

ROBERTO PEREIRA GONZALEZ

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS: VIAS DE
SINALIZAÇÃO E EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O FENÓTIPO E
FUNÇÃO DE CÉLULAS GERADAS *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2014

ROBERTO PEREIRA GONZALEZ

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS: VIAS DE
SINALIZAÇÃO E EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O FENÓTIPO E
FUNÇÃO DE CÉLULAS GERADAS *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Gonzalez, Roberto Pereira.

Diferenciação de células mononucleares do sangue periférico humano em células dendríticas: vias de sinalização e efeitos da melatonina sobre o fenótipo e função de células geradas in vitro / Roberto Pereira Gonzalez. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Células Dendríticas.

Versão do título para o inglês: Differentiation of human peripheral blood mononuclear cells into dendritic cells: signaling pathways and melatonin effects on phenotype and function of in vitro generated cells.

1. Células Dendríticas 2. Melatonina 3. Monócitos 4. Citocinas
5. Diferenciação 6. Ativação I. Barbuto, Prof. Dr. José Alexandre
Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB063/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Roberto Pereira Gonzalez.

Título da Tese: Diferenciação de células mononucleares do sangue periférico humano em células dendríticas: vias de sinalização e efeitos da melatonina sobre o fenótipo e função de células geradas in vitro.

Orientador(a): Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbutto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 12 de dezembro de 2007.

PARECER 820/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 81ª reunião realizada em 11.12.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Diferenciação de células mononucleares do sangue periférico humano em células dendríticas: vias de sinalização e efeitos da melatonina sobre o fenótipo e função de células geradas In Vitro"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **12 de dezembro de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
Roberto Pereira Gonzalez
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Dedico este trabalho à minha esposa, a pessoa mais importante neste processo, minha companheira e amiga, cujo apoio foi a viga mestra que sempre me motivou e encorajou, em todos os momentos.

Aos meus pais: Ivan que em sua fase produtiva foi analista químico e com suas histórias e relatos me instigou a conhecer o trabalho de laboratório e me direcionar para o mundo das ciências em geral e Nair que, no aprendizado das primeiras letras, foi persistente em me dar suporte diante das adversidades. A palavra obrigado jamais conterà toda a gratidão que tenho por tudo que até hoje me proporcionam.

À minha querida tia Laurinda Pereira da Silva (*in memorian*) que se foi antes da conclusão deste trabalho, mas cuja participação, mesmo que de modo indireto, ainda se manifesta vivamente.

Aos meus irmãos Rafael e Delma; minhas cunhadas Eliane e Magda; meu cunhado Cláudio; minhas sobrinhas Débora, Mariana, Gabriela, Manuelinha e Camila; os sobrinhos Daniel, Victor e Arthur. Primeiro meu pedido de desculpas pelas ausências. E um obrigado especial por fazer parte da vida de vocês.

À Toshiko Uessugui (*Batian, in memorian*) que sempre incentivou seu “neto” a estudar.

À Keiko Uessugui pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Uma pessoa foi determinante para que eu trilhasse esse caminho. Alguém que fez adaptações e sobretudo acreditou em meu potencial, meu orientador. Espero que esse agradecimento possa traduzir a minha gratidão, por tudo. Obrigado!

À minha amiga de longa data, Patrícia Cruz Bergami-Santos cujo incentivo e conversas totalmente descontraídas foram importantes em alguns momentos críticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro.

Ao meu grande amigo e companheiro de longas conversas filosóficas João Carlos Violardi Lopes e toda sua família pelo apoio, principalmente nos momentos mais tensos, nos quais me deram suporte e me ajudaram quer direta ou indiretamente a transpor os obstáculos.

À Elaine Cichiello por sua amizade sincera e pelo seu apoio ao longo de muitos anos.

Ao Dr. J. Geraldo Beggiato, um grande entusiasta das ciências, mas, acima de tudo, um excelente profissional, sempre competente em me ajudar e me colocar de novo na luta. Considero-o um verdadeiro amigo que me ajudou a escolher o caminho. Longe de lhe faltar com o respeito, tenho que dizer: “Você é o cara!”

À Andrea Glatt, por seu suporte e muito mais pelos anos de amizade, que proporcionaram que minha estada se tornasse muito mais agradável.

Para um casal promissor, Cristiano Jacob de Moraes e Nathalia Cruz de Vito que sempre doaram seu tempo ajudando aqui e ali ou só proseando. É pouco dizer obrigado, mas ainda é cedo e nossa amizade vai durar muito.

À Dra. Dóris Ricci por todo o apoio ao longo de minha ainda breve história acadêmica.

À amiga Keide Melo cuja simpatia atinge a todos ao seu redor e transforma nosso ambiente.

À Érica Akemi Kavati com quem cursei algumas disciplinas que rendeu uma boa amizade.

À Giovana Toledo Alonso que ao longo dos anos de amizade sempre manifestou seu apoio.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia de Tumores: Ana Carolina, Cecilia, Karen, Maria, Claudinha, Bruna, Isabela, Rodrigo e Célia, vocês todos são especiais pois, de alguma forma, participaram de um momento de minha vida, e em muitos deles proporcionando boas risadas e experiências enriquecedoras, obrigado a todos vocês.

Ao amigo Fernando de Sá Silva por todas as conversas filosóficas, científicas e as não científicas que tivemos e que possibilitaram momentos de descontração, sem os quais o que era difícil poderia se tornar impossível.

À toda a Secretaria da Biotecnologia: Eliane, Fabia e Marcos um obrigado especial a todos vocês que sempre, com dedicação, amizade e profissionalismo, moveram montanhas para ajudar neste longo processo, principalmente nas etapas finais.

Ao pessoal da Biblioteca do ICB, que me auxiliaram muito durante todos estes anos, com amizade e dedicação, em especial à Renata, Edilson, Delza, Jaci, Monica e demais membros da biblioteca que participaram direta ou indiretamente da minha empreitada.

À Claudia Iwashita pela amizade.

À Lucila e a Mayara que embora não estejam mais no laboratório proporcionaram momentos enriquecedores, assim como os que um dia pertenceram ao Laboratório de Imunologia de Tumores e cujos caminhos cruzados ao meu proporcionaram boas experiências.

A um outro casal afinado, Cris e Leandro. Conversar com vocês é sempre muito bom e ajudou muito a passar pelas pedras.

Ao pessoal do ICB IV: Eni, Jotelma, Amanda, Aurea, Marlene, Sandra, Beth, Moisés, Andrés, Márcio, Otacílio, Milton, Nelson, Ailton, Delman, Juscelino, e, minhas desculpas se não me lembrei do nome de todos, mas a todos vocês meu muito obrigado pela convivência.

Aos membros de minha banca de qualificação, Professora Doutora Maria Lúcia Zaidan Dagli, Professora Doutora Aurora Marques Cianciarullo e Professora Doutora Ana Paula Lepique, por suas participações.

À todas as enfermeiras do Serviço de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz em especial Maria Matilde Ruela, Ester de Almeida Pina, Adriana, Shirley Mendonça Lima, Silvely e todas as demais atendentes que contribuíram muito para o bom andamento de meu trabalho.

Ao Dr. Joselito Bomfim Brandão responsável pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

Ao Professor Doutor Bayardo Baptista Torres que me mostrou que ensinar é enriquecedor.

Às Professoras Monamaris Marques Borges e Marta de Oliveira Domingos pelos ensinamentos.

À professora Itamar Ruiz que contribuiu com meu aprendizado e sempre estimulou a busca pelo conhecimento, fiquei muito honrado em conhecê-la e estimulado por suas aulas agradáveis.

Ao professor Aldo Tonso que sempre acreditou na interdisciplinaridade e que não há barreiras para transmissão do conhecimento.

Aos recém conhecidos companheiros de trabalho, Adilson Kleber, Ricardo, Ariane e Sarah pelo aprendizado.

“Não se mede o estudo pelo número de páginas lidas numa noite ou pela quantidade de livros lidos num semestre. Estudar não é um ato de consumir ideias, mas de criá-las e recriá-las”.

Paulo Freire

“A pesquisa básica é como atirar uma flecha ao ar e, onde quer que ela caia, pintar um alvo”.

Homer Adkins

RESUMO

GONZALEZ, R. P. **Diferenciação de células mononucleares do sangue periférico humano em células dendríticas: vias de sinalização e efeitos da melatonina sobre o fenótipo e função de células geradas *in vitro***. 2014. 131 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A melatonina (MLT) é um hormônio responsável pela regulação dos ritmos circadianos, que exibe outros efeitos como a modulação de células do sistema imunológico em diferentes espécies, incluindo os seres humanos. Ela estimula a ativação de monócitos, aumenta a capacidade de apresentação de antígenos, a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e de citocinas. Este estudo pretendeu avaliar os efeitos da MLT sobre monócitos durante o processo de obtenção de células dendríticas (DCs), um fenômeno com diversas aplicações biotecnológicas. Para tanto, a MLT foi adicionada em diferentes concentrações, por duas horas, a monócitos em etapa de adesão, antes da adição das citocinas, IL-4 e GM-CSF, indutoras da diferenciação dos monócitos em DCs. A MLT provocou aumento de moléculas do MHC de classe II (HLA-DR), CD11c, CD86, CD83, CD209 e dos receptores para citocinas GM-CSF, IL-4 e TNF- α nos monócitos tratados. Nestas células a MLT provocou, também, aumento de ERK-1 e -2 e STAT-5 fosforiladas, mas não de STAT-6. Já as DCs geradas sob ação da MLT, não apresentaram mudança em ERK-1 e -2 fosforiladas, tiveram redução de STAT-5 fosforilada, mas elevação de STAT-6 fosforilada, além de aumento de expressão de CD80, CD40 e CD83. Em sobrenadantes de DCs imaturas geradas sob ação da MLT detectou-se mais IL-6, IL-8 e IL-10, e IL-6, IL-8 e TNF- α nos de DCs maduras. A MLT aumentou a capacidade de estimulação linfocitária das DCs e, nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos e DCs maduras, houve aumento das concentrações de IL-4, IL-10 e IFN- γ e diminuição de IL-2, IL-6 e TNF- α . A fim de avaliar se o aumento de receptor de IL-4 em monócitos, provocado pela MLT, poderia permitir o uso de menores concentrações desta citocina e, assim, economia na geração *in vitro* de DCs, concentrações reduzidas de IL-4 foram utilizadas em ensaios para geração destas células. Observou-se que, sob ação da MLT, já 3,125 ng/ml de IL-4 foram capazes de induzir a diferenciação de DCs com fenótipo equivalente ao obtido com o uso da concentração-padrão, de 50 ng/ml, de IL-4 (avaliado pela expressão de CD11c, HLA-DR, CD209, CD80, CD86, CD40, CD83 e CD274). Além do mais, estas DCs mantiveram tendência a provocar aumento do índice de proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+. Entre os linfócitos CD4+ notou-se, também, aumento de células CD279+. Populações duplo positivas CD4 e CD25 também se mantiveram elevadas, mas houve redução de células CD4+CD25+FoxP3+ quando comparadas às células estimuladas por DCs geradas com a concentração padrão de IL-4. Ainda, houve elevação da população CD4+ Tbet+, indicativo de padrão Th-1, e diminuição da população CD4+ Gata-3+ (Th-2). Concomitantemente, houve detecção de IFN- γ e acentuada queda na concentração de IL-4, citocinas típicas dos padrões Th-1 e Th-2, respectivamente. O uso do inibidor de MLT (Luzindol) inibiu parcialmente alguns dos efeitos induzidos pela MLT, mas, paradoxalmente, potencializou outros.

Palavras-chave: Células dendríticas. Melatonina. Monócitos. Citocinas. Diferenciação. Ativação.

ABSTRACT

GONZALEZ, R. P. **Differentiation of human peripheral blood mononuclear cells into dendritic cells: signaling pathways and melatonin effects on phenotype and function of in vitro generated cells.** 2014. 131 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Melatonin (MLT) is a hormone responsible for the circadian rhythm regulation, and presents other effects, such as modulation of immune system cells, in different species, including human beings. It stimulates monocytes activation, enhances antigen presentation, lymphocyte proliferation, antibodies and cytokines production. This study intended to evaluate the effects of MLT over the monocytes differentiation into dendritic cells (DCs), a phenomenon with various biotechnological applications. For that, MLT was added, at different concentrations, during two hours, to monocytes in the adhesion stage, before the IL-4 and GM-CSF cytokine supplementation. MLT caused enhanced expression of class II MHC molecules (HLA-DR), CD11c, CD86, CD83, CD209 and of the IL-4, GM-CSF and TNF- α cytokine receptors, by the treated monocytes. In these cells, MLT induced, also, increases of p-ERK-1 and -2 and of p-STAT-5, but not found of p-STAT-6. On the other hand, on DCs generated under MLT, there were no changes in p-ERK-1 -2, reduction of p-STAT-5, but an increase of p-STAT-6, besides the enhanced expression of CD80, CD40 and CD83. In culture supernatants of immature DCS generated under MLT, higher levels of IL-6, IL-8 and IL-10 were detected, while in mature DCs' supernatant, we detected more IL-6, IL-8 and TNF- α . MLT increased the ability of DCs to stimulate lymphocytes proliferation and, in the supernatants of mature DCs and lymphocytes co-cultures there were increases in the IL-4, IL-10 and IFN- γ and decreases in IL-2, IL-6 and TNF- α . In order to investigate if the enhanced presence of IL-4 receptors by MLT-treated monocytes would allow the use of reduced doses of this cytokine, and thus, economy in the *in vitro* generation of these cells, lower concentrations of IL-4 were evaluated in DC generation assays. Indeed, already 3.125 ng/ml were able to induce the differentiation of DCs with an equivalent phenotype to that obtained with the standard IL-4 concentration, 50 ng/ml (as evaluated by the expression of CD11c, HLA-DR, CD209, CD80, CD86, CD40, CD83 and CD274). Furthermore, these DCs maintained the tendency to enhance the lymphocyte proliferation rate of both CD4+ and CD8+ T cells. Among CD4+ cells an increase in CD279+ cells was also noted. Double positive cells for CD4 and CD25 were also enhanced, but CD4+CD25+FoxP3+ cells were reduced when compared to the response induced by DCs generated by the standard IL-4 concentration. There was an increase of CD4+ Tbet+ cells (Th1 pattern), and a diminished CD4+ Gata-3+ population (Th2 pattern). In parallel, IFN- γ was detected, as was an expressive diminution of IL-4, cytokines related to Th1 and Th2 lymphocytes, respectively. The use of a MLT inhibitor (Luzindol) inhibited some of the MLT effects but, paradoxically, enhanced others.

Keywords: Dendritic cells. Melatonin. Monocytes. Cytokines. Differentiation. Activation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Dot plots</i> representativos do padrão da população e os respectivos <i>gates</i> realizados para análise do fenótipo das células obtidas após 5 dias.....	43
Figura 2 -	<i>Dot plots</i> representativos do padrão da população e os respectivos <i>gates</i> realizados para análise do fenótipo das células após 7 dias.....	47
Figura 3 -	<i>Dot plots</i> e histogramas representativos do padrão da população e das frequências e índices de MFI para a molécula CD209.....	52
Figura 4 -	<i>Dot plots</i> representativos do padrão da população de monócitos analisados antes e após a etapa de adesão com ou sem MLT.....	53
Figura 5 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD11c nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	59
Figura 6 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de HLA-DR nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	60
Figura 7 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD80 nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	61
Figura 8 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD86 nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	62
Figura 9 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD40 nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	63
Figura 10 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD209 nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	65
Figura 11 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD83 nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração).....	66

Figura 12 -	Produção de citocinas (IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) por DCs imaturas, analisada através do sobrenadante de culturas que receberam MLT nas concentrações de 10 pM, 1nM e 100 μ M na etapa de adesão de duas horas, seguido de citocinas GM-CSF e IL-4, ou somente as citocinas (sem MLT), ou monócitos mantidos em meio de cultura (sem citocinas ou MLT).....	68
Figura 13 -	Produção de citocinas (IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) por DCs maduras, analisada através do sobrenadante de culturas que receberam ou não MLT nas concentrações de 10 pM, 1 nM e 100 μ M na etapa de adesão de duas horas, seguido de citocinas GM-CSF e IL-4 até o 5° dia e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia ou Monócitos mantidos em meio de cultura sem citocinas ou MLT	70
Figura 14 -	Índice de proliferação de linfócitos (ly) mantidos em co-cultura com DCs, por um período de 5 dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC), e suas respectivas frequências (%) em um experimento representativo.....	71
Figura 15 -	Produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) por Lys T em co-cultura com DCs maduras que receberam MLT nas concentrações de 10 pM, 1 nM e 100 μ M na etapa de adesão de 2 horas, seguido de citocinas GM-CSF e IL-4 até o quinto dia e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia (indicadas por DC MLT e a respectiva concentração) ou que receberam somente citocinas (indicadas por DC Cito) ou células mantidas unicamente em meio de cultura, sem citocinas ou MLT (Mono D7).....	74
Figura 16 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD11c nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	75
Figura 17 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de HLA-DR nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	76
Figura 18 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD209 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	77
Figura 19 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD14 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e	

	ativadora (TNF- α).....	78
Figura 20 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD80 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	79
Figura 21 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD86 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	80
Figura 22 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD40 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	81
Figura 23 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD83 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	82
Figura 24 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD274 nas células que receberam MLT ou não (__)durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α).....	83
Figura 25 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de HLA-DR nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	85
Figura 26 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD11c nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	86
Figura 27 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD80 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em	

	concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	87
Figura 28 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD86 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	89
Figura 29 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD40 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	90
Figura 30 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD83 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	91
Figura 31 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD209 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	92
Figura 32 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD14 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	93
Figura 33 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD274 nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo da figura em cada grupo.....	94
Figura 34 -	Frequência e Índice de proliferação de linfócitos (ly) mantidos em co-cultura com DCs. DCs foram co-cultivadas com Lys por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC).....	96
Figura 35 -	Porcentagem e índices de MFI de Lys positivos para CD4 que	

	proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC).....	97
Figura 36 -	Porcentagem e índices de MFI de Lys positivos para CD8 que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	98
Figura 37 -	Porcentagem e índices de MFI de Lys duplo positivos para CD4 e CD279 presentes na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	100
Figura 38 -	Porcentagem e índices de MFI de Lys duplo positivos para CD8 e CD279 presentes na população de Lys CD8+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	101
Figura 39 -	Porcentagem e índices de MFI de Lys duplo positivos para CD4 e CD25 presentes na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4	102
Figura 40 -	Porcentagem e Índice de MFI de Lys CD4+CD25+FoxP3+ encontrados na população de Lys CD4+CD25+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	103
Figura 41 -	Porcentagem e Índice de MFI de Lys positivos para CD4 e Tbet encontrados na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	104
Figura 42 -	Porcentagem e Índice de MFI de Lys positivos para CD4 e Gata-3 encontrados na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	105
Figura 43 -	Produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-17) por Lys T que proliferaram sob estímulo de DCs maduras obtidas em concentrações diferentes de IL-4.....	107
Figura 44 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de CD14 em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão.....	108

- Figura 45 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **ERK 1/2 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão..... 110
- Figura 46 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-5 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão..... 111
- Figura 47 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-6 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão..... 113
- Figura 48 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-6 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão..... 114
- Figura 49 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **ERK 1/2 fosforilada** em células após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4 50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DC MLT IL4-50) ou com MLT

	+ IL-4 3,125 ng/mL (DC MLT IL4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas.....	115
Figura 50 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de STAT-5 fosforilada em células após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4 50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DC MLT IL4-50) ou com MLT + IL-4 3,125 ng/mL (DC MLT IL4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas.....	116
Figura 51 -	Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de STAT-6 fosforilada em células após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4 50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DC MLT IL4-50) ou com MLT + IL-4 3,125 ng/mL (DC MLT IL4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas.....	117
Figura 1A -	Morfologia de células dendríticas (DCs) observadas em cultura no sétimo dia por meio microscópio óptico invertido e microscópio de fluorescência.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência e Índice de MFI em culturas de monócitos mantidas por cinco dias para geração de imDCs.....	46
Tabela 2	Frequência e Índice de MFI em culturas de monócitos mantidas por 7 dias para geração de mDCs.....	48
Tabela 3	Frequência e Índice de MFI de Monócitos após adesão por 2 horas em diferentes concentrações de MLT.....	57
Tabela 4	Índice de Proliferação e Frequência de Lys Alogênicos após co-cultura.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula apresentadora de antígenos do inglês *Antigen Presenting Cell*

CD – *Cluster of differentiation*

CTLA-4 – Receptor de alta afinidade em Lys T para ligação de CD80 e CD86

DC – Células dendríticas, do inglês *Dendritic Cells*

DLC – Células semelhantes a dendríticas, do inglês *Dendritic Like Cells*

ERK – Extracellular signal-regulated protein kinase

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*

GM-CSF-R – Receptor para o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (CD116)

HLA-ABC – Antígeno leucocitário humano, do inglês *Human Leucocyte Antigen* (ABC pertence ao MHC de classe I)

HLA-DR - Antígeno leucocitário humano do, inglês *Human Leucocyte Antigen* (DR pertence ao MHC de classe II)

IFN- γ – Interferon gama

IL-10 – Interleucina 10

IL-12p70 – Interleucina 12p70

IL-17 – Interleucina 17

IL-23 – Interleucina 23

IL-4 – Interleucina 4

IL-4-R – Receptor para interleucina-4 (CD124)

Jak – Janus activated Kinase

Ly – Linfócito do inglês *Lymphocyte*

MFI- Intensidade média de fluorescência, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Hystocompatibility Complex*

MLT – Melatonina

MT1A – Receptor 1 de membrana para a Melatonina

MT1B – Receptor 2 de membrana para a Melatonina

NF- κ B – Fator nuclear kappa B do inglês *Nuclear Factor kappa B*

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

R-10 – Meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino

ROR- α 1 – Retinoid-related orphan receptor do tipo alfa-1 – Receptor nuclear para MLT

RPMI – Tipo de meio de cultura simples sem suplementação

SFB – Soro fetal bovino

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição, do inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription*

TNF- α – Fator alfa de necrose tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor-alpha*

TNF- α -R – Receptor para o fator alfa de necrose tumoral (CD120)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	24
1.1 Objetivos.....	30
1.2 Objetivos específicos.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 Casuística.....	31
2.2 Isolamento de células mononucleares.....	31
2.3 Cultura para diferenciação/ativação de células dendríticas.....	31
2.4 Coleta e análise fenotípica das células.....	33
2.5 Separação imunomagnética de linfócitos.....	34
2.6 Avaliação da função aloestimuladora.....	35
2.7 Avaliação da presença de citocinas nos sobrenadantes.....	36
2.8 Análise de moléculas presentes no citoplasma por meio de Citometria.....	37
2.9 Análise de fatores de transcrição presentes em Lys por meio de Citometria Intracelular.....	38
2.10 Determinação de citocinas através de ensaio imunoenzimático do tipo Elisa.....	38
2.11 Caracterização da morfologia de DCs por meio de microscopia de fluorescência.....	39
2.12 Análise Estatística.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1 Obtenção e caracterização das células mononucleares após sete dias de cultura com melatonina (dados não mostrados).....	41
3.2 Caracterização das células mononucleares após cinco dias de cultura com as concentrações selecionadas de melatonina.....	43
3.3 Caracterização das células mononucleares após sete dias de cultura com as concentrações selecionadas de melatonina.....	47

3.4 Caracterização das células mononucleares após duas horas de adesão em meio de cultura com suplementação de MLT.....	52
3.5 Caracterização das DCs obtidas após permanência das PBMCs por duas horas em meio contendo MLT nas concentrações de 10 pM, 1 nM e 100 µM.....	58
3.6 Perfil das citocinas produzidas durante culturas de DCs imaturas.....	67
3.7 Perfil das citocinas produzidas pelas mDCs após adição de TNF-α no 5° e mantida até o 7° dia cultura.....	68
3.8 Caracterização funcional das DCs obtidas sob ação da MLT por meio de co-cultura com linfócitos.....	70
3.9 Perfil das citocinas produzidas pelos linfócitos T alogênêicos mantidos em co-cultura com as mDCs por cinco dias.....	72
3.10 Caracterização do fenótipo de membrana de células cultivadas com doses reduzidas de IL-4.....	74
3.11 Caracterização do fenótipo de membrana de células submetidas ao inibidor de MLT Luzindol e cultivadas com 3,125 ng/mL de IL-4.....	83
3.12 Caracterização funcional das DCs submetidas ao luzindol, MLT e obtidas em concentração reduzida de IL-4 por meio de co-cultura com linfócitos alogênêicos.....	95
3.13 Perfil das citocinas produzidas pelos linfócitos T alogênêicos mantidos em co-cultura com as DCs obtidas com concentração de 3,125 ng/mL de IL-4.....	106
3.14 Análise da presença de moléculas das vias de sinalização intracitoplasmática ERK1/2, STAT-5 e STAT-6 fosforiladas.....	107
4 RESUMO DOS ACHADOS.....	118
5 CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
APÊNDICE A – Figura suplementar.....	131

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Em 1973 um artigo intitulado *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice* publicado no periódico *Journal of Experimental Medicine*, iniciava a descrição das Células Dendríticas (DCs) por meio da morfologia, quantificação e localização destas nos tecidos linfóides (STEINMAN; COHN, 1973).

A este artigo inicial seguiram outros quatro que descreviam as características funcionais *in vitro* das DCs (STEINMAN; COHN, 1974), *in vivo* (STEINMAN; LUSTIG; COHN, 1974) sua caracterização e distribuição no baço dos animais (STEINMAN; ADAMS; COHN, 1975) e, por fim, a separação, manutenção da viabilidade em cultura e a presença de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (STEINMAN et al., 1979).

Cerca de 40 anos se passaram e a estes trabalhos iniciais foram somados diversos outros estudos enfocando diferentes aspectos da imunobiologia das DCs, que vão desde descrições da função que as qualificam como as mais importantes células apresentadoras de antígenos (APCs), descrevendo-as como de elevada eficiência em ativar linfócitos (Ly) T *naive* (BANCHEREAU et al., 2000; BOOG et al., 1985; FONG; ENGLEMAN, 2000), assim como sua importância na regulação da atividade imunológica (revisto por GALLO; GALLUCCI, 2013).

Estas células vêm sendo alvo de inúmeros estudos para a utilização em protocolos de imunoterapia de estados fisiopatológicos como asma (KUIPERS; LAMBRECHT, 2005), diabetes (LO; CLARE-SALZLER, 2006), infecção por HIV (ANDRIEU; LU, 2006), tumores (BARBUTO et al., 2004; MACKENSEN et al., 2000; MORSE et al., 1997; NESTLE et al., 1998), e também estudos relacionados à imunologia dos transplantes de órgãos e tratamento de doenças auto-imunes (LU; THOMSON, 2002). Estes estudos ilustram a variedade de papéis fisiológicos e a ampla possibilidade de uso das DC, estimulando ou regulando a função imune do organismo.

Monócitos do sangue periférico humano, tratados com o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina 4 (IL-4) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), dão origem a DC mielóides, muito utilizadas em protocolos de vacinação, inclusive pelo grupo do Professor Barbuto (BARBUTO et al., 2004; NEVES et al., 2005). Entretanto, as DCs constituem uma população heterogênea e com grande plasticidade, mesmo *in vitro*, e, dependendo das

condições de cultura, obtêm-se diferentes tipos de DC, tanto a partir de monócitos do sangue periférico quanto a partir de outros precursores, como as células-tronco hematopoiéticas CD34⁺, por exemplo (STRUNK et al., 1996; ZHOU; TEDDER, 1996). De modo geral e incompleto, pode-se falar de DCs mielóides, caracterizadas pelo fenótipo CD11c⁺CD123⁻ (CRAVENS et al., 2007), DCs plasmacitóides, geralmente caracterizadas pelo fenótipo CD11c⁻CD123⁺ (SUMMERS et al., 2001) e de células de Langerhans (LC), que apresentam os marcadores CD1a, langerina e os grânulos de Birbeck (ITO et al., 1999). Pode-se, ainda, acrescentar alguns tipos celulares derivados de precursores mielóides, que apresentam morfologia e funcionalidade semelhantes às DC, quando tratadas com P-selectina, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e IL-4, sem, no entanto, serem classificadas como tal, recebendo a denominação de células semelhantes a dendríticas (*Dendritic Like Cells* – DLC), que a despeito da morfologia e funcionalidade semelhante às DC, têm predominância dos marcadores de superfície CD14 e CD16, característicos de macrófagos (LI et al., 2003).

