	
	IL-10	-3,34	-5,51	2,66	-3,34	0	1	2	33%	
	IL-17	-0,57	12,63	41,15	12,63	0	2	1	67%	
	TNF	6,76	7,42	1,53	6,76	0	2	1	67%	
	IL-12p70	0	0	0	0	0	0	3	0%	
					Total N6	7%	19%	74%	19%	0,40
N7	IFNg	-5,96	0	1,44	0	1	0	2	33%	
	IL-2	-7,09	-4,54	-0,88	-4,54	1	0	2	33%	
	IL-5	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-4	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-6	0,99	-4,03	-4,56	-4,03	0	0	3	0%	
	IL-10	-3,6	-4,12	2,35	-3,6	0	0	3	0%	
	IL-17	-0,57	-10,88	0	-0,57	1	0	2	33%	
	TNF	3,99	0,98	2,06	2,06	0	0	3	0%	
	IL-12p70	0	0	0	0	0	0	3	0%	Somente
					Total N7	11%	0%	89%	11%	REGULA
I8	IFNg	-5,96	0	0	0	1	0	2	33%	
	IL-2	-13,07	-6,22	-1,21	-6,22	2	0	1	67%	
	IL-5	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-4	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-6	-2,21	-5,23	0,8	-2,21	1	0	2	33%	
	IL-10	-1,45	-9,64	7,32	-1,45	1	1	1	0%	
	IL-17	-0,57	-11,75	0	-0,57	1	0	2	33%	
	TNF	-8,96	-4,24	9,29	-4,24	1	1	1	0%	
	IL-12p70	0	0	0	0	0	0	3	0%	
					Total I8	26%	7%	67%	26%	3,50
C4	IFNg	0,63	0	2,41	0,63	0	0	3	0%	
	IL-2	-14,78	-6,45	-0,85	-6,45	2	0	1	67%	
	IL-5	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-4	0	0	0	0	0	0	3	0%	
	IL-6	4,41	1,63	2,7	2,7	0	0	3	0%	
	IL-10	-2,82	-1,93	0,86	-1,93	0	0	3	0%	
	IL-17	-0,57	-11,75	0	-0,57	1	0	2	33%	
	TNF	-3,59	1,36	4,72	1,36	0	0	3	0%	
	IL-12p70	0	0	0	0	0	0	3	0%	Somente
					Total C4	11%	0%	89%	11%	REGULA

Figura 29 - Resumo do efeito dos peptídeos da HSP60 (N2, N3, N6, N7, I8 e C4) sobre a secreção relativa de citocinas. A citocinas foram dosadas nos sobrenadantes no 4º dia de cultura dos esplenócitos murinos (n=3) com os diferentes peptídeos (10µg/ml) pela técnica de CBA-FACS. Os valores do gráfico estão descontados do valor da condição basal, sem estímulo, (produção basal) do respectivo experimento. Isso foi realizado para se obter a produção da citocina induzida pelo peptídeo. O limite de detecção da técnica foi de 1,25pg/ml. Os valores de produção basal entre 0 e 1,25 foram arredondados para 1,24. Os valores negativos significam inibição da produção da citocina. Valores acima dos controles foram marcados em negrito e vermelho (>5) e reduções foram marcadas em negrito e azul (<-5). Modificações tipo REGULA em verde (↑secreção citocina imunorreguladora ou ↓secreção de citocina inflamatória) ou tipo INFLAMA em laranja (↑secreção de citocina inflamatória ou ↓ secreção de citocina imunorreguladora). Citocinas predominantemente imunorreguladoras IL-4, e IL-10 e predominantemente inflamatórias IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, TNFα e IFNγ.

4.5 Protocolos para a indução de tolerância ao alotransplante de pele

Ao analisarmos nossos resultados *in vitro*, levando em consideração não só os resultados prévios de nosso grupo, mas também os resultados prévios do mesmo estudo realizado *in vitro* com PBMC de indivíduos saudáveis (Martello, 2010), optamos por iniciar os ensaios de indução de tolerância ao aloenxerto de pele utilizando o peptídeo N7. Testamos 3 protocolos diferentes com o peptídeo N7 (Protocolos I a III):

Protocolo I (intranasal N7):

No primeiro ensaio, utilizamos 7 camundongos C57BL/6 fêmeas transplantadas com aloenxerto de pele de F1 C57BL/6 x Balb/c em cada grupo experimental (tratados com PBS ou N7). Os experimentos foram conduzidos pelas mesmas pessoas, em dias diferentes e utilizando-se subgrupos com animais pareados (PBS com N7), a fim de diminuir a variabilidade experimental. Após 5 instilações intranasais, em dias alternados, foi realizado o transplante de pele, e o curativo foi retirado no 6º dia pós transplante.

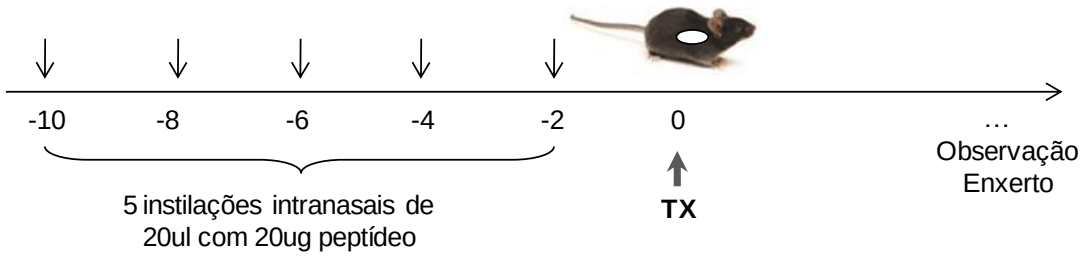


Figura 30 – Protocolo de indução de tolerância ao alotransplante de pele com o peptídeo N7 da HSP60. Esquema experimental para indução de tolerância ao aloenxero de pele murino. TX=momento de ralização do transplante de pele.

A partir da retirada do curativo, os aloenxertos foram analisados e medidos diariamente avaliando-se as alterações macroscópicas e medindo-se a retração do enxerto. Os animais foram eutanasiados no momento de detecção de 65% ou mais de retração do enxerto, sendo considerado o momento de rejeição. Neste momento, o animal foi eutanasiado e suas células esplênicas e sangue foram coletados e congelados para estudos funcionais.

Tabela 2- Porcentagem de perda do enxerto: dias pós-transplante.

Grupo	Animal	8ºdia	9ºdia	10ºdia	11ºdia	12ºdia	13ºdia	14ºdia	Sobr.TX mediana
	1	50%	50%	50%	69%	-	-	-	
	2	56%	79%	-	-	-	-	-	
	3	50%	75%	-	-	-	-	-	
PBS	4	27%	17%	50%	56%	74%	-	-	
	5	19%	62%	62%	73%	-	-	-	
	6	17%	52%	71%	-	-	-	-	
	7	40%	58%	90%	-	-	-	-	10 dias
	1	64%	56%	56%	79%	-	-	-	
	2	30%	69%	-	-	-	-	-	
	3	74%	-	-	-	-	-	-	
N7	4	29%	71%	-	-	-	-	-	
	5	44%	63%	83%	-	-	-	-	
	6	17%	29%	50%	57%	71%	-	-	
	7	17%	40%	46%	52%	52%	52%	71%	10 dias

Porcentagem de perda do enxerto de pele, medida a partir de um dia após retirada do curativo (7º dia), e nos dias seguintes até chegar a 65% ou mais de perda da área do enxerto (rejeição), momento no qual o animal foi eutanasiado (n=7 animais por grupo). Sobrevida mediana do transplante de 10 dias em ambos os grupos.

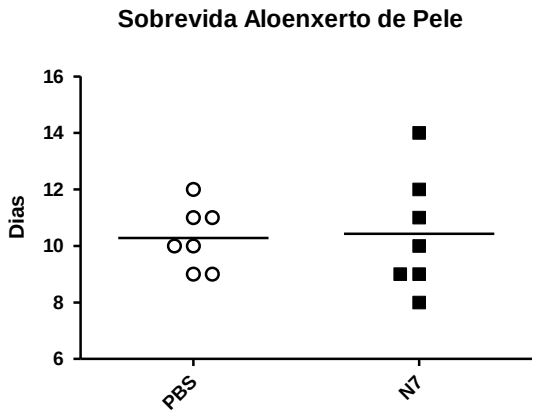


Figura 31 - Sobrevida do aloenxerto de pele após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7. Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por 65% ou mais de perda da área do enxerto (n=7 animais por grupo). Grupo controle, só PBS. Sobrevida mediana do transplante de 10 dias em ambos os grupos.

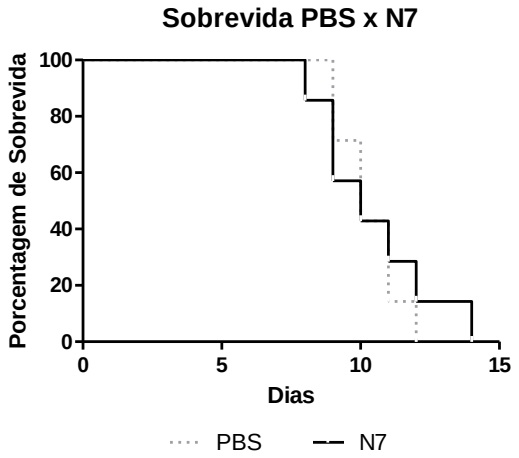


Figura 32- Curva de sobrevida do aloenxerto de pele murino após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7. Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por 65% ou mais de perda da área do enxerto (n=7 animais por grupo). Sobrevida mediana do transplante de 10 dias em ambos os grupos- (p=0,89) – Teste estatístico de Wilcoxon.

Ao analisarmos as alterações macroscópicas do enxerto, verificamos que os dois grupos foram muito similares. No processo de rejeição, observou-se, diminuição de crescimento do pêlo, ressecamento do enxerto, espessamento da pele com formação de crosta e contração do enxerto e formação de cicatriz por baixo do enxerto.

Os enxertos tiveram sobrevida de no mínimo 8 dias (1 animal instilado com N7) a no máximo 14 dias (2 animais instilados com N7). A sobrevida mediana do aloenxerto em ambos os grupos foi de 10 dias. Não foi observada diferença estatística quanto ao dia de perda do enxerto entre os grupos experimentais tratados com PBS ou N7 intranasal (p=0,89 – Teste de Wilcoxon).

Protocolo II (subcutâneo IFI+ N7 ou p277):

Em seguida, testamos um protocolo utilizando animais com disparidades de antígenos secundários: camundongas DBA/2 (H-2d, CD51, CD8a1) doando o aloenxerto de pele para camundongas Balb/c (H-2d, CD52, CD8a2). Neste protocolo, utilizamos também o adjuvante incompleto de freund (IFI). Testamos o peptídeo p277 da região C-terminal (já utilizado no contexto de diabetes como imunorregulador, e em trabalhos de nosso e outros grupos como imunorregulador no transplante) e o peptídeo N7 junto com IFI. Os animais foram imunizados uma vez com 100ug peptídeo + IFI pela via subcutânea, e após 14 dias foi realizado o transplante de pele.

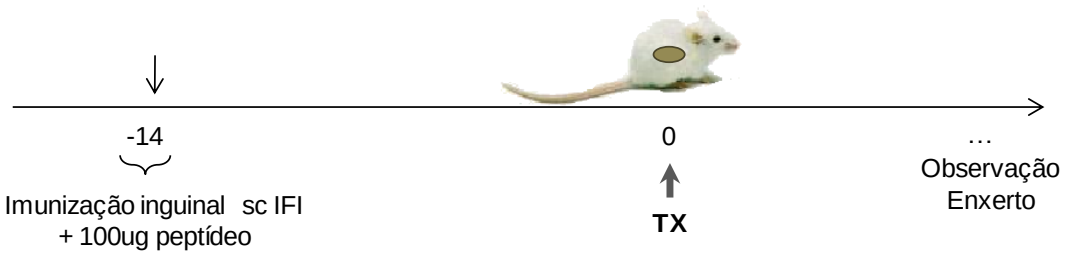


Figura 33 – Protocolo de indução de tolerância ao alotransplante de pele com peptídeos da HSP60. Esquema experimental para indução de tolerância ao aloenxero de pele murino. Peptídeos testados: N7 e p277, controle PBS (n=4 animais por grupo). TX=momento de ralização do transplante de pele; IFI=adjuvante incompleto de Freund; sc=subcutâneo.

Da mesma forma que o experimento anterior, o curativo foi retirado no 6º dia após o transplante, e os aloenxertos foram analisados e medidos diariamente. Macroscopicamente, de maneira similar ao experimento anterior, verificamos que os dois grupos foram muito similares. No processo de rejeição, observou-se, diminuição de crescimento do pêlo, ressecamento do enxerto, espessamento da pele com formação de crosta e contração do enxerto e formação de cicatriz por baixo do enxerto.

Tabela 3- Porcentagem de perda do enxerto: dias pós-transplante.

Grupo	Animal	8ºdia	9ºdia	10ºdia	11ºdia	12ºdia	13ºdia	14ºdia	15ºdia	Sobr.TX mediana
IFI+ PBS	1	21%	21%	57%	57%	73%	-	-	-	
	2	11%	11%	54%	54%	70%	-	-	-	
	3	31%	31%	40%	40%	77%	-	-	-	
	4	22%	22%	22%	22%	44%	22%	35%	70%	12 dias
IFI + p277	1	0%	0%	30%	30%	73%	-	-	-	
	2	17%	17%	44%	44%	75%	-	-	-	
	3	33%	33%	17%	17%	42%	25%	33%	72%	12 dias
IFI+ N7	1	33%	33%	33%	33%	56%	43%	52%	81%	
	2	17%	17%	29%	29%	40%	40%	52%	71%	
	3	0%	0%	0%	0%	20%	0%	50%	68%	
	4	11%	11%	11%	11%	72%	-	-	-	15 dias

Porcentagem de perda do enxerto de pele, medida a partir de um dia após retirada do curativo (7º dia), e nos dias seguintes até chegar a 65% ou mais de perda da área do enxerto (rejeição), momento no qual o animal foi eutanasiado (n=4 animais em cada grupo). Sobrevida mediana foi de 12 dias (PBS e p277) e de 15 dias (N7).

Os enxertos tiveram sobrevida de no mínimo 12 dias (3 animais imunizados com PBS, 2 animais com p277 e apenas 1 animal com N7), e no máximo 15 dias (3 animais imunizados com N7, e apenas 1 com p277 e PBS). Apesar do grupo tratado com o peptídeo N7 ter tido um maior número de animais com maior sobrevida do enxerto em relação aos outros grupos, não houve diferença estatística. No entanto, é interessante observar que as diferenças (p=0,18) entre o grupo imunizado com N7 (15 dias de mediana) e o PBS (12 dias de sobrevida mediana) foram maiores do que entre o grupo imunizado com p277 e PBS (p=0,82, 12 dias de sobrevida mediana em ambos os grupos)(Tabela 3).