Com a possibilidade de se obter DCs a partir de células mononucleares do sangue periférico, principalmente por meio de aférese do sangue de doadores saudáveis (SVENSSON et al., 2005; THURNER et al., 1999), estas vêm sendo muito estudadas em protocolos terapêuticos para os mais variados tipos de tumores (BARBUTO et al., 2004; HOMMA et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2007; MORSE et al., 1997; THOMAS-KASKEL et al., 2007; WESTERS; OSSENKIPPELE; LOOSDRECHT, 2007).

No nosso laboratório são geradas DCs para utilização em imunoterapia de tumores (BARBUTO et al., 2004). Por outro lado, a melatonina (MLT) tem mostrado efeito antitumoral tanto em trabalhos *in vitro* (COS; FERNANDEZ; SANCHEZ-BARCELÓ, 1996) quanto *in vivo* (LISSONI et al., 2003; LISSONI, 2007). Isto despertou interesse em estudar os possíveis efeitos desta substância sobre as células dendríticas, usando-se como modelo seu efeito sobre a diferenciação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humano.

A MLT é um hormônio ligado à regulação dos ritmos circadianos, principalmente em mamíferos (BINKLEY, 1988) e apresenta participação fundamental em diversos aspectos do sistema imune como revisto em vários trabalhos (GUERRERO; REITER, 2002; MAESTRONI, 1999; MILLER et al., 2006). Mais especificamente, já foi descrita a sua participação na ativação de monócitos,

com secreção de IL-1, IL-6 e TNF- α (BARJAVEL et al., 1998), produção de IL-12 (GARCIA-MAURIÑO et al., 1999), inibição da circulação leucocitária (LOTUFO et al., 2001), aumento da apresentação de antígenos e de moléculas de MHC de classe II com amplificação da proliferação de linfócitos T (PIOLI et al., 1993), além de seu já bastante citado efeito citostático sobre células tumorais (CHEN et al., 1995; HILL; BLASK, 1988). Intrigantemente, a MLT também apresentou efeito redutor da taxa de rejeição de alotransplantes cardíacos em ratos, com aumento na sobrevivência do órgão transplantado (JUNG et al., 2004). Esta última observação é condizente com a hipótese paradoxal em vista dos vários efeitos acima citados da MLT, de um papel “tolerogênico” deste hormônio sobre as DC.

A MLT liga-se a três receptores específicos, dois de membrana (MT1 e MT2) e um nuclear (ROR α 1) (LANOIX; OUELLETTE; VAILLANCOURT, 2006). Tanto MT1 quanto MT2 são receptores pertencentes à família das proteínas G, com sete domínios α -hélice transmembrana e sequências pouco conservadas em relação a outros receptores acoplados a proteínas G (GPCR) encontrados (revisto por BARRET; CONWAY; MORGAN, 2003), os quais, de modo geral, são controladores chave em processos fisiológicos, tais como transmissão neuronal, metabolismo celular, secreção de substâncias, diferenciação e crescimento celular (DAULAT et al., 2007).

Os receptores MT1 e MT2 podem estar presentes como homo ou heterodímeros nas células de mamíferos (AYOUB et al., 2002). Pozo et al. (2004) já relataram a presença do receptor de membrana MT1 bem como de mRNA para o receptor nuclear em diferentes células humanas do sistema imune, como PBMCs, células CD4+, CD8+, CD19+, CD14+ e CD56+. A expressão do receptor MT2, por outro lado, foi descrita para adipócitos e células arteriais humanas (BRYDON et al., 2001; EKMEKCIOGLU et al., 2003). Assim, embora o receptor MT1 pareça o melhor candidato a mediar a ação da MLT sobre a diferenciação de PBMC *in vitro*, não se pode excluir a participação dos outros dois receptores neste fenômeno.

Como já mencionado anteriormente, a adição de citocinas, como IL-4 e GM-CSF, favorece a diferenciação de monócitos em células dendríticas imaturas, *in vitro*. A via de sinalização, no caso da IL-4, inicia-se com a participação do receptor para IL-4 e parece contar com a participação de proteínas como as JAK-1 e -3 que levam à ativação da STAT-6 (JIANG; HARRIS; ROTHMAN, 2000) ou através da fosforilação da via Ras/MAPK (Proteína ligadora/proteína quinase ativadora de

mitógeno) que resultará na ativação das proteínas quinase MEK e, na sequência da cascata, ERK-1 e ERK-2 que no núcleo ativam a expressão de genes como *c-fos* (NELMS et al., 1999) e fatores de transcrição como fator nuclear (NF)- κ -B (INOUE et al., 2004).

Para a citocina GM-CSF, a ligação com o receptor também pode ativar a proteína JAK-2 que ativa, neste caso, STAT-5 (SAKURAI; ARAI; WATANABE, 2000) ou, como também ocorre com a IL-4, a sinalização pode ocorrer através da via Ras/MAPK via receptor para GM-CSF, culminando também com a ativação na cascata de proteínas como MEK e ERK (LIU et al., 1999). Na verdade, tem-se descrito a via Raf/MEK/ERK como muito relevante para a diferenciação e sobrevivência de DC imaturas derivadas de PBMCs (XIE et al., 2005).

Por outro lado, para a ativação das DCs, desempenham papel relevante fatores de transcrição como, por exemplo, o NF- κ -B e a proteína ativadora (AP)-1 (JANSSENS et al., 2003), além de fatores reguladores de interferon (IRF) (GORIELY et al., 2006), envolvidos com a produção de citocinas pelas mesmas (GAUTIER et al., 2005). Estão também envolvidas a via p-38 MAPK (ARDESHNA et al., 2000) e a via da quinase da porção N-terminal de c-Jun (JNK) (NAKAHARA et al., 2004), ambas regulando a expressão de moléculas como CD80, CD83 e CD86, e a família das proteínas quinase (PK) C (LIN et al., 2007), relacionadas com a diferenciação de monócitos em DCs.

Já foi descrita a ativação da via das MAPK/MEK de modo MLT-dependente na agregação de pigmento em melanóforos de rãs da espécie *Xenopus laevis* (ANDERSSON; SVENSSON; KARLSSON, 2003), da mesma forma que em células da linhagem tumoral de mama MCF-7 (CHAN et al., 2002). Nestas células tumorais, mostrou-se que a MLT é capaz de ativar a JNK, o que pode indicar um mecanismo de ação da MLT na diferenciação de DCs, uma vez que esta mesma quinase está relacionada com o aumento das moléculas de superfície CD80, CD83, CD86 e CD54 durante a ativação de DCs pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (NAKAHARA et al., 2004). É relevante notar que esta mesma via (MEK/ERK-1 e -2) pode ser ativada também pelo receptor MT2, ao menos em osteoblastos humanos (RADIO; DOCTOR; WITT-ENDERBY, 2006), abrindo-se assim, mais uma possível via de influência da MLT sobre a geração de DCs. E, mais recentemente, outro trabalho relatou o envolvimento da MLT sobre a via Jak/STAT, mais especificamente a Jak2/STAT-3, cuja ativação pela MLT reduz o dano oxidativo mitocondrial atenuando

a injúria miocárdica por isquemia/reperfusão (YANG et al., 2013), e também o dano por estresse oxidativo em células Huvec (DUAN et al., 2013).

Retornando ao papel do fator de transcrição NF- κ -B nas DCs, há relatos de que a inibição do componente RelB, impede sua translocação para o núcleo, o que diminui levemente a expressão de CD80 e, intensamente, a expressão de CD40, diminuindo a capacidade das DCs estimularem a proliferação e ativar Lys T (HERNANDEZ et al., 2007). Sabe-se, por outro lado, que a inibição do fator de transcrição NF- κ -B pela MLT é um fator de inibição do crescimento *in vitro* de células de glioma (MARTIN et al., 2006). Em modelo animal de trauma de crânio, a MLT atenuou a ativação dos fatores NF- κ -B e AP-1, protegendo neurônios da oxidação (BENI et al., 2004). Esta ação da MLT sobre estes fatores de transcrição também indica mais uma via potencial de ação desta substância sobre a biologia das DCs, visto que o equilíbrio entre NF- κ -B e JNK/AP-1 já foi descrito como necessário à sobrevivência deste tipo celular (KRIEHUBER et al., 2005), ações que apontam para uma tendência reguladora da substância, talvez relacionada com a homeostase.

A diferenciação de PBMC em DC pelo uso de GM-CSF e IL-4 é indicada pela diminuição da expressão de moléculas CD14 e aumento da expressão de CD1a (PEREIRA et al., 2005), gerando células em cachos, semi-aderentes, apresentando dendritos, com aumentada expressão de moléculas do MHC de classe II (HLA-DR), DC-SIGN (CD209), o receptor para manose homólogo ao de macrófagos (DEC-205), bem como elevada capacidade endocítica, mesmo frente a baixas concentrações de antígenos (AHN; AGRAWAL, 2005). Com a adição de TNF- α , para a maturação, ocorre a diminuição de moléculas de membrana CD1a e expressão de moléculas CD83 (ZHOU; TEDDER, 1996), bem como aumento na expressão de moléculas CD80, CD86 e acentuada diminuição da taxa de endocitose (PEREIRA et al., 2005), além da expressão do receptor de quimiocinas, CCR7 (DIEU-NOSJEAN et al., 1999).

Em estudo anterior, verificou-se que a MLT induz, em PBMCs de doadores saudáveis, modificações fenotípicas que são compatíveis com uma diferenciação para DCs, mas, ao mesmo tempo que DC diferenciadas sob ação da MLT apresentam maior produção de IL-10 (GONZALEZ, 2006). No entanto, a simples diferenciação não fornece informações precisas e detalhadas do funcionamento destas células. Um detalhamento mais amplo do fenótipo destas células por meio de uma análise mais apurada das moléculas de membrana que indiquem a diferenciação das PBMC

em DCs, bem como a avaliação da melhor concentração de MLT a ser utilizada nas culturas foram, então, as etapas iniciais de desenvolvimento do presente trabalho. Além do efeito direto da MLT ainda consideramos os efeitos indiretos da mesma, na indução de um aumento de sensibilidade das PBMCs a citocinas presentes no meio e capazes de levá-las à diferenciação em DCs (receptores para as citocinas GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Também o estado de “maturação” das DCs foi investigado, não só pelo fenótipo de membrana das células, mas também pela avaliação da função linfo-estimuladora das mesmas e pelo perfil das citocinas produzidas pelas DCs ou em co-culturas das mesmas com Linfócitos T. Dada a possibilidade de um comportamento tolerogênico das DCs sob ação da MLT, buscamos também identificar a presença de linfócitos T reguladores (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺), relacionados com a imunorregulação e supressão (LEHNER, 2008; RAMOS et al., 2012).

Ainda com relação ao tipo de linfócitos sujeitos à ação das DCs e que podem proliferar sob estímulo destas, embora haja sugestão de um comportamento tolerogênico, não se pode deixar de lado o aspecto de polarização destes linfócitos quanto a outros subtipos como os já conhecidos linfócitos Th1 e Th2, e que além das citocinas que os caracterizam (IFN- γ e IL-4, respectivamente), também contam com fatores de transcrição associados como Tbet para linfócitos Th1 e Gata-3 para Th2 (revisito por AMSEN; SPILIANAKIS; FLAVELL, 2009)

Além do estudo do fenótipo e função, buscou-se esclarecer o mecanismo pelo qual a MLT age. Já foi relatado que a via de transdução de sinal da MLT partilha com as vias da IL-4 e GM-CSF moléculas em comum, como ERK-1 e ERK-2, estabelecendo assim um elo de ligação entre MLT e citocinas utilizadas no processo de diferenciação e ativação. Assim, avaliou-se a presença das moléculas STAT-6 e STAT-5, relacionadas às citocinas IL-4 e GM-CSF, respectivamente.

Em conclusão, portanto, o presente trabalho objetivou investigar o papel da MLT na diferenciação *in vitro* de PBMC, analisando o fenótipo de membrana e o papel funcional das células, ao mesmo tempo em que procurou acrescentar algum conhecimento sobre as vias de sinalização envolvidas nesta diferenciação sob ação da MLT.

1.1 Objetivos

Investigar a ação da MLT no processo de obtenção de DCs derivadas de PBMCs.

1.2 Objetivos específicos

Caracterizar o fenótipo de membrana das células obtidas, características funcionais destas, potenciais vias de sinalização envolvidas, e o padrão de citocinas produzidas no processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) utilizadas para os experimentos foram obtidas de câmaras de leucorredução, originadas como resíduo no processo de plaquetofereze realizado no Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, que seriam destinadas ao descarte. Foram utilizadas câmaras de leucorredução de um total de 52 doações, de indivíduos sadios após consentimento por escrito destes. Este projeto foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com Parecer de número 820 emitido em 12 de dezembro de 2007.

2.2 Isolamento de células mononucleares

Para purificação de PBMC, o produto da plaquetofereze dos doadores foi colocado em tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo, 10 mL de Ficoll-Paque™ Plus (GE-Healthcare densidade 1.077 +/- 0,001 g/mL). O material foi centrifugado a 900 g, por 30 minutos, a 18 °C e a camada de células mononucleares formada foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril de plástico. O produto obtido foi lavado três vezes em meio RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco Brl – Life Technologies, Grand Island, NY) com centrifugação a velocidades decrescentes (290 g, 244 g e 163 g) por 10 minutos cada vez e, o botão celular ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 1% de L-glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco Brl – Life Technologies), pH 7,2 (meio R-10) e a viabilidade celular testada com Azul de Trypan (0,4% - Sigma) 1:1.

2.3 Cultura para diferenciação/ativação de células dendríticas

As células mononucleares obtidas como anteriormente descrito foram enriquecidas por aderência a placas plásticas de seis poços, em meio R-10, por um período de duas horas, em estufa a 37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ e

saturada de água. Após esse período, as células não aderentes foram coletadas e congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, em meio contendo 30% de SFB e 10% de DMSO, para posterior utilização em ensaios para avaliação da resposta linfocitária (BARBUTO et al., 2002; NEVES et al., 2005; PALUCKA et al., 1998), e as aderentes cultivadas em meio de cultura contendo fatores capazes de induzir sua diferenciação em DCs. Neste ponto, o protocolo usual requisita o acréscimo das citocinas IL-4 e GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ), para a diferenciação das células dendríticas. Usamos as concentrações de 50 ng/mL para cada citocina. A MLT (Sigma-Aldrich St. Louis – MO - USA) foi usada em concentrações de 1 mM, 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM e 1 pM, com a finalidade de se encontrar uma dose potencialmente mais efetiva. Inicialmente a MLT foi usada isoladamente, sem o acréscimo de citocinas e adicionada nos mesmos momentos em que se adicionou GM-CSF e IL-4 às culturas suplementadas com citocinas. Essas culturas foram mantidas por cinco dias e, com a finalidade de se observar a maturação de DCs, foram adicionadas às culturas, a partir do 5º dia, a citocina TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ) ou, no caso dos grupos suplementados com MLT, a MLT foi adicionada nas mesmas doses utilizadas na etapa de diferenciação (1 mM; 100 μM ; 10 μM ; 1 μM ; 100 nM; 10 nM; 1 nM; 100 pM; 10 pM; 1 pM). Como controle negativo da diferenciação PBMCs foram mantidas em meio de cultura sem adição de citocinas ou MLT. Numa segunda etapa desta avaliação a MLT foi adicionada na etapa de adesão das PBMCs às placas de cultura, seguindo a mesma faixa de concentrações mencionada acima. Nesses experimentos a MLT utilizada para estímulo das células mononucleares foi removida após decorridas as duas horas da etapa de adesão e, a partir deste momento, as culturas não receberam mais qualquer dose de melatonina, sendo suplementadas com meio contendo citocinas para diferenciação (GM-CSF e IL-4). A MLT, nesta etapa, foi usada em concentrações de 100 μM , 1 nM ou 10 pM, com a finalidade de se avaliar estas doses anteriormente selecionadas e encontrar uma dose potencialmente mais efetiva. Essas células foram mantidas em cultura por cinco dias e, para a obtenção de DCs maduras, foi adicionada às culturas, a partir do 5º dia, a citocina TNF- α . Alguns experimentos foram feitos com doses variadas de IL-4 (50 ng (usual); 25 ng; 12,5 ng; 6,25 ng ou 3,125 ng/mL) com a finalidade de avaliar se a presença de maior quantidade de receptores para IL-4, encontrada em células que estiveram em contato com MLT, provoca uma diferenciação mais acentuada das células em

cultura. Outros experimentos receberam Luzindol, um inibidor dos receptores de membrana (MT1 e MT2) na concentração de 50 pM, durante uma hora (RADOGNA et al., 2009; ROSEN et al., 2012), antes da etapa de adesão de duas horas em meio contendo MLT, com a finalidade de inibir a ação desta substância. Após essa etapa, as células tiveram o meio contendo Luzindol e MLT retirados e foram adicionadas as citocinas, como já descrito acima. Em todas essas culturas, as células foram mantidas por cinco dias e, para a obtenção de DCs maduras, foi adicionada, a partir do quinto dia, a citocina TNF- α e as culturas foram mantidas até o sétimo dia. Foram coletadas alíquotas dos sobrenadantes de cultura nos quinto e sétimo dia e armazenados para posterior análise das citocinas produzidas. As DCs obtidas no sétimo dia de cultivo foram analisadas quanto à presença das moléculas de membrana conforme mencionado abaixo. Todos os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, em ausência de luz ambiente artificial e baixa luminosidade natural (como precaução quanto à degradação da MLT).

2.4 Coleta e análise fenotípica das células

Após o quinto ou sétimo dias de cultura o sobrenadante foi retirado, adicionado meio RPMI fresco e as células coletadas por meio de pipetagem vigorosa. As células foram colocadas em tubos, e centrifugadas por 10 minutos a 153 g. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de R-10 e em seguida quantificadas e a viabilidade analisada utilizando-se o método de exclusão do Azul de Trypan, conforme mencionado anteriormente.

Para a determinação do fenótipo de membrana, as células foram marcadas utilizando-se anticorpos monoclonais específicos. Como controle, foi feito uso da autofluorescência das células. Analisou-se a expressão de diferentes moléculas de membrana com os anticorpos: anti-HLA de classe I (BD Biosciences – San Jose - CA - USA), anti-HLA de classe II (BD Biosciences), anti-CD1a (BD Biosciences), anti-CD3 (BD Biosciences), anti-CD19 (BD Biosciences), anti-CD56 (BD Biosciences), anti-CD11c (BD Biosciences), anti-CD14 (BD Biosciences), anti-CD16 (BD Biosciences), anti-CD40 (BD Biosciences), anti-CD80 (BD Biosciences), anti-CD86 (BD Biosciences) anti-CD83 (BD Biosciences), anti-CD123 (BD Biosciences), anti-CCR7 (BD Biosciences), anti GM-CSF-R (CD116 - BD Biosciences), anti IL-4R

(CD124 - BD Biosciences), e anti-TNF- α -R (CD120b - BD Biosciences), anti-CD209 (BD Biosciences), anti-CD274 (BD Biosciences).

Cerca de 2×10^5 células de cada grupo foram colocadas em tubos de 1,5 mL e centrifugadas por 10 minutos a 153 g, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se o anticorpo específico para o marcador de interesse, diluído em 25 μ L de tampão para citometria (PBS, 0,5% de soroalbumina bovina (Life Technologies) e 0,02% de azida sódica – PBS-BSA 0,5%); as células foram incubadas por 20 minutos à 4 °C, protegidas da luz. Com o término do período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes em um volume de 100 μ L/tubo de tampão para citometria (PBS/BSA 0,5%), fixadas em tampão para citometria contendo 2% de paraformaldeído (200 μ L/tubo) e armazenadas até a aquisição em citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Para análise utilizou-se o software FlowJo versão 8.7 (TriStar Software) usando a exclusão por meio de negatização de linhagens contendo os marcadores CD3, CD14, CD19, CD56 (Lineage Negative) e parâmetros de tamanho e granulosidade compatíveis com DC.

Foi utilizado um índice representativo da intensidade média de fluorescência (MFI), (uma medida da quantidade de moléculas por célula, ou seja, uma medida relativa desta expressão). Este índice de expressão foi estabelecido por meio do produto da porcentagem pela MFI da amostra, dividido pelo resultado do mesmo processo feito para o controle. Como exemplificado pela fórmula abaixo:

$$\text{Índice de Expressão} = \frac{\text{Porcentagem de Cél. Positivas na Amostra} \times \text{MFI da Amostra}}{\text{Porcentagem de Cél. Positivas no Controle} \times \text{MFI do Controle}}$$

Utilizou-se, como controle, DCs que foram cultivadas com citocinas, mas que não receberam MLT em nenhuma etapa do processo (o valor de referência é igual a 1 e é resultado da fórmula acima, onde os valores da “amostra” são iguais aos do controle).

2.5 Separação imunomagnética de linfócitos

Células não aderentes congeladas a partir de culturas anteriores ou obtidas frescas de câmaras de leuco-redução por separação por gradiente, como mencionado para a obtenção das PBMCs, foram submetidas a separação

magnética. Utilizou-se colunas magnéticas recomendadas para uso no *kit* “Pan T Cell Isolation Kit II” (Miltenyi Biotec, CA – USA). Resumidamente, foi determinado o número de células não aderentes para a obtenção dos linfócitos, as quais foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos e seu sobrenadante pipetado completamente. As células obtidas foram ressuspensas em 40 µL de tampão apropriado (PBS-BSA 0,5%, pH 7,2, e 2 mM EDTA, 4-8 °C), até o total de 10^7 células. Foram adicionados a seguir 10 µL do coquetel de anticorpos (anti-CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 e glicoforina A), até um total de 10^7 células. O conteúdo foi agitado e incubado por 10 minutos à temperatura de 4-8 °C. Decorrido este período, foram adicionados 30 µL de tampão e em seguida 20 microlitros de anti-biotina Microbeads (sempre observando a quantidade proporcional de 10^7 células), homogeneizado e incubado por mais 15 minutos à temperatura de 4-8 °C. Após o tempo necessário, foi adicionado o tampão em volume de 10-20 vezes para lavagem das células e centrifugadas a 300 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por pipetagem e o pellet ressuspensado em 500 µL de tampão, procedendo-se então à passagem através da coluna para obtenção de linfócitos T-CD3 positivos purificados, que foram usados nos ensaios de proliferação.

2.6 Avaliação da função aloestimuladora

Como células estimuladoras nestes ensaios foram utilizadas as DCs obtidas por cultura de PBMCs aderidas como mencionado acima. Estas foram colocadas na concentração de 1×10^3 células/poço, em placas de 96 poços de fundo em U. Como células respondedoras foram usados os linfócitos T alogênêicos (1×10^4 células/poço), purificados dentre as células não-aderentes de indivíduos diferentes, através da separação magnética conforme descrito acima. Antes de serem colocados em co-cultura os linfócitos foram corados com éster de succinimidil-5-(e-6)-diacetato de carboxifluoresceína (CFSE – Invitrogen – Carlsbad – CA - USA) (LYONS; PARISH, 1994; LYONS, 2000), para que a redução deste fluorocromo, a cada divisão, fornecesse um valor menor da média geométrica nas células que proliferaram e, com isso fosse calculado um índice de proliferação. As co-culturas foram mantidas por cinco dias em estufa saturada de água, a 37 °C e contendo 5% de CO₂. Após esse período as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 (BD

Biosciences), anti-CD8 (BD Biosciences), anti-CD25 (BD Biosciences), (anti-CD279 (PD-1) BD Biosciences), e anti-FoxP3 (BD Biosciences). Para análise desta última molécula, as células não foram marcadas com CFSE. Os sobrenadantes das co-culturas foram armazenados a -20 °C para posterior análise das citocinas.

A proliferação foi verificada através de citometria de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, Palo Alto, CA) e, a análise realizada usando-se o software FlowJo versão 8.7 (TriStar Software). O resultado da proliferação foi determinado através do cálculo de um índice de proliferação, obtido pela divisão da média geométrica da intensidade de fluorescência de linfócitos T corados com CFSE cultivados sem estímulo (selecionados por tamanho e granulosidade) pela média geométrica da intensidade de fluorescência de células, da mesma região, das co-culturas (estimulados).

$$\text{Índice} = \frac{\text{MFI do Controle (Lys Sem Estímulo)}}{\text{MFI da Amostra (Lys Estimulados)}}$$

2.7 Avaliação da presença de citocinas nos sobrenadantes

As citocinas foram avaliadas através da análise do sobrenadante das culturas de DCs e das co-culturas de DCs com Lys T alogênêicos. Para os sobrenadantes de culturas de DCs investigou-se a presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α . Para os sobrenadantes das co-culturas de DCs com Lys as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17A. Foram usados os kits “BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit” e “BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1, Th2 e Th17 Cytokines Kit” para análise dos sobrenadantes de DCs e das co-culturas, respectivamente. Foram seguidas as instruções do fabricante na execução do ensaio. Resumidamente, os padrões liofilizados de cada kit foram reconstituídos com 2 mL de Diluente do Ensaio, e mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente, após o que são misturados por pipetagem suave. Em oito tubos de 12 x 75 mm foram adicionados 300 μ L de Diluente do Ensaio e em seguida foram colocados 300 μ L do Padrão *Top* em outro tubo de 12 x 75 mm e, a partir deste, foi iniciada uma diluição seriada em oito tubos a partir de 1:2 até uma diluição de 1:256, para obtenção da curva padrão. As “Beads” de Captura foram misturadas agitando-se vigorosamente e adicionando-se 50 μ L a todos os tubos de amostras. Foram adicionadas também 50 μ L das diluições

padrão das citocinas inflamatórias aos tubos controles e mantido um tubo sem adição para o controle negativo, também foram adicionados 50 µL do Reagente de Detecção de Citocinas-PE a todos os tubos. Procedeu-se a uma incubação de três horas, em temperatura ambiente e protegida da luz. Decorrido o tempo de incubação, todos os tubos foram lavados com 1 mL de tampão de lavagem, por centrifugação a 200 g por cinco minutos. Descartou-se o sobrenadante de cada tubo e em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em 300 µL de tampão de lavagem para aquisição por meio de citometria de fluxo em equipamento FacsCanto (BD Biosciences) e analisado através do *software* FCAP Array (BD Biosciences).

2.8 Análise de moléculas presentes no citoplasma por meio de Citometria

Células obtidas sob diferentes tratamentos foram retiradas das placas de cultivo e submetidas à análise de moléculas intracitoplasmáticas como STAT-5 (anti-STAT-5 BD Biosciences-Phosflow - San Jose – CA – USA), STAT-6 (anti-STAT-6 BD Biosciences-Phosflow) e ERK-1 e -2 (anti-ERK 1/2 BD Biosciences-Phosflow). De modo resumido, as células retiradas das culturas foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL. Foram centrifugados por cinco minutos em velocidade de 1258 g, 25 °C, para agrupamento do *pellet*. Quando necessário, as células foram marcadas externamente com anticorpos de citometria para avaliação do fenótipo de membrana (procedimento para marcação extracelular mencionado acima). Após a marcação extracelular as células foram lavadas com 500 µL de PBS 1X e centrifugadas a 1258 g por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado, o excesso retirado com auxílio de uma pipeta e as células ressuspensionadas em 100 µL de solução fixadora Lysefix® ou Cytifix® (BD Biosciences – San Jose – CA – USA - conforme indicado na bula para o tipo do anticorpo) e, em seguida, incubados por 10 minutos em estufa a 37 °C. Após a incubação, foram submetidos a nova centrifugação a 1258 g por cinco minutos a 25 °C. Após descarte do sobrenadante, o excesso foi retirado com pipeta e foram acrescentados 100 µL de solução permeabilizadora PermFix® (BD Biosciences – San Jose – CA – USA) e os tubos foram mantidos por 30 minutos no gelo. Decorrido o tempo de incubação as células foram centrifugadas a 1258 g por cinco minutos e ressuspensionadas em 500 µL de PBS 1X e centrifugadas a 1258 g por cinco minutos a 25 °C, duas vezes. Na última lavagem o tubo foi virado contra uma folha de papel absorvente com o propósito de

eliminar possível excesso de tampão. Sobre o sobrenadante que ainda permaneceu no tubo foram adicionados 2 μL do anticorpo ligante da molécula de interesse e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir as células foram lavadas por duas vezes com 500 μL de PBS 1X (1258 g por 5 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$). O *pellet* obtido ao final da centrifugação foi ressuscitado em 400 μL de Tampão PBS-BSA 0,5% sem formaldeído e a leitura feita em Citômetro de Fluxo em até duas horas.

2.9 Análise de fatores de transcrição presentes em Lys por meio de Citometria Intracelular

No caso dos linfócitos foram usados os anticorpos anti-FoxP3 (BD Biosciences), anti-Tbet (BD Biosciences) e anti-Gata-3 (BD Biosciences). As células foram lavadas inicialmente e ressuscitadas em 50 mL de tampão de lavagem (PBS-BSA 0,5%) com a quantidade necessária de anticorpos para ligação às moléculas extracelulares de interesse. Após incubação de 30 minutos na geladeira, foram lavadas novamente com 300 μL de Wash Buffer® (BD Biosciences – San Jose – CA – USA) e centrifugadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ e 13000 rpm (spin 10 s). Lavadas com mais 300 μL de Wash Buffer®, ressuscitadas em 300 μL de PermFix® e incubadas em geladeira por 30 minutos, envoltas em folha de alumínio. Decorrido o tempo de incubação foram novamente lavadas com 300 μL de Wash Buffer®, centrifugadas em modo spin e acrescidas de 25 μL de Wash Buffer® com os anticorpos intracelulares, seguidas de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, lavadas duas vezes com 300 μL de Wash Buffer® e ressuscitadas em 300 μL PBS-BSA 0,5% sem formaldeído e a leitura feita em Citômetro de Fluxo em até 2 horas.

2.10 Determinação de citocinas através de ensaio imunoenzimático do tipo Elisa

Foi utilizado o método ELISA para quantificação das citocinas nos sobrenadantes armazenados previamente. Optou-se por kits Elisa RD Systems®. Resumidamente, os anticorpos de captura para cada citocina foram diluídos na concentração de trabalho em PBS sem proteína carreadora (sem BSA), conforme indicação do fabricante. Uma microplaca de 96 poços foi coberta com 100 μL por

poço do anticorpo de captura diluído, envolvida em filme plástico e incubada overnight a temperatura ambiente.

Decorrido o tempo de incubação, cada poço foi aspirado e lavado por três vezes com 400 μL de tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,05%), removendo-se totalmente o líquido a cada lavagem. Depois da última lavagem o líquido foi removido totalmente, por aspiração ou por inversão da placa e movimentação vigorosa contra folhas limpas de papel absorvente. Em seguida realizou-se o bloqueio das placas adicionando-se 300 μL de tampão de bloqueio (1% BSA em PBS com 0,05% NaN_3) a cada poço e incubando em temperatura ambiente por, no mínimo, uma hora. Novamente repetiu-se a etapa de aspiração/lavagem descrita acima, e adicionou-se a seguir 100 μL por poço de amostra ou do padrão. As placas foram cobertas com filme plástico e incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação foi repetida a etapa de aspiração/lavagem e foram adicionados 100 μL , em cada poço, do anticorpo de detecção diluído como orientado pelo fabricante. As placas foram novamente cobertas com filme plástico e incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida foi repetida a etapa de aspiração/lavagem e adicionados 100 μL de Streptavidin-HRP em cada poço. As placas foram cobertas com folha de alumínio e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente, sempre evitando a luz direta. Repetiu-se o processo de aspiração/lavagem e acrescentou-se a cada poço 100 μL da solução substrato e incubou-se por mais 20 minutos em temperatura ambiente coberto com folha de alumínio evitando a luz direta. Após o tempo de incubação foram adicionados 50 μL de Solução de Parada (Stop Solution) em cada poço e as placas foram agitadas suavemente para garantir uma boa mistura. A densidade óptica foi medida imediatamente usando-se um espectrofotômetro com leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

2.11 Caracterização da morfologia de DCs por meio de microscopia de fluorescência

As lamínulas a serem utilizadas foram previamente preparadas, lavando-as com água e detergente neutro, sendo o excesso de água retirado e em seguida foram flambadas com álcool. Após esta etapa, foram tratadas por 20 minutos com 50 μL de poli-L-lisina, para que as DCs cultivadas se mantivessem aderidas. As lamínulas tratadas e secas foram colocadas em placas de 24 poços e as PBMCs

plaqueadas sobre as mesmas. Decorridos os sete dias de cultura, mantendo-se os procedimentos de cultura para obtenção de DCs, as lamínulas foram lavadas com 1 mL de PBS 1X, suavemente e em temperatura ambiente. O PBS 1X foi retirado e aos poços foram acrescentados 300 μ L de paraformaldeído (PFA) 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação em PFA, os poços foram lavados novamente com PBS 1X, e mantidos em 1 mL de PBS 1X. Foram retiradas as lamínulas dos poços e mantidas em uma câmara úmida (improvisada com placa de Petri revestida com folha de alumínio, forrada em seu interior com parafilme na base e papel umedecido na tampa). Foram realizados dois bloqueios sequenciais de uma hora cada. O primeiro com 50 μ L de PBS-BSA 1% (temperatura ambiente) e o segundo com 50 μ L de PBS-Glicina 1% (temperatura ambiente), tomando-se o cuidado de secar as lamínulas a cada troca de bloqueio ou lavagens efetuadas. Após os bloqueios, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo primário anti-CD209 (Sigma-Aldrich - USA) diluído em 50 μ L (1:500) de PBS ultrafiltrado e incubados por 30 minutos. Para lavagem das lamínulas, após esta incubação, fez-se uso de dois bequers contendo PBS 1X, dois contendo PBS-Tween 20 0,1% e dois contendo água MilliQ® (Millipore – USA), A lavagem se deu por imersão de cada lamínula por 15 vezes em cada bequer. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor 633 (Invitrogen, USA) diluído em PBS (1:6000), por 30 minutos e posteriormente seguiram-se as lavagens por imersão das lamínulas. Finalizando o processo, as lamínulas foram previamente identificadas e colocadas com sua superfície voltada para a lâmina contendo uma gota de Prolong acrescido de DAPI (Invitrogen, USA). Como controle negativo da reação, o anticorpo primário não foi adicionado à mesma. Após a secagem, as lamínulas foram vedadas em suas bordas e armazenadas a -20 °C.

2.12 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados com base nas médias e análise da variância quando apresentaram distribuição normal, seguido pelo pós-teste de Tukey quando $p < 0,05$ e, quando não houve distribuição normal, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Os gráficos e dados estatísticos foram obtidos com auxílio do programa GrafPad Prism Software V.5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção e caracterização das células mononucleares após sete dias de cultura com melatonina (dados não mostrados)

Inicialmente a proposta era a de realizar culturas com a utilização da MLT por um período de sete dias, durante o qual as PBMCs obtidas de doadores saudáveis permaneceriam em contato com a MLT. Para o controle positivo dos efeitos da MLT sobre as células cultivadas foram mantidas células em cultura com as citocinas usuais GM-CSF e IL-4 para diferenciação, bem como TNF- α para ativação. Como um controle negativo mantivemos as PBMCs em cultura sem qualquer suplementação, quer seja de citocinas ou de MLT. Culturas mantidas com MLT apresentaram maior frequência de células expressando CD83, importante molécula indicadora da maturação de DCs, porém não foi observado aumento correspondente na MFI destas células quanto à presença dessa molécula. A frequência de células apresentando a molécula CD80, importante na função co-estimuladora de linfócitos, apresentou uma tendência à diminuição, acompanhada por uma diminuição da expressão da molécula em cada célula (determinada pela intensidade média de fluorescência ou MFI). Em algumas concentrações não foi detectada nenhuma frequência de células após análise. Estes dados podem indicar que é possível haver um efeito inibidor da expressão desta molécula nas células cultivadas com MLT.

Já a presença de células expressando CD86, também importante na função co-estimuladora de linfócitos pelas DCs, manteve-se em níveis próximos dos obtidos para culturas tratadas com citocinas, porém com alguma tendência à diminuição de sua porcentagem para algumas concentrações de MLT. Esse efeito redutor também foi observado ao se analisar as MFIs para o CD86.

Outra molécula que indica que as DCs estão em um estado maduro é o receptor para quimiocinas CCR7, cuja análise apontou uma fraca expressão.

De modo semelhante ao CCR7, constatou-se uma baixa porcentagem de células expressando CD1a. No entanto, essa baixa frequência de células expressando CD1a é esperada após tratamentos das culturas com TNF- α (ZHOU; TEDDER, 1996). Esta observação também foi possível em culturas tratadas com MLT, principalmente nas concentrações abaixo de 1mM, quando comparadas às células tratadas com citocinas.

Houve pouca expressão de CD40, molécula também relacionada com a ativação de linfócitos, com tendência à diminuição da presença da porcentagem de células CD40 positivas em culturas tratadas com MLT, embora a expressão para o grupo controle, tratado com citocinas, também tenha se apresentado reduzida.

Moléculas relacionadas à apresentação de antígenos foram determinadas pela marcação de anticorpo anti-HLA-ABC, representando o MHC de classe I. Culturas que receberam MLT (1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM e 100 pM, 10 pM, 1 pM) apresentaram porcentagem de células expressando HLA-ABC acima das médias das culturas que receberam citocinas, o que foi acompanhado pela MFI destas culturas em relação às culturas com citocinas.

Embora alguns experimentos tenham se mostrado com baixa frequência de células expressando alguns marcadores ou apresentaram-se com baixa MFI, foram selecionadas algumas doses para que se iniciasse um refinamento da avaliação da atividade da MLT em culturas de monócitos. Assim, optou-se por culturas que apresentaram uma média semelhante, umas entre as outras, das moléculas relacionadas com apresentação de antígenos HLA-DR (MHC de classe II), que é utilizada para definir as populações de DCs, durante a análise das leituras feitas por citometria de fluxo. Como também foi observada a presença de outra molécula relacionada com apresentação de antígeno em nossos experimentos representados pelo marcador HLA-ABC (MHC de classe I), optou-se por definir algumas concentrações de MLT a partir destes resultados para a frequência e expressão de moléculas apresentadoras de antígenos. Três experimentos foram realizados seguindo-se o mesmo padrão de concentração tanto de citocinas quanto de MLT e foi possível constatar, após análise dessas culturas, que as concentrações que apresentavam um efeito estimulador da expressão de moléculas de superfície de membrana eram as concentrações de 10 picomolar, 1 nanomolar e 1 micromolar, conforme mostrado nas tabelas 1 e 2. Assim, as concentrações selecionadas para os próximos experimentos foram as concentrações de 10 pM, 1 nM e 1 μ M.

3.2 Caracterização das células mononucleares após cinco dias de cultura com as concentrações selecionadas de melatonina

Com intuito de avaliar o fenótipo das células durante a diferenciação, as culturas foram analisadas no seu quinto dia quanto à presença de moléculas indicadoras da diferenciação dessas em DCs.

A figura 1 mostra o tamanho e a granulosidade das células adquiridas no citômetro de fluxo, avaliadas pelos parâmetros de *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC). Janelas de análise (*gates*) foram desenhadas, portanto, a partir de parâmetros de tamanho e granulosidade e as células ali presentes, analisadas.

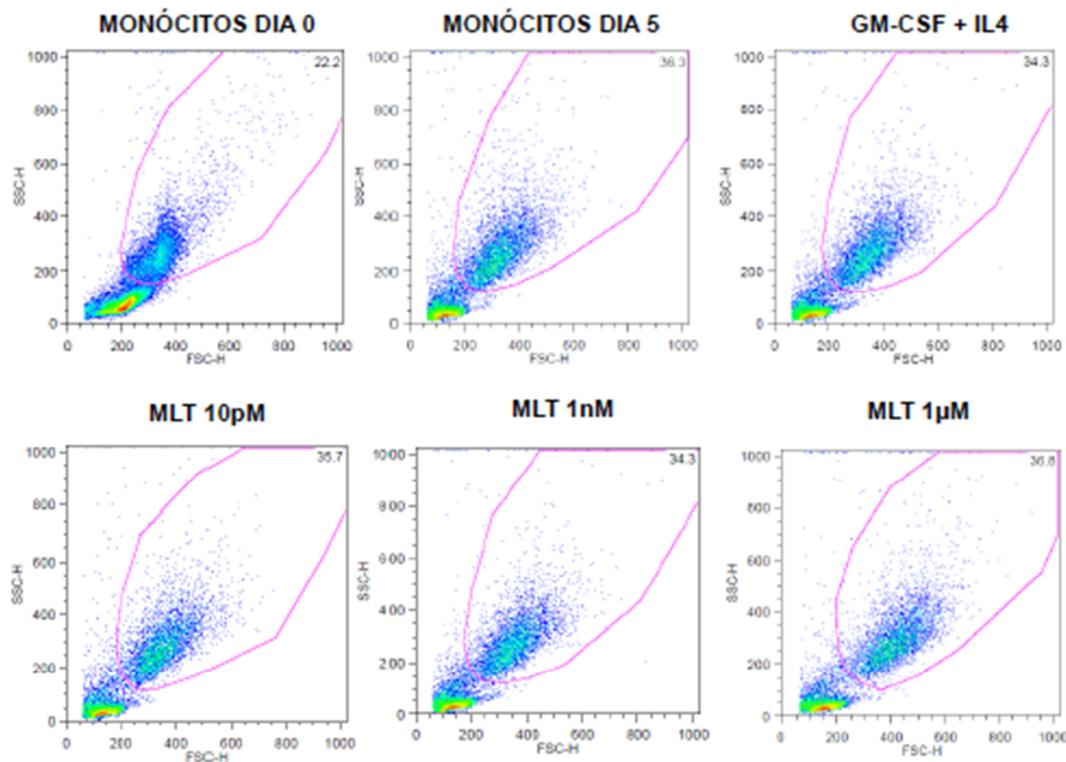


Figura 1 - *Dot plots* representativos do padrão da população e os respectivos *gates* realizados para análise do fenótipo das células obtidas após 5 dias. As células foram analisadas após separação e antes do ensaio de adesão, após culturas mantidas por cinco dias em meio sem adição de substâncias (citocinas ou MLT), após suplementação com citocinas (GM-CSF + IL-4) ou após suplementação com MLT nas concentrações selecionadas (10pM, 1nM e 1µM).

O resultado da análise de quatro experimentos com culturas mantidas por cinco dias, quanto à presença das moléculas de membrana, é mostrado na tabela 1. Nota-se que há semelhança nas frequências de células que expressaram HLA-DR nas diferentes concentrações de MLT usadas, quando comparadas aos controles representados pelas citocinas (controle positivo) e a PBMCs mantidas por cinco dias

em meio de cultura R-10 (controle negativo). Nota-se que o índice de expressão elaborado para a MFI encontra-se mais elevado para as culturas mantidas com suplementação de MLT, quando comparados ao índice 1 referente ao controle positivo. Observa-se também que o índice do controle negativo apresenta-se elevado. Culturas mantidas com MLT 1nM apresentaram maior frequência de células expressando CD11c, embora todos os grupos tenham mantido similaridade entre as frequências. O índice de expressão manteve valores próximos entre as culturas estimuladas por MLT. Outra molécula apresentadora analisada, correspondente ao MHC de classe I, a molécula HLA do tipo ABC teve sua expressão reduzida nas culturas tratadas com as citocinas, quando se observa sua frequência no dia inicial das culturas (dia 0). Os demais grupos apresentaram frequências semelhantes e índices de MFI bastante elevados em relação ao encontrado para as citocinas, indicando novamente uma provável influência da MLT principalmente na concentração de 1 nM. Quanto a presença de CD80, molécula co-estimuladora, as frequências e os índices encontrados ficaram abaixo do controle positivo, sugerindo pouco ou mesmo nenhum efeito da MLT sobre essa molécula. A molécula CD86 relacionada igualmente à função de co-estimulação mostrou frequências acima do controle positivo, nos grupos tratados com MLT. No entanto, estas frequências foram semelhantes aos dos grupos não tratados (dia 0 e dia 5). Com relação ao índice para a MFI culturas mantidas em concentração de 10 pM de MLT apresentaram o índice mais elevado. Para CD40 as frequências e índices mais elevados foram apresentados por células estimuladas com MLT 10 pM e 1 uM. Culturas estimuladas por citocinas e por MLT 1 nM apresentaram frequências e índices semelhantes. A observação de outro marcador para DCs maduras nestas células cultivadas por cinco dias, a molécula CD83, mostra frequências semelhantes entre os grupos não tratados e tratados com MLT. Exceção para culturas mantidas com MLT em concentração de 1 µM, com valor um pouco mais elevado. Culturas estimuladas por citocinas apresentaram-se com valores bastante baixos quanto a presença dessa molécula. Essas culturas também foram analisadas quanto à presença dos receptores para as citocinas GM-CSF (CD116), IL-4 (CD124) e TNF-α (CD120). Pode-se observar que após o dia inicial das culturas (dia 0) a molécula GM-CSF-R apresentou frequências reduzidas, principalmente nas culturas estimuladas pelas citocina correspondente. Monócitos sem estímulo e os estimuladas com MLT apresentaram frequências semelhantes, inclusive para os altos índices apresentados

para a MFI. Para o receptor da IL-4 constatou-se uma queda nas frequências em relação ao dia 0 e, somente as culturas estimuladas com MLT apresentaram alguma frequência de células expressando esse receptor. Culturas sem estímulo até o dia 5 e estimuladas com citocinas não apresentaram CD124.

Tabela 1 – Frequência e Índice de MFI em culturas de monócitos mantidas por cinco dias para geração de imDCs.

Molécula	Mono Dia 0 ^a (N = 4)		Mono Dia 5 ^b (N = 4)		Citocinas ^c (N = 4)		MLT ^d 10pM (N = 4)		MLT ^d 1nM (N = 4)		MLT ^d 1µM (N = 4)	
	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI
HLA-DR	95,15 ± 3,40	2,25 ± 1,92	95,48 ± 4,11	3,52 ± 1,68	93,89 ± 3,66	1 ± 0	96,43 ± 2,35	4,82 ± 2,93	94,59 ± 5,98	2,43 ± 1,89	93,50 ± 8,18	4,15 ± 2,85
CD11c	81,85 ± 9,42	1,183 ± 0,86	90,27 ± 7,44	0,85 ± 0,80	84,72 ± 19,92	1 ± 0	86,77 ± 13,29	1,49 ± 0,88	91,56 ± 6,86	1,45 ± 0,69	88,49 ± 8,51	1,49 ± 0,89
HLA-ABC *	82,78 ± 11,86**	19,82 ± 8,29	86,69 ± 6,31	117,75 ± 221,8	33,55 ± 13,21**	1 ± 0	84,97 ± 7,85	18,97 ± 24,99	77,25 ± 14,51	127,08 ± 244,1	78,31 ± 11,18	94,12 ± 178,9
CD80	16,59 ± 15,34	10,71 ± 21,02	10,68 ± 21,02	0,10 ± 0,20	36,38 ± 27,78	1 ± 0	24,85 ± 26,00	0,35 ± 0,39	12,63 ± 20,27	0,30 ± 0,56	25,30 ± 26,64	0,25 ± 0,29
CD83	21,88 ± 25,59	17,91 ± 31,32	15,82 ± 18,37	156,7 ± 299,1	3,08 ± 6,15	1 ± 0	15,40 ± 18,04	6,06 ± 1,09	18,21 ± 19,73	533,8 ± 1051,0	24,38 ± 30,90	498,6 ± 970,1
CD86 #	82,61 ± 7,85	3,19 ± 3,82	71,54 ± 8,60	1,57 ± 1,64	33,09 ± 20,03##	1 ± 0	72,84 ± 14,43	1,85 ± 2,02	67,02 ± 15,19	1,44 ± 1,32	67,32 ± 11,46	1,36 ± 1,41
CD40	16,96 ± 13,46	1,44 ± 1,81	8,95 ± 17,90	0,19 ± 0,38	13,81 ± 15,81	1 ± 0	21,68 ± 19,15	0,65 ± 0,73	12,48 ± 17,04	0,78 ± 1,00	19,08 ± 23,56	1,62 ± 2,83
CD116	82,38 ± 11,08	610,9 ± 777,9	55,20 ± 36,90	17,08 ± 18,65	8,05 ± 11,46§	1 ± 0	60,88 ± 41,31	24,73 ± 25,88	56,63 ± 38,51	19,29 ± 26,59	56,44 ± 37,86	21,11 ± 17,67
CD120	66,11 ± 10,33	54,58 ± 86,29	15,63 ± 26,43	0,32 ± 0,38	20,13 ± 24,10	1 ± 0	19,60 ± 21,94	0,61 ± 0,89	15,75 ± 23,28	0,51 ± 0,60	24,10 ± 28,27	1,09 ± 1,93
CD124	17,23 ± 23,48	-	4,75 ± 9,50	-	0	-	8,68 ± 13,32	-	4,90 ± 6,84	-	14,65 ± 23,86	-

^a Monócitos obtidos após separação por gradiente de densidade; ^b Monócitos mantidos em meio R-10 por 5 dias;

^c Monócitos mantidos por 5 dias em R-10 suplementado com GM-CSF e IL-4; ^d Monócitos mantidos por 5 dias em R-10 suplementado com MLT nas concentrações descritas. Os valores representam as médias ± desvio padrão de N = 4 experimentos.

* Anova P < 0,0001; ** Teste de Tukey P < 0,05 entre Citocinas e os demais grupos;

Anova P = 0,0011; ## Teste de Tukey P < 0,05 entre Citocinas e os demais grupos ;

§ Teste de Tukey P < 0,05 entre Citocinas e Mono Dia 0.

3.3 Caracterização das células mononucleares após sete dias de cultura com as concentrações selecionadas de melatonina

Células cultivadas por sete dias receberam as citocinas GM-CSF e IL4 até o 5º dia e TNF- α a partir deste até o 7º dia, quando foram coletadas. Com relação à adição de MLT seguiu-se o mesmo critério colocando-a no 1º e 5º dias das culturas. As células não tratadas foram mantidas em meio de cultura e só receberam meio de cultura como suplementação no 5º dia de cultura. Marcações para detalhamento do fenótipo foram feitas para as mesmas moléculas de células cultivadas e analisadas após cinco dias. Na figura 2 podemos observar o padrão das populações e seus respectivos *gates*. A tabela 2 exhibe os resultados observados para as culturas de PBMCs que foram cultivadas durante os sete dias com suplementação de citocinas e serviram como controle positivo da diferenciação e ativação em DCs. As demais culturas receberam suplementação de MLT e uma delas foi mantida pelo mesmo período somente em meio de cultura R-10.

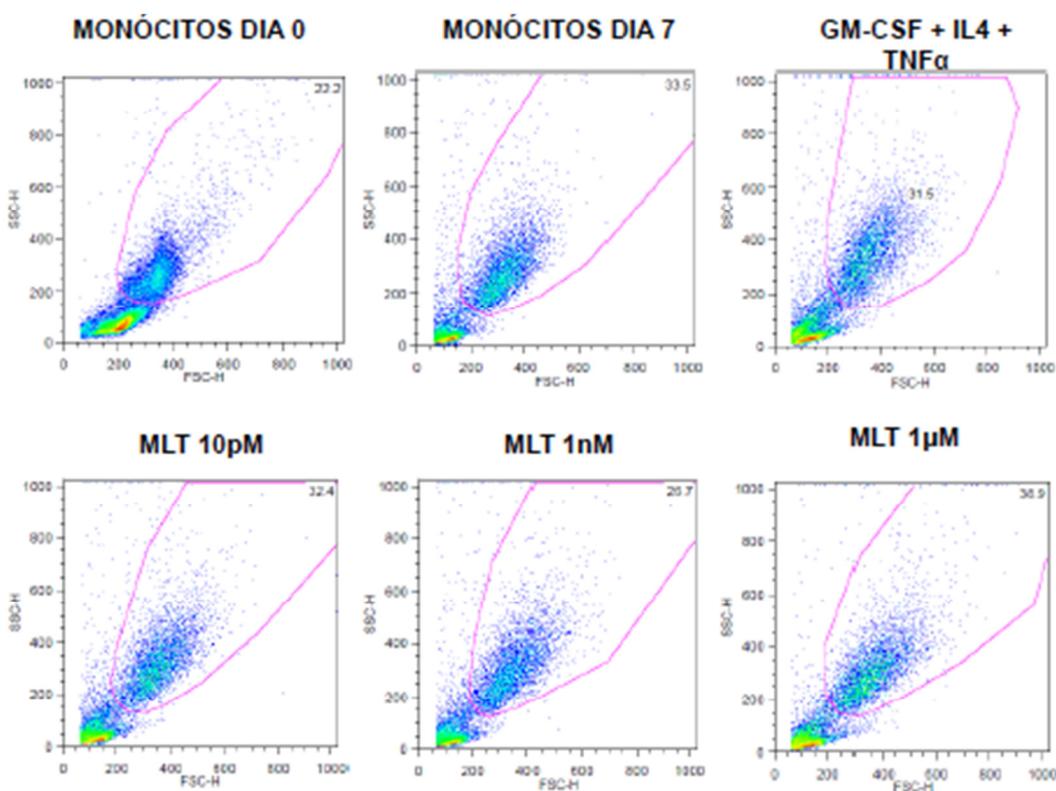


Figura 2 - *Dot plots* representativos do padrão da população e os respectivos *gates* realizados para análise do fenótipo das células após 7 dias. As células foram analisadas após separação e antes do ensaio de adesão; após culturas mantidas por sete dias em meio sem adição de substâncias (citocinas ou MLT); após suplementação com citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α); após suplementação com MLT nas concentrações selecionadas (10pM, 1nM e 1 μ M).

Tabela 2 – Frequência e Índice de MFI em culturas de monócitos mantidas por 7 dias para geração de mDCs.

Molécula	Mono Dia 0 ^a (N = 5)		Mono Dia 7 ^b (N = 5)		Citocinas ^c (N = 5)		MLT ^d 10pM (N = 5)		MLT ^d 1nM (N = 5)		MLT ^d 1µM (N = 5)	
	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI	%	Índice MFI
HLA-DR	96,03 ± 3,56	3,02 ± 4,66	92,94 ± 5,45	3,36 ± 3,35	96,94 ± 7,56	1 ± 0	95,15 ± 3,60	3,79 ± 3,00	96,01 ± 1,83	2,57 ± 2,41	92,11 ± 7,23	3,67 ± 3,91
CD11c	83,76 ± 10,55	2,72 ± 2,29	76,07 ± 18,04	1,26 ± 0,49	75,65 ± 15,60	1 ± 0	84,31 ± 12,59	1,64 ± 0,57	83,61 ± 10,23	1,63 ± 0,66	72,70 ± 27,43	1,53 ± 0,88
HLA-ABC	85,24 ± 13,22	7,02 ± 6,74	65,10 ± 19,24	3,06 ± 1,96	42,58 ± 14,82	1 ± 0	65,36 ± 17,76	4,37 ± 2,69	64,18 ± 18,10	2,65 ± 2,03	66,90 ± 17,02	3,85 ± 2,33
CD80	17,21 ± 18,73	1,60 ± 2,29	20,36 ± 14,12	0,21 ± 0,17	43,86 ± 25,16	1 ± 0	15,54 ± 15,44	0,29 ± 0,30	17,64 ± 16,55	0,48 ± 0,44	13,52 ± 17,62	0,19 ± 0,28
CD83	16,27 ± 28,17	3,31 ± 5,74	14,04 ± 19,92	0,31 ± 0,50	23,68 ± 18,70	1 ± 0	18,80 ± 26,47	0,59 ± 0,83	18,60 ± 26,04	0,55 ± 0,83	5,68 ± 6,13	0,18 ± 0,27
CD86	81,69 ± 9,35	3,40 ± 2,66	49,61 ± 20,19	1,32 ± 0,49	33,96 ± 12,91	1 ± 0	45,82 ± 14,64	1,53 ± 1,04	47,74 ± 17,65	1,78 ± 2,12	46,98 ± 32,23	0,81 ± 0,47
CD40	16,54 ± 16,46	0,79 ± 0,80	15,82 ± 18,74	0,49 ± 0,50	22,96 ± 15,45	1 ± 0	4,92 ± 6,83	0,25 ± 0,36	7,74 ± 10,80	0,47 ± 0,73	12,24 ± 12,52	0,54 ± 0,73
CD116 *	82,38 ± 11,08	20,21 ± 18,81**	60,84 ± 13,18	1,81 ± 2,38	46,17 ± 16,10	1 ± 0	60,09 ± 13,90	2,51 ± 2,15	62,13 ± 8,00	3,00 ± 2,78	55,65 ± 25,43	2,13 ± 2,58
CD120	66,48 ± 12,63	64,76 ± 103,00	21,84 ± 20,88	6,61 ± 13,39	31,14 ± 22,89	1 ± 0	23,07 ± 27,25	1,42 ± 1,59	19,64 ± 25,21	0,66 ± 1,02	14,74 ± 12,97	0,68 ± 0,80
CD124 #	9,97 ± 9,06	41,62 ± 52,57###	15,42 ± 21,62	3,08 ± 6,77	15,14 ± 19,60	1 ± 0	16,80 ± 23,01	2,96 ± 6,04	18,10 ± 24,82	3,69 ± 7,21	6,98 ± 13,85	2,26 ± 4,79

^a Monócitos obtidos após separação por gradiente de densidade; ^b Monócitos mantidos em meio R-10 por 7 dias;

^c Monócitos mantidos por 7 dias em R-10 suplementado com GM-CSF, IL-4 e TNF-α; ^d Monócitos mantidos por 7 dias em R-10 suplementado com MLT nas concentrações descritas. Os valores representam as médias ± desvio padrão de N = 5 experimentos.