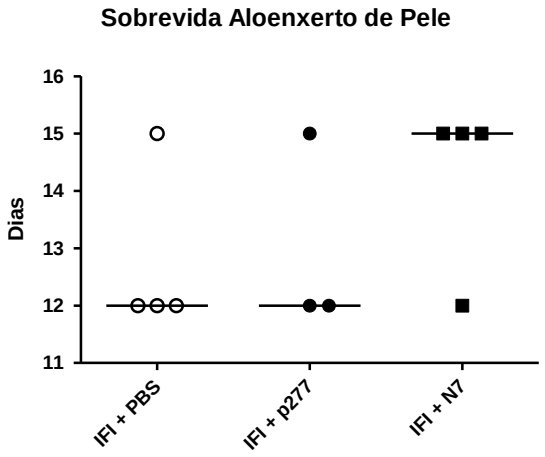


Figura 34 - Sobrevida do aloenxerto de pele murino após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7 ou p277 com IFI. Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por mais de 65% ou mais perda da área do enxerto (n=4 animais por grupo). Sobrevida mediana do transplante foi de 12 dias (PBS e p277) e de 15 dias (N7).

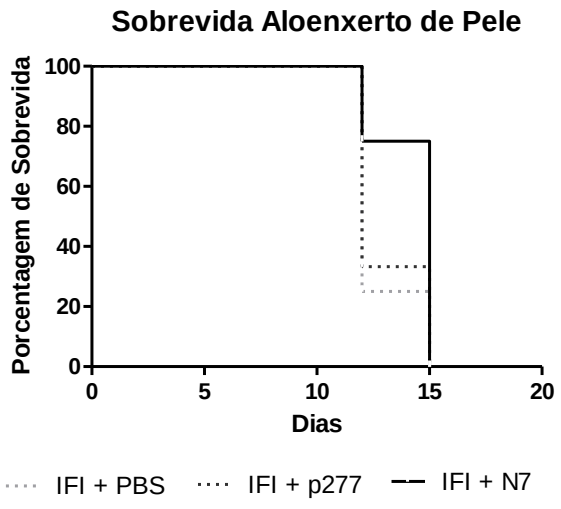


Figura 35- Curva de sobrevida do aloenxerto de pele murino após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7 ou p277 com IFI. Os Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por mais de 65% ou mais perda da área do enxerto (n=4 animais por grupo). Sobrevida mediana foi de 12 dias (PBS e p277) e de 15 dias (N7). Entre PBS e p277 p=0,82; entre PBS e N7 p=0,18 – Teste estatístico de Wilcoxon.

Protocolo III (intravenoso αCD3 + intranasal N7):

No experimento seguinte, continuamos utilizando animais com disparidades antigênicas secundárias (DBA doando para Balb/c). Utilizamos também, concomitantemente, o anticorpo monoclonal anti-CD3 (αCD3), uma terapia imunossupressora comumente utilizada na clínica para transplantados que depleta linfócitos T e pode induzir também a geração de células T reguladoras. Dessa forma, os grupos que foram tratados previamente com o αCD3 receberam 10ug/100ul do anticorpo diluído, pela via intravenosa durante 5 dias seguidos antes do transplante. Foram dadas 5 doses do peptídeo N7 (50ug/20ul, dias -5, -3, 0, 3, 6), pela via intranasal.

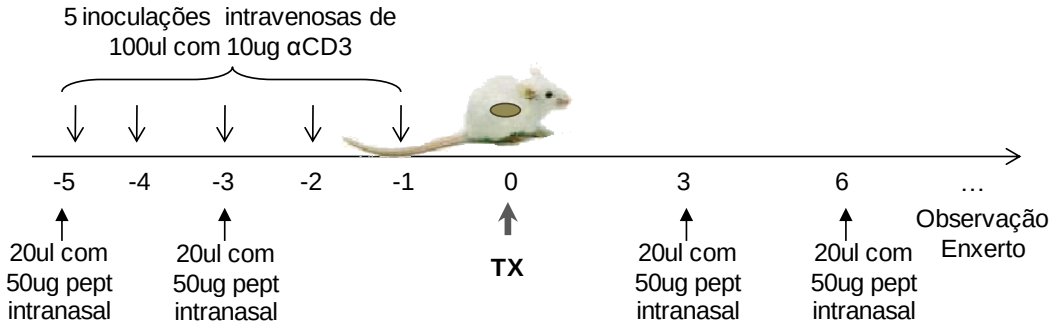


Figura 36 – Protocolo de indução de tolerância ao alotransplante de pele com peptídeos da HSP60
Esquema experimental para indução de tolerância ao aloenxero de pele murino. Peptídeos testados: N7, controle PBS (n=5 animais por grupo). TX=momento de ralização do transplante de pele.

Tabela 4- Porcentagem de perda do enxerto: dias pós-transplante.

Dias TX	Animal	14ºdia	16ºdia	17ºdia	18ºdia	19ºdia	21ºdia	23ºdia	25ºdia	26ºdia	30ºdia	Sobr.TX mediana
αCD3 + N7	1	17%	33%	33%	33%	33%	36%	36%	52%	52%	70%	
	2	26%	42%	42%	42%	42%	56%	56%	50%	50%	72%	
	3	0%	24%	24%	24%	24%	24%	24%	24%	24%	75%	
	4	29%	43%	43%	57%	57%	76%	-	-	-	-	
	5	17%	33%	33%	50%	50%	58%	57%	70%	-	-	30 dias
αCD3	1	20%	38%	38%	38%	38%	61%	72%	-	-	-	
	2	17%	44%	44%	44%	44%	50%	69%	-	-	-	
	3	9%	36%	36%	36%	36%	45%	60%	60%	72%	-	
	4	30%	38%	38%	38%	38%	48%	69%	-	-	-	
	5	0%	33%	33%	33%	33%	25%	25%	20%	20%	73%	23 dias
N7	1	70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	43%	43%	43%	43%	58%	58%	81%	-	-	-	
	3	74%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	51%	51%	51%	51%	69%	-	-	-	-	-	
	5	51%	51%	60%	70%	-	-	-	-	-	-	18 dias
PBS	1	44%	44%	54%	54%	70%	-	-	-	-	-	
	2	50%	50%	71%	-	-	-	-	-	-	-	
	3	48%	48%	69%	-	-	-	-	-	-	-	
	4	52%	70%	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	62%	70%	-	-	-	-	-	-	-	-	17 dias

Porcentagem de perda do enxerto de pele, medida a partir de um dia após retirada do curativo (7º dia), e nos dias seguintes até chegar a 65% ou mais de perda da área do enxerto (rejeição), momento no qual o animal foi eutanasiado (n=5 animais por grupo). Sobrevida mediana foi N7=18 dias, PBS=17 dias, αCD3=23 dias, αCD3+N7=30 dias.

No processo de rejeição, nos grupos inoculados apenas com PBS ou N7, observaram-se características semelhantes aos experimentos anteriores, com ressecamento do enxerto, espessamento da pele com

formação de crosta, diminuição de crescimento do pêlo, contração do enxerto e formação de cicatriz por baixo do enxerto. Já nos grupos que foram previamente tratados com αCD3, na primeira semana houve formação de uma casca semelhante aos demais grupos (mais fina), que caiu, deixando exposto o aloenxerto com suas bordas bem cicatrizadas. A partir da terceira semana após o transplante, os enxertos começaram a apresentar retração, com espessamento da pele e ressecamento.

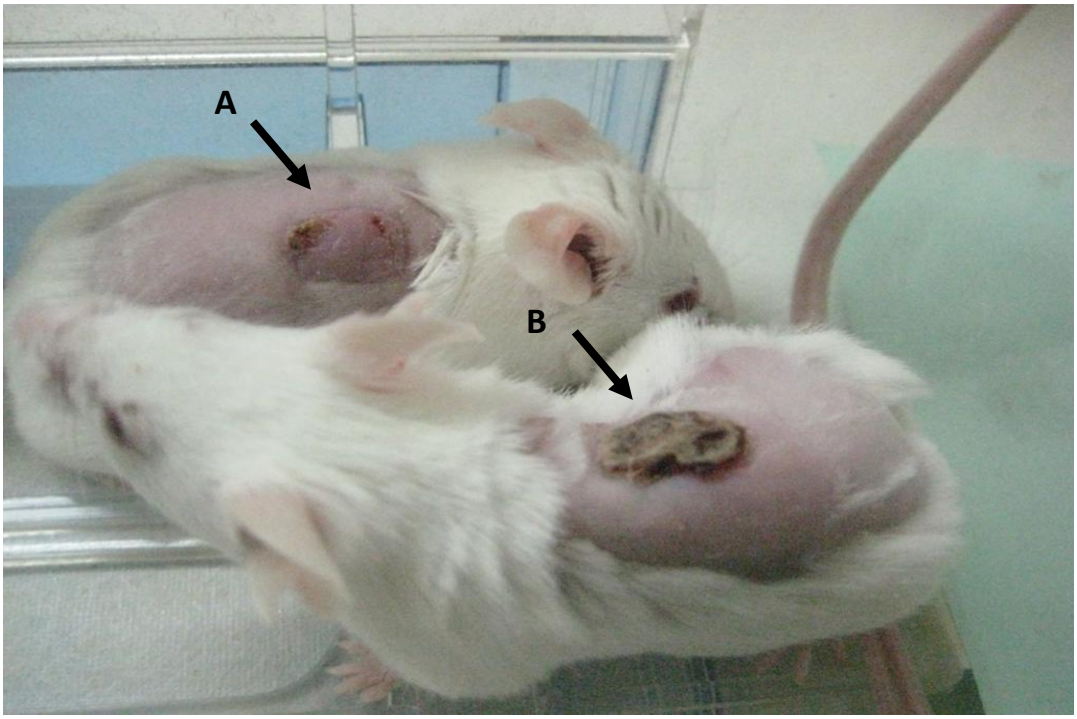


Figura 37 – Foto de camundongos submetidos ao alotranplante de pele, 14 dias após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7+αCD3. Após 2 semanas (14 dias) é possível verificar uma grande diferença entre os aloenxertos de pele dos animais tratados com αCD3+N7 (animal A) ou apenas N7 (animal B). No primeiro grupo, houve formação de uma casca de consistência mais fina sobre o enxerto que foi se descolando ao longo dos dias, deixando à mostra um tecido saudável, cujas bordas estão bem cicatrizadas. Já no segundo grupo, há formação de casca de consistência grossa, ressecada, e percebe-se a retração do enxerto com contração do enxerto com formação de cicatriz por baixo.

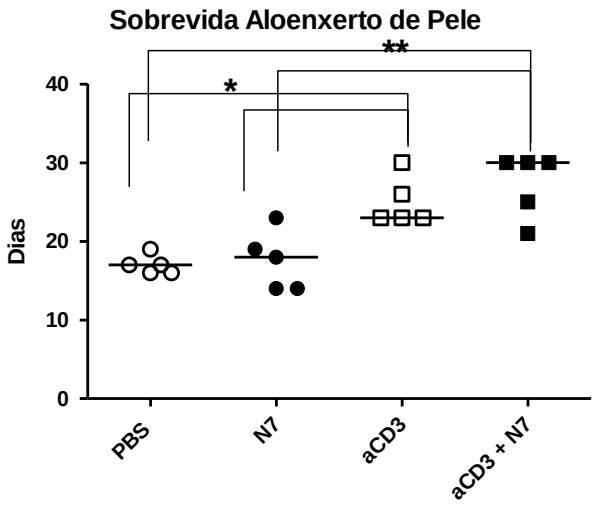


Figura 38 - Sobrevida do aloenxerto de pele murino após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7+αCD3. Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por 65% ou mais de perda da área do enxerto (n=5 animais pr grupo). Sobrevida mediana foi N7=18 dias, PBS=17 dias, αCD3=23 dias, αCD3+N7=30 dias. Altamente significativo (**p<0,005) αCD3+N7 com PBS ou N7; e significativo (*p<0,05) αCD3 com N7 ou PBS.Teste de Bonferroni.

Ao analisarmos os dias de sobrevida do aloenxerto de pele, verificamos que houve diferença estatística entre os grupos tratados com αCD3 e os não tratados: entre o grupo αCD3+N7 e os grupos tratados apenas com N7 ou PBS (p<0,005, Teste de Bonferroni); e entre o grupo tratado apenas com αCD3 e os grupos tratados apenas com N7 ou PBS (p<0,05, Teste de Bonferroni).

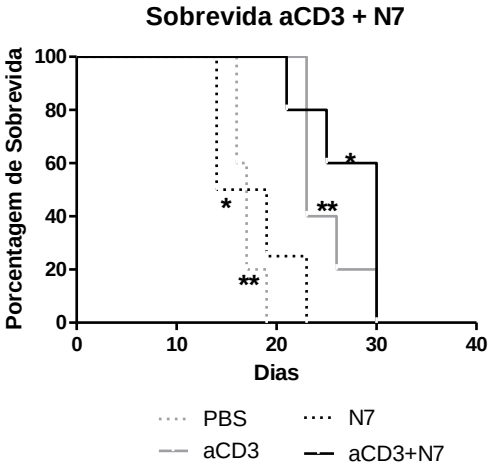


Figura 39- Curva de sobrevida do aloenxerto de pele murino após protocolo para indução de tolerância com o peptídeo N7+αCD3. Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por mais de 65% ou mais de perda da área do enxerto (n=5 animais por grupo). Sobrevida mediana do transplante foi N7=18 dias, PBS=17 dias, αCD3=23 dias, αCD3+N7=30 dias. Altamente significativo (**p<0,005) PBS e αCD3/αCD3+N7; e significativo (*p<0,05) N7 com αCD3/αCD3+N7. Comparando-se αCD3+N7 com αCD3 p=0,38; e N7 com PBS p=0,89. Teste de Wilcoxon.

Não houve diferença entre as medianas de sobrevida do enxerto dos grupos tratados apenas com PBS (17 dias) ou com N7 (18 dias) (p=0,89 – Teste de Wilcoxon). Houve uma diferença de 7 dias entre a mediana do grupo tratado com αCD3 (23 dias) e o tratado com αCD3+N7 (30 dias), no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos (p=0,38 – Teste de Wilcoxon). Verificamos diferenças estatisticamente significantes na sobrevida do aloenxerto de pele entre os grupos tratados com αCD3 e os não tratados: entre o grupo αCD3+N7 e os grupo tratado apenas com PBS; e αCD3 e o grupo N7 (p<0,05, Teste de Wilcoxon); e entre o grupo tratado apenas com αCD3 e os grupos tratados apenas com PBS, e entre os grupo αCD3+N7 e PBS (p<0,005, Teste de Wilcoxon) (Tabela 5).

Tabela 5- Diferenças estatísticas entre os grupos (PBS ou N7 com ou sem αCD3).

Bonferroni			Wilcoxon			
Grupos		p	Grupos			p
αCD3+N7	αCD3	ns	αCD3+N7	αCD3	ns	0,382
αCD3+N7	N7	p<0,005	αCD3+N7	N7	*	0,014
αCD3+N7	PBS	p<0,005	αCD3+N7	PBS	**	0,003
αCD3	N7	p<0,05	αCD3	N7	*	0,019
αCD3	PBS	p<0,05	αCD3	PBS	**	0,003
N7	PBS	ns	N7	PBS	ns	0,899

Resultados estatísticos da distribuição dos dias de perda do enxerto e da curva de sobrevida do enxerto (n=5 animais por grupo). Ns= não significante.

4.6 Caracterização da rejeição - Análise histopatológica

Os fragmentos dos enxertos de pele foram retirados quando alcançaram 65% ou mais de retração do enxerto, e foram avaliados quanto ao grau do processo de rejeição (não rejeição, rejeição aguda, rejeição aguda em cronificação e rejeição crônica).

Na Tabela 6, observamos que ao retirarmos os enxertos com 65% ou mais de diminuição da área original, todos os enxertos se encontram em processo de rejeição, independente do tratamento dado ao animal. As rejeições verificadas são em sua maioria, rejeições agudas, uma vez que os animais tratados somente com PBS ou diferentes concentrações e doses de N7 intranasal tiveram menor sobrevida do transplante, o qual foi rejeitado de forma aguda. Os animais tratados com αCD3 sozinho ou em

combinação com N7 tiveram maior sobrevida do transplante, o qual foi rejeitado mais tardiamente, e foram classificados em sua maioria entre rejeição aguda (em cronificação) ou rejeição crônica. Somente um animal tratado com αCD3+ N7 teve seu enxerto classificado como estando em um processo de rejeição aguda.

Algumas amostras não puderam ser analisadas, pois o transplante foi perdido (descolamento e queda do enxerto), ou por processamento inadequado.

Tabela 6- Análise histopatológica dos enxertos dos diferentes protocolos.

Protocolo	Grupo	Sobrev. Mediana	Sobrev. Máx	Sobrev. Mín	Rej. Aguda	Rej. Aguda (cron)	Rej. Crônica
I	PBS (n=7)	10 dias	12 dias (n=1)	9 dias (n=1)	80% (n=4/5)	-	20% (n=1/5)
	N7 (n=7)	10 dias	14 dias (n=1)	8 dias (n=1)	100% (n=5/5)	-	-
III	αCD3+ N7 (n=5)	30 dias	30 dias (n=3)	21 dias (n=1)	20% (n=1/5)	65% (n=3/5)	20% (n=1/5)
	αCD3 (n=5)	23 dias	30 dias (n=1)	23 dias (n=3)	-	67% (n=2/3)	33% (n=1/3)
	N7 (n=5)	18 dias	23 dias (n=1)	14 dias (n=2)	50% (n=1/2)	-	50% (n=1/2)
	PBS (n=5)	17 dias	19 dias (n=1)	16 dias (n=2)	50% (n=1/2)	-	50% (n=1/2)

N: número de animais estudados.

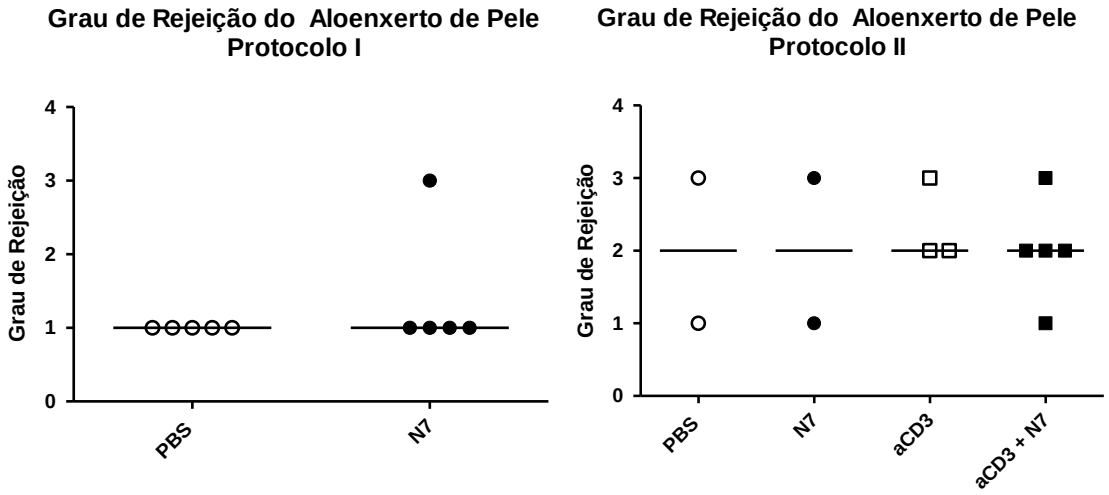


Figura 40- Distribuição dos diferentes graus de rejeição do aloenxerto de pele murino em cada grupo experimental analisado. Os animais foram eutanasiados no momento de rejeição macroscópica do enxerto, caracterizada por 65% ou mais de perda da área do enxerto. Sobrevida mediana do transplante foi, no protocolo I PBS=10 dias, N7=10 dias; e no protocolo II foi N7=18 dias, PBS=17 dias, αCD3=23 dias, αCD3+N7=30 dias. Os transplantes foram classificados histopatologicamente de acordo com o grau do processo de rejeição em que se encontravam como: grau 0 (sem rejeição), grau 1 (rejeição aguda), grau 2 (rejeição aguda em cronificação), grau 3 (rejeição crônica). Medianas de grau 1 para ambos os grupos (N7 e PBS) utilizando o protocolo I, e grau 2 para todos os grupos (PBS, N7, αCD3 e αCD3+N7) utilizando o protocolo II. Não houve diferença entre os grupos (p=0,89 com o protocolo II – Teste estatístico de 1-way Anova).

Com o intuito de facilitar a visualisação da distribuição dos diferentes graus de rejeição dos enxertos, nós classificamos como grau 0 a 3 (grau 0 - sem rejeição; grau 1 – rejeição aguda; grau 2- rejeição aguda em cronificação e; grau 3 – rejeição crônica), mas não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos.

4.7 Resumo dos principais resultados dos peptídeos selecionados

Tabela 7- Resumo dos principais resultados com os peptídeos N2, N3, N6, N7, I8, C4.

Pept.	Razão REG/INF	Genes com expressão mais alterada*	Citocinas mais alteradas**	Sobrevida mediana do aloenxerto
N2	1,32	↑IL-10 ↑IL-4 ↓IL-17, ↑T-bet	↑IL-2, ↑TNFα	nr
N3	1,25	Nenhum destaque	↑IL-10	nr
N6	1,60	↓IL-12p40 ↑IL-10 ↓T-bet	↑IL-17 ↑TNFα	nr
N7	2,71	↓IL-17 ↓ IL-12p40	Nenhum destaque	↑ 3 dias p=0,18 (+IFI sc) ↑ 7 dias p=0,38 (+αCD3 iv, N7 vo)
I8	1,57	↑IL-17	↓IL-2	nr
C4	1,63	↓IL-12p40 ↓IL-17	↓IL-2	nr

Razão REGULA/INFLAMA de cada peptídeo escolhido, *genes com expressão mais alterada (alterada em 50% ou mais dos animais estudados), **indução de citocinas mais alteradas (secreção pelo menos 5pg/ml a mais/menos que os controles em 50% ou mais dos animais estudados), aumento da sobrevida do aloenxerto de pele (TX) em relação aos controles. Não houve destaque em relação aos ensaios de proliferação e de inibição da proliferação induzida por conA ou αCD3. nr =não realizado.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, nosso objetivo foi identificar peptídeos da HSP60 potencialmente imunorreguladores, a partir da análise de um painel de genes da resposta imune. Conforme descrito nos resultados, todos os peptídeos estudados foram capazes de modificar a expressão de diversos genes relacionados à resposta imune, e também a secreção de citocinas, o que confirma nossa hipótese de que estes peptídeos se ligam a moléculas presentes nas células do sistema imune.

É importante notar que, apesar de utilizarmos camundongos isogênicos, tivemos diferenças significativas entre os experimentos dos diferentes animais, mostrando que o efeito, *in vitro,* da HSP60 e de seus peptídeos também tem variabilidade individual, sendo caracterizados como modificações REGULA e INFLAMA, ou mesmo não induzindo modificação na expressão gênica. Esses dados sugerem que diversos peptídeos da HSP60 podem desempenhar atividade imunorreguladora ou inflamatória, e este efeito também depende do contexto individual. Isso reforça a hipótese da dupla função da HSP60 na interação com o sistema imune como descrito por diversos grupos (Moudgil & Sercarz, 2005; Quintana & Cohen, 2008; Henderson, 2010) e pelo nosso grupo (Granja *et al*, 2004; Caldas *et al*, 2006).

A comparação dos dados obtidos no sistema murino com aqueles

obtidos no sistema humano, nos permitiu identificar diferenças importantes, mas também semelhanças. Apesar de todos os peptídeos terem induzido alguma modificação da expressão gênica de pelo menos um gene em pelo menos um animal, verificamos que, em sua maioria, eles não induziram modificação na expressão gênica, simultaneamente, dos genes estudados (sem modificação, o que ocorreu em mais de 50% dos experimentos). Esse resultado é diferente do obtido no estudo da reatividade de PBMCs humanos frente aos mesmos peptídeos, quando mais frequentemente ocorreram modificações de expressão de vários genes simultaneamente (Martello, 2010). Os níveis detectados de citocinas no sobrenadante foram muito baixos, similar ao observado no sistema humano (Martello, 2010). É importante ressaltar que os peptídeos foram desenhados, originalmente, em nosso laboratório, frente a sua predição de ligação às moléculas HLA-DR humanas pelo programa T-epitope (Caldas *et al*, 2004). Isto pode ter, pelo menos em parte, alguma influência na maior amplitude de efeito desses peptídeos na expressão gênica no sistema humano. Não obstante, o efeito imunorregulador de alguns desses peptídeos já foi descrito em modelos animais por nosso grupo (Luna *et al*, 2007; Volsi, 2008). Nestes modelos, os que mais se destacaram foram os peptídeos p277 e o N7, com produção de citocinas imunorreguladoras (IL-10 e TGFβ), efeito via células dendríticas e em linfócitos T, inibição da proliferação alogeneica e aumento da sobrevida de aloenxertos.

Dessa forma, ao compararmos o presente estudo com o equivalente no sistema humano, é provável que as diferenças observadas (principalmente em magnitute) não sejam apenas pela não ligação dos peptídeos (seja ao MHC ou às moléculas TLR2 ou TLR4), mas pelas diferenças na experiência imunológica entre os indivíduos dessas duas espécies. Os camundongos, por serem criados em um ambiente livre de patógenos, possuem uma experiência imunológica mais limitada, diferentemente dos humanos os quais estão sempre em contato com novos antígenos, inclusive de microorganismos patogênicos. Dessa forma, o sistema imune está sempre se modificando, ora inflamando ora regulando e, com isso, há diferenças no repertório de linfócitos, inclusive reativos à HSP60 e outras HSPs, tanto efetores quando de memória. É possível que indivíduos saudáveis tenham clones de linfócitos específicos para os peptídeos testados, devido não só ao maior contato com as HSPs exógenas, mas também a eventuais desequilíbrios na própria homeostase. No entanto, nos camundongos criados em ambientes livres de patógenos, seu contato com HSPs exógenas e outras proteínas é menor, e o ambiente externo é controlado visando minimizar desequilíbrios da homeostase dos animais. Assim, é possível que os animais testados tenham menos clones (de células efetoras ou de memória) específicas para os peptídeos testados do que os indivíduos saudáveis, o que explicaria, em parte, as menores magnitudes na expressão gênica relativa e secreção de citocinas referentes a indivíduos saudáveis. De maneira similar, também há

variação na magnitude da reatividade a autoantígenos entre indivíduos saudáveis e aqueles com doenças autoimunes, ou então entre indivíduos vacinados e aqueles não vacinados para antígenos exógenos.

É importante ressaltar que além da influência das diferentes experiências imunológicas de cada um, há as diferenças genotípicas dos indivíduos. Dessa forma, ao considerarmos as diferenças entre as experiências imunológicas, assim como as diferenças genéticas entre os humanos e camundongos, sabemos das limitações dos estudos realizados em animais e da necessidade da tradução desses estudos para os humanos. Esses dilemas são reconhecidos e amplamente discutidos na comunidade científica (Assessing the status of human immunology, 2008).

Apesar das amplitudes das modificações encontradas não terem sido pronunciadas, obtivemos diversos resultados interessantes. Verificamos que os genes com expressão mais modificada pelos peptídeos da HSP60 foram os genes da IL-17, IL-10. Outros grupos também verificaram o efeito imunorregulador da HSP60 aumentando a secreção de IL-10 via TLR2 com inibição de T-bet, NF-kappaB e NFATp e indução de GATA-3 (Zanin-Zhorov *et al*, 2005). Esses resultados podem ser um indício de que os peptídeos, no sistema murino, atuem preferencialmente nesses genes do que nos outros estudados. É interessante notar que o gene da IL-10 foi alterado de maneira semelhante tanto no modelo murino quanto humano (Martello, 2010), com aumento de sua expressão. Apesar de não termos

analisado a expressão do gene RORγt, como nos estudos do nosso grupo no sistema humano, vimos que a expressão do gene da IL-17 no modelo murino, a qual está associada a esse fator de transcrição característico das células Th17, teve redução semelhante à do gene RORγt. Estes dados sugerem que os peptídeos da HSP60 podem atuar sobre os mesmos genes induzindo a expressão de citocinas como IL-10 e IL-17, tanto no sistema humano quanto no murino. É possível que os peptídeos da HSP60 induzam células secretoras de IL-10, as quais poderiam ser, por exemplo, por um desvio para células Th2 como já descrito (Zanin-Zhorov *et al*, 2005; Nussbaum *et al*, 2006) ou induzindo Tregs (Zanin-Zhorov *et al*, 2006; Quintana *et al*, 2008). Também é possível que os peptídeos da HSP60 inibam células Th17 por essa mesma indução preferencial de outros tipos celulares. É possível que isso ocorra por ligação direta a receptores TLR ou MHC nos linfócitos T, ou mesmo de maneira indireta, através da ligação desses peptídeos a células dendríticas, por exemplo. Há descrito na literatura que, na ausência de células Th1, verificou-se um forte envolvimento das células Th17, principalmente nos processos de rejeição aguda (Tang *et al*, 2001). Ainda assim, as células Th17 são mais reconhecidas pelo seu envolvimento em doenças autoimunes. Nesse sentido, diversos peptídeos da HSP60 foram sugeridos como imunodominantes em diversas doenças autoimunes, estando envolvidos com a proteção ou melhora das doenças (quadro abaixo). Dessa forma, seria interessante também testar nossos peptídeos em modelos de

doenças autoimunes.