* Anova P < 0,0038; ** Teste de Tukey P < 0,05 entre Mono D0 e os demais grupos;

Anova P = 0,0356; ### Teste de Tukey P < 0,05 entre Mono D0 e os grupos Mono D7, Citocinas, MLT 10pM e MLT 1µM.

A frequência de células expressando HLA-DR se manteve equivalente em todas as culturas observadas. Células mantidas apenas em meio de cultura e as estimuladas por MLT apresentaram elevado índice de MFI em relação tanto ao controle positivo quanto ao controle negativo. Com relação à molécula CD11c as concentrações de MLT 10 pM e 1 nM mantiveram a frequência semelhante ao encontrado para o dia 0, o mesmo se mantendo para os índices das MFIs. Para a molécula representante do MHC de classe I HLA-ABC as médias das frequências e das MFIs foram semelhantes entre culturas de monócitos mantidos por sete dias somente com o meio de cultura e entre as concentrações de MLT 10 pM e 1 nM. Culturas tratadas com MLT na concentração de 1 µM apresentaram médias de frequência e do índice para MFI superiores ao controle. A análise das moléculas co-estimuladoras CD80, como encontrado anteriormente nas culturas mantidas por cinco dias, mostrou diminuição da frequência em relação às DCs obtidas com estímulo de citocinas. Para a molécula co-estimuladora CD86 a maior média entre as frequências foi observada para a cultura tratada com MLT 1 µM, mas não foi acompanhada pelo índice de MFI. Culturas estimuladas por MLT 1 nM apresentaram o índice para MFI mais elevado, porém não acompanhado pela frequência. Para outra molécula co-estimuladora, a CD40, a MLT não estimulou nem a frequência nem a MFI, quando comparada às culturas sem estímulo ou estimulada com as citocinas usuais. A frequência de CD83 apresentou médias próximas em todas as culturas com MLT, exceto 1 µM. O índice indicador da MFI apresentou-se elevado nos monócitos cultivados apenas com meio de cultura. Foram avaliadas as presenças dos receptores para citocinas CD116, CD124 e CD120. Culturas estimuladas pela MLT 1 nM apresentaram média das frequências de GM-CSF-R (CD116) maior que os demais grupos, dado observado também para a média dos índices quando comparada ao controle negativo (PBMCs cultivadas em meio R-10). DCs diferenciadas e ativadas com citocinas mantiveram valores abaixo desses. O receptor de TNF-α (CD120) foi detectado em valores maiores em culturas estimuladas por citocinas, os demais grupos tiveram valores abaixo destes. Valores maiores de média das frequências e dos índices para IL-4-R (CD124) foram detectados em culturas tratadas com MLT 1 nM ao se comparar este grupo com os controles positivo e negativo. Foi possível notar que esta substância exerceu alguns efeitos sobre as culturas de monócitos mantidos por cinco e sete dias em cultura. A MLT elevou a frequência de monócitos expressando CD83, comparados aos

monócitos mantidos com meio sem suplementação, o que pode ter sido um efeito causado por citocinas secretadas por Lys T contaminantes da cultura, mesmo após a adesão por duas horas. Houve uma redução na proporção de CD80, o que poderia caracterizar um efeito inibidor pela exposição por longo período (sete dias) das células em cultura com meio contendo MLT. No entanto, a presença de CD86 foi detectada em níveis acima dos encontrados nas DCs, com diminuição da MFI em concentração de 1 μ M da MLT. Também detectamos influência da MLT nas moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos, tanto pelo MHC de classe I quanto pelo MHC de classe II (HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente). Monócitos mantidos em cultura por cinco dias com MLT, quando comparados com as DCs imaturas obtidas com o uso de citocinas, apresentaram elevação da MFI de HLA-DR por exemplo. No entanto, notou-se posteriormente que as culturas mantidas em R-10 sem MLT apresentaram índice de MFI elevados. Este fato foi observado em experimentos subsequentes e pareceram indicar células em condições de adversidade, visto apresentarem diferenças em tamanho e mesmo em sua granulosidade sob a óptica da citometria de fluxo. A concentração apontada como fisiológica (1 nM) (GARCIA-MAURIÑO, 1997) aumentou a expressão de CD11c, CD86, CD16 e CD124 em relação ao observado para culturas estimuladas por MLT 1 μ M, concentração indicada como farmacológica (GARCIA-MAURIÑO, 1997). A proporção de CD86 foi elevada, mas semelhante aos grupos não tratados, o que poderia provocar a suspeita que o efeito observado é semelhante ao efeito provocado pela permanência das células em meio de cultura por um longo período. Essa observação também se deu para a molécula CD83, ressaltando-se a possibilidade de geração por células contaminantes das culturas, porém diferenças em algumas concentrações de MLT podem sustentar a hipótese de seu efeito. Com relação aos receptores de citocinas encontrados nas células, não se poderia descartar a possibilidade de terem valores menores devido ao fato de estarem ligados às citocinas e, portanto, sem livre acesso pelos anticorpos específicos marcados, principalmente CD116 e CD124. No 7º dia das culturas a MLT, na concentração de 1 nM, manteve em níveis mais elevados os receptores para GM-CSF e IL-4, mas não foram observadas influências provocadas pela MLT nos valores para o receptor de TNF- α .

No entanto, continuando esta caracterização e baseando-se em valores considerados baixos para uma célula apresentadora de antígenos como as DCs e

outros valores muito semelhantes ao controle negativo da diferenciação/ativação, foi necessário definir se os monócitos cultivados em presença de MLT estariam se diferenciando em DCs ou se o efeito da MLT apresentado constituía um fenômeno a parte, não deixando de ser indicativo da ação da MLT sobre esse tipo celular.

A detecção da presença de CD209 (molécula característica de DCs – BULLWINKEL et al., 2011; GEIJTENBEEK et al., 2000; RELLOSO et al., 2002) foi o fator determinante e a figura 3 representa um de dois experimentos realizados e mostra que somente culturas estimuladas com citocinas apresentaram uma elevada frequência de CD209. As células estimuladas por MLT tiveram, em algumas concentrações (10 pM e 1 nM), valores próximos dos obtidos no dia 0, bem como no sétimo dia de cultura mantida em R-10. Com relação aos índices de expressão desta molécula, as culturas estimuladas por MLT 10 pM e 1 nM apresentaram valores semelhantes aos obtidos para monócitos no sétimo dia de cultura. Essa baixa frequência e índice de MFI apresentados para a molécula CD209 foi o fator desencadeador para que outra estratégia para o uso da MLT fosse testada: sua utilização durante a etapa de adesão de duas horas das PBMCs em placas plásticas.

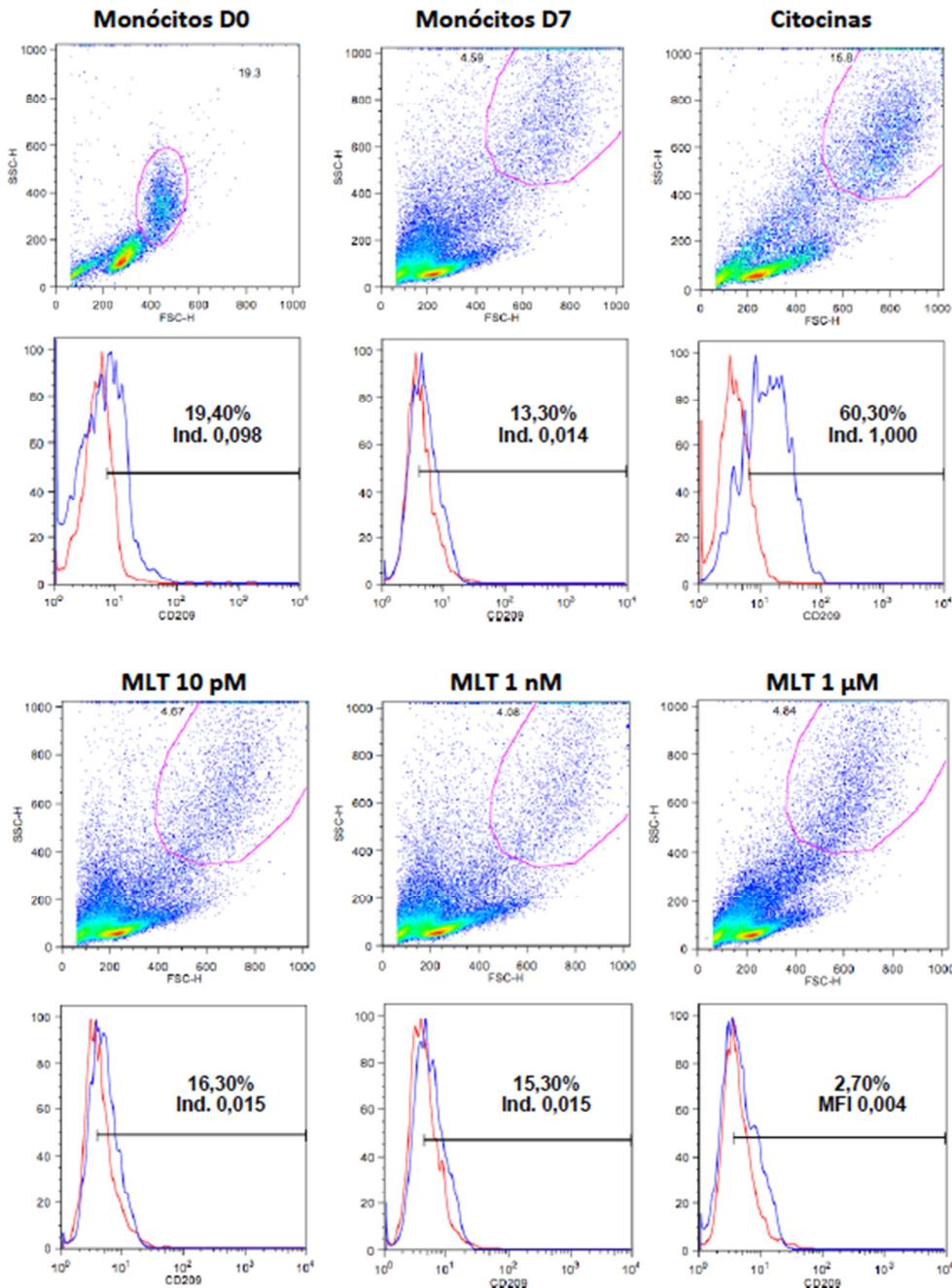


Figura 3 - *Dot plots* e histogramas representativos do padrão da população e das frequências e índices de MFI para a molécula CD209. As células foram analisadas após separação e antes do ensaio de adesão; após culturas mantidas por 7 dias em meio sem adição de substâncias (citocinas ou MLT); após suplementação com citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α); após suplementação com MLT nas concentrações selecionadas (10pM, 1nM e 1µM).

3.4 Caracterização das células mononucleares após duas horas de adesão em meio de cultura com suplementação de MLT

Foram utilizadas todas as concentrações iniciais para determinação das concentrações que seriam testadas a partir do ensaio de adesão. Assim, foram realizados experimentos buscando encontrar, alguma alteração no padrão de

moléculas de membrana que justificasse a escolha de concentrações que poderiam afetar a geração de DCs e sua função em relação à estimulação de linfócitos T *naive* alogênêicos. Na figura 4 encontram-se os *dot plots* representativos de um experimento mostrando o aspecto da população com e sem adição de MLT.

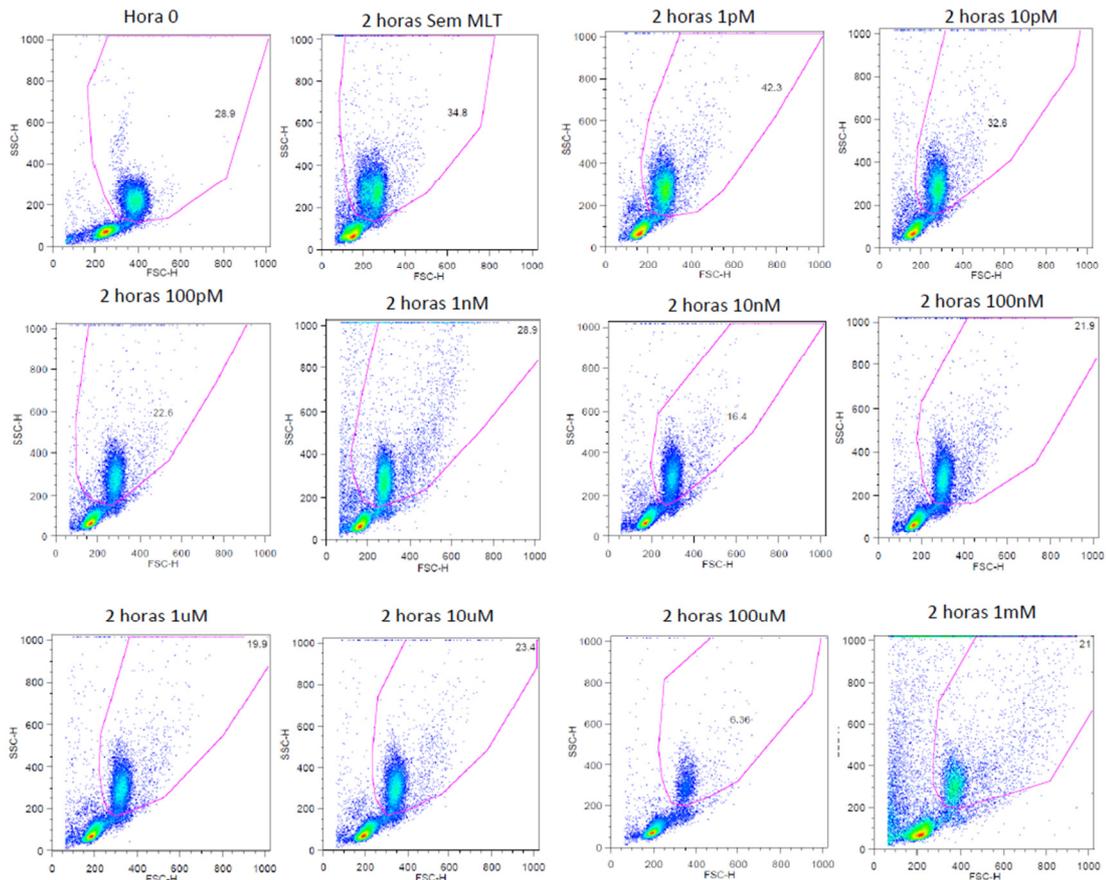


Figura 4 - *Dot plots* representativos do padrão da população de monócitos analisados antes e após a etapa de adesão com ou sem MLT. Os monócitos foram mantidos em meio de cultura suplementado com MLT nas concentrações indicadas ou somente em meio de cultura sem MLT. A indicação hora 0 representam os monócitos que não permaneceram em adesão, foram analisados após a separação em gradiente de densidade.

A tabela 3 agrupa os resultados destas análises. Para a análise dos efeitos da MLT sobre a adesão por duas horas dos monócitos, foram usadas células aderidas em meio de cultura sem MLT. Monócitos mantidos em meio de cultura foram utilizados como controle dos efeitos da adesão. O valor de referência é igual a 1 e é resultado da divisão da multiplicação da porcentagem pela MFI do grupo controle por ele mesmo conforme descrito em Material e Métodos.

A presença de CD11c foi avaliada e, como esperado, as células CD11c positivas apresentaram médias em torno de 80%, com certa uniformidade dos valores encontrados, embora tenha havido bastante variação entre as diferentes

doses de MLT utilizadas, principalmente na concentração de 1 mM, que parece ser um fator redutor desta positividade. O índice de expressão diminuiu com a adesão das células, mas a MLT mostrou ser um fator mantenedor da presença da molécula na célula, quando comparada ao controle sem MLT. Células CD11c⁺ são características da linhagem mielóide de DCs (CRAVENS et al., 2007) e experimentos *in vivo* com camundongos mostraram que o antígeno (OVA) conjugado à subunidade α_x da integrina CD11c, (expressa em todas as subpopulações de DCs murinas como um componente do receptor 4 do complemento (CR4)) atua como adjuvante na resposta humoral durante vacinação (WHITE et al., 2010).

Da mesma forma, para a molécula HLA de classe II (HLA-DR), encontra-se uniformidade dentro de uma proporção esperada (em torno de 90%), exceção para a concentração de 1 mM, como anteriormente apontado para CD11c. De um modo geral a expressão da molécula por célula, indicada pelo índice de expressão, se manteve intensificada nas culturas em que houve adição de MLT, em relação à hora 0. É importante que as culturas mantenham elevada proporção de células expressando HLA-DR, visto que esta é molécula essencial para a apresentação de antígenos aos Ly T CD4⁺ (EREN et al., 2006), ativando Lys T CD8 citotóxicos (KEENE; FORMAN, 1982), de elevada importância na imunidade anti-tumoral (revisto por ACOLLA et al., 2014) e, exatamente por isso, foi utilizada para determinação da população de DCs entre as células obtidas nas culturas.

Na tabela 3, observa-se que a MLT também modula a expressão de CD80, importante molécula co-estimuladora. No entanto, a expressão inicial (hora 0) de CD80, é relativamente mais elevada quando comparada com células após a adesão. Mas células tratadas com MLT só apresentam baixa proporção quando na menor concentração da substância (1 pM). Com relação ao índice de expressão, as concentrações mais elevadas de MLT (entre 100 nM e 1 mM) mostraram uma maior intensidade, confirmando um efeito da MLT sobre essa molécula co-estimuladora, necessária à atividade de estimulação de Lys (LANIER et al., 1995).

CD86 é outra importante molécula co-estimuladora mostrada na tabela 3. Aqui a porcentagem de células expressando CD86 se mantém uniforme entre as concentrações de MLT e os valores apresentados entre a hora 0 e as culturas não tratadas. As células tratadas pelas concentrações de 100 μ M e 100 nM também mostraram similaridade entre si, com valores relativamente variados e abaixo

daquele mencionado para a hora 0. Os índices de expressão mostraram-se acima do controle composto por células sem tratamento com MLT, mas ainda abaixo da hora 0. Tanto CD80 quanto CD86 participam da ativação de Lys T (LANIER et al., 1995), e CD86 está presente em grande quantidade nos monócitos desde o momento inicial de sua obtenção e não diminui durante a diferenciação (DILIOGLOU; CRUSE; LEWIS, 2003). Neste mesmo estudo foi demonstrado que o bloqueio de CD80 prejudica menos a ativação de Lys T CD4+ pelas DCs derivadas de monócitos que CD86 (uma diminuição de 24 e 71%, respectivamente). Um outro aspecto já descrito é a inibição da função de Treg quando ocorre a interação CD86-CD28, inversamente a este fato a ligação ao CD80, promove interação com CTLA-4 e estimula a função reguladora desses Lys (ZHENG et al., 2004), apontando características importantes para a regulação do sistema imunológico.

Outra molécula (CD83) é considerada de importância para a detecção de células dendríticas ativas (ZHOU; TEDDER, 1996) e sua análise indicou que a MLT manteve a porcentagem de expressão em níveis iniciais (hora 0), enquanto que células cultivadas pelo mesmo período sem MLT apresentaram queda da expressão de CD83 (tabela 3). Vale notar que o papel do CD83 na função das DCs ainda é pouco conhecido. Recentemente nosso grupo mostrou que esta molécula parece influenciar o influxo de cálcio em linfócitos T ativados pelas DCs (PINHO et al., 2014), além de haver a descrição de um papel modulador do CD83 sobre a expressão de MHC de classe II e CD86, na superfície de DCs (TZE et al., 2011).

A análise da presença do receptor para IL-4 (CD124) nos monócitos expostos à MLT durante sua adesão mostrou que, enquanto no momento inicial (hora 0) havia células apresentando esta molécula em alta proporção e intensidade, ocorreu diminuição de sua expressão, que, mais uma vez foi antagonizada pela presença da MLT (Tabela 3). A MLT parece evitar, portanto, que os receptores para IL-4 sejam perdidos em grande proporção no processo de adesão, o que seria vantajoso para obter a diferenciação dos monócitos em DCs em culturas onde esta citocina é usada para tal fim, como é bastante usual (BEDNAREK et al., 2010; DILIOGLOU; CRUSE; LEWIS, 2003; ZHANG et al., 2008; ZHENG et al., 2004).

Outra molécula avaliada neste período de adesão de duas horas, e que também está relacionada ao estímulo de diferenciação, foi o receptor para a citocina GM-CSF (CD116). Neste caso, porém, a adesão levou a um aumento de expressão

nas células controle, que não foi significativamente alterado pela presença da MLT (tabela 3).

Pode-se ver também na tabela 3 a análise para a presença do receptor para TNF- α , a molécula de superfície de membrana, CD120. Vale ressaltar que esse receptor exerce papel na ativação das DCs (CHOMARAT et al., 2003). Nota-se um efeito semelhante ao que ocorre com CD124, ou seja, no momento inicial (hora 0) as células têm uma positividade para este receptor que parece ser diminuída após a incubação por duas horas, que, no entanto, aparenta se manter conservada em algumas concentrações da MLT. Chama a atenção, porém, a concentração de 1 mM de MLT, que provocou inibição nítida da expressão de CD120. Embora para outros marcadores esta concentração de MLT tenha tido efeito estimulador, a análise microscópica da viabilidade das células expostas à mesma, sugere que ela possa ser tóxica, uma vez que se contou grande porcentagem de células positivas para o Azul de Trypan (dados não mostrados).

Estas células, cultivadas por duas horas, passaram a apresentar positividade para CD209, molécula característica de DCs (GEIJTENBEEK et al., 2000), como pode ser observado na tabela 3. Neste caso, a MLT provocou efeitos que, todavia, não apontam para um aumento ou diminuição predominantes. Vale ainda notar que a expressão de CD209 pode estar relacionada com o receptor para IL-4 como já descrito (SVAJGER et al., 2011).

Tabela 3 – Frequência e Índice de MFI de Monócitos após adesão por 2 horas em diferentes concentrações de MLT.

		TRATAMENTOS											
		Hora Zero	SEM MLT	MLT 1pM	MLT 10pM	MLT 100pM	MLT 1nM	MLT 10nM	MLT 100nM	MLT 1µM	MLT 10µM	MLT 100µM	MLT 1mM
MOLÉCULA	N												
% CD11c	2	89,83	89,30	91,00	88,92	86,31	87,69	86,85	90,85	87,93	86,95	90,18	81,73
ÍNDICE CD11c		2,795	1,000	1,069	2,002	1,364	1,658	1,674	1,589	1,527	1,521	1,574	1,433
% HLA-DR	2	88,84	81,13	91,49	92,10	89,12	91,42	90,94	89,89	90,91	90,51	92,53	88,45
ÍNDICE HLA-DR		0,919	1,000	1,343	1,602	0,963	1,375	1,154	0,994	1,184	1,186	1,488	1,688
% CD80	2	67,18	30,03	27,55	31,00	33,40	36,59	32,10	37,70	37,90	32,70	36,96	42,04
ÍNDICE CD80		1,802	1,000	0,727	0,835	0,838	0,938	0,773	1,024	1,083	1,006	1,170	2,012
% CD86	2	91,87	86,10	88,75	88,22	85,01	86,98	88,01	90,36	87,33	86,35	89,98	86,48
ÍNDICE CD86		3,785	1,000	1,311	1,795	1,486	1,683	1,833	1,742	1,585	1,613	1,722	1,710
% CD83	2	79,58	63,35	78,65	80,92	74,41	81,38	73,21	78,06	78,73	77,60	81,23	77,93
ÍNDICE CD83		1,430	1,000	1,479	1,616	1,450	1,553	1,144	1,387	1,431	1,453	1,623	1,747
% CD116	2	90,83	88,03	87,20	88,55	85,90	88,79	87,30	87,65	87,80	85,75	90,51	90,59
ÍNDICE CD116		0,599	1,000	0,957	1,114	0,963	0,905	0,909	1,026	0,995	0,893	0,875	0,862
% CD120	2	85,73	77,83	79,45	79,45	79,30	83,54	81,55	79,95	77,85	81,65	83,61	71,20
ÍNDICE CD120		0,549	1,000	1,005	0,830	0,976	1,280	1,165	0,959	0,864	1,493	1,132	0,472
% CD124	2	63,28	10,73	27,80	37,50	33,40	39,54	36,25	36,95	36,45	33,85	39,81	34,39
ÍNDICE CD124		10,760	1,000	7,243	8,171	6,380	8,164	7,476	5,745	8,999	8,183	8,417	16,920
% CD209	2	31,23	42,40	48,10	55,57	56,56	57,18	54,71	49,61	53,78	51,20	55,53	49,65
ÍNDICE CD209		0,454	1,000	0,942	1,268	1,246	1,244	1,166	1,017	1,121	1,077	0,999	1,400

Os dados possibilitaram a escolha das concentrações de MLT que apresentaram no conjunto uma ampla ação sobre os receptores e moléculas de membrana que bem caracterizam as DCs. Assim, estudamos mais apuradamente as concentrações de 10 pM (HLA-DR, CD83, CD116, CD120, CD124 e CD209), 1nM (HLA-DR, CD83, CD116, CD120, CD124 e CD209) e 100 µM (CD11c, HLA-DR, CD86, CD83, CD116, CD120, CD124 e CD209).

3.5 Caracterização das DCs obtidas após permanência das PBMCs por duas horas em meio contendo MLT nas concentrações de 10 pM, 1 nM e 100 µM

Na figura 5 pode-se ver que a molécula CD11c manteve frequências e índices de MFI uniformes nos experimentos quanto à sua presença e não mostra diferenças significativas em relação ao grupo controle positivo tratado com citocinas. Observa-se também que as células que não receberam tratamento têm a porcentagem de células positivas para CD11c diminuída. Por outro lado, a MFI relativa dos grupos tratados na adesão com MLT apresentaram uma tendência à diminuição de suas médias quando comparados ao controle. As células sem tratamento apresentaram médias reduzidas em relação ao controle. Aqui ressalta-se que o fato pode estar relacionado com condições de cultivo em um estresse elevado para as células, visto que a não suplementação deste grupo com as citocinas usuais e, um período de cultivo relativamente longo, podem ocasionar uma perda da estabilidade da membrana e conseqüentemente a diminuição da frequência de células expressando a molécula e mesmo apresentar ligações inespecíficas, elevando a MFI.