Tabela 8- Balanço de dados da literatura sobre peptídeos da HSP60 envolvidos em doenças autoimunes (dados da literatura).

Peptídeo Literatura	Relação com Nossos Peptídeos	Doença Autoimune	Referência
HSP60 153-163	~N10 136-155	Aterosclerose	Lu *et al*, 2010
HSP60 253-268	Entre I2 e I4 223-242 269-289	Aterosclerose	Van Puijvelde *et al*, 2007
HSP60 437-460	~ C3 449-468	Síndrome de Sjörgen	Delaleu *et al*, 2008
Hu3 31-50	= N3 31-50	Artrite autoimune induzida	Quintana *et al*, 2003
HSP60 336-351	~ I6 321-340	Uveíte autoimune	Phipps *et al*, 2003
Diapep 437-460	= p277 437-460	Diabetes	Elias & Cohen, 1994

Número correspondente à posição dos aminoácidos na proteína HSP60.

Tem sido também descrito o envolvimento das HSPs no contexto do transplante. Conforme já mencionado, no contexto do transplante, não só os aloantígenos do doador, mas também autoantígenos, incluindo as proteínas de choque térmico possuem uma participação na resposta imune ao aloenxerto. Foi sugerido que a resposta à HSP amplificava a resposta inflamatória ao transplante (Duquesnoy *et al*, 1995). Outro grupo observou um aumento da expressão de HSP70 no aloenxerto renal humano com rejeição, e também a presença de linfócitos T infiltrantes no enxerto reativos à HSP70 humana associada ao processo de rejeição do enxerto (Trieb *et al*, 1996), enquanto que Davis e colaboradores mostraram que o tratamento com imunossupressores inibiu parcialmente a expressão da HSP no aloenxerto cardíaco (Davis *et al*, 1996). Mais

recentemente, também foi descrito um aumento na expressão das HSPs no processo de rejeição do alotransplante murino e humano (Oltean *et al*, 2004). Estes relatos indicam a participação de linfócitos T reativos às HSPs na resposta ao transplante, e sugerem que essa reatividade esteja associada com o processo de rejeição.

Além do potencial proinflamatório das HSPs no transplante, outros grupos de pesquisa, inclusive o nosso, têm estudado o seu papel imunorregulador e também citoprotetor. Dados de nosso grupo sugerem a existência tanto de populações de linfócitos T autorreativos à HSP60 próinflamatórias, como outras potencialmente reguladoras, em pacientes transplantados renais (Granja *et al*, 2004). Como continuidade desta linha de pesquisa, temos investido na busca de peptídeos ou regiões da HSP60 que tenham papel imunorregulador para a indução de tolerância no contexto do alotransplante. Observamos também em transplantados renais que diferentes regiões da HSP60 podem induzir respostas imunes funcionalmente distintas, sendo que a produção de IL-10 foi mais induzida por peptídeos da região C-terminal, e alguns da N-terminal (Caldas *et al*, 2006). Mais recentemente, em pacientes transplantados cardíacos verificou-se um aumento da HSP60 no miocárdio após episódios de rejeição aguda. No entanto, os autores associaram esse aumento à indução de uma resposta protetora após a lesão do tecido cardíaco (Sarri *et al*, 2009).Também é importante ressaltar que é discutida a pureza das HSPs recombinantes utilizadas nos estudos

anteriores, uma vez que a presença de LPS contaminante ativa células apresentadoras de antígeno via TLR4 e CD14 induzindo a secreção de IL-12, IL-6 e TNFα (Osterloh *et al*, 2008), e que sua eliminação elimina a indução de genes inflamatórios observados em diversos trabalhos (Tsan & Gao, 2004). Por essa razão, nosso grupo e outros se preocupam cada vez mais em adquirir ou expressar HSP com baixas quantidades de LPS (menor que 10 EU/mg). No entanto, a quantidade que induz esses efeitos ainda é discutida.

Foi descrito que a HSP60 induz a redução de T-bet e aumento de Gata-3 em linfócitos T humanos (Zanin-Zhorov *et al*, 2005). Nós encontramos respostas diferentes induzidas por nossos peptídeos da HSP60. Verificamos, ao contrário, que houve um predomínio com aumento da expressão relativa de T-bet (principalmente com os peptídeos N2, N6, I4, e C3), o que sugere que os peptídeos possam induzir células Th1, enquanto Gata-3 manteve-se próximo do equilíbrio. Encontramos um predomínio da maior expressão gênica de TNFα, o que deve ser analisado com cuidado, uma vez que apesar da citocina TNFα ser inflamatória, ela faz parte de uma a via que também induz genes imunorreguladores como o A20, o qual atua como feedback negativo, inibindo vias de sinalização inflamatórias como aquelas que controlam NF-kappaB- e IRF3 (Verstrepen *et al*, 2010). Foi interessante verificar que a expressão relativa dos genes IL-12p35 e IL-12p40 caminharam em direções opostas; enquanto uma aumentava sua expressão (IL-12p35, principalmente com

o peptídeo I4), a outra reduzia (IL-12p40, principalmente com os peptídeos N6, N7, N10, I5, I8, C4, C8 e p277). Isso pode significar que eles não façam parte da IL-12, e sim de outras citocinas como a proinflamatória IL-23 (subunidade p40 com p19) ou da imunorreguladora IL-35 (subunidade p35 com Ebi). É descrito que a produção de cada um dos 4 heterodímeros da família da IL-12 é limitada pela expressão da cadeia α (p35, p28 e p19). A produção de IL-12 e IL-35 é limitada, pois p35 é expressa em níveis menores do que p40 e Ebi, e a coexpressão das cadeias α (p35, p28 e p19) e β (p40 e Ebi) é necessária para a secreção da citocina ativa (Wolf *et al*, 1991). Isso vai contra o encontrado em nosso trabalho, uma vez que vimos que a expressão de IL-12p35 foi maior do que a de IL-12p40. Como as expressões gênicas são relativas, é provável que os diferentes peptídeos alterem a expressão de cada subunidade, e que IL-12p35 esteja sendo secretada junto com a Ebi, formando a IL-35 uma citocina imunorreguladora secretada por células Treg Foxp+ (revisado por Collison & Vignali, 2008). Isso seria coerente com os achados de maior expressão relativa de IL-10, uma citocina secretada também por Tregs, e com a diminuição de IL-17, uma vez que a IL-35 induz a proliferação de células Treguladoras produtoras de IL-10 e reduz a atividade de células Th17 e consequentemente, a quantidade de IL-17, possivelmente sendo um dos mecanismos de atuação desses peptídeos (Niedbala *et al*, 2007). Mas, ao analisarmos a expressão relativa de Foxp3, verificamos que ela não aumentou, muito pelo contrário, na

maioria das modificações encontradas ela diminuiu, sugerindo que provavelmente não há geração de Tregs Foxp3+ e talvez até ocorra uma redução delas, a qual pode ser relativa devido ao aumento das outras populações com atividade imunorreguladora (células Th2 secretoras de IL-10, por exemplo), ou absoluta pela redução de sua população.

Ao analisarmos os peptídeos que induziram modificações predominantemente imunorreguladoras, encontramos, em ordem de maior razão REGULA/INFLAMA: N7, I9 C4, N6, I8, C8, C10, N2, p277, N3, I5, I2, C3 e I6. Muitos destes peptídeos induziram resultados semelhantes aos encontrados no sistema humano: N7, N2, N6, I8, C4 e N3 (Martello, 2010). Esses dados indicam um potencial efeito imunorregulador dominante para alguns peptídeos da HSP60 nas duas espécies. A nossa proposta foi usar as informações obtidas nos dois sistemas – humano e murino- para selecionar peptídeos potencialmente imunorreguladores a serem testados ainda neste projeto, *in vivo,* no modelo de alotransplante de pele murino, e futuramente em ensaios clínicos em humanos. Desta forma, escolhemos alguns peptídeos que fossem predominantemente imunorreguladores nos dois sistemas para dar continuidade aos estudos, através da análise de citocinas no sobrenadante, ensaios de inibição da proliferação e ensaios de indução de tolerância *in vivo*.

Dados os resultados obtidos nos sistemas murino (PCR de Tempo Real, CBA-FACS) e humano (PCR de Tempo Real, CBA-FACS e ensaios de MLR), selecionamos pelo menos 1 peptídeo de cada região que fosse

predominantemente imunorregulador, para prosseguir com os estudos funcionais *in vitro* e ensaios *in vivo* de indução de tolerância ao aloenxerto de pele murino. Desta forma, selecionamos os peptídeos N2, N3, N6, N7, I8 e C4 para dar continuidade ao estudo. Alguns deles possuem sequências semelhantes a peptídeos já descritos na literatura como potencialmente imunorreguladores, conforme será discutido mais adiante.

O peptídeo N7 apresentou-se como o mais promissor, dada a alta razão REGULA/INFLAMA em relação à capacidade de induzir modificações da expressão gênica, encontrada no modelo murino e no sistema humano. No modelo murino, ele induziu principalmente a redução da expressão relativa de IL-17. Também se destacou a redução da expressão de IL-12p40, subunidade da IL-12 e IL-23, citocinas inflamatórias (revisado por Collison & Vignali, 2008). Como ele não induziu qualquer modificação na expressão de IL-12p35, é possível que essa redução na subunidade p40 esteja associada à redução de Ebi, e consequentemente, à citocina próinflamatória IL-23. Também é interessante notar que em algumas condições, o peptídeo N7 induziu IL-4, uma citocina Th2 e predominantemente imunorreguladora. No entanto, esse aumento na expressão relativa de IL-4 não foi acompanhada de Gata-3 ou por outras citocinas imunorreguladoras como TGFβ ou IL-10.

Quando verificamos a secreção de citocinas no sobrenadante, vimos também um predomínio REGULA, com a redução da secreção de citocinas inflamatórias. Dados de outros trabalhos em nosso grupo também

corroboram o potencial imunorregulador do peptídeo N7. Volsi verificou que os peptídeos N7 e p277, quando cultivados com DCs murinas induziram a secreção de IL-10 e TGFβ e inibiram a proliferação induzida por αCD3 (Volsi, 2008). No sistema humano, foi observado que N7 induziu alterações de expressão gênica predominantemente imunorreguladoras em linfócitos T humanos, via a sua ação em células dendríticas imaturas (Socorro-Silva, 2007). No sistema humano, o nosso grupo verificou que o N7 induziu produção de IL-10, sendo dos peptídeos testados, o que teve maior razão protéica IL-10/IFNγ. Também foi verificada a expressão sustentada de Foxp3 e a capacidade de inibir a MLR, os quais são resultados muito interessantes e sugerem a indução de células Tregs (Martello, 2010). Por ser o peptídeo mais promissor, testamos o peptídeo N7 no modelo de alotransplante de pele murino, cujos resultados são discutidos mais ao final. Esses dados obtidos através de diferentes estudos e sistemas sugerem o papel potencialmente imunorregulador do peptídeo N7, o qual está sendo analisado para um futuro pedido de patente. Estes últimos trabalhos do grupo com o peptídeo N7 ainda não foram publicados devido à solicitação da patente.

O segundo peptídeo mais interessante foi o N6. Tanto no sistema humano quanto murino, o peptídeo N6 foi inibidor da expressão gênica relativa de T-bet. Em ambos os sistemas, ele foi indutor da expressão gênica relativa de IL-10, o que refletiu, no sistema humano, na secreção de IL-10. Apesar dele não ter alcançado uma alta razão protéica IL-10/IFNγ

no sistema humano, foi o 2º peptídeo com menor razão IFNγ/IL-10. Ainda no sistema humano, o peptídeo N6 foi capaz de inibir a proliferação induzida por uma resposta alogênica *in vitro*, o que é um resultado bastante promissor (Martello, 2010). Não encontramos, na literatura, trabalhos com peptídeos semelhantes ao N6. É possível que no sistema humano e no murino, o peptídeo N6 tenha induzido uma população de células Th2 ou Tregs secretoras de IL-10, o que indica o potencial imunorregulador do peptídeo.

Já em nosso estudo no sistema murino, também verificamos que o peptídeo N6 inibiu a expressão gênica de IL-12p40 em todas as condições testadas, enquanto que IL-12p35 permaneceu inalterado ou teve uma alteração que não acompanhou a IL-12p40. Verificamos que, de fato, não houve secreção de IL-12, uma citocina Th1, o que sugere um papel imunorregulador do peptídeo. Observamos, também, que ocorreu a diminuição da expressão gênica de IL-17 em diversos momentos, outro resultado que sugere um perfil imunorregulador para o peptídeo N6. No entanto, foi inesperado o aumento encontrado na secreção de IL-17, uma citocina característica das células inflamatórias Th17. Também houve aumento da secreção de TNFα, outra citocina inflamatória. Estes dados, ao contrário, sugerem um perfil inflamatório do peptídeo N6. Assim, o que foi verificado como imunorregulador no sistema humano (Martello, 2010), e o que foi verificado como imunorregulador pelas análises de RT-PCR no sistema murino foram incoerentes com as citocinas inflamatórias

encontradas no presente estudo.

É descrito na literatura que, geralmente, há uma correlação positiva entre a quantificação gênica e a proteína encontrada, mas que nem sempre isso ocorre, o que ressalta a importância de confirmar os achados na expressão gênica com a proteína (revisado por Maier *et al*, 2009). Isso ocorreu não somente com o peptídeo N6, mas com diversos outros, conforme descrito mais adiante. É possível que as citocinas como a IL-10, encontradas com expressão gênica aumentada, estejam sendo consumidas do meio pelas células, e que não tenhamos detectado alterações nos genes, no caso, da IL-17 e TNFα, pois eles já foram previamente modulados e o observado nesse momento, sejam as citocinas que ainda estão presentes no meio. Desta forma, dadas as incoerências encontradas, devemos verificar em ensaios funcionais *in vitro* se o peptídeo N6 é ou não capaz de inibir a proliferação induzida.

Os peptídeos N2 e N3 também despertaram nosso interesse. Em nosso grupo, Caldas verificou que o peptídeo N3 induziu alta frequência de células secretoras de IL-10 em PBMC de indivíduos transplantados renais e sadios (Caldas *et al*, 2006). Outro grupo também verificou o potencial imunorregulador de peptídeo semelhante, através da vacinação de ratos com Hu3 (regiões sobrepostas dos peptídeos N3 e N4) e inibição do desenvolvimento de artrite autoimune induzida (Quintana *et al*, 2003). Esse mesmo grupo observou que a proteção estava associada à maior proliferação de células T a uma variedade de antígenos associados à

doença, junto com um desvio da resposta para Th2/Th3, com inibição da secreção de IFNγ e aumento de IL-10 e TGFβ. Em nosso estudo, o peptídeo N3 não teve predomínio marcante de moléculas com expressão gênica relativa induzida ou inibida. Mesmo assim, N3 induziu um predomínio de alterações da expressão gênica do tipo REGULA. Ao observarmos a secreção de citocinas no sobrenadante, vimos que somente houve um predomínio da secreção de IL-10, o que vai de acordo com os dados prévios de nosso grupo (Caldas *et al*, 2006) e da literatura (Quintana *et al*, 2003). Também verificamos uma inibição de IL-17, as quais são consideradas alterações REGULA e podem sugerir que o peptídeo N3 esteja induzindo células Th2 ou outro tipo celular como células dendríticas secretoras de IL-10.

Ao analisarmos o peptídeo N2, verificamos que ele inibiu a expressão gênica relativa de IL-17 na maioria dos casos, aumentou IL-10 e IL-4, achados característicos de células Th2, o que sugere que o peptídeo N2 tenha um perfil imunorregulador. Quando verificamos a secreção de citocinas, vimos uma redução de IL-2, IL-17, porém a IL-10 e IL-6 ora aumentaram ora diminuíram. Também houve aumento da TNFα no sobrenadante. É possível, que algumas citocinas estejam sendo consumidas no meio, como a IL-10 e a IL-2, e que outras citocinas encontradas no sobrenadante, como o TNFα, sejam resquícios de uma modulação prévia de sua expressão gênica induzida pelo peptídeo, uma vez que a via de TNFα também induz genes imunorreguladores como o

A20, o qual está regula negativamente vias proinflamatórias como o da NF-kappaB e IRF3 (Verstrepen *et al*, 2010). Apesar da disparidade entre os achados protéicos e a expressão gênica relativa, ainda houve predomínio de modificações do tipo REGULA, o que sugere o potencial imunorregulador do peptídeo N2. Os achados com o pepetídeo N2 foram diferentes entre os sistemas murino e humano. No sistema humano, N2 induziu um aumento na expressão gênica relativa de TGFβ, IFNγ, IDO e indução sustentada de Foxp3, e no sobrenadante foram encontrados IFNγ e IL-10 (Martello, 2010). Estes achados indicam a possibilidade de indução de células Tregs pelo peptídeo N2 no sistema humano, uma vez que a expressão de Foxp3 é transitória em células T efetoras e sustentada em Tregs (Mantel *et al*, 2006). Ainda no sistema humano, o peptídeo N2 foi capaz de inibir a MLR em 29%, e a proliferação induzida por αCD3 em 17% (Martello, 2010). Não testamos, no sistema murino, a capacidade do peptídeo N2 de inibir proliferação induzida por αCD3 e conA.

O próximo peptídeo que nos despertou interesse foi o peptídeo I8. Ele foi o peptídeo mais interessante da região intermediária no sistema humano, e o 2º mais interessante no sistema murino. Foi sugerido, na literatura, que a capacidade da HSP60 de ativar células da resposta imune inata como os macrófagos murinos, seja decorrente de sua ligação específica a LPS através de um peptídeo (Hsp354-366) semelhante ao I8 (Hsp353-372). Essa ligação leva à ativação de células da resposta imune inata com atividade inflamatória (Habich *et al*, 2005). O mesmo grupo de

pesquisadores mostra que essa região da HSP60 é diferente de um outro epítopo responsável pela ligação à superfície de macrófagos, previamente identificada como a região Hsp481-500 (semelhante a outro peptídeo que estudamos, o peptídeo C4 da região C-terminal)(Habich *et al*, 2004). Estes dados indicam o papel importante da HSP60 como ativadora da resposta imune inata através também do reconhecimento de LPS e ativação de macrófagos. De maneira contrária, em nosso trabalho, verificamos que o peptídeo I8 amentou a expressão relativa de IL-10, e reduziu IL-12p40, ambas modificações do tipo REGULA, associadas à indução de populações celulares reguladoras como Th2 e Treg. Porém, quando analisamos a secreção de citocinas no sobrenadante, não verificamos o aumento de IL-10, o que pode ter sido devido ao consumo da citocina do sobrenadante. Verificamos que o peptídeo I8 induziu modificações REGULA com a redução da secreção principalmente de IL-2. Essas modificações sugerem a indução de populações Th2 ou Treg e inibição de Th1 e Th17. Considerando as características predominantemente imunorreguladoras verificadas nos 2 sistemas, é relevante testá-lo funcionalmente *in vitro* e *in vivo* no sistema murino para confirmar seu potencial imunorregulador.

É interessante notar que, apesar de não termos escolhido o peptídeo I9 para prosseguir nosso presente estudo, é necessário considerá-lo no futuro em ensaios *in vivo* de indução de tolerância ao aloenxerto de pele. Em estudos anteriores de nosso grupo, o peptídeo I9 induziu maior produção de IL-10 nas células mononucleares do sangue periférico de

indivíduos transplantados renais, obtidas no pós-transplante, quando comparados aos indivíduos sadios (Caldas *et al*, 2006). O peptídeo I9 não se destacou no estudo mais recente em PBMC de indivíduos sadios (Martello, 2010), o que pode ser devido a eventuais efeitos diferentes e mais pronunciados em células de indivíduos não-saudáveis que estejam com algum desequilíbrio que em indivíduos saudáveis. Em nosso estudo, o peptídeo I8 foi o mais interessante da região Intermediária e ficando atrás somente do N7, induzindo principalmente aumento da expressão relativa de IL-10 e diminuição de IL-17, ambas modificações do tipo REGULA. É possível que o peptídeo induza células predominantemente imunorreguladoras como Th2 ou Tregs. Porém, são necessários mais estudos para verificar seu mecanismo de ação.

O último peptídeo que nos despertou interesse para imunorregulação foi o peptídeo C4 (região C-terminal da HSP60). Em trabalhos prévios de nosso grupo, o peptídeo C4 também induziu maior produção de IL-10 nas células de indivíduos transplantados renais (Caldas *et al*, 2006). Em contraste, dados de outro grupo sugerem que as regiões da Hsp461-480 (região do peptídeo estudado, C4) (Habich *et al*, 2004), Hsp241-260 e Hsp391-410 (Habich *et al*, 2006) estejam envolvidas na ligação de diferentes sítios em macrófagos, indicando o potencial da HSP60 como ativador da resposta imune inata e potencial ação proinflamatória. Em seu trabalho, Habich (2006) encontrou altos níveis de TNFα induzidos pelo peptídeo C4 em conjunto com LPS, o que pode ser pela ativação de

macrófagos do tipo M1, de perfil proinflamatório (Martinez *et al*, 2008). Também foi descrito que a HSP60 é capaz de se ligar ao receptor LOX-1 (do inglês, *"lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1"* ou receptor 1 de lecitina oxidada lipoprotéica de baixa densidade) pela região C-terminal. Essa ligação de LOX-1 à HSP60 está envolvida na entrega de antígenos fusionados à HSP60 para a via de apresentação do MHC de classe I (Xie *et al*, 2010). Ainda não se sabe ao certo se essa ligação ocorre na região HSP60 461–480 (região do peptídeo estudado, C4) e/ou HSP60 481–500, mas este estudo mostra outro mecanismo de reconhecimento da HSP60 e seus peptídeos. É possível que o peptídeo C4, nesses contextos, funcione como um sensor de antígenos microbianos, como o LPS ou outros, melhorando o reconhecimento dessas estruturas pelas células da resposta imune inata.

No sistema murino, o peptídeo C4 induziu redução da expressão relativa de IL-12p40 e IL-17, ambas modificações REGULA. Ao medirmos as citocinas no sobrenadante, verificamos que houve redução considerável de IL-2, e também em uma condição, a redução mais proeminente de IL-17, o que vai de acordo com o encontrado na expressão gênica relativa e podem indicar uma ação imunorreguladora do peptídeo C4 com a inibição de células Th17. Em trabalhos prévios de nosso grupo, no sistema humano, verificou-se que o peptídeo C4 induziu maior produção de IL-10 nas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos transplantados renais (Caldas *et al*, 2006). Em outro

trabalho, com indivíduos saudáveis, o peptídeo C4 induziu a redução da expressão gênica relativa de TGFβ, Gata-3 (modificações INFLAMA) e aumento de IDO (REGULA), levando a uma razão REGULA/INFLAMA próximo do equilíbrio (Martello, 2010). O peptídeo C4, no sistema humano, induziu a secreção de principalmente de IFNγ, mas também de IL-10 e IL-2, o que gerou a maior razão IFNγ/IL-10 dos peptídeos testados (Martello, 2010). Esses resultados no sistema humano, sugerem que o peptídeo C4 induza baixas quantidades de IL-10 e maiores de IFNγ, possivelmente através da indução preferencial de populações próinflamatórias como de células Th1, ou mesmo de macrófagos M1. Considerando nossos resultados e os dados da literatura, talvez seja interessante focar nos peptídeos mais imunorreguladores do que o C4.

Tabela 9- Dados do nosso grupo e outros dobre os peptídeo ecolhidos da HSP60 humana: N7 (87-110), N6 (76-95), N3 (31-50), N2 (16-35), I8 (353-372) e C4 (464-483).

Peptídeo Literatura	Relação com nossos peptídeos	Resumo dos Resultados	Referência
N7 87-110	N7 87-110	Indução de IL-10 e TGFβ em DCs murinas, inibição da proliferação induzida por αCD3	Volsi, 2008 *
N7 87-110	N7 87-110	Indução de genes imunorreguladores (IL-10 e TGFβ) em DCs imaturas humanas	Socorro-Silva, 2007 *
N7 87-110	N7 87-110	Aumento da expressão gênica e da secreção protéica de IL-10, aumento da expressão de Foxp3 e inibição do MLR em humanos	Martello, 2010 *
N6 76-95	N6 76-95	Aumento da espressão gênica/protéica de IL-10, inibidor de T-bet, inibição do MLR	Martello, 2010 *
N3 31-50	N3 31-50	Alta freqüência de céls secretoras de IL-10 em PBMC de transplantados renais e sadios	Caldas *et al*, 2006
Hu3 31-50	N3 31-50	Inibição do desenvolvimento de AA em ratos vacinados, desvio de resposta Th2/Th3, aumento de IL-10 e TGFβ	Quintana *et al*, 2003
N2 16-35	N2 16-35	Aumento da expressão de TGFβ, IFNγ, IDO e Foxp3, e secreção de IFNγ e IL-10; inibição MLR e proliferação do αCD3	Martello, 2010 *
I8 353-372	I8 353-372	Aumento da expressão de IDO, RORgT, e diminuição de T-bet	Martello, 2010 *
HSP60 354-366	~I8 353-372	Envolvido na ligação de LPS e ativação de células do sistema imune inato	Habich *et al*, 2005
C4 464-483	C4 464-483	Redução da expressão de Gata-3, TGFβ, aumento de IDO, e secreção de IFNγ e IL-10 em PBMC de indivíduos sadios	Martello, 2010 *
C4 464-483	C4 464-483	Indução da secreção de IL-10 em PBMC de indivíduos transplantados renais	Caldas *et al*, 2006
HSP60 461-480	~C4 464-483	Ligante de LOX-1 sendo endocitado e apresentado via MHC classe I	Xie *et al*, 2010
HSP60 461-480 242-260 391-410	~C4 464-483	Regiões que se ligam a macrófagos murinos	Habich *et al*, 2006
HSP60 461-480	~C4 464-483	Epítopo que se liga a macrófagos murinos	Habich *et al*, 2004

*dados não publicados de nosso grupo (teses); número se refere à posição de aminoácidos na HSP60 humana.

Os ensaios *in vivo* para a indução de tolerância, realizados com o peptídeo mais promissor, o N7, pela via intranasal não apresentaram diferenças estatísticas com o grupo controle. Apesar da via intranasal ser conhecida, juntamente com a via oral e intravenosa como vias tolerogênicas (Maron *et al*, 2002), nós não tivemos sucesso, apesar de utilizarmos múltiplas doses e concentrações diferentes do peptídeo.

Verificamos que outros grupos utilizaram, com sucesso, a inoculação subcutânea de peptídeos da HSP60 com o adjuvante incompleto de Freund (IFI) em modelos de doenças autoimunes. Um grupo pôde prevenir a artrite autoimune induzida em ratos inoculados com IFI junto com o peptídeo Hu (igual ao nosso N3) através de mecanismos reguladores como secreção de IL-10 e TGFβ (Quintana *et al*, 2003). Outro grupo teve sucesso na indução de Tregs secretoras de IL-10 e TGFβ em camundongos inoculados com IFI com o peptídeo Hsp60 437-460 (semelhante ao nosso p277) por um mecanismo dependente de TRL2 (Wang *et al*, 2009). Também no contexto do transplante, o grupo de Cohen obteve sucesso inoculando camundongos com IFI e o peptídeo p277, prolongando a sobrevida do aloenxerto de pele murino (Birk *et al*, 1999). Porém, este é o único trabalho para a indução de tolerância no transplante com os peptídeos da HSP60, além daqueles do nosso grupo. Dessa forma, optamos por testar também a inoculação dos peptídeos com IFI, conseguindo apenas um aumento de 3 dias na sobrevida do enxerto com o peptídeo N7, sem haver, no entanto, diferença estatística (entre grupo controle PBS e p277 p=0,82, e com o grupo tratado com N7 p=0,19). Mesmo ao utilizarmos o mesmo peptídeo p277 de Birk e colaboradores (1999), nós não conseguimos reproduzir o protocolo em nossas condições. Isto reflete a complexidade para a otimização dos protocolos de indução de tolerância utilizando autoantígenos como a HSP60, principalmente no contexto do transplante.

Considerando que a rejeição ao aloenxerto é um processo complexo, que envolve múltiplas células e antígenos, é possível que a HSP60 ou seus peptídeos precisem, concomitantemente, de estímulos imunossupressores mais fortes para auxiliar no processo. Dessa forma, em outro protocolo para a indução de tolerância, utilizamos o nosso peptídeo N7 junto com o anticorpo αCD3, utilizado em pacientes transplantados. Utilizamos a terapia com o anticorpo monoclonal αCD3 pela via endovenosa, 5 dias antes do transplante, em combinação com o nosso peptídeo N7 pela via intranasal. Já é bem descrito na literatura o uso do anticorpo αCD3 no pré-transplante, e que a terapia, principalmente com o anticorpo humano, favorece a geração de células Tregs. O grupo de Von Herrath utilizou um protocolo administrando a porção Fc do αCD3 intravenoso e o peptídeo da proinsulina intranasal, o qual foi utilizado com sucesso na reversão do diabetes recente em camundongos. Esse protocolo induziu a expansão de células Tregs específicas para insulina produtoras de IL-10, TGFβ e IL-4 (Bresson *et al*, 2006). Nosso grupo utilizou o mesmo protocolo, só que com a molécula inteira do αCD3 e o peptídeo N7 no contexto do alotransplante de pele murino. Com esse protocolo, notamos que houve diferença entre os grupos tratados com αCD3 e os não tratados ($p<0,05$), mas, no entanto, não houve diferença estatística entre o grupo tratado somente com αCD3 e aquele com αCD3+N7. Apesar disso, é interessante ressaltar que a sobrevida média do enxerto no grupo tratado com αCD3+N7 em relação

ao grupo αCD3 foi ainda maior que no experimento anterior (mais 7 dias de sobrevida do enxerto). Isso pode indicar uma ação imunorreguladora do peptídeo N7, *in vivo*, uma vez que notamos que a última dose do peptídeo N7 foi dada 6 dias após o transplante, e que o grupo tratado com αCD3+N7 teve uma sobrevida média do enxerto 7 dias a mais que o grupo tratado somente com αCD3. Talvez, a não diferença estatística seja descorrente do pequeno número de animais estudados. Devemos também aprimorar o protocolo. É possível que ao utilizarmos protocolos com doses prolongadas do peptídeo, a sobrevida do enxerto se prolongue.