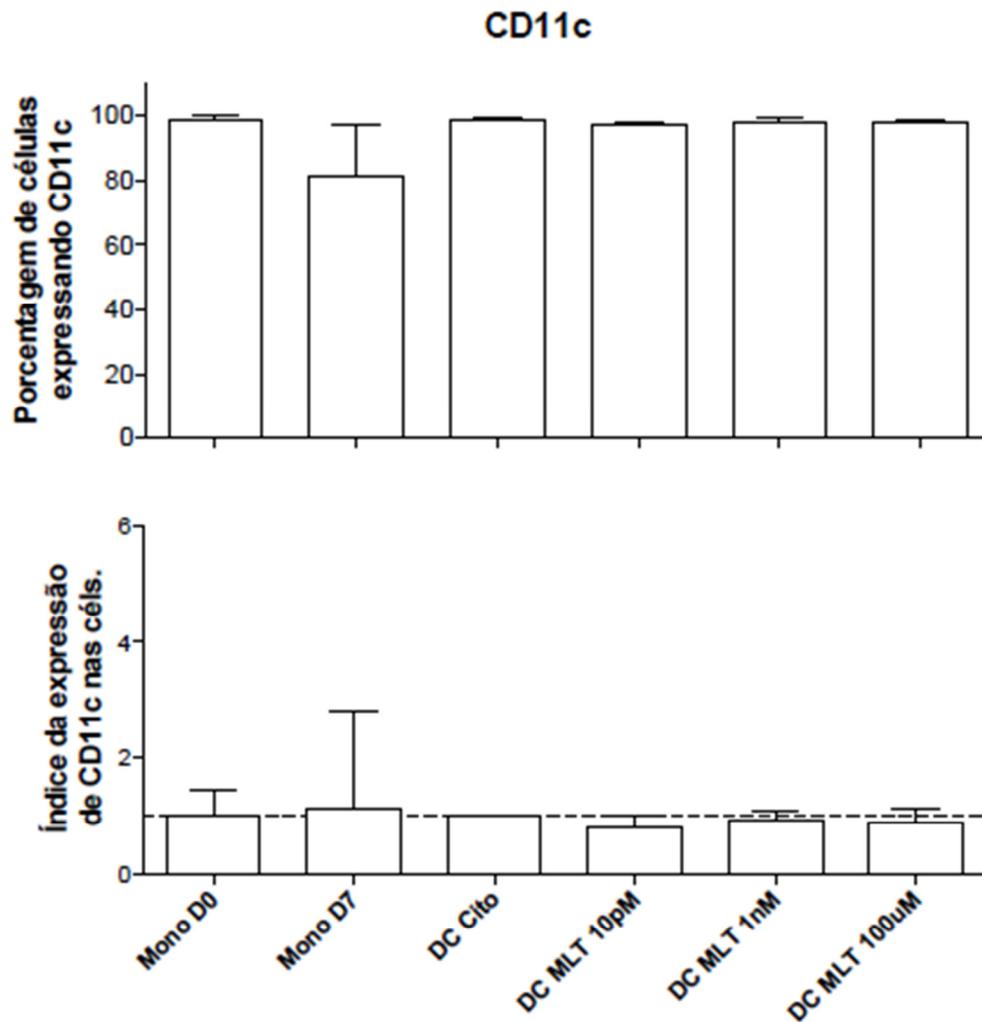


Figura 5 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD11c** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,001$ entre Sem trat e demais grupos. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,9515**.

Células obtidas sob efeito da MLT (figura 6) apresentaram médias de porcentagens compatíveis com uma frequência esperada (acima de 95% de positividade para HLA-DR) e, além disso, ficaram acima de valores obtidos para HLA-DR das culturas tratadas apenas com citocinas, com exceção de DC MLT 10pM. A concentração de MLT 1nM contribuiu para a elevação da média neste grupo, acompanhado pelo índice de expressão, visto que não houve diferença significativa. Nota-se que o índice encontra-se elevado em células que não foram

tratadas. Novamente, alerta-se para a hipótese de que condições extremas estejam alterando as condições fenotípicas das células mantidas nessas culturas.

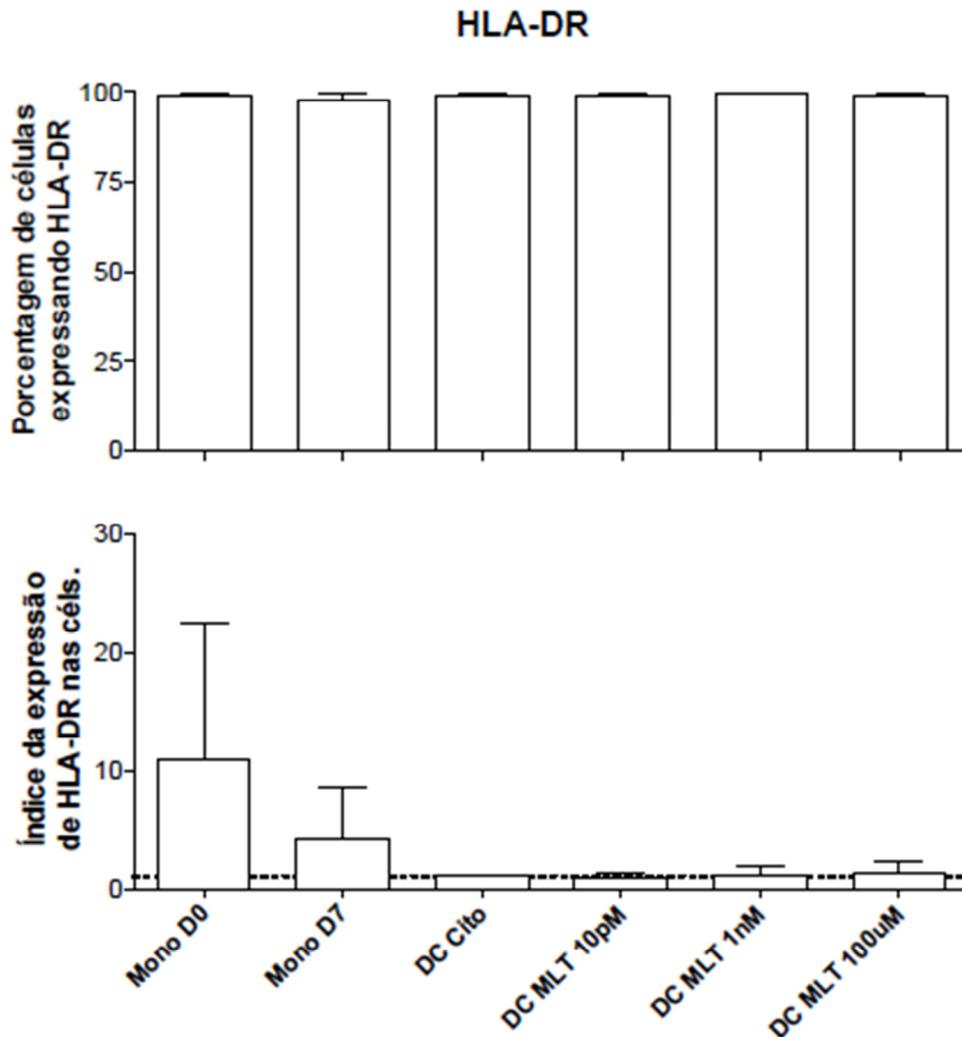


Figura 6 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **HLA-DR** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0196** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D7 e DC MLT 1nM e 100 μ M. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0004** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D0 e demais grupos.

A figura 7 nos mostra a porcentagem de expressão e a MFI relativa dada pelo índice de expressão para a molécula co-estimuladora CD80. De um modo geral, as médias se apresentaram uniformes, com uma média de maior porcentagem e maior MFI para o grupo obtido com o uso de MLT na concentração de 1nM. Culturas que não receberam qualquer tratamento mostraram baixa porcentagem de CD80. Com

relação ao índice que nos mostra a MFI, parece que o efeito dose dependente anteriormente apresentado foi eliminado com o aumento do número de experimentos.

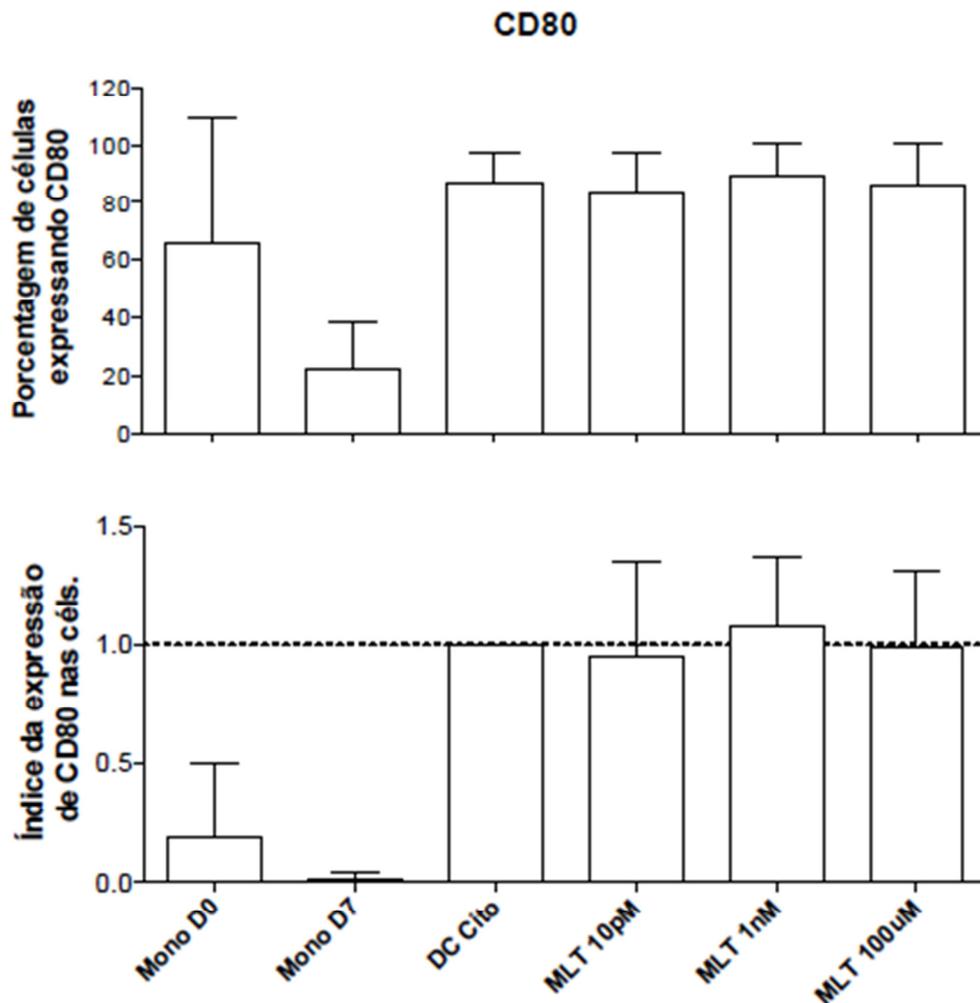


Figura 7 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD80** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D7 e demais grupos. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D0 e demais grupos e entre Mono D7 e demais grupos.

Outra molécula co-estimuladora cuja modulação pela MLT foi estudada, foi a CD86. Podemos ver (fig. 8) que células tratadas com 10 pM apresentaram o menor nível para CD86. A maior proporção de células positivas para esta importante molécula co-estimuladora ficou com o grupo cultivado com a participação de MLT 1

nM. O índice de expressão (MFI) teve médias acima do controle positivo (DC Cito), sendo a dose de 100µM de MLT a que apresentou a maior média neste aspecto.

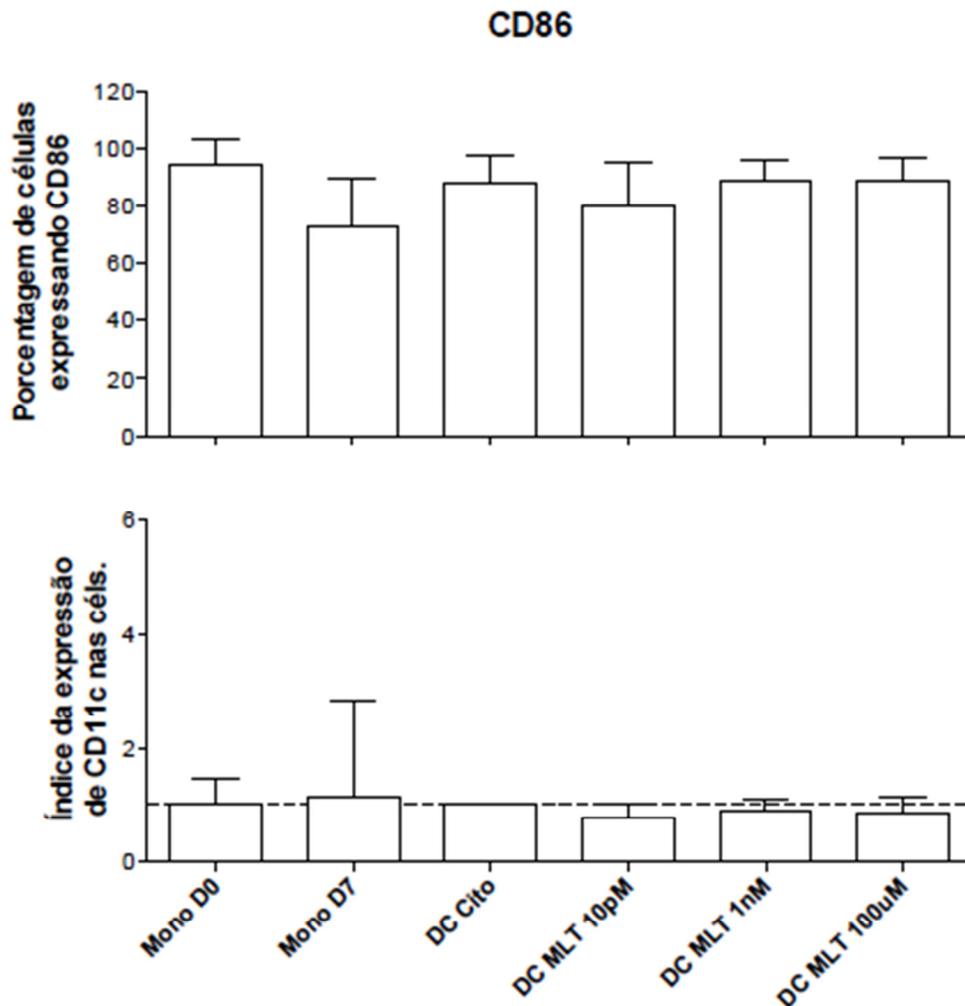


Figura 8 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD86** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0149** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D0 e Mono D7. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,1085**.

Outra molécula importante para a interação DCs - Linfócitos, a molécula co-estimuladora CD40, tem seus resultados apresentados na figura 9. DCs expressando CD40 estão mais bem representadas pelas culturas tratadas apenas com citocinas e que mantiveram certa similaridade com os resultados observados em DCs tratadas previamente com MLT 100 µM, com relação à frequência. Com

relação ao índice para MFI essa concentração mostrou-se mais elevada em relação às culturas suplementadas com citocinas. Nota-se também que há uma tendência de aumento tanto de frequência quanto de MFI do tipo dose-resposta nos grupos tratados com MLT. Células cultivadas sem suplementação mantiveram-se abaixo de todas as outras culturas.

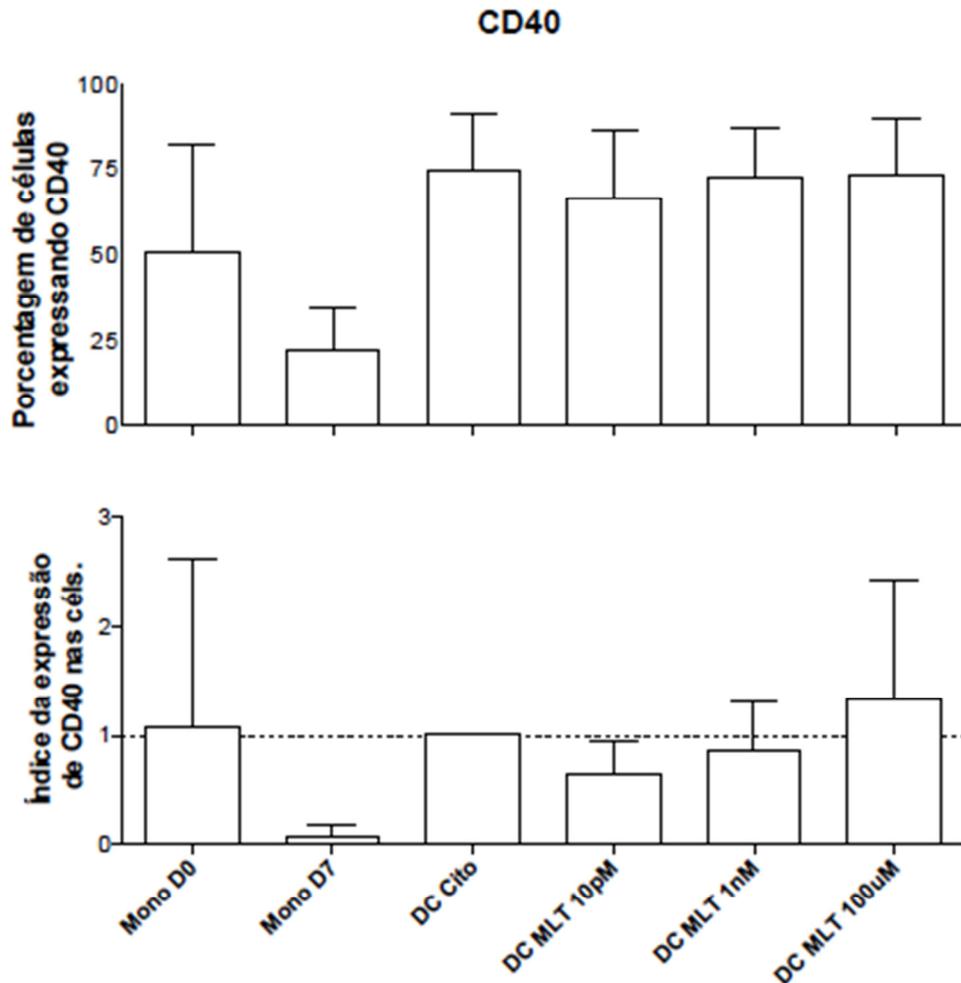


Figura 9 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD40** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D7 e demais grupos. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0075** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D7 e DC MLT 100 μ M.

A análise da expressão de CD209 nas células das diferentes culturas pode ser vista na figura 10. A frequência de células positivas para CD209 se manteve

elevada entre as DCs e a maior média de porcentagem foi apresentada pelas DC obtidas com suplementação por MLT em concentração de 1 nM, mas mesmo assim próxima das obtidas com MLT 10pM e as tratadas unicamente com citocinas. Culturas que não receberam qualquer suplementação e foram mantidas somente em meio de cultura apresentaram uma porcentagem baixa de expressão desta molécula. A intensidade de fluorescência para estas células não suplementadas também ficou muito baixa. Por outro lado as DCs obtidas por tratamento inicial com MLT, embora tenham apresentado médias para MFI inferiores às observadas para citocinas, mostraram tendência a um comportamento dose-dependente inversamente proporcional, mostrando elevação do índice para as menores concentrações de MLT.

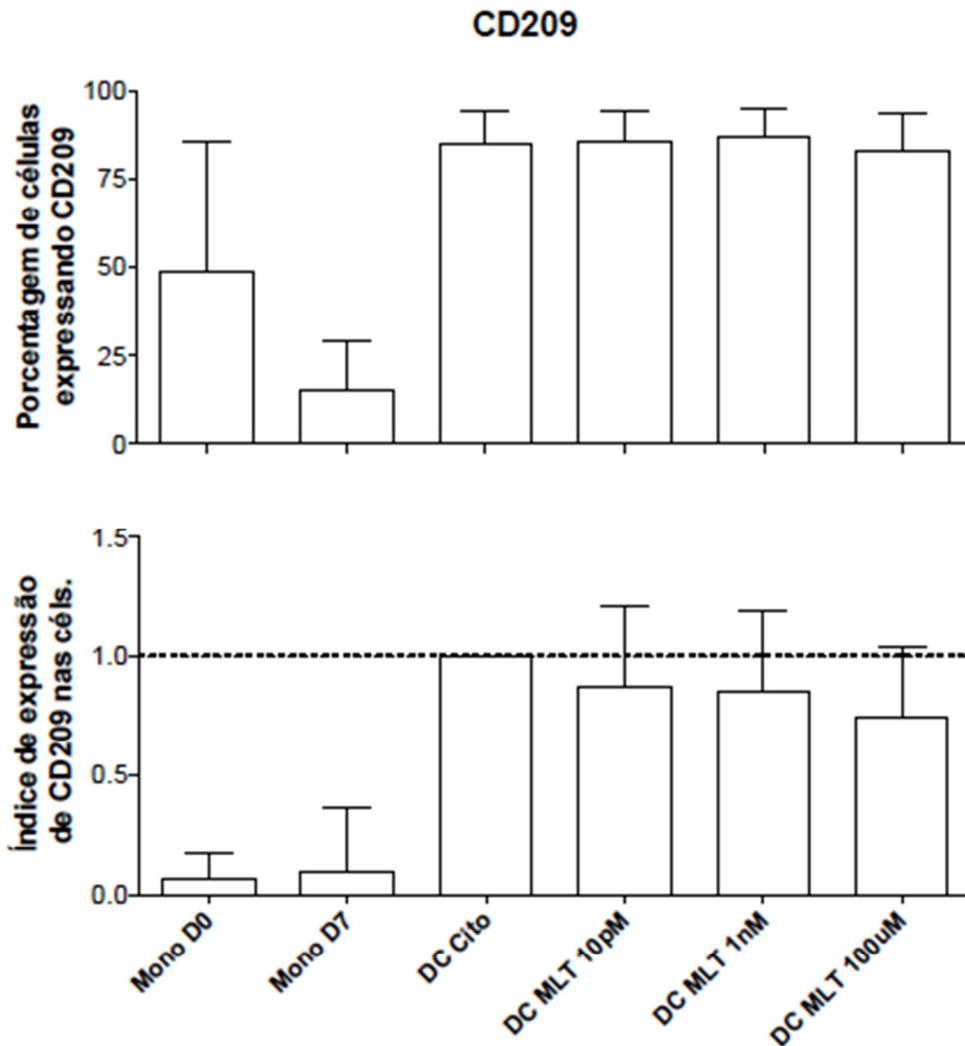


Figura 10 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD209** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D0 e demais grupos e entre mono D7 e demais grupos. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D0 e os grupos de DCs e entre Mono D7 e os grupos de DCs.

Também descrita como importante na identificação de DCs maduras, CD83 foi analisada e os resultados encontram-se na figura 11. As médias das frequências de células expressando CD83, foram maiores para as DCs que receberam MLT na etapa de adesão nas concentrações de 1 nM e 100 μ M, quando comparadas às que receberam somente citocinas. Há correspondência com os dados iniciais obtidos na etapa de adesão, o que pode levar a uma hipótese de que o efeito obtido possa ser

mantido durante o tempo de cultura. Nas células não tratadas essa expressão se manteve reduzida se comparada às demais. As médias dos índices de expressão, observados para as culturas que receberam MLT, superaram a média do observado para Citocinas, no entanto, ao contrário do observado com a média das porcentagens, o grupo tratado com MLT 1nM ficou abaixo dos demais grupos tratados com MLT.

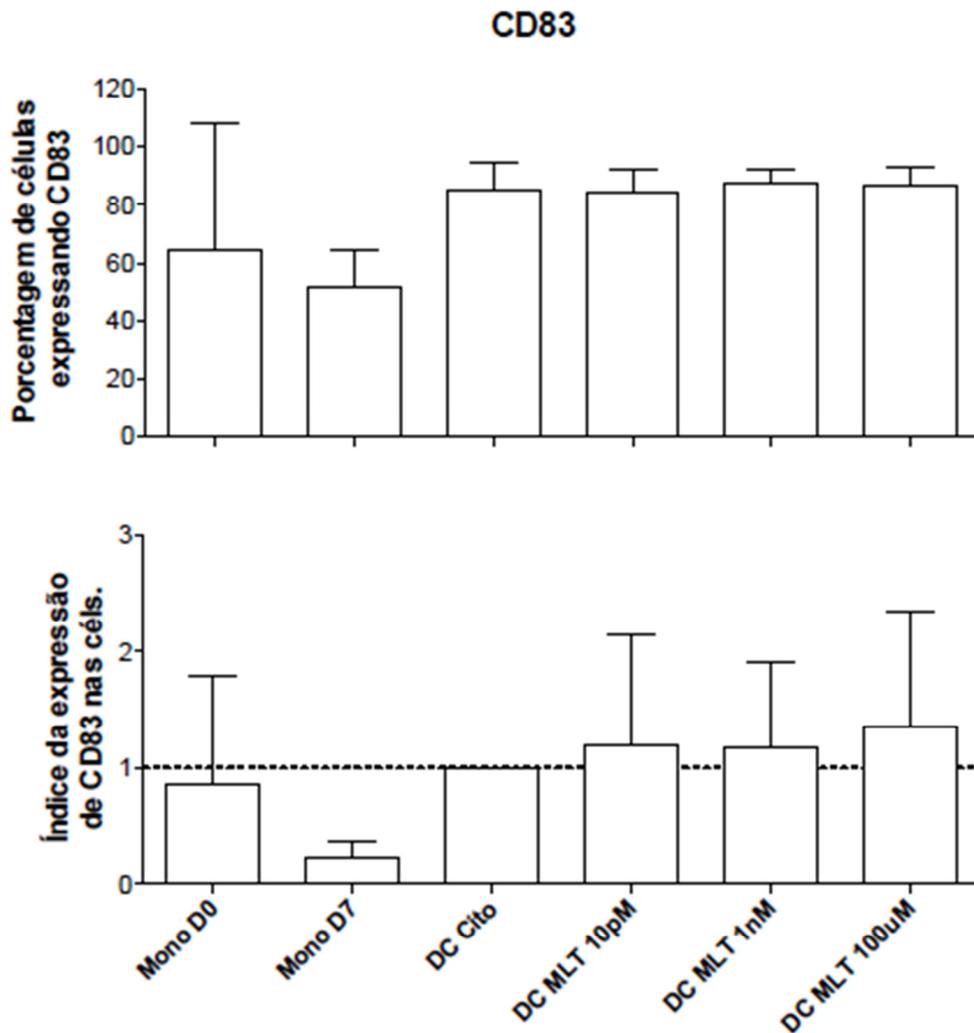


Figura 11 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD83** nas DCs que receberam MLT ou não durante o período de adesão por 2 horas (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração). Após a adesão o sobrenadante foi retirado e as culturas foram mantidas com ou sem meio suplementado com citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas como **DC Cito**). O controle considerado para o índice de expressão foram as **DC Cito**, células que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas. Mono D0 e D7 representam os monócitos obtidos após separação e os mantidos por sete dias em meio R-10, respectivamente. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos sobre as colunas representam os desvios padrão de $n = 9$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0001** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D7 e os grupos de DCs. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0257** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre Mono D7 e DC MLT 100 μ M.

3.6 Perfil das citocinas produzidas durante culturas de DCs imaturas

Os sobrenadantes armazenados foram submetidos à análise quanto à presença de citocinas, eventualmente produzidas pelas células cultivadas, através do método CBA® descrito resumidamente em material e métodos. Na figura 12 podem-se ver os valores encontrados para as citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , obtidos pela análise dos sobrenadantes de DCs coletados no quinto dia da cultura (DCs ainda imaturas) antes da adição de TNF- α , a fim de verificar se o uso de MLT na etapa de adesão interfere na produção desta e das demais citocinas pelas células.

Alguns resultados para citocinas não ultrapassaram o limite de detecção do ensaio, como foi o caso de IL-12p70 e IL-1 β . A primeira observação neste ensaio foi o efeito da diferenciação das células em DCs sobre a secreção das diversas citocinas, que se pode notar na comparação entre as células controle, mantidas em meio sem suplementação com as citocinas e os demais grupos. Como mostra a figura 12, a diferenciação está associada a um aumento de IL-6 (e IL-10, quando a MLT está presente) uma diminuição de IL-8 (esta significativa, com $p < 0,05$) e nenhum efeito nítido sobre TNF- α .

Já na comparação entre as células expostas à MLT antes da adição das citocinas e as células apenas tratadas com as citocinas, os efeitos foram mais discretos e dose-dependentes (10 pM e 1 nM). Nota-se pelas médias obtidas que a MLT nas concentrações de 10 pM e 1 nM parece estimular as iDCs a produzirem IL-6 mais intensamente do que quando somente as citocinas (GM-CSF e IL-4) foram adicionadas. Na verdade, já foi descrita a produção de IL-6 por células das linhagens linfocíticas e monocíticas por estímulo da MLT (GARCIA-MAURIÑO et al., 2000).

Os resultados para IL-8 que se mostraram mais uniformes e com médias significativamente diferentes ($p = 0,0441$) quando as células sofreram ação das citocinas, não indicaram, por outro lado, efeito da MLT em nenhuma dose. Observa-se aqui uma correspondência inversa entre IL-6 e IL-8, células que produziram mais IL-6 (após sua diferenciação) produziram menos IL-8 e vice-versa.

Com relação à IL-10 notamos que apenas algumas culturas, e somente as tratadas com MLT, produziram a citocina, ainda que muito próximo do limite de detecção. Embora tenha sido detectada a presença de IL-10 não se pode inferir quanto à existência de um efeito tolerogênico/regulador, uma vez que esta citocina,

quando secretada por células com atividade regulador/supressora, atinge níveis muito mais elevados (RAMOS et al., 2012).