Devemos testar outros protocolos de indução de tolerânica e envolver o peptídeo com microesferas lipídicas antes da inoculação pela via intranasal, assim como foi realizado com o p277 em trabalhos anteriores realizados pelo grupo (Luna *et al*, 2007). Outra possibilidade é tentar outros métodos de inoculação do peptídeo. É descrito que a via oral também é uma via de indução de tolerância, sendo que ela já foi testada com sucesso com alguns peptídeos da HSP60 no contexto de aterosclerose (Van Puijvelde *et al*, 2007). Também é possível utilizar outras vias tolerogênicas como a intravenosa. Desta forma, será interessante testar os diferentes protocolos com o peptídeo N7 a fim de verificar se algum deles promove uma maior sobrevida do transplante de pele alogeneico. Também será interessante testar algumas combinações de peptídeos imunorreguladores, com N7, N6, N3, N2, I8, I9 e C4, a fim de verificar se eles podem atuar de forma sinérgica e promor uma maior sobrevida do

aloenxerto.

É interessante ressaltar que, no trabalho anterior de nosso grupo no sistema humano, os peptídeos testados também tiveram efeito diretamente sobre linfócitos T purificados, inclusive na indução tardia da expressão gênica de Foxp3, o que indica que esses efeitos podem também ocorrer independentemente de células apresentadoras de antígenos (Martello, 2010).

Conforme já mencionado, as HSPs podem interagir com diversos receptores de superfície. É possível que estes peptídeos se liguem a diversos tipos celulares (linfócitos T, células dendríticas, macrófagos, etc) via diferentes receptores, e, que isso também contrinua para os diferentes tipos de respostas imune. No contexto da imunorregulação, Cohen e colaboradores propuseram que a HSP60 atue na resposta inata, via a ligação da forma solúvel da HSP60 a receptores tipo toll (TLR2 e TLR4); inibindo células TH1 e reduzindo a expressão de T-bet, NFkB, NFAT, TNFα, IFNγ e SDF1; induzindo céls TH2 com o aumento de Gata-3, IL-10; e aumentando a capacidade supressora de Tregs (Cohen-Sfady *et al*, 2005). Outros receptores de membrana já foram apontados como candidatos para participantes da internalização das HSPs 60 e 70, como membros da família dos receptores scavenger, como o LOX-1 e SREC-1 e o receptor de lipoproteína de baixa densidade, CD91 (Theriault *et al*, 2005; Calderwood *et al*, 2007; Xie *et al*, 2010). Em outros trabalhos, já foi mostrado que alguns peptídeos da HSP60 podem ser apresentados pelas moléculas

MHC, tanto no contexto murino (Ciatto *et al*, 2003), como no humano (Michaelsson *et al*, 2002). Dessa forma, alguns peptídeos da HSP60 podem ser gerados endogenamente, possuindo funções ainda desconhecidas no direcionamento da resposta imune.

Cohen e colaboradores propuseram que na resposta imune adaptativa, ocorreria a apresentação de peptídeos da HSP60 pelas células do tecido inflamado via MHC classe I, ou pelas próprias células TH1 ativadas a células TH2 e Tregs Hsp-específicas as quais suririam a resposta efetora das TH1 (Quintana *et al*, 2008). Mais recentemente, verificou-se a existência de células Tregs Foxp3+ induzidas por HSP60 que são capazes de reconhecer epítopos da HSP60, suprimir outras T efetoras não relacionadas (toxina tetânica) e que são CD30 positivas, uma molécula da superfamília do TNF também importante na diferenciação de Th17, no sistema murino (Sun *et al*, 2010). Também foi verificado que a indução de Tregs por HSP60 foi aumentada pela sinalização via TLR4 em APCs (De Kleer *et al*, 2010). Esses achados indicam a existência de populações de células Tregs CD30+ específicas para a HSP60. Essas células mostram a importância da HSP60 como antígeno imunodominante para a manutenção da homeostase do organismo. No contexto do transplante, é possível que essas células Treg CD30+ auxiliem a suprimir o processo de rejeição ao enxerto, uma vez que, em camundongos, a sinalização de CD30 já foi relacionada à supressão da rejeição do aloenxerto e da doença do enxerto-versus-hospedeiro em humanos e

camundongos (Zeiser *et al*, 2007). Porém, ainda há muito a ser melhor estudado, uma vez que CD30 também é importante para a diferenciação de Th17.

Também é importante ressaltar que, o impacto multiantigênico do transplante alogeneico é muito mais diverso do que o impacto das doenças autoimunes. No transplante, há a exposição de múltiplos aloantígenos desde os primeiros momentos no contexto inflamatório de transplante. Em contraste, nas doenças autoimunes, em um primeiro momento, há apenas alguns antígenos específicos envolvidos na resposta, e somente depois com a exposição de novos focos inflamatórios, ocorre a exposição de novos tecidos e antígenos, e o processo de expansão dos epítopos (do inglês, *"epitope spreading"*), no qual linfócitos T ou B passam a reconhecer epítopos endógenos diferentes e em geral não relacionados com os epítopos que induziram a doença (Vanderlugt & Miller, 1996; Fujinami *et al*, 2006). Desta forma, apesar dos experimentos bem sucedidos em modelos animais de doenças autoimunes, tem sido difícil obter sucesso em ensaios clínicos com epítopos imunodominantes em doenças autoimunes, sendo ainda mais desafiador o sucesso no contexto multiepitopico do alotransplante. Ainda sim, a estratégia de utilizar diversos epítopos imunodominantes de proteínas conservadas, como a HSP60, no contexto de indução de tolerância ao aloenxerto parece mais promissora, do ponto de vista de populacional, do que a estratégia de induzir tolerância aos diferentes antígenos alogeneicos presentes na

população, pela sua maior facilidade de aplicação.

Sabemos, hoje, a importância das HSPs e da HSP60 para a homeostase dos organismos. No entanto, muitas questões permanecem em aberto. Ainda não sabemos o que as HSPs fazem fisiologicamente na circulação em concentrações tão elevadas que podem chegar a mg/ml (Pockley *et al*, 1998; Pockley *et al*, 1999). Tampouco sabemos muitas das funções desconhecidas das HSPs. Diversos grupos apontam a HSP60 como um sensor extracelular de antígenos bacterianos como por exemplo, o LPS, atuando como um sinal de perigo (Habich & Burkart, 2007). Outros grupos apontam as funções imunorreguladoras da HSP60, em diversas doenças autoimunes (Phipps *et al*, 2003) e em mecanismos imunorreguladores (Zanin-Zhorov *et al*, 2006). Talvez a HSP60 tenha diversos epítopos imunodominantes, e seja processada internamente gerando diversos peptídeos com as mais diferentes funções. Isso explicaria, ao menos em parte, sua diversidade de funções. Talvez assim, a HSP60 seja ser importante e fundamental para a homeostase e, dessa forma, forneça vantagens adaptativas na evolução.

Apesar de nós não termos investigado o processo de apresentação e reconhecimento dos nossos peptídeos, é possível que os seus efeitos imunorreguladores envolvam os diversos mecanismos descritos para a HSP60 e seus peptídeos. Em nosso grupo, estamos realizando ensaios de colocalização a fim de verificar onde os peptídeos estudados se ligam nos diferentes tipos celulares. Isso nos trará informações complementares

importantes para o prosseguimento do estudo. É provável que os diferentes peptídeos interajam com múltiplos receptores ativando diversas vias de sinalização simultaneamente. Esses novos conhecimentos nos incentivam a elaborar novos estudos visando, no futuro, o uso de abordagens mais direcionadas para a aplicação terapêutica na clínica.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ✓ A estratégia experimental de avaliar o efeito de peptídeos da HSP60 na expressão gênica de um painel de moléculas da resposta imune (painel REGULA/INFLAMA) permitiu a seleção de peptídeos potencialmente imunorreguladores das diferentes regiões da proteína (N-terminal: N2, N3, N6 e N7; Intermediária: I8 e C-terminal: C4), vários compartilhados nos sistemas murino e humano. Esses dados indicam que o perfil molecular imunorregulador de peptídeos da HSP60 apresenta algum grau de conservação entre essas duas espécies e não é determinada pela região da proteína.

- ✓ Os peptídeos da HSP60 induziram modificações da expressão gênica de diferentes moléculas da resposta imune, em células esplênicas murinas, porém, com predomínio na modulação de IL-10, IL-17 e IL-12p40. Com esses dados, destacamos a plasticidade funcional de peptídeos da HSP60. Considerando a grande conservação evolutiva das HSPs e seu papel na homeostase, em diferentes espécies, é possível que as suas vias moleculares de ação dominantes sejam vias imunorreguladoras mais conservadas evolutivamente.

- ✓ Apesar da variabilidade do efeito dos peptídeos da HSP60, entre os diferentes animais isogênicos, observamos um predomínio de efeito imunorregulador, para a maioria dos peptídeos estudados, sugerindo ser este o efeito imunológico dominante no sistema murino.

- ✓ O peptídeo N7 foi testado, in vivo, para indução de tolerância ao alotransplante de pele, porém, não observamos um aumento significativo na sobrevida do enxerto. Esses dados indicam ser necessário aprimorar os protocolos para a indução de tolerância, utilizando esse peptídeo em combinação com outros peptídeos, ou com outros agentes imunomoduladores.

Anexos

ANEXO 1- Tabelas com as seqüências dos peptídeos estudados

Tabela 10- Peptídeos estudados, suas regiões e seqüências.

Peptídeo/ Região*	N° de resíduos aa	Sequência
N-terminal		
N2 (16-35)	20	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD
N3 (31-50)	20	KFGADARALMLQGVDLLADA
N6 (76-95)	20	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
N7 (87-110)	24	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
N10 (136-155)	20	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL
Intermediária		
I2 (223-242)	20	YISPYFINTSKGQKCEFQDA
I4 (269-289)	21	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN
I5 (285-307)	23	TLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGD
I6 (321-340)	20	GGAVFGEEGLTLNLEDVQPH
I8 (353-372)	20	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ
I9 (372-391)	20	QEIIEQLDVTTSEYEKEKLN
C-terminal		
C3 (449-468)	24	PALDSLTPANEDQKIGIEII
C4 (464-483)	20	GIEIIKRTLKIPAMTIAKNA
C8 (521-544)	20	PTKVVRTALLDAAGVASLLTTAE
C10 (554-573)	20	KDPGMGAMGGMGGGMGGGMF
p277 (437-460)	20	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED

* A localização dos resíduos de aminoácidos de cada peptídeo, em relação à sequência da HSP60 humana, encontra-se destacada entre parênteses. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

ANEXO 2- Tabelas com as seqüências dos primers, concentração de uso, Tm e eficiência

Tabela 11- Sequências dos pares de primers.

Primers	Foward	Reverse
GAPDH	GGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGTCGTTGATGGCAACAAT
Gata-3	TCTCACTCTCGAGGCAGCATG	GGTACCATCTCGCCGCCACAG
Foxp3	TCTCTGGAGCAGCAGCTGGA	CCATTGAGGCCACAGATGGA
IDO	ATCTGTCTGGCTGGAAATGCAG	TGCACTGCCCCCTGAAAAC
IL-4	GCCTGGATTCATCGATAAGCTG	GAGTAATCCATTTGCATGATGCTCT
IL-10	CTGAGGCGCTGTCATCGATT	TTCATGGCCTTGTAGACACCTTG
IL-12p35	CCACCCTTGCCCTCCTAAAC	GGCAGCTCCCTCTTGTTGTG
IL-12p40	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
TGFβ	TATTGCTTCAGCTCCACAGAGAAGA	GGATCCACTTCCAACCCAGG
T-bet	TACCAGAACGCAGAGATCACTCAG	ACACTCGTATCAACAGATGCGTACA
IL-17	TGGACTCTCCACCGCAATG	TTCCCTCCGCATTGACACA
TNFα	TCCCCAAAGGGATGAGAAGTTC	TACGACGTGGGCTACAGGCTT

Tabela 12- Eficiência e concentrações de uso dos pares de primers.