A quantidade de TNF- α , ainda que baixa, foi detectada pelo método. Observamos para esta citocina uma tendência à inibição de sua secreção pelas diferentes concentrações de melatonina, mas já tendendo a diminuir pela diferenciação induzida pelas citocinas GM-CSF e IL-4 isoladamente.

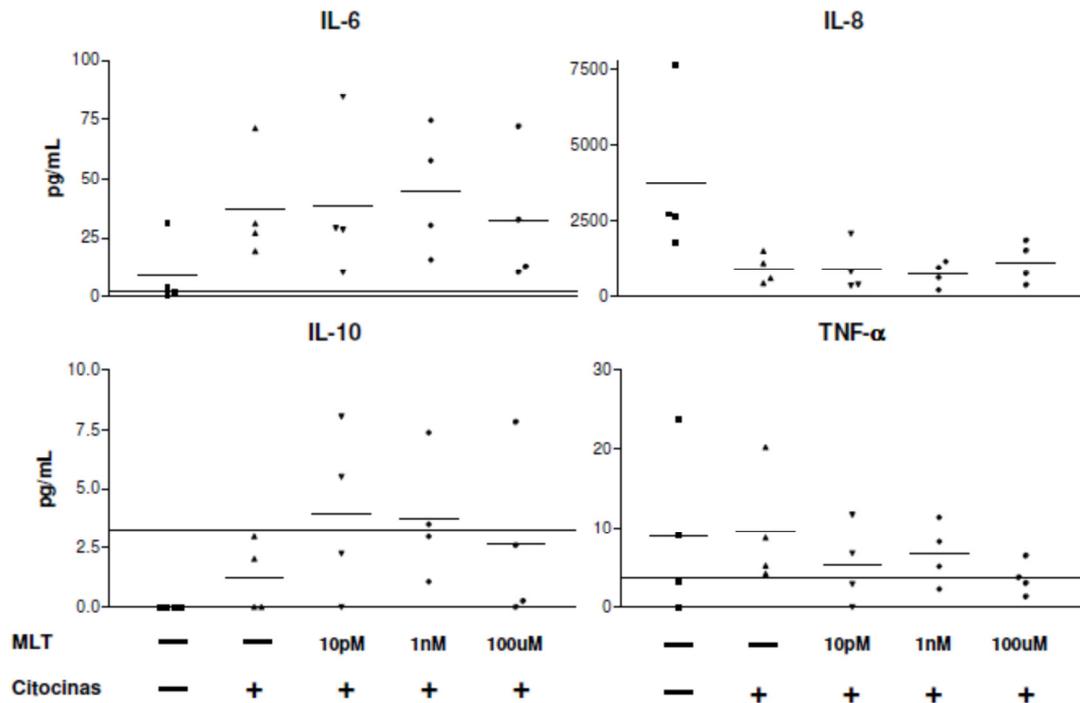


Figura 12 - Produção de citocinas (IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) por DCs imaturas, analisada através do sobrenadante de culturas que receberam MLT nas concentrações de 10 pM, 1nM e 100 μ M na etapa de adesão de duas horas, seguido de citocinas GM-CSF e IL-4, ou somente as citocinas (sem MLT), ou monócitos mantidos em meio de cultura (sem citocinas ou MLT). Os sobrenadantes foram retirados no 5 $^{\circ}$ dia de cultura, antes da adição de TNF- α . A linha contínua representa o limite de detecção do kit. Os traços curtos representam as médias obtidas. Foram analisadas n = 4 culturas de cada grupo. Valores significativos foram encontrados para IL-8 P = 0,0441 (Repeated Measures ANOVA). IL-6 P = 0,0587; IL-10 P = 0,0547; TNF- α P = 0,4696.

3.7 Perfil das citocinas produzidas pelas mDCs após adição de TNF- α no 5 $^{\circ}$ e mantida até o 7 $^{\circ}$ dia de cultura

Os sobrenadantes das mDCs coletados no sétimo dia das culturas, foram analisados quanto à presença das mesmas citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α . Novamente, não foi detectada a presença de IL-1 β e de IL-12p70.

Também, a primeira observação é do efeito da diferenciação sobre as demais citocinas. Foi detectada a presença de IL-6 e as médias são mostradas na figura 13.

Houve uma tendência das células tratadas com MLT na etapa de adesão, apresentarem valores superiores de IL-6, quando comparadas com DCs que não receberam MLT na etapa de adesão ou com as células que permaneceram em meio de cultura, embora os níveis detectados estejam muito baixos. A análise da presença de IL-8 mostrou a média mais elevada para esta quimiocina nas culturas que foram mantidas somente com meio de cultura. As concentrações de 100 μ M e 1 nM tiveram médias superiores ao controle (DCs tratadas com citocinas que não receberam MLT em qualquer momento) e, por fim, as culturas que receberam MLT na concentração de 10 pM. A presença de IL-10 foi detectada em níveis muito baixos apenas em um dos experimentos cujas culturas foram estimuladas por MLT 10 pM e 1 nM na etapa de adesão.

Foram encontrados níveis de TNF- α em todos os sobrenadantes das culturas, com um efeito dose-dependente e inversamente proporcional à quantidade de MLT adicionada às culturas. Esta é uma observação intrigante. Uma vez que a citocina foi adicionada às culturas, na concentração de 50 ng/ml, seria de se esperar sua detecção nas mesmas, em concentrações maiores do que as encontradas, caso ela não fosse consumida pelas células. No entanto, este consumo parece ocorrer, sendo os níveis encontrados nas culturas cerca de 1000 vezes menores do que o inicialmente adicionado. Neste ponto ganha relevância a análise da expressão de CD120 pelas células. Como mostrou a tabela 3, a adesão dos monócitos provoca um aumento claro da expressão desta molécula, que, na presença de MLT, é ainda maior, em porcentagem de células, e, para as doses maiores, também quanto ao nível de expressão. A citocina TNF- α está relacionada com a sobrevivência celular (neste caso das DCs), por meio da regulação entre NF- κ B, JNK e AP-1, o que poderia aumentar a magnitude do sinal entre DCs e Lys (KRIEHUBER et al., 2005). De modo semelhante, a MLT também já foi descrita como moduladora dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1 na proteção a células neuronais (BENI et al., 2004).

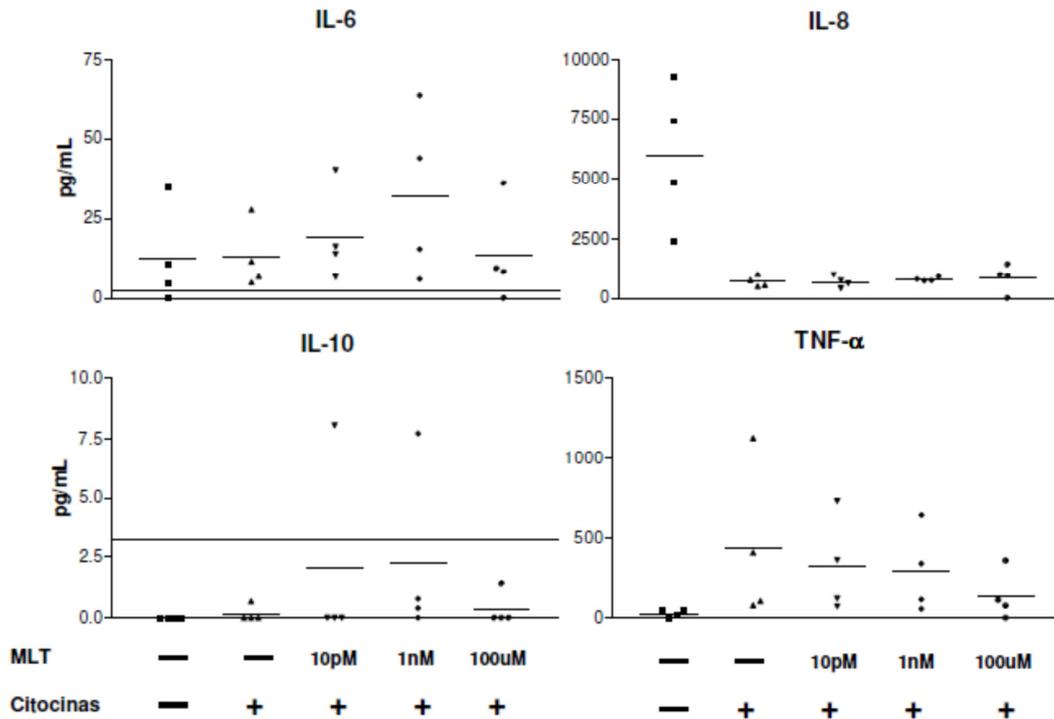


Figura 13 - Produção de citocinas (IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) por DCs maduras, analisada através do sobrenadante de culturas que receberam ou não MLT nas concentrações de 10 pM, 1 nM e 100 μ M na etapa de adesão de duas horas, seguido de citocinas GM-CSF e IL-4 até o 5^o dia e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia ou Monócitos mantidos em meio de cultura sem citocinas ou MLT. Os sobrenadantes foram retirados no sétimo dia de cultura. As linhas contínuas representam o limite de detecção do kit. Os traços curtos representam as médias obtidas. Foram analisadas n = 4 culturas de cada grupo. Valores significativos foram encontrados para IL-8 P = 0,0004 (Repeated Measures ANOVA). IL-6 P = 0,4141; IL-10 P = 0,4672; TNF- α P = 0,1806.

3.8 Caracterização funcional das DCs obtidas sob ação da MLT por meio de co-cultura com linfócitos

Com relação às características funcionais, as DCs que foram derivadas de monócitos submetidos aos efeitos da MLT durante a etapa de adesão foram co-cultivadas com linfócitos T com a finalidade de avaliar o efeito alo-estimulador dessas. Foram analisadas as moléculas CD4, CD8 e CD25 de linfócitos que proliferaram por estímulo das DCs. Foi utilizado como índice de proliferação o cálculo com base na MFI dos linfócitos do grupo controle (Lys com CFSE, mas sem estímulo de proliferação) dividida pela MFI das amostras (Lys corados com CFSE estimulados pelas DCs e que, portanto, apresentam redução na MFI a cada divisão).

A figura 14 mostra um experimento representativo da co-cultura de Lys T alogenênicos com as DCs geradas *in vitro* com ou sem participação da MLT em diferentes concentrações. São indicados no interior de cada quadro a porcentagem de proliferação dos linfócitos e os respectivos índices de proliferação. Podemos observar, em um experimento representativo, que as DCs derivadas de monócitos aderidos sob estímulo de MLT, tiveram atividade aloestimuladora superior à de DCs controle, com a concentração de 1 nM demonstrando a maior atividade.

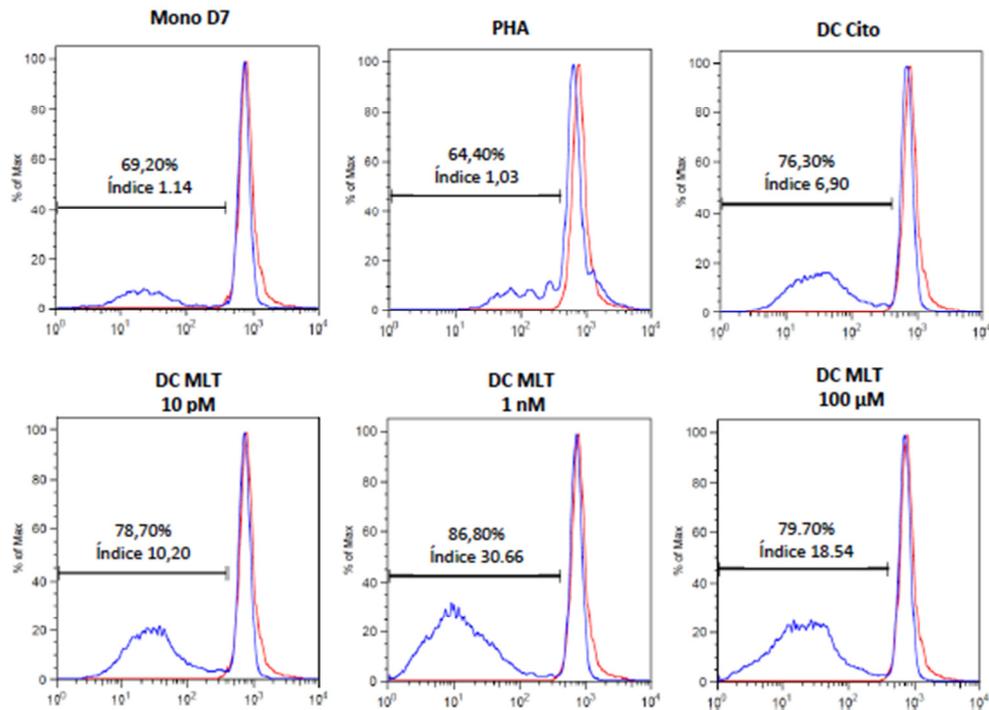


Figura 14 - Índice de proliferação de linfócitos (Iy) mantidos em co-cultura com DCs, por um período de 5 dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC), e suas respectivas frequências (%) em um experimento representativo. As DCs foram geradas após adesão em meio contendo MLT em diferentes concentrações e, após a retirada do meio com MLT, foram adicionadas as citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) até o dia 5 e a partir deste até o dia 7 receberam TNF- α (indicadas por **DC MLT** e a concentração correspondente). O grupo indicado por **DC Cito** teve a etapa de adesão sem qualquer suplementação, e o grupo indicado como **Mono D7** não recebeu MLT na etapa de adesão e nem citocinas durante os sete dias de cultura. **PHA** representa os linfócitos que receberam estímulo de fitohemaglutinina A.

A tabela 4 agrupa os resultados de oito experimentos realizados nas mesmas condições e confirma que DCs geradas com estímulo de MLT na etapa de adesão dos monócitos apresentam maior atividade linfo-estimuladora, quando comparadas às DCs geradas somente com citocinas ou com as células que não receberam citocinas nem melatonina, indicando um efeito em longo prazo da MLT sobre as DCs geradas. Como esperado, os monócitos mantidos em meio de cultura pelo mesmo período apresentaram também uma estimulação reduzida dos Lys.

Coincidentemente, a expressão de CD80 e CD86 também se manteve discretamente mais elevada no grupo tratado com MLT 1nM, correlacionando-se com o fenômeno observado para a proliferação. As porcentagens de proliferação não mostram a mesma tendência que os índices calculados. Isto mostra, na verdade, que o que aconteceu não foi um aumento do número de células respondendo ao estímulo, mas sim, um aumento da intensidade/duração do estímulo, o que leva a um maior número de divisões e, portanto, a um índice de proliferação maior. Já a análise dos subtipos (CD4 e CD8) não mostrou alterações correspondentes aos índices de proliferação.

Tabela 4 – Índice de Proliferação e Frequência de Lys Alogênicos após co-cultura

	Anova (P) ^a	Estímulo						
		--- ^b	Mono D7 ^c	DC Cito ^d	DC MLT 10 pM ^e	DC MLT 1 nM ^e	DC MLT 100 μM ^e	PHA ^f
Índice de Proliferação	0,1070	1,0 ± 0	2,65 ± 4,22	6,55 ± 8,17	7,83 ± 10,94	12,39 ± 13,04	8,07 ± 9,59	1,18 ± 0,09
Porcentagem de Proliferação	0,2990	---	36,97 ± 23,20	53,93 ± 24,67	49,30 ± 26,82	54,00 ± 25,51	57,46 ± 22,50	33,14 ± 24,65
Porcentagem de CD4+	0,9644	---	45,74 ± 26,17	48,15 ± 10,82	46,88 ± 10,77	45,93 ± 9,91	45,06 ± 10,58	39,55 ± 33,11
Porcentagem de CD8+	0,9933	---	24,19 ± 22,91	20,28 ± 10,05	20,76 ± 9,30	20,87 ± 8,44	20,76 ± 8,75	20,20 ± 18,28
Porcentagem de CD4+CD25+	0,9930	---	17,10 ± 20,98	22,89 ± 23,55	21,87 ± 20,43	23,46 ± 23,44	19,13 ± 22,31	21,65 ± 24,60

^a N = 8; ^b Lys corados com CFSE mas sem estímulo que serviram como controle da proliferação; ^c Monócitos cultivados por sete dias; ^d DCs geradas em meio com citocinas;

^e DCs geradas após adesão em meio com MLT nas concentrações mencionadas;

^f Fitohemaglutinina A

3.9 Perfil das citocinas produzidas pelos linfócitos T alogênicos mantidos em co-cultura com as mDCs por cinco dias

A figura 15 mostra os resultados obtidos com a análise dos sobrenadantes das co-culturas de mDCs com Lys T alogênicos. As citocinas pesquisadas foram a IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ e TNF-α. Antes de discutir os efeitos da MLT, é interessante notar que os resultados encontrados para IL-2 mostram uma correlação com a produção de TNF-α, o que é coerente com o fato de que estas citocinas foram

descritas como estimuladoras da produção uma da outra (BEAYERT; FIERS, 1998; THORPE, 1998).

Já a MLT, parece provocar diminuição dose-dependente até 1nM da concentração de IL-2, TNF-alfa e de IL-6 no sobrenadante da cultura. Por outro lado, a concentração das citocinas IL-4, IL-10 e também de IFN-gama, aumentaram com a dose de MLT de 10 pM, decrescendo apenas com as doses maiores. Não foi detectada a presença de IL-17A nestas co-culturas. É intrigante notar que se a MLT pareceu favorecer um perfil inflamatório, ao se olhar para o IFN-gama, a análise das concentrações das demais citocinas, indica o oposto. Sendo assim, não podemos atribuir às DCs diferenciadas de monócitos submetido ao tratamento com MLT a indução preferencial de um ou outro perfil secretório nos Lys T. A análise dos efeitos das diferentes concentrações sugere que elas possam afetar diferentemente as características fenotípicas e funcionais das DCs (ou, provavelmente, a de qualquer outro tipo celular). Como já mencionado anteriormente, a MLT se liga a três diferentes receptores, sendo dois de membrana MT1 e MT2 e um receptor nuclear da família dos receptores órfãos ROR-RZR (LANOIX; OUELLETTE; VAILLANCOURT, 2006). Como revisto por Radogna, Diederich e Ghibelli (2010) em concentrações na faixa nM a MLT tem maior afinidade pelos receptores de membrana (MT1 e MT2), ativando sinais intracelulares via adenilato ciclase ou proteína G. Já no citoplasma a MLT pode se ligar em concentrações μ M às enzimas hidroquinona e calmodulina, interações que podem levar regulação de microtúbulos e ativação da fosfolipase A2. Por fim, os receptores nucleares são alvo da MLT em concentrações na faixa de pM a nM, descritos como possíveis responsáveis pela diminuição da 5-lipo-oxigenase.

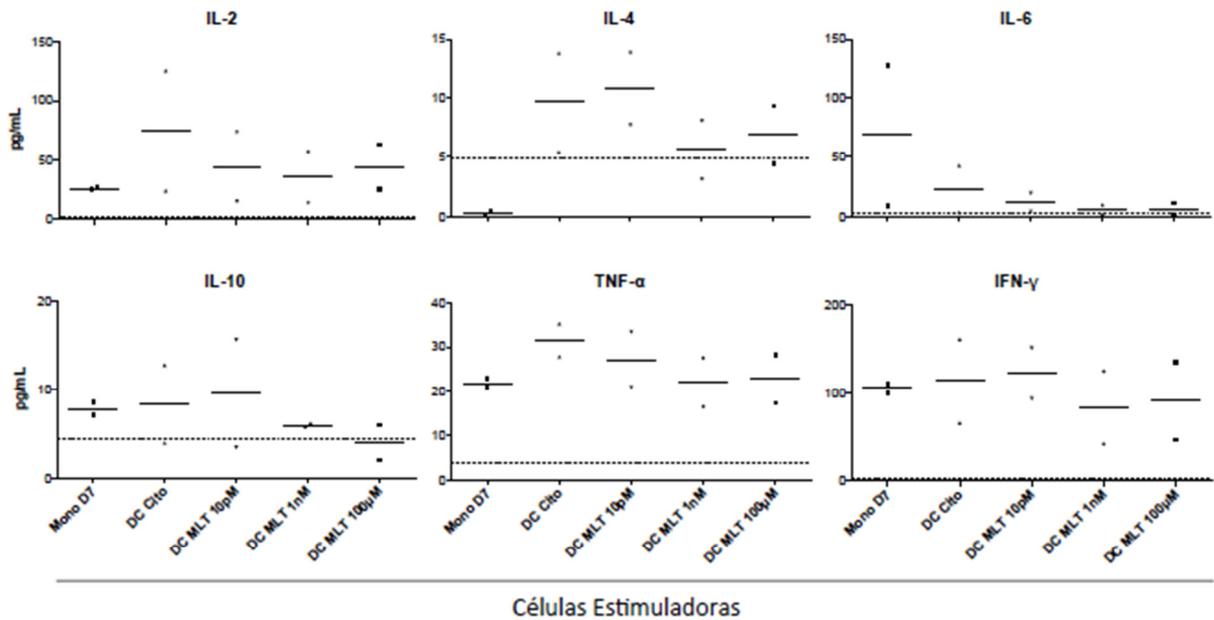


Figura 15 - Produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) por Lys T em co-cultura com DCs maduras que receberam MLT nas concentrações de 10 pM, 1 nM e 100 μ M na etapa de adesão de 2 horas, seguido de citocinas GM-CSF e IL-4 até o quinto dia e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia (indicadas por **DC MLT** e a respectiva concentração) ou que receberam somente citocinas (indicadas por **DC Cito**) ou células mantidas unicamente em meio de cultura, sem citocinas ou MLT (**Mono D7**). Foram analisados os sobrenadantes retirados no quinto dia das co-culturas. As linhas tracejadas representam o limite de detecção do kit. Os traços curtos representam as medianas. Foram analisadas n = 2 culturas de cada grupo. Sem significância entre as medianas (teste Kruskal-Wallis).

3.10 Caracterização do fenótipo de membrana de células cultivadas com doses reduzidas de IL-4

Como notamos que o tratamento dos monócitos aumentava a expressão de receptores para IL-4 (CD124), nestes experimentos foi utilizada MLT em concentração de 1 nM, adicionada no período de adesão e testou-se o uso de concentrações decrescentes de IL-4: 50 ng/mL (de acordo com o protocolo atualmente em uso no laboratório) e 25; 12,5; 6,25; 3,125 ng/mL. As demais citocinas foram mantidas na concentração usual de 50 ng/mL.

Observa-se na figura 16 que células expressando CD11c (um marcador típico das DCs) tiveram expressões relativamente uniformes, com até mesmo 3,125 ng/mL de IL-4 mostrando-se com resultados equivalentes aos obtidos com a concentração de 50 ng/mL.

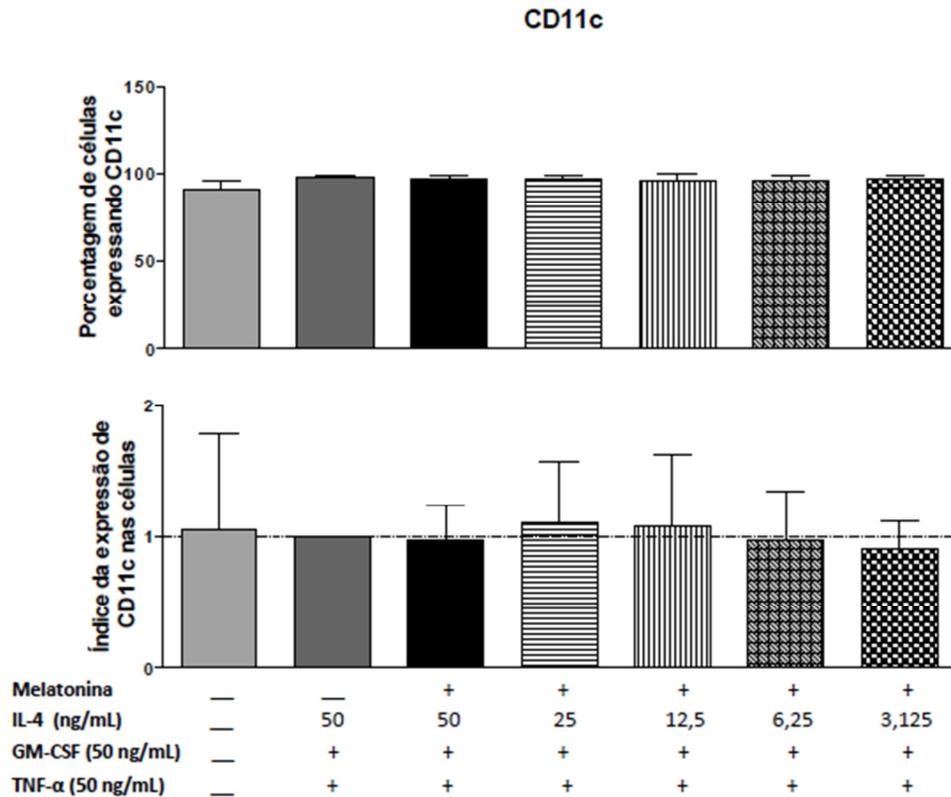


Figura 16 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD11c** nas células que receberam MLT ou não (__) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0043** – Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e demais grupos (menos para DC MLT IL-4 6,25 ng/mL). Para o Índice de Expressão **ANOVA P = 0,9803**.

Na figura 17 mostra-se a avaliação da expressão da molécula HLA-DR em células diferenciadas em DCs e nas PBMCs mantidas em meio de cultura por sete dias. Novamente, nota-se que a expressão de HLA-DR por células que receberam qualquer estímulo é inferior à de células mantidas em cultura sem estimulação. Já, entre os estímulos, nas diferentes concentrações de IL-4, observam-se médias de porcentagens e de intensidade de expressão muito próximas.

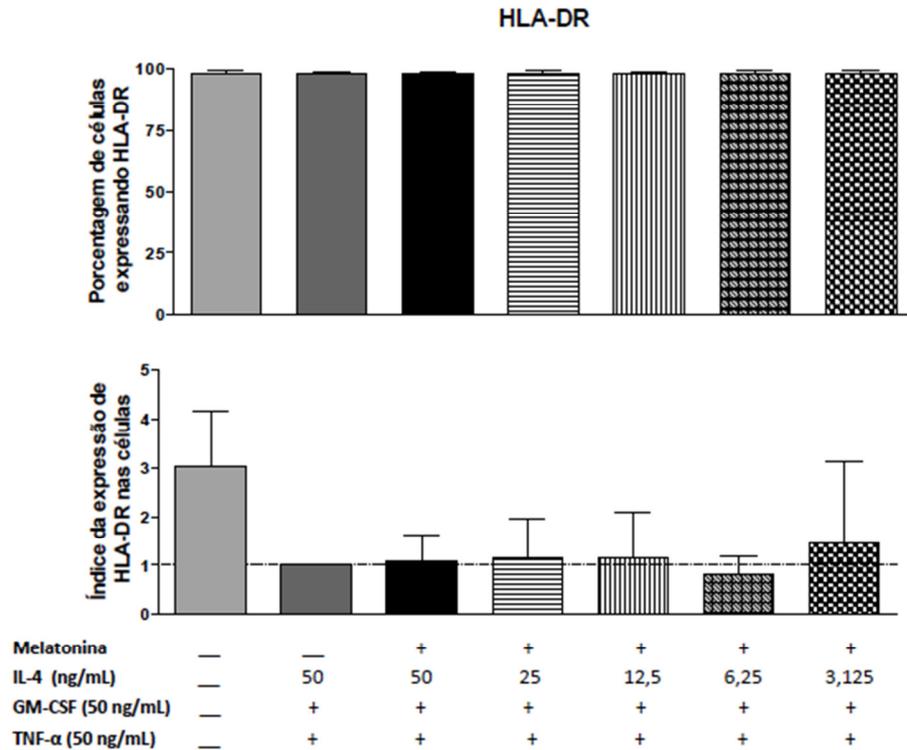


Figura 17 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **HLA-DR** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,8065**. Para o Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0014** –Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e demais grupos.

Observa-se os resultados de frequência e MFI relativa dada pelo índice de expressão para a molécula CD209 na figura 18. Mais uma vez, as médias de frequências apresentam-se próximas, mas observamos tendência a elevação na concentração de 25 ng/mL e 6,25 ng/mL. Com relação aos índices de expressão as maiores médias são observadas para as concentrações de 25 ng/mL e 12,5 ng/mL. Com exceção do grupo mantido em meio de cultura, sem estímulos, todos os grupos apresentaram elevada presença de CD209, característica de DCs. Ressaltamos que embora com frequência e índice de MFI reduzido, os monócitos mantidos apenas em meio de cultura apresentaram positividade para CD209, apontando a possibilidade de existência de uma taxa de diferenciação ocasionada pela produção de citocinas pelas células contidas no “meio ambiente” das culturas.