Primers	Eficiência	Concentração	TM
GAPDH	2,06	200nM	83°C
Gata-3	2,03	200nM	82 °C
Foxp3	2,09	200nM	84,5 °C
IDO	2,03	200nM	81,2 °C
IL-4	1,82	200nM	77,2 °C
IL-10	2,06	200nM	78,2 °C
IL-12p35	1,99	200nM	81 °C
IL-12p40	1,95	200nM	80°C
TGFβ	2,03	200nM	80,2 °C
T-bet	1,96	200nM	78,6 °C
IL-17	2,07	200nM	81,1 °C
TNFα	2,00	300nM	80 °C

ANEXO 3- Curvas de Dissociação dos Primers

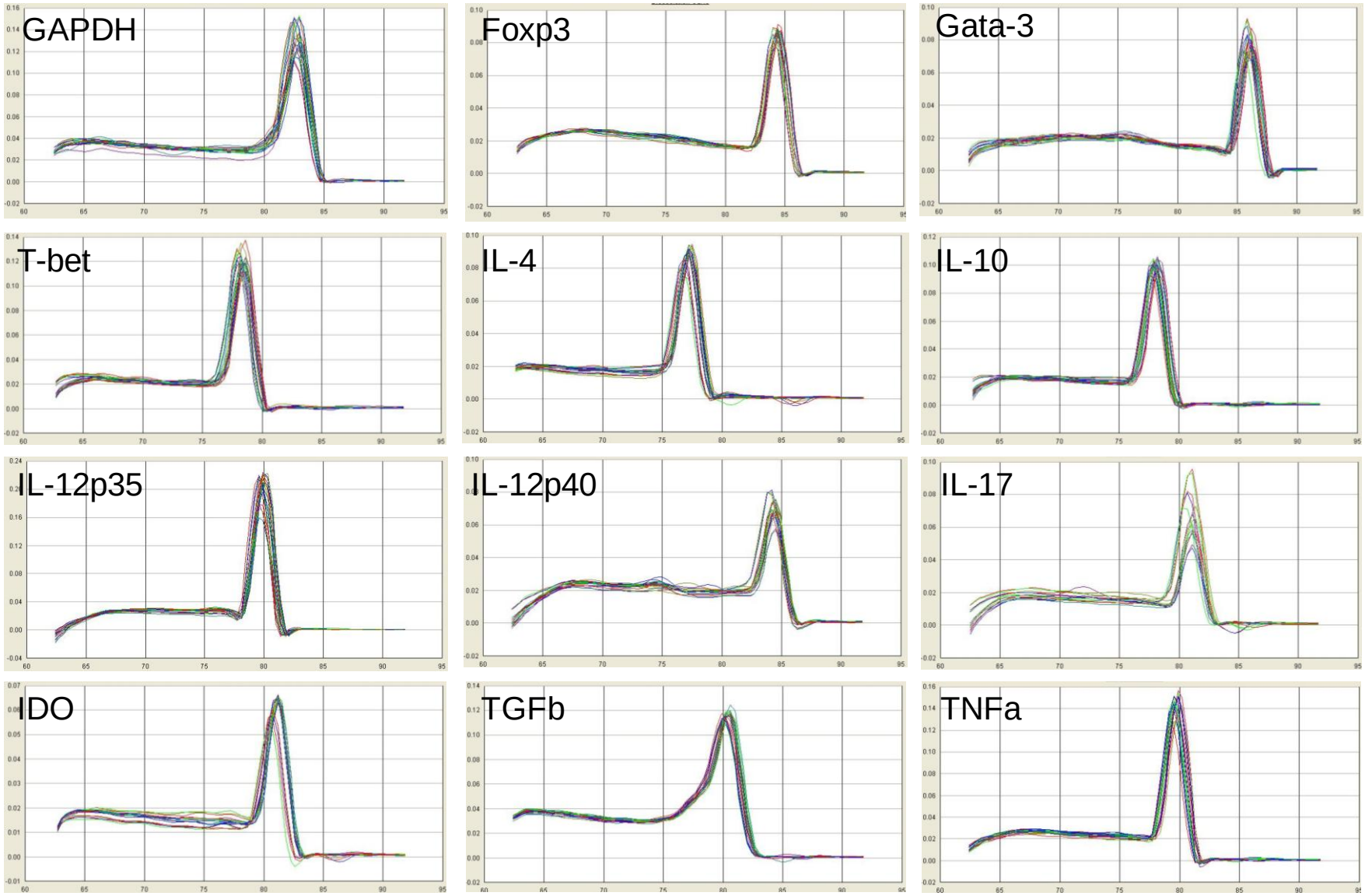


Figura 41- Curvas de dissociação. Dissociação do amplicon com um pico único, preenchendo um dos critérios de validade da PCR em tempo real (descritos em material e métodos). (GAPDH, Foxp3, Gata-3, T-bet, IL-4, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-17, IDO, TGFβ, TNFα.

ANEXO 4- Aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS FMUSP

INCOR ZERBINI CIÊNCIA E HUMANISMO

Mem. CC. 1581

São Paulo, 01 de novembro de 2007.

À
Profa. Dra. Verônica Porto C. V. Coelho

A Comissão Científica do Instituto do Coração, **APROVOU** na sessão 525/07/17 de 01.11.2007, o Protocolo de Pesquisa SDC 3065/07/140 **"Mapeamento de Peptídeos da Proteína de Choque Térmico HSP60 Potencialmente Imunorreguladores no Modelo Murino"**.

Aguardar aprovação da CAPPesq e do financiamento para iniciar o estudo. Solicitamos nos enviar cópia da aprovação dos recursos solicitados à agência de fomento, assim que possível. Caso o financiamento não seja aprovado ou não tenhamos recebido a carta de aprovação após o prazo de 120 dias, o pesquisador será convocado pela Comissão Científica para justificar-se.

Atenciosamente,

Selma C. Quaia Fortunato
Secretária da Comissão Científica
InCor - HC.FMUSP

Obs.: Lembramos que de acordo com a Res. 196 de 10/10/96, incisos IX.1 e 2, a responsabilidade do pesquisador é indelegável, indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais e cabe ao pesquisador apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa.

ANEXO 5- Aprovação Comitê de Ética CEP-IMT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 05 de dezembro de 2007.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Verônica Coelho
Faculdade de Medicina – U.S.P.

Prezada Senhora:

Em reunião realizada na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT) analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto catalogado sob no. 18/07 e intitulado "**Mapeamento de peptídeos da proteína de choque térmico Hsp60 potencialmente imunorreguladores no modelo murino**" a ser executado pela pós-graduanda **Anna Paula Sheppard Guembes**, sob orientação de Vossa Senhoria.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
Coordenador do CEP-IMT

ANEXO 6- Aprovação Comitê de Ética CAPPesq – HC

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05.12.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1095/07**, intitulado: "**MAPEAMENTO DE PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP60 POTENCIALMENTE IMUNORREGULADORES NO MODELO MURINO.**" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa.Dra. Verônica Coelho**

Pesquisador (a) Executante: **Anna Paula Sheppard Guembes**

CAPPesq, 05 de dezembro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Referências

7. REFERÊNCIAS

Akdis, C. A. T cells in health and disease. J Allergy Clin Immunol, v.123, n.5, May, p.1022-3. 2009.

Andersson, J. ; Tran, D. Q. ; Pesu, M. ; Davidson, T. S. ; Ramsey, H. ; O'shea, J. J. & Shevach, E. M. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. J Exp Med, v.205, n.9, Sep 1, p.1975-81. 2008.

Assessing the status of human immunology. Nat Immunol, v.9, n.6, Jun, p.569. 2008.

Awasthi, A. ; Murugaiyan, G. & Kuchroo, V. K. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. J Clin Immunol, v.28, n.6, Nov, p.660-70. 2008.

Barrat, F. J. ; Cua, D. J. ; Boonstra, A. ; Richards, D. F. ; Crain, C. ; Savelkoul, H. F. ; De Waal-Malefyt, R. ; Coffman, R. L. ; Hawrylowicz, C. M. & O'garra, A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. J Exp Med, v.195, n.5, Mar 4, p.603-16. 2002.

Binder, R. J. & Srivastava, P. K. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.16, Apr 20, p.6128-33. 2004.

Birk, O. S. ; Gur, S. L. ; Elias, D. ; Margalit, R. ; Mor, F. ; Carmi, P. ; Bockova, J. ; Altmann, D. M. & Cohen, I. R. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.9, Apr 27, p.5159-63. 1999.

Blair, P. J. ; Bultman, S. J. ; Haas, J. C. ; Rouse, B. T. ; Wilkinson, J. E. & Godfrey, V. L. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. J Immunol, v.153, n.8, Oct 15, p.3764-74. 1994.

Bresson, D. ; Togher, L. ; Rodrigo, E. ; Chen, Y. ; Bluestone, J. A. ; Herold, K. C. & Von Herrath, M. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. J Clin Invest, v.116, n.5, May, p.1371-81. 2006.

Burchill, M. A. ; Yang, J. ; Vogtenhuber, C. ; Blazar, B. R. & Farrar, M. A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. J Immunol, v.178, n.1, Jan 1, p.280-90. 2007.

Caldas, C. ; Luna, E. ; Spadafora-Ferreira, M. ; Porto, G. ; Iwai, L. K. ; Oshiro, S. E. ; Monteiro, S. M. ; Fonseca, J. A. ; Lemos, F. ; Hammer, J. ; Ho, P. L. ; Kalil, J. & Coelho, V. Cellular autoreactivity against heat shock protein 60 in renal transplant patients: peripheral and graft-infiltrating responses. Clin Exp Immunol, v.146, n.1,

Oct, p.66-75. 2006.

Caldas, C. ; Spadafora-Ferreira, M. ; Fonseca, J. A. ; Luna, E. ; Iwai, L. K. ; Kalil, J. & Coelho, V. T-cell response to self HSP60 peptides in renal transplant recipients: a regulatory role? Transplant Proc, v.36, n.4, May, p.833-5. 2004.

Calderwood, S. K. ; Mambula, S. S. ; Gray, P. J., Jr. & Theriault, J. R. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. FEBS Lett, v.581, n.19, Jul 31, p.3689-94. 2007.

Chen, Y. ; Kuchroo, V. K. ; Inobe, J. ; Hafler, D. A. & Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science, v.265, n.5176, Aug 26, p.1237-40. 1994.

Ciatto, C. ; Capitani, G. ; Tissot, A. C. ; Pecorari, F. ; Pluckthun, A. & Grutter, M. G. Structural analysis of mycobacterial and murine hsp60 epitopes in complex with the class I MHC molecule H-2Db. FEBS Lett, v.543, n.1-3, May 22, p.11-5. 2003.

Cohen-Sfady, M. ; Nussbaum, G. ; Pevsner-Fischer, M. ; Mor, F. ; Carmi, P. ; Zanin-Zhorov, A. ; Lider, O. & Cohen, I. R. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. J Immunol, v.175, n.6, Sep 15, p.3594-602. 2005.

Cohen, I. R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. Nat Rev Immunol, v.7, n.7, Jul, p.569-74. 2007.

Cohen, I. R. ; Quintana, F. J. & Mimran, A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. J Clin Invest, v.114, n.9, Nov, p.1227-32. 2004.

Cohen, I. R. & Young, D. B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immunol Today, v.12, n.4, Apr, p.105-10. 1991.

Collison, L. W. & Vignali, D. A. Interleukin-35: odd one out or part of the family? Immunol Rev, v.226, Dec, p.248-62. 2008.

Danke, N. A. ; Koelle, D. M. ; Yee, C. ; Beheray, S. & Kwok, W. W. Autoreactive T cells in healthy individuals. J Immunol, v.172, n.10, May 15, p.5967-72. 2004.

Davis, E. A. ; Wang, B. H. ; Stagg, C. A. ; Baldwin, W. M., 3rd ; Baumgartner, W. A. ; Sanfilippo, F. & Udelsman, R. Induction of heat shock protein in cardiac allograft rejection--a cyclosporine-suppressible response. Transplantation, v.61, n.2, Jan 27, p.279-84. 1996.

De Kleer, I. ; Vercoulen, Y. ; Klein, M. ; Meerding, J. ; Albani, S. ; Van Der Zee, R. ; Sawitzki, B. ; Hamann, A. ; Kuis, W. & Prakken, B. CD30 discriminates heat shock protein 60-induced FOXP3+ CD4+ T cells with a regulatory phenotype. J Immunol, v.185, n.4, Aug 15, p.2071-9. 2010.

Delaleu, N. ; Madureira, A. C. ; Immervoll, H. & Jonsson, R. Inhibition of

experimental Sjogren's syndrome through immunization with HSP60 and its peptide amino acids 437-460. Arthritis Rheum, v.58, n.8, Aug, p.2318-28. 2008.

Derbinski, J. ; Schulte, A. ; Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat Immunol, v.2, n.11, Nov, p.1032-9. 2001.

Duquesnoy, R. J. ; Moliterno, R. ; Qian, J. ; Donovan-Peluso, M. ; Pan, F. & Valdivia, L. Role of heat shock protein immunity in allograft rejection. Transplant Proc, v.27, n.1, Feb, p.468-70. 1995.

Elias, D. Efficacy Study of DiaPep277 in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Patients (DIA-AID) 2009a.

_____. Long-Term Treatment Effect of DiaPep277 in Type 1 Diabetes 2009b.

_____. Efficacy and Safety Study of DiaPep277 in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Adults (DIA-AID2) 2010.

Elias, D. & Cohen, I. R. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. Lancet, v.343, n.8899, Mar 19, p.704-6. 1994.

Elias, D. ; Meilin, A. ; Ablamunits, V. ; Birk, O. S. ; Carmi, P. ; Konen-Waisman, S. & Cohen, I. R. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. Diabetes, v.46, n.5, May, p.758-64. 1997.

Elias, D. & Palmer, J. Safety, Tolerability, Immunological and Clinical Efficacy of Multiple Subcutaneous Doses of DiaPep277 in Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) 2009.

Fontenot, J. D. ; Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol, v.4, n.4, Apr, p.330-6. 2003.

Fujinami, R. S. ; Von Herrath, M. G. ; Christen, U. & Whitton, J. L. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. Clin Microbiol Rev, v.19, n.1, Jan, p.80-94. 2006.

Gambineri, E. ; Torgerson, T. R. & Ochs, H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. Curr Opin Rheumatol, v.15, n.4, Jul, p.430-5. 2003.

Granja, C. ; Moliterno, R. A. ; Ferreira, M. S. ; Fonseca, J. A. ; Kalil, J. & Coelho, V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. Hum Immunol, v.65, n.2, Feb, p.124-34. 2004.

Greenwald, R. J. ; Boussiotis, V. A. ; Lorsbach, R. B. ; Abbas, A. K. & Sharpe, A. H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. Immunity, v.14, n.2, Feb, p.145-55. 2001.

Grohmann, U. ; Fallarino, F. ; Bianchi, R. ; Orabona, C. ; Vacca, C. ; Fioretti, M. C. & Puccetti, P. A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. J Exp Med, v.198, n.1, Jul 7, p.153-60. 2003.

Groux, H. ; O'garra, A. ; Bigler, M. ; Rouleau, M. ; Antonenko, S. ; De Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature, v.389, n.6652, Oct 16, p.737-42. 1997.

Habich, C. & Burkart, V. Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. Cell Mol Life Sci, v.64, n.6, Mar, p.742-51. 2007.

Habich, C. ; Kempe, K. ; Burkart, V. ; Van Der Zee, R. ; Lillicrap, M. ; Gaston, H. & Kolb, H. Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. FEBS Lett, v.568, n.1-3, Jun 18, p.65-9. 2004.

Habich, C. ; Kempe, K. ; Gomez, F. J. ; Lillicrap, M. ; Gaston, H. ; Van Der Zee, R. ; Kolb, H. & Burkart, V. Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. FEBS Lett, v.580, n.1, Jan 9, p.115-20. 2006.

Habich, C. ; Kempe, K. ; Van Der Zee, R. ; Rumenapf, R. ; Akiyama, H. ; Kolb, H. & Burkart, V. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. J Immunol, v.174, n.3, Feb 1, p.1298-305. 2005.

Henderson, B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. Cell Biochem Funct, v.28, n.1, Jan, p.1-14. 2010.

Huurman, V. A. ; Decochez, K. ; Mathieu, C. ; Cohen, I. R. & Roep, B. O. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. Diabetes Metab Res Rev, v.23, n.4, May, p.269-75. 2007.

Hwu, P. ; Du, M. X. ; Lapointe, R. ; Do, M. ; Taylor, M. W. & Young, H. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol, v.164, n.7, Apr 1, p.3596-9. 2000.

Isomura, I. ; Palmer, S. ; Grumont, R. J. ; Bunting, K. ; Hoyne, G. ; Wilkinson, N. ; Banerjee, A. ; Proietto, A. ; Gugasyan, R. ; Wu, L. ; Mcnally, A. ; Steptoe, R. J. ; Thomas, R. ; Shannon, M. F. & Gerondakis, S. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. J Exp Med, v.206, n.13, Dec 21, p.3001-14. 2009.