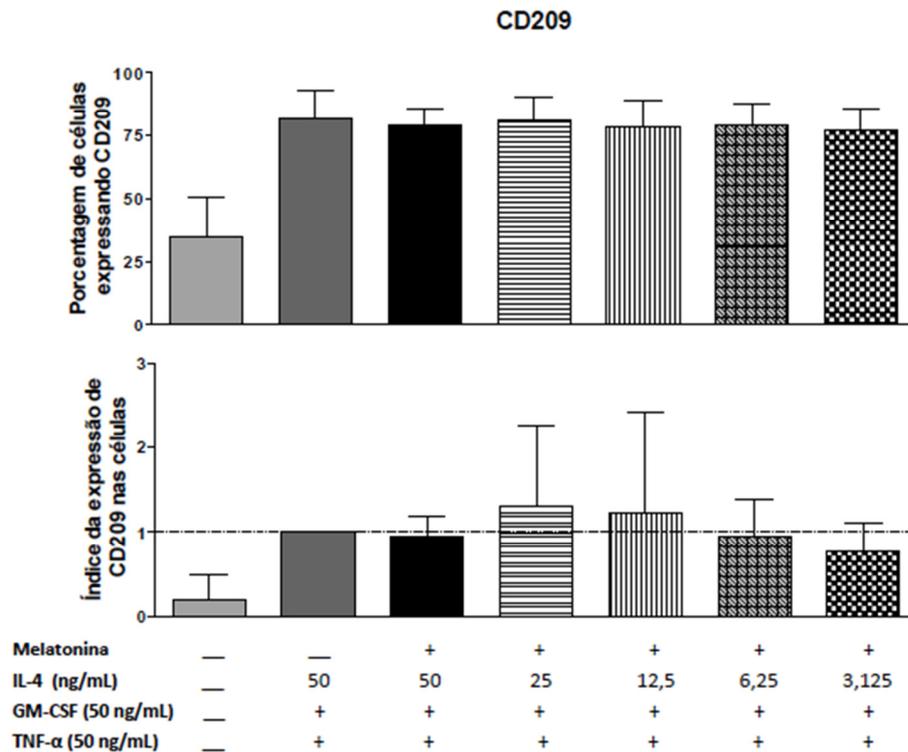


Figura 18 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD209** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF-α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF-α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e os demais grupos. Para o Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0462**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e concentrações de IL-4 25 ng/mL.

A presença de CD14 foi avaliada nas culturas, visto que a redução de concentração de IL-4 poderia interferir nos resultados para essa molécula característica de monócitos e que se apresenta em elevada frequência antes da diferenciação, ou em células sem tratamento, conforme podemos observar na figura 19. Nota-se que apenas os monócitos mantidos sem suplementação apresentam um nível elevado de células positivas para CD14. As DCs obtidas com o uso de citocinas, mesmo em concentrações reduzidas de IL-4, apresentaram, como esperado para este tipo celular, frequência e índice de MFI reduzidos para CD14. Com os dados apresentados para CD209 e CD14, pode se dizer que a redução na concentração de IL-4, aparentemente, não afetou a diferenciação de monócitos em DCs.

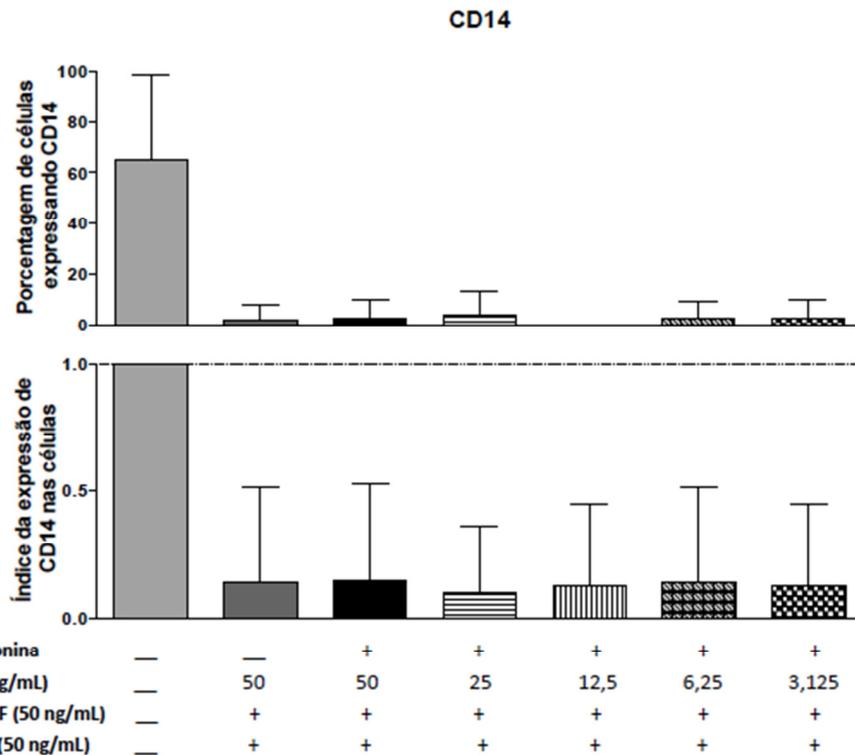


Figura 19 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD14** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e os demais grupos. Para o Índice de Expressão **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e os demais grupos.

Analisando a presença de CD80, molécula co-estimuladora presente em DCs e de importância na estimulação de linfócitos, pode-se observar (figura 20) que para a concentração de 6,25 ng/mL foi encontrada a maior média entre as frequências da molécula.

Em relação ao índice de expressão, as DCs obtidas com a concentração de 25 ng/mL de IL-4 apresentaram a maior média. No entanto, tanto frequência quanto MFI não apresentaram diferenças entre os grupos de DCs. A redução na concentração, novamente, parece não afetar a obtenção de DCs a partir de monócitos.

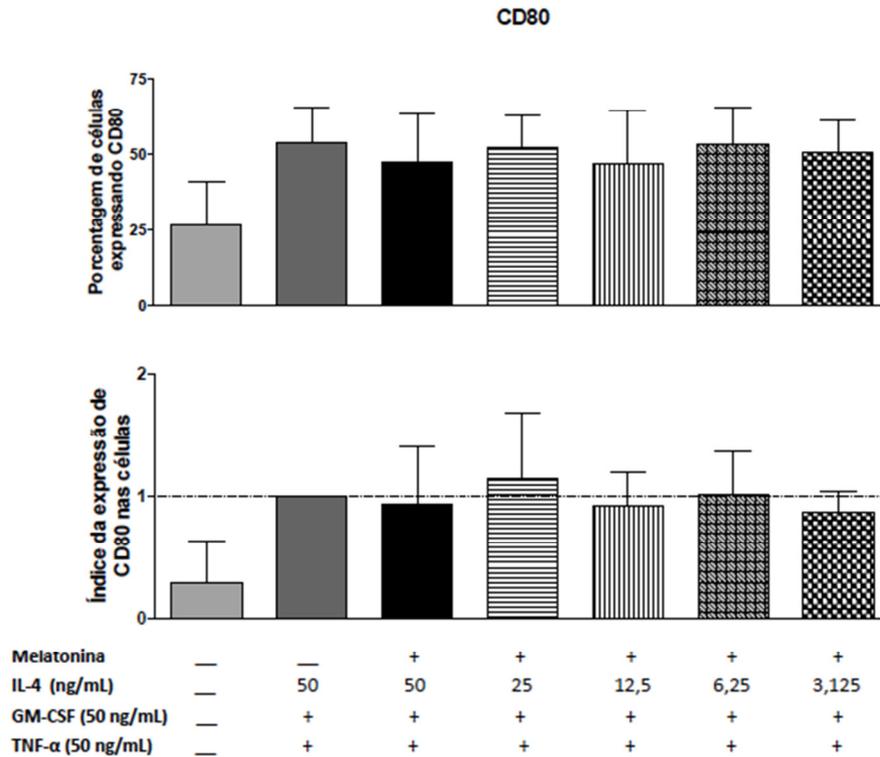


Figura 20 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD80** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0087** - Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e DC Cito; DC MLT IL-4 25 ng/mL; DC MLT IL-4 6,25 ng/mL; DC MLT IL-4 3,125 ng/mL. Para o Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0016** - Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e os demais grupos.

Na figura 21 são apresentados os resultados encontrados para CD86, outra molécula co-estimuladora importante nas DCs.

DCs diferenciadas em concentração de 25 ng/mL de IL-4 apresentaram a maior frequência seguida por 3,125 ng/mL. Os índices de MFI tiveram maiores médias para as concentrações de 25 ng/mL e 12,5 ng/mL. De modo semelhante ao encontrado para CD80 não foi detectada diferença para CD86, tanto em frequência quanto em MFI, entre os diferentes grupos de DCs obtidos em concentrações reduzidas de IL-4.

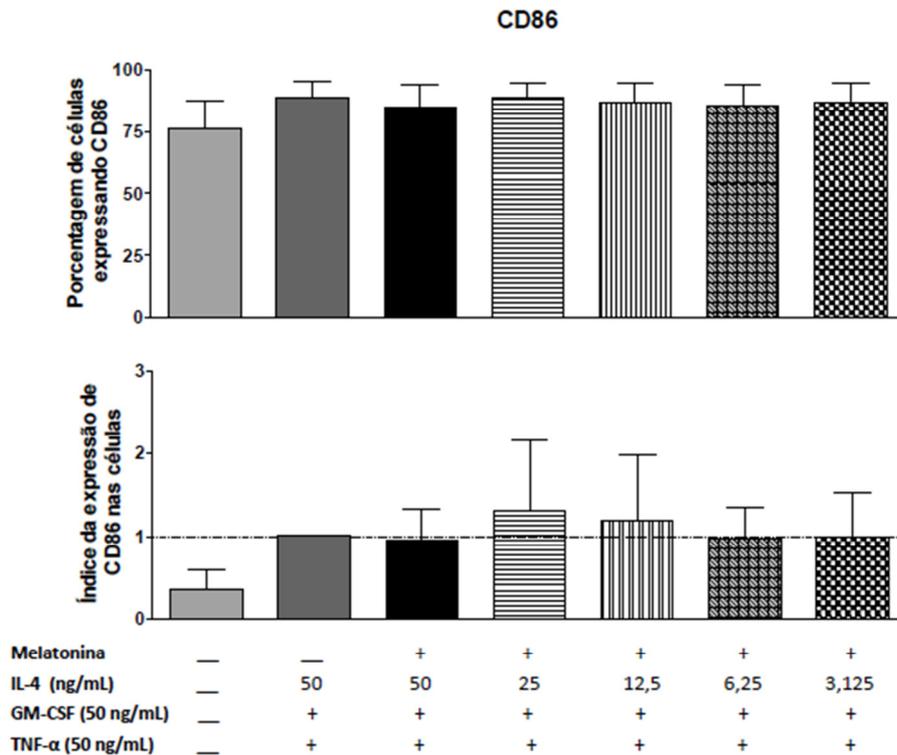


Figura 21 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD86** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,1062**. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0560**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre controle negativo (sem tratamento) e DC MLT IL-4 25 ng/mL.

Na figura 22 observam-se os resultados para a análise de frequência de CD40 e seu índice de MFI. As médias das frequências para CD40 encontram-se muito próximas umas das outras, sem diferenças, com maior valor encontrado para a concentração de 25 ng/mL de IL-4. Os índices de MFI também encontram-se muito próximos uns dos outros, sem correspondência com as frequências e sem diminuição ou elevação dependente das concentrações. O maior valor médio, entre as concentrações reduzidas, foi determinado para culturas suplementadas com 12,5 ng/mL de IL-4.

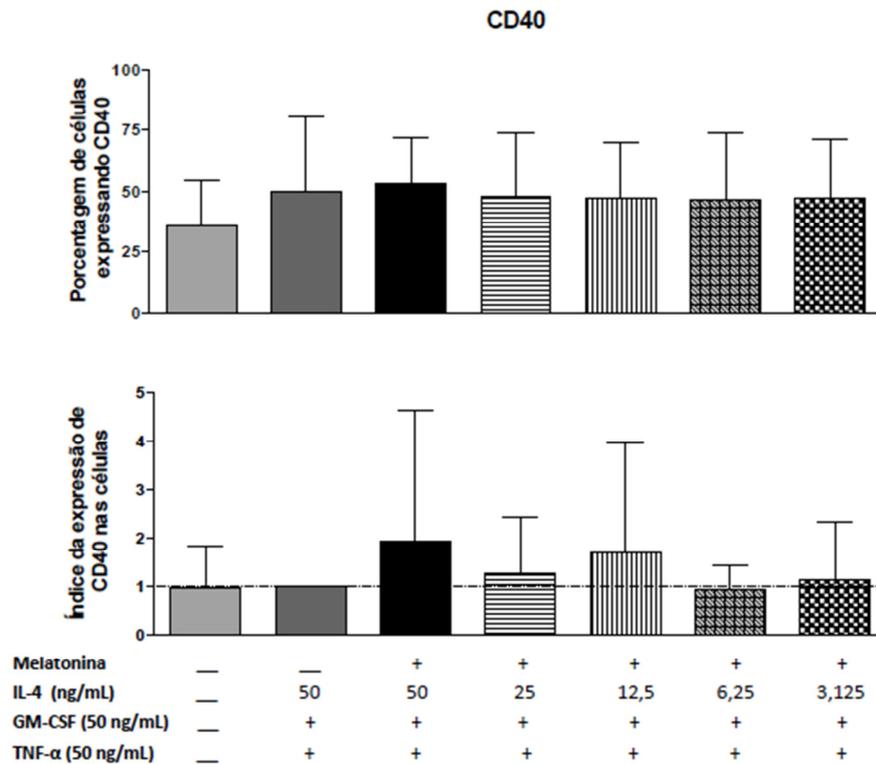


Figura 22 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD40** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,9198**. Para o Índice de Expressão **ANOVA P = 0,8330**.

Resultados para a frequência e intensidade de fluorescência da molécula CD83 podem ser vistos na figura 23. A médias mais elevadas para a frequências de células foi encontrada para culturas estimuladas com IL-4 nas concentrações de 6,25 ng/mL e 3,125 ng/mL. Houve correspondência das médias das frequências com as médias observadas para os índices de MFI, para as mesmas concentrações. O desvio padrão, mais reduzido em relação aos demais, observado para a IL-4 3,125 ng/mL indica uniformidade dos resultados para esta concentração.

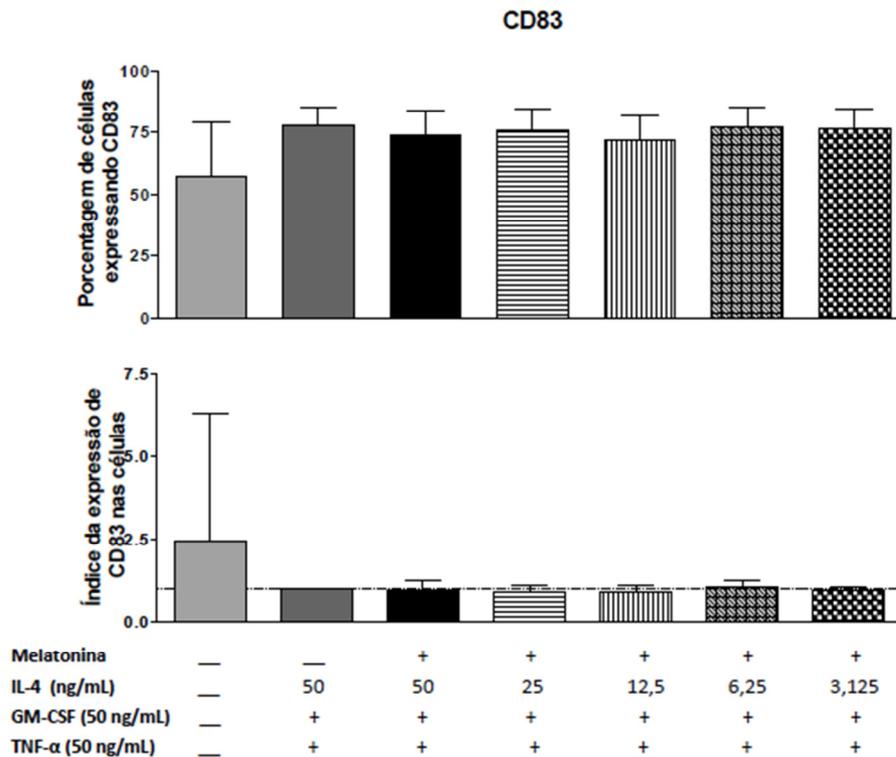


Figura 23. Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD83** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0276**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e DC Cito; DC MLT IL-4 6,25 ng/mL. Para o Índice de Expressão **ANOVA P = 0,3740**.

Resultados para a molécula CD274, também conhecida como PDL1 e relacionada com a indução de tolerância pelas DCs, podem ser vistos na figura 24. Pode-se notar que a média das porcentagens apresentou-se mais elevada para culturas mantidas com IL-4 25 ng/mL, seguida pelas culturas suplementadas com 3,125 ng/mL. Esta observação teve correspondência de porcentagem e índice de MFI para culturas suplementadas com IL-4 25 ng/mL, mas o mesmo não aconteceu para as culturas suplementadas com IL-4 3,125 ng/mL. No entanto, novamente não houve diferenças entre as concentrações reduzidas de IL-4 e o grupo controle (citocinas em concentrações usuais).

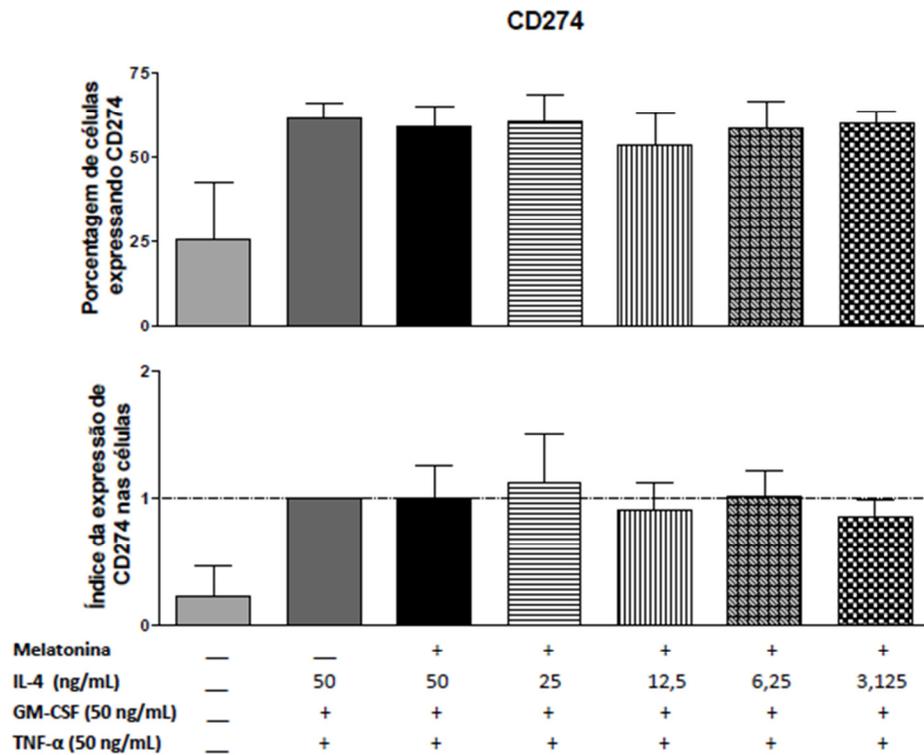


Figura 24 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD274** nas células que receberam MLT ou não (—) durante o período de adesão por duas horas e, posteriormente, citocinas diferenciadoras (GM-CSF e IL-4) e ativadora (TNF- α). Alguns grupos receberam IL-4 em concentrações diferentes da usual, conforme valores listados abaixo de cada grupo. GM-CSF e TNF- α foram acrescentados às culturas em concentrações usuais (50 ng/mL). Todas as células foram cultivadas até o sétimo dia. O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços sobre as colunas representam os desvios padrão para $n = 7$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e os demais grupos. Para Índice de Expressão **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre o controle negativo (sem tratamento) e os demais grupos.

Uma vez que esta análise mostrou que todas as concentrações de IL-4 foram capazes de induzir nas DCs tratadas com MLT um fenótipo semelhante, resolveu-se aprofundar os estudos com a menor das concentrações de IL-4, pois esta seria a que maior economia de reagentes proporciona.

3.11 Caracterização do fenótipo de membrana de células submetidas ao inibidor de MLT Luzindol e cultivadas com 3,125 ng/mL de IL-4

PBMCs aderentes foram cultivadas por sete dias adicionando as citocinas GM-CSF e TNF- α (este adicionado no quinto dia apenas) na concentração usual de 50 ng/mL para obtenção das DCs. A IL-4 foi adicionada na concentração selecionada de 3,125 ng/mL, uma vez que a MLT foi adicionada às células durante o período de aderência. Para avaliar se os efeitos observados pelo tratamento com a

MLT eram dependentes dos receptores de membrana deste hormônio, MT1 e MT2, foi feito uso do inibidor Luzindol, também na etapa de adesão por duas horas, conforme descrito em material e métodos. Avaliou-se os resultados de oito experimentos realizados para a molécula HLA-DR na figura 25. Nota-se que, surpreendentemente, o uso de Luzindol sobre células induzidas a diferenciar pelas citocinas (com IL-4 na concentração de 3,125 ng/ml), sem estímulo pela MLT, provocou um aumento da frequência de células positivas para esta molécula. No entanto, não diferiu significativamente das DC7 obtidas com a concentração de 50 ng/mL de IL-4.

Por outro lado, um efeito inibidor muito discreto do Luzindol sobre as DC7 que receberam MLT na etapa de adesão pode ser notado, diminuindo a expressão de HLA-DR por célula, como visto pela diminuição do índice neste grupo, e comparando-o ao grupo que também recebeu MLT, mas não o Luzindol.

Também aqui se observa a elevação do índice de expressão em monócitos mantidos apenas em meio de cultura, sem suplementação alguma. É possível que as células, sem estímulos passem a exteriorizar material contido em compartimentos endossomais como ocorre com DCs imaturas (YOUNG et al., 2008), neste caso as moléculas de MHC classe II (HLA-DR).

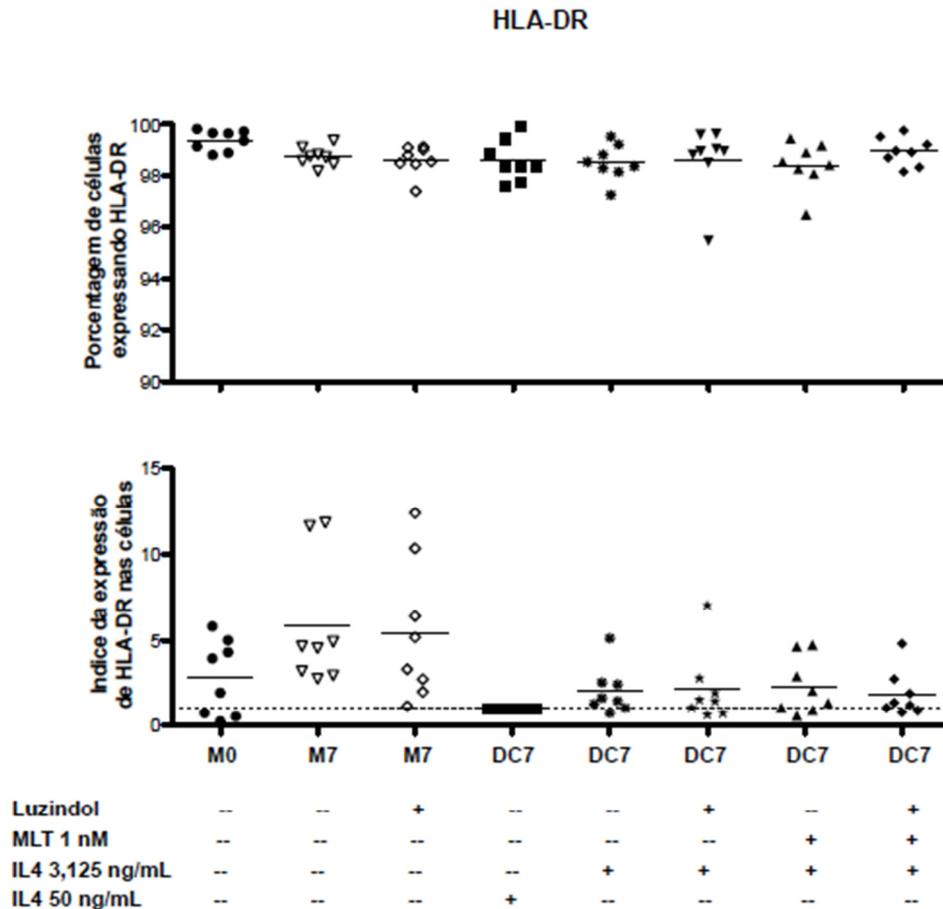


Figura 25 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **HLA-DR** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,2646**. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0009**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M7 (monócito dia 7) e DC7 IL-4 50ng/mL; DC7 (Luzindol + MLT + IL-4 3,125 ng/mL) e M7 (com Luzindol) e DC7 IL-4 50 ng/mL.

Na figura 26 é mostrada a presença de CD11c nas diferentes culturas. A redução de IL-4 para 3,125 ng/mL provocou uma diminuição na frequência e índice de CD11c, que parece ser resgatada pelo uso de MLT. A adição de Luzindol, sem a posterior adição de MLT, parece não apresentar efeito inibidor sobre a frequência de células positivas, mas mantém o efeito observado de redução do índice para MFI para a concentração de 3,125 ng/mL. Nota-se que o inibidor Luzindol pareceu exercer sua função inibidora neste aspecto. Efeito semelhante foi observado para o índice de expressão de HLA-DR, que também apresentou a média deste indicador diminuída. Esse efeito inibidor do Luzindol sobre a ação da MLT parece manifestar-

se somente em presença de MLT, visto que nos grupos suplementados com a substância nos quais não houve adição de MLT pareceu haver uma elevação do índice.

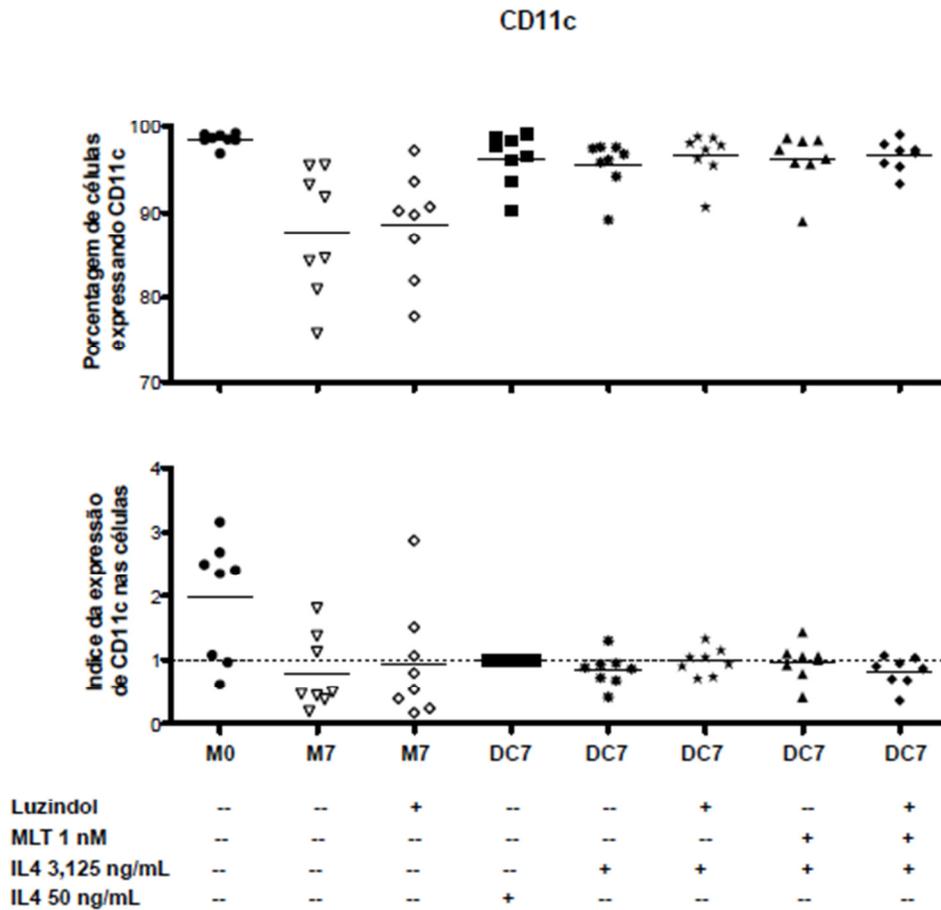


Figura 26 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD11c** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e os grupos DC7 IL-4 50ng/mL e IL-4 3,125 ng/mL. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0009**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 (monócito dia 0) e demais grupos.

A presença de CD80 nessas culturas pode ser vista na figura 27. Aqui nota-se que a concentração de 3,125 ng/mL de IL-4 parece exercer um efeito potencializador da frequência de células expressando essa molécula, um efeito que parece ser intensificado pelo uso de Luzindol nas culturas, mesmo quando foi utilizada a MLT. De modo similar, os índices de expressão da MFI mostram correspondência com os

resultados de porcentagem encontrados. Uma hipótese para explicar o efeito potencializador, provocado pelo Luzindol, seria a ligação deste de modo cruzado causando ativação da célula para a expressão de CD80, no entanto, a baixa concentração da citocina IL-4 poderia estar direcionando a célula para um perfil regulador, visto já terem sido descritos o aspecto modulador da função supressora de Lys T reguladores, ativados por CD80 via ligação ao CTLA-4 (ZHENG et al., 2004).

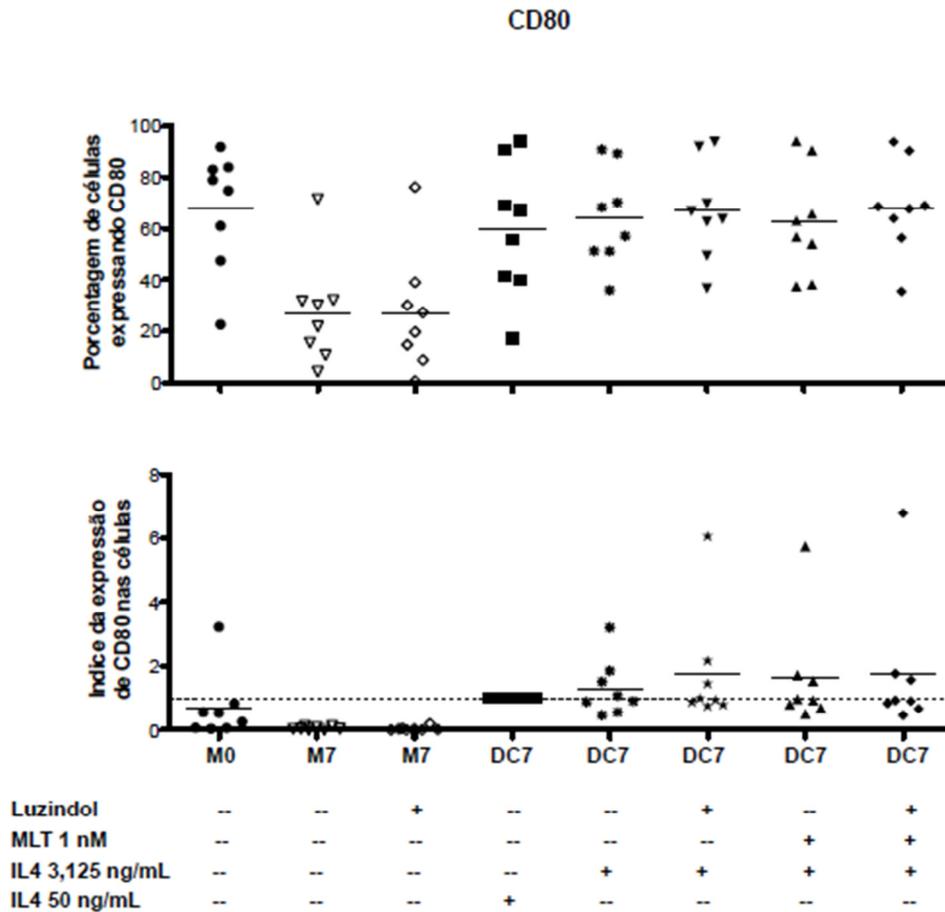


Figura 27 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD80** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e entre M7 sem Luzindol e os grupos DC7 IL-4 50 ng/mL e IL-4 3,125 ng/mL. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0227**.

Para CD86, outra molécula co-estimuladora, as médias das porcentagens encontradas ficaram muito próximas, como pode ser visto na figura 28. O uso de IL-

4 em concentração reduzida mostra uma tendência à redução na frequência e índice de expressão, que parece ser resgatado pelo uso de MLT, como visto para CD11c. O uso de Luzindol potencializou a frequência mas não os índices de expressão nas culturas em que foi adicionado. O índice mostrado em culturas que receberam IL-4 3,125 ng/mL ficou abaixo do observado para a concentração usual. Aqui, de novo, a MLT parece interferir positivamente, mantendo o índice compatível com o observado para a concentração usual. A interação CD86-CD28 interfere na função inibidora gerada por *lys T* reguladores (ZHENG et al., 2004), e sua presença intensificou a habilidade de DCs derivadas de monócitos extraídos de cordão umbilical ativarem *lys T CD4+ naive* (DILIOGLOU; CRUSE; LEWIS, 2003), o que torna importante a manutenção desta molécula na membrana de DCs.

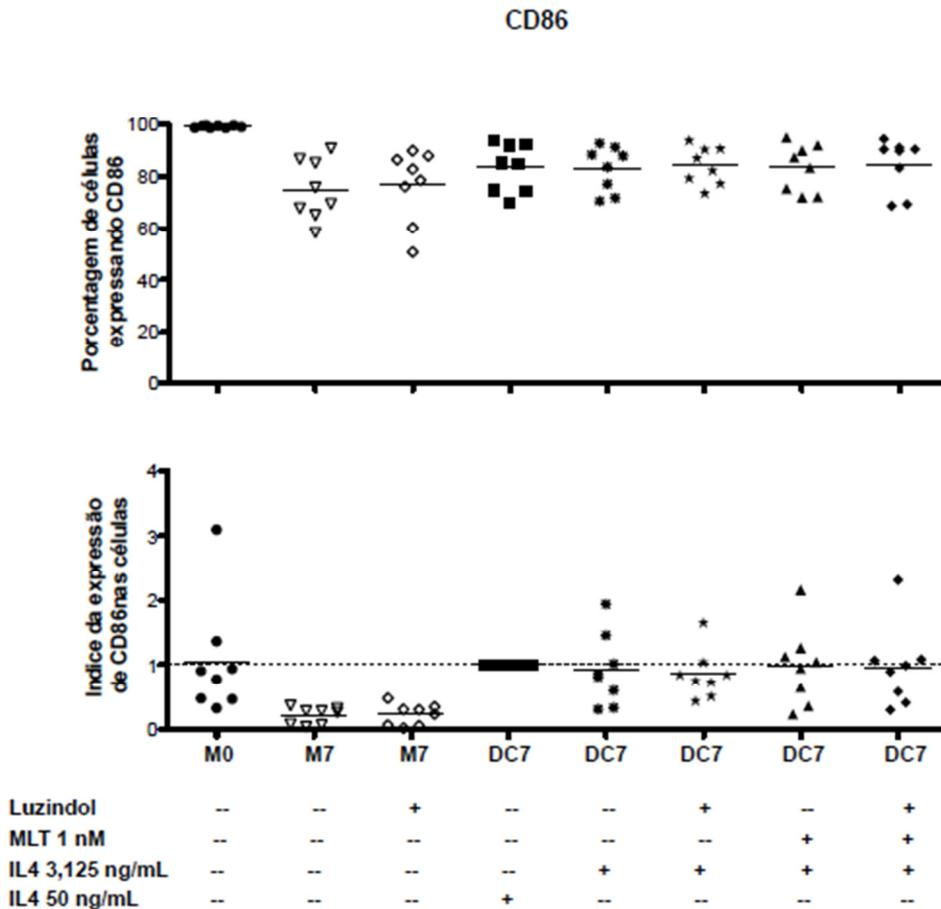


Figura 28 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD86** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0004**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e entre M0 e os grupos DC7 sem Luzindol. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0021**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol).

A frequência da molécula CD40 é avaliada na figura 29. A redução da concentração de IL-4 parece potencializar tanto a frequência quanto a MFI, representada pelo índice. O uso de Luzindol gerou resultados aparentemente conflitantes. Enquanto ele diminuiu os índices de expressão, ele também aumentou a frequência de células positivas para CD40.

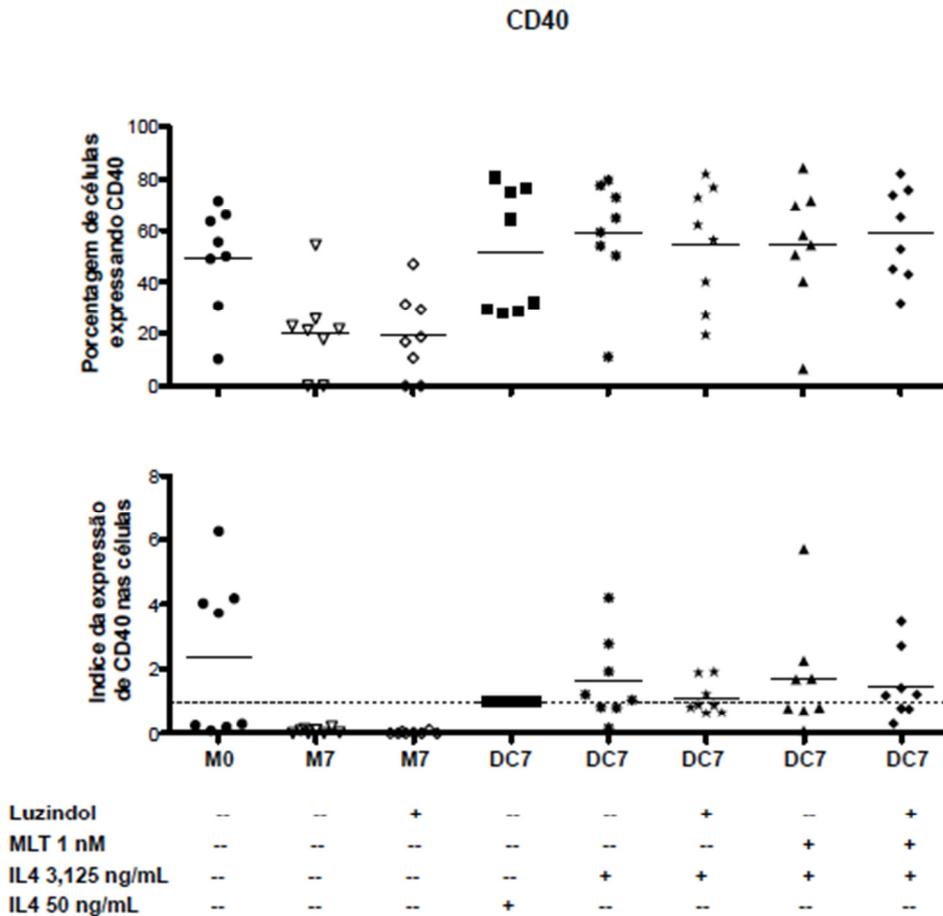


Figura 29 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD40** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--)durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P = 0,0002**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M7 (monócito no dia 7 com e sem luzindol) e os grupos DC7 IL-4 3,125 ng/mL. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0037**.

Os resultados para CD83, indicador da diferenciação de PBMCs em DCs maduras, encontram-se na figura 30 e não apresentam diferenças acentuadas entre os grupos suplementados com IL-4 3,125 ng/mL. Novamente encontramos tendência de elevação das médias para células de culturas mantidas em meio contendo concentrações reduzidas de IL-4 em relação às culturas adicionadas da concentração usual. No mais, nem a MLT nem o Luzindol provocaram efeitos nítidos. Embora a função de CD83 ainda não esteja completamente esclarecida, essa molécula mostra importância na estimulação de linfócitos T (PINHO et al., 2014) e é interessante notar que o uso de menor concentração de IL-4 permita obtenção de células com expressão semelhante da mesma.

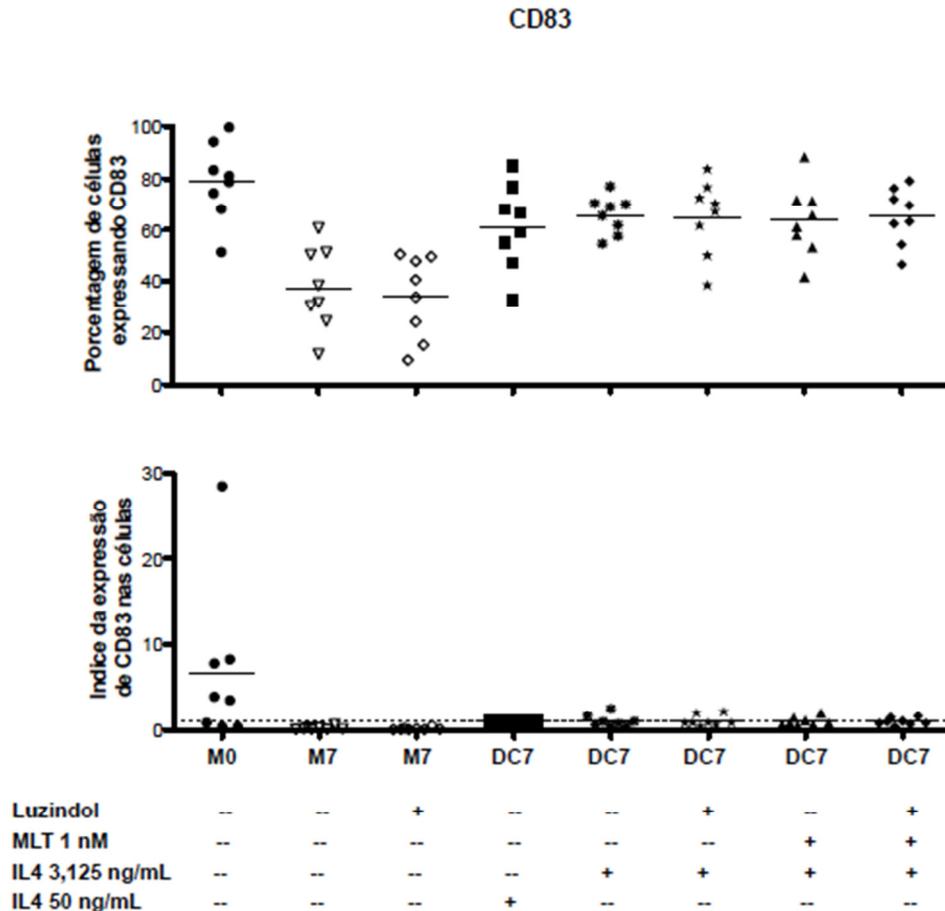


Figura 30 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD83** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e entre M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e os grupos DC7. Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0055**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e demais grupos.

A molécula CD209, também representativa da diferenciação em DCs, foi analisada e os resultados encontrados podem ser visualizados na figura 31. Luzindol potencializou a frequência de DC7 com concentração reduzida de IL-4 com ou sem suplementação de MLT. Em relação ao índice de MFI este efeito foi observado apenas para DC7 suplementadas com MLT na adesão.

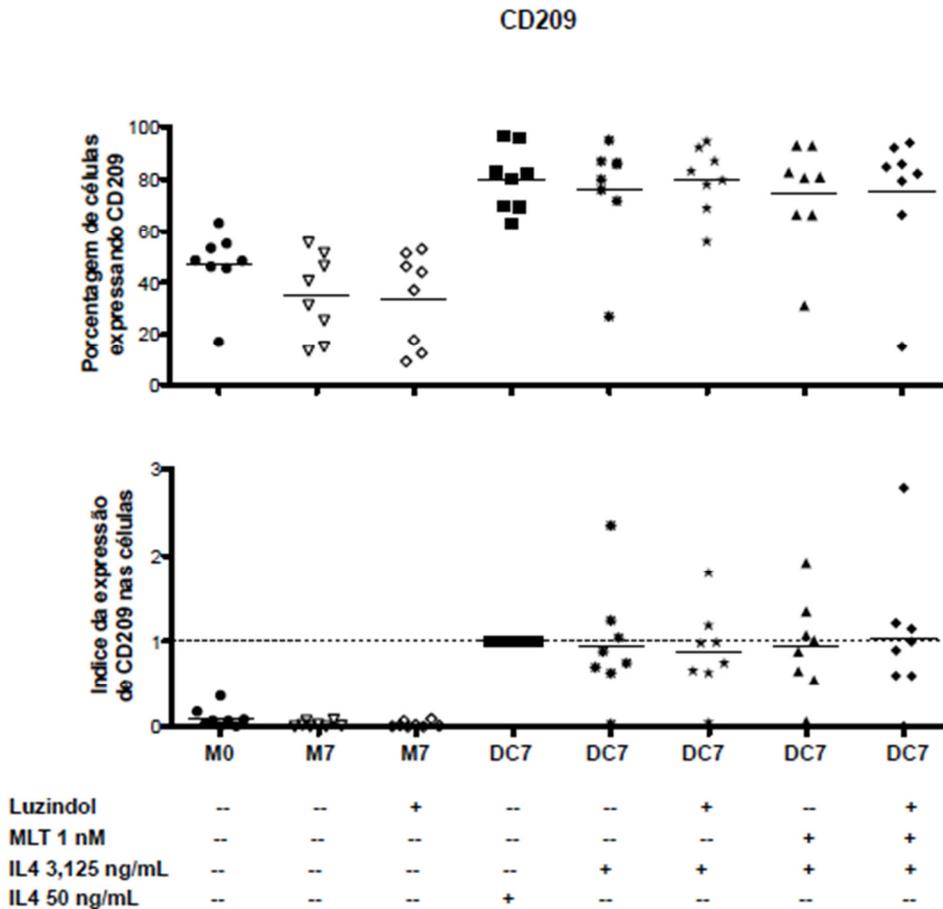


Figura 31 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD209** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--)durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e DC7 (IL-4 50 ng/mL) e DC7 (IL-4 3,125 ng/mL com e sem Luzindol mas sem MLT) e entre M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e os grupos DC7. Para Índice de Expressão **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e M7 (com e sem Luzindol) e demais grupos DC7.

Como foi analisada a presença de CD209, indicativo da diferenciação em DCs, a observação da presença de CD14 também foi objeto de estudo nesta etapa, visto que IL-4 está relacionada com a diminuição desta molécula durante o processo de diferenciação. Observamos na figura 32 que mesmo em concentrações reduzidas de IL-4 há uma redução na frequência e MFI relacionados com a presença de CD14, quando comparados aos monócitos mantidos por sete dias em meio de cultura R-10. Essas culturas que não receberam suplementação com IL-4 (M7) apresentam níveis elevados de CD14. Culturas de DCs com redução de IL-4 mostraram, entretanto, uma frequência maior de CD14. Um dado indicativo de que baixas concentrações de

IL-4 podem afetar a expressão de CD14. De novo, a MLT parece interferir e atenuar o efeito da concentração diminuída de IL-4 sobre a frequência, mas o Luzindol aplicado às culturas que também receberam MLT não exerceu inibição deste efeito da MLT.

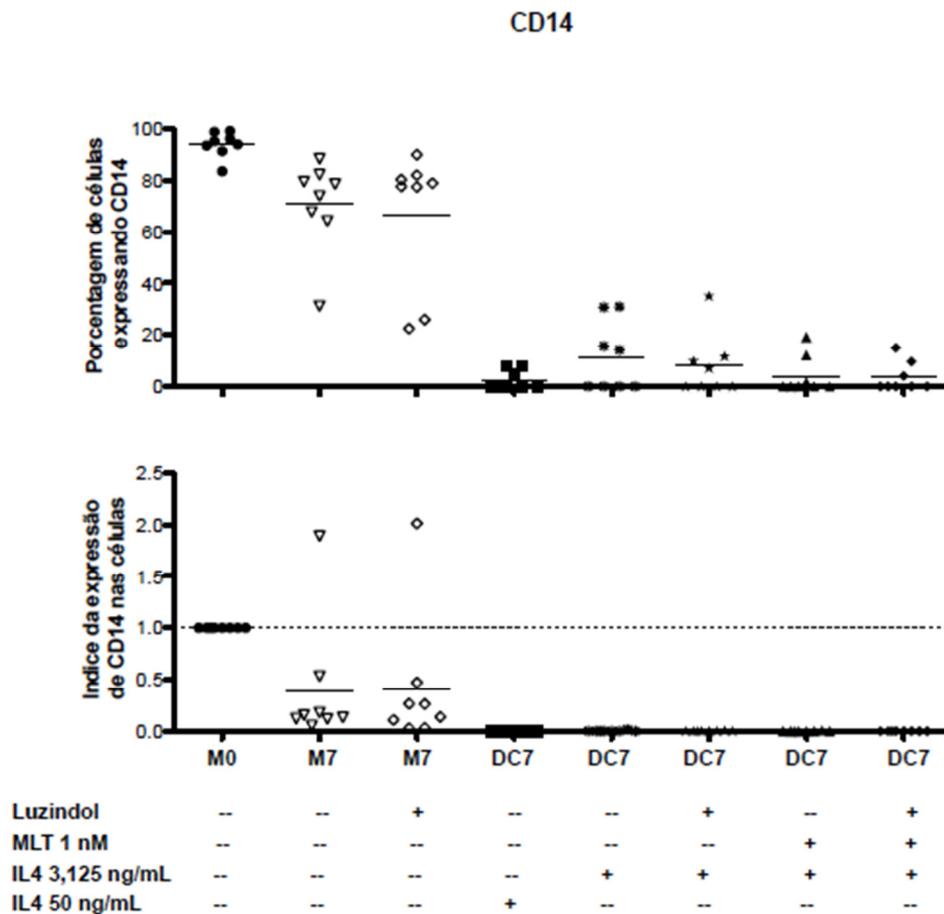


Figura 32 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD14** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e demais grupos e entre M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol) e os grupos DC7. Para Índice de Expressão **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e demais grupos.

A análise da presença de CD274 revelou, conforme visto na figura 33, que 3,125 ng/mL de IL-4 reduz os níveis de CD274 em relação ao dia zero, mas os níveis ficaram acima dos observados para a concentração de 50 ng/mL (controle positivo em concentração usual de IL-4). O uso de MLT nas duas horas de adesão

reduz os níveis de CD274 para próximos do nível observado para IL-4 50 ng/mL, mais uma vez confirmando o efeito positivo da MLT sobre a diferenciação das DCs. Luzindol aplicado às culturas isoladamente mostrou tendência à diminuição da frequência de CD274, mas elevou os índices de MFI. Já na presença da MLT, para intensidade da expressão, o inibidor pareceu diminuir o efeito da MLT, provocando ligeiro aumento da expressão de CD274, mas quando se avalia a frequência de expressão desta molécula, o mesmo não se nota.

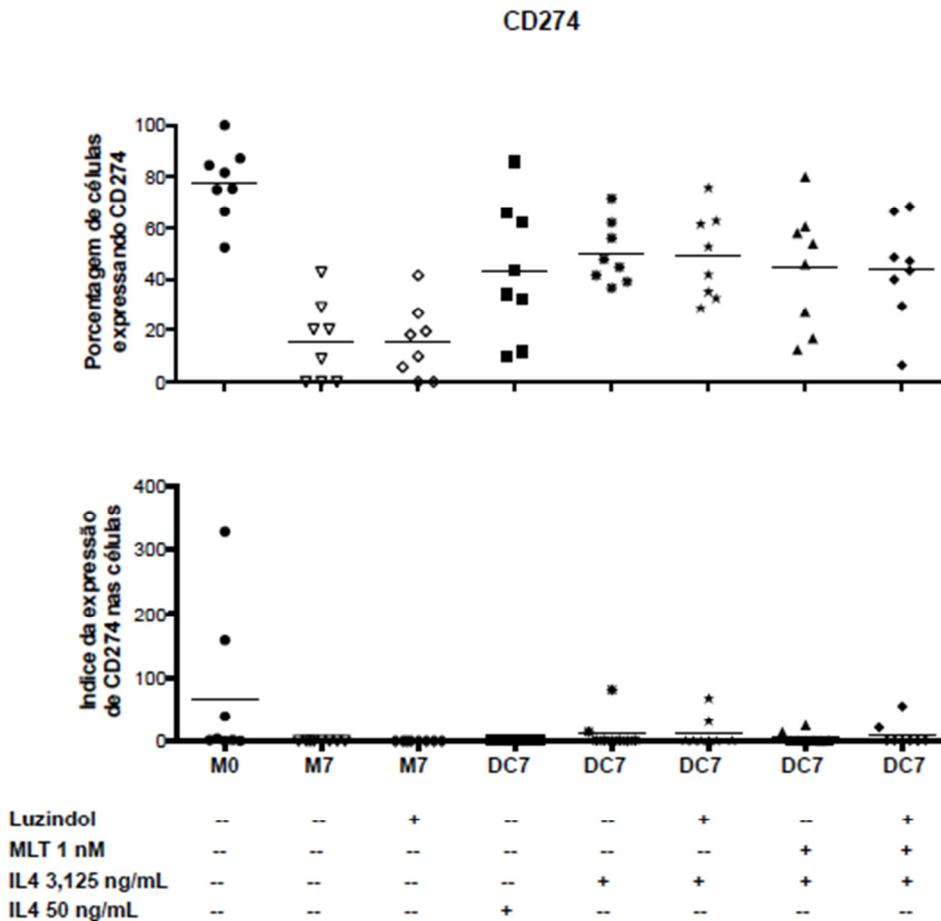


Figura 33 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD274** nas células que receberam Luzindol, MLT (+) ou nenhuma suplementação (--) durante o período de adesão por duas horas e/ou citocinas IL-4 em concentração de 50 ng/ml ou 3,125 ng/mL conforme indicação (+) abaixo de cada grupo na figura. Culturas de PBMCs estão indicadas pela letra M, sendo M0 o dia inicial após a separação por gradiente de densidade e M7 as cultivadas por sete dias em meio R-10. Culturas que receberam citocinas são indicadas por DC7 (DCs obtidas no sétimo dia da cultura). Todas as DC7 receberam igualmente GM-CSF e TNF- α (50 ng/mL). O controle considerado para o índice de expressão foram as DCs que não receberam MLT na adesão e posteriormente receberam as Citocinas (todas em concentração de 50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Os traços curtos representam as médias de $n = 8$ experimentos. Para porcentagem **ANOVA P < 0,0001**. Teste de Tukey $P < 0,05$ entre M0 e M7 (monócito no dia 7 com e sem Luzindol); entre M0 e DC7 (IL-4 50 ng/mL); entre M0 e DC7 (MLT com e sem Luzindol); entre M7 (com e sem Luzindol) e DC7 (sem MLT com e sem Luzindol). Para Índice de Expressão **ANOVA P = 0,0768**.

3.12 Caracterização funcional das DCs submetidas ao luzindol, MLT e obtidas em concentração reduzida de IL-4 por meio de co-cultura com linfócitos alogênicos

Com a finalidade de constatar se as DCs geradas sob ação da MLT e de seu inibidor parcial, Luzindol, apresentavam alterações funcionais, foram realizados experimentos de co-cultura com Lys T. Foram analisadas as moléculas CD4, CD8, CD25 e os fatores de transcrição FoxP3, T-bet e Gata-3, dentro da população de Lys que proliferaram por estímulo dessas DCs. Utilizou-se como índice de proliferação o cálculo com base na MFI dos Lys do grupo controle (Lys com CFSE, mas sem estímulo de proliferação) como descrito em Material e Métodos.

Na figura 34 são mostradas as medianas das porcentagem de Lys CFSE positivos que proliferaram quando em co-cultura com DCs obtidas sob diferentes condições de estímulo, quer sejam por uso das concentrações usuais de citocinas (DC50); sem MLT e sob redução de IL-4 (DC3); com MLT e redução de IL-4 (DCM3); sob ação de Luzindol, MLT e redução de IL-4 (DCLM3). DCs obtidas com redução de IL-4 apresentaram maior mediana entre as frequências observadas. Os grupos suplementados com MLT ou Luzindol e MLT apresentaram medianas superiores ao das concentrações usuais de citocinas. Pode-se observar, no entanto, que as DCs obtidas com utilização inicial de MLT mantiveram um índice de proliferação de Lys totais mais elevado que os demais grupos, embora