Jindal, K. K. ; Mcdougall, J. ; Woods, B. ; Nowakowski, L. & Goldstein, M. B. A study of the basic principles determining the performance of several high-flux

dialyzers. Am J Kidney Dis, v.14, n.6, Dec, p.507-11. 1989.

Kamradt, T. & Mitchison, N. A. Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med, v.344, n.9, Mar 1, p.655-64. 2001.

Klunker, S. ; Chong, M. M. ; Mantel, P. Y. ; Palomares, O. ; Bassin, C. ; Ziegler, M. ; Ruckert, B. ; Meiler, F. ; Akdis, M. ; Littman, D. R. & Akdis, C. A. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. J Exp Med, v.206, n.12, Nov 23, p.2701-15. 2009.

Komiyama, Y. ; Nakae, S. ; Matsuki, T. ; Nambu, A. ; Ishigame, H. ; Kakuta, S. ; Sudo, K. & Iwakura, Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol, v.177, n.1, Jul 1, p.566-73. 2006.

Lu, X. ; Chen, D. ; Endresz, V. ; Xia, M. ; Faludi, I. ; Burian, K. ; Szabo, A. ; Csanadi, A. ; Miczak, A. ; Gonczol, E. & Kakkar, V. Immunization with a combination of ApoB and HSP60 epitopes significantly reduces early atherosclerotic lesion in Apobtm2SgyLdlrtm1Her/J mice. Atherosclerosis, v.212, n.2, Oct, p.472-80. 2010.

Luna, E. ; Postol, E. ; Caldas, C. ; Benvenuti, L. A. ; Rodrigues, J. M., Jr. ; Lima, K. ; Kalil, J. & Coelho, V. Treatment with encapsulated Hsp60 peptide (p277) prolongs skin graft survival in a murine model of minor antigen disparity. Scand J Immunol, v.66, n.1, Jul, p.62-70. 2007.

Macian, F. ; Im, S. H. ; Garcia-Cozar, F. J. & Rao, A. T-cell anergy. Curr Opin Immunol, v.16, n.2, Apr, p.209-16. 2004.

Maier, T. ; Guell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett, v.583, n.24, Dec 17, p.3966-73. 2009.

Mantel, P. Y. ; Ouaked, N. ; Ruckert, B. ; Karagiannidis, C. ; Welz, R. ; Blaser, K. & Schmidt-Weber, C. B. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. J Immunol, v.176, n.6, Mar 15, p.3593-602. 2006.

Maron, R. ; Sukhova, G. ; Faria, A. M. ; Hoffmann, E. ; Mach, F. ; Libby, P. & Weiner, H. L. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Circulation, v.106, n.13, Sep 24, p.1708-15. 2002.

Martello, F. Hsp60 e imunorregulação: estratégias para a identificação de peptídeos imunorreguladores. . Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Martinez, F. O. ; Sica, A. ; Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci, v.13, p.453-61. 2008.

Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol, v.12, p.991-1045. 1994.

Mellor, A. L. ; Chandler, P. ; Baban, B. ; Hansen, A. M. ; Marshall, B. ; Pihkala, J. ; Waldmann, H. ; Cobbold, S. ; Adams, E. & Munn, D. H. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. Int Immunol, v.16, n.10, Oct, p.1391-401. 2004.

Mellor, A. L. & Munn, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? Immunol Today, v.20, n.10, Oct, p.469-73. 1999.

_____. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol, v.4, n.10, Oct, p.762-74. 2004.

Michaelsson, J. ; Teixeira De Matos, C. ; Achour, A. ; Lanier, L. L. ; Karre, K. & Soderstrom, K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. J Exp Med, v.196, n.11, Dec 2, p.1403-14. 2002.

Mimran, A. ; Mor, F. ; Carmi, P. ; Quintana, F. J. ; Rotter, V. & Cohen, I. R. DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiergotypic response. J Clin Invest, v.113, n.6, Mar, p.924-32. 2004.

Moliterno, R. ; Valdivia, L. ; Pan, F. & Duquesnoy, R. J. Heat shock protein reactivity of lymphocytes isolated from heterotopic rat cardiac allografts. Transplantation, v.59, n.4, Feb 27, p.598-604. 1995.

Mor, F. ; Reizis, B. ; Cohen, I. R. & Steinman, L. IL-2 and TNF receptors as targets of regulatory T-T interactions: isolation and characterization of cytokine receptor-reactive T cell lines in the Lewis rat. J Immunol, v.157, n.11, Dec 1, p.4855-61. 1996.

Moudgil, K. D. & Sercarz, E. E. Understanding crypticity is the key to revealing the pathogenesis of autoimmunity. Trends Immunol, v.26, n.7, Jul, p.355-9. 2005.

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

Munn, D. H. ; Zhou, M. ; Attwood, J. T. ; Bondarev, I. ; Conway, S. J. ; Marshall, B. ; Brown, C. & Mellor, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science, v.281, n.5380, Aug 21, p.1191-3. 1998.

Murai, M. ; Turovskaya, O. ; Kim, G. ; Madan, R. ; Karp, C. L. ; Cheroutre, H. & Kronenberg, M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. Nat Immunol, v.10, n.11, Nov, p.1178-84. 2009.

Niedbala, W. ; Wei, X. Q. ; Cai, B. ; Hueber, A. J. ; Leung, B. P. ; Mcinnes, I. B. &

Liew, F. Y. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. Eur J Immunol, v.37, n.11, Nov, p.3021-9. 2007.

Nussbaum, G. ; Zanin-Zhorov, A. ; Quintana, F. ; Lider, O. & Cohen, I. R. Peptide p277 of HSP60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis. Int Immunol, v.18, n.10, Oct, p.1413-9. 2006.

Oldenhove, G. ; Bouladoux, N. ; Wohlfert, E. A. ; Hall, J. A. ; Chou, D. ; Dos Santos, L. ; O'brien, S. ; Blank, R. ; Lamb, E. ; Natarajan, S. ; Kastenmayer, R. ; Hunter, C. ; Grigg, M. E. & Belkaid, Y. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. Immunity, v.31, n.5, Nov 20, p.772-86. 2009.

Oltean, M. ; Dindelegan, G. ; Kurlberg, G. ; Nilsson, O. ; Karlsson-Parra, A. & Olausson, M. Intragraft heat shock protein-60 expression after small bowel transplantation in the mouse. Transplant Proc, v.36, n.2, Mar, p.350-2. 2004.

Osterloh, A. ; Veit, A. ; Gessner, A. ; Fleischer, B. & Breloer, M. Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. Int Immunol, v.20, n.3, Mar, p.433-43. 2008.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.

Phipps, P. A. ; Stanford, M. R. ; Sun, J. B. ; Xiao, B. G. ; Holmgren, J. ; Shinnick, T. ; Hasan, A. ; Mizushima, Y. & Lehner, T. Prevention of mucosally induced uveitis with a HSP60-derived peptide linked to cholera toxin B subunit. Eur J Immunol, v.33, n.1, Jan, p.224-32. 2003.

Pockley, A. G. ; Bulmer, J. ; Hanks, B. M. & Wright, B. H. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. Cell Stress Chaperones, v.4, n.1, Mar, p.29-35. 1999.

Pockley, A. G. ; Shepherd, J. & Corton, J. M. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. Immunol Invest, v.27, n.6, Dec, p.367-77. 1998.

Quintana, F. J. ; Carmi, P. ; Mor, F. & Cohen, I. R. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. J Immunol, v.171, n.7, Oct 1, p.3533-41. 2003.

Quintana, F. J. & Cohen, I. R. HSP60 speaks to the immune system in many voices. Novartis Found Symp, v.291, p.101-11; discussion 111-4, 137-40. 2008.

Quintana, F. J. ; Mimran, A. ; Carmi, P. ; Mor, F. & Cohen, I. R. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. PLoS ONE, v.3, n.12, p.e4026. 2008.

Rudra, D. ; Egawa, T. ; Chong, M. M. ; Treuting, P. ; Littman, D. R. & Rudensky, A. Y. Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. Nat Immunol, v.10, n.11, Nov, p.1170-7. 2009.

Sarri, S. ; Shaw, S. M. ; Gieschen-Krische, M. A. ; Archer, L. ; Yonan, N. & Fildes, J. E. Myocardial heat shock protein 60 expression is upregulated following acute cardiac rejection. Transpl Immunol, v.21, n.3, Jul, p.140-2. 2009.

Socorro-Silva, A. Papel das células dendríticas no direcionamento funcional da auto-reatividade celular à HSP60, no sistema humano. Alergia e Imunologia, Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Sun, X. ; Yamada, H. ; Shibata, K. ; Muta, H. ; Tani, K. ; Podack, E. R. & Yoshikai, Y. CD30 ligand/CD30 plays a critical role in Th17 differentiation in mice. J Immunol, v.185, n.4, Aug 15, p.2222-30. 2010.

Tang, J. L. ; Subbotin, V. M. ; Antonysamy, M. A. ; Troutt, A. B. ; Rao, A. S. & Thomson, A. W. Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection. Transplantation, v.72, n.2, Jul 27, p.348-50. 2001.

Terness, P. ; Bauer, T. M. ; Rose, L. ; Dufter, C. ; Watzlik, A. ; Simon, H. & Opelz, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. J Exp Med, v.196, n.4, Aug 19, p.447-57. 2002.

Theriault, J. R. ; Mambula, S. S. ; Sawamura, T. ; Stevenson, M. A. & Calderwood, S. K. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. FEBS Lett, v.579, n.9, Mar 28, p.1951-60. 2005.

Trieb, K. ; Grubeck-Loebenstein, B. ; Eberl, T. & Margreiter, R. T cells from rejected human kidney allografts respond to heat shock protein 72. Transpl Immunol, v.4, n.1, Mar, p.43-5. 1996.

Tsan, M. F. & Gao, B. Cytokine function of heat shock proteins. Am J Physiol Cell Physiol, v.286, n.4, Apr, p.C739-44. 2004.

Van Eden, W. Immunoregulation of autoimmune diseases. Hum Immunol, v.67, n.6, Jun, p.446-53. 2006.

Van Puijvelde, G. H. ; Van Es, T. ; Van Wanrooij, E. J. ; Habets, K. L. ; De Vos, P. ; Van Der Zee, R. ; Van Eden, W. ; Van Berkel, T. J. & Kuiper, J. Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.27, n.12, Dec, p.2677-83. 2007.

Vanderlugt, C. J. & Miller, S. D. Epitope spreading. Curr Opin Immunol, v.8, n.6, Dec, p.831-6. 1996.

Verhasselt, V. ; Vosters, O. ; Beuneu, C. ; Nicaise, C. ; Stordeur, P. & Goldman, M. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. Eur J Immunol, v.34, n.3, Mar, p.762-72. 2004.

Verstrepen, L. ; Verhelst, K. ; Van Loo, G. ; Carpentier, I. ; Ley, S. C. & Beyaert, R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). Biochem Pharmacol, Jul 3. 2010.

Visekruna, A. ; Huber, M. ; Hellhund, A. ; Bothur, E. ; Reinhard, K. ; Bollig, N. ; Schmidt, N. ; Joeris, T. ; Lohoff, M. & Steinhoff, U. c-Rel is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells. Eur J Immunol, v.40, n.3, Mar, p.671-6. 2010.

Volsi, E. Células dendríticas e a proteína de choque térmico 60KDA (HSP60): estratégias para imunorregulação do sistema imune murino. Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Walker, L. S. ; Chodos, A. ; Eggena, M. ; Dooms, H. & Abbas, A. K. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. J Exp Med, v.198, n.2, Jul 21, p.249-58. 2003.

Wang, X. ; Zhou, S. ; Chi, Y. ; Wen, X. ; Hoellwarth, J. ; He, L. ; Liu, F. ; Wu, C. ; Dhesi, S. ; Zhao, J. ; Hu, W. & Su, C. CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from Schistosoma japonicum is TLR2 dependent. Eur J Immunol, v.39, n.11, Nov, p.3052-65. 2009.

Wei, J. ; Duramad, O. ; Perng, O. A. ; Reiner, S. L. ; Liu, Y. J. & Qin, F. X. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.46, Nov 13, p.18169-74. 2007.

Wing, K. ; Fehervari, Z. & Sakaguchi, S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. Int Immunol, v.18, n.7, Jul, p.991-1000. 2006.

Wing, K. ; Onishi, Y. ; Prieto-Martin, P. ; Yamaguchi, T. ; Miyara, M. ; Fehervari, Z. ; Nomura, T. & Sakaguchi, S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science, v.322, n.5899, Oct 10, p.271-5. 2008.

Wing, K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. Nat Immunol, v.11, n.1, Jan, p.7-13. 2010.

Wolf, S. F. ; Temple, P. A. ; Kobayashi, M. ; Young, D. ; Dicig, M. ; Lowe, L. ; Dzialo, R. ; Fitz, L. ; Ferenz, C. ; Hewick, R. M. & Et Al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. J Immunol, v.146, n.9, May 1, p.3074-81. 1991.

Xie, J. ; Zhu, H. ; Guo, L. ; Ruan, Y. ; Wang, L. ; Sun, L. ; Zhou, L. ; Wu, W. ; Yun,

X. ; Shen, A. & Gu, J. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 delivers heat shock protein 60-fused antigen into the MHC class I presentation pathway. J Immunol, v.185, n.4, Aug 15, p.2306-13. 2010.

Yao, Z. ; Kanno, Y. ; Kerenyi, M. ; Stephens, G. ; Durant, L. ; Watford, W. T. ; Laurence, A. ; Robinson, G. W. ; Shevach, E. M. ; Moriggl, R. ; Hennighausen, L. ; Wu, C. & O'shea, J. J. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. Blood, v.109, n.10, May 15, p.4368-75. 2007.

Zanin-Zhorov, A. ; Bruck, R. ; Tal, G. ; Oren, S. ; Aeed, H. ; Hershkoviz, R. ; Cohen, I. R. & Lider, O. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. J Immunol, v.174, n.6, Mar 15, p.3227-36. 2005.

Zanin-Zhorov, A. ; Cahalon, L. ; Tal, G. ; Margalit, R. ; Lider, O. & Cohen, I. R. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. J Clin Invest, v.116, n.7, Jul, p.2022-32. 2006.

Zanin-Zhorov, A. ; Nussbaum, G. ; Franitza, S. ; Cohen, I. R. & Lider, O. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. Faseb J, v.17, n.11, Aug, p.1567-9. 2003.

Zeiser, R. ; Nguyen, V. H. ; Hou, J. Z. ; Beilhack, A. ; Zambricki, E. ; Buess, M. ; Contag, C. H. & Negrin, R. S. Early CD30 signaling is critical for adoptively transferred CD4+CD25+ regulatory T cells in prevention of acute graft-versus-host disease. Blood, v.109, n.5, Mar 1, p.2225-33. 2007.

Zhang, F. ; Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. Nat Immunol, v.9, n.11, Nov, p.1297-306. 2008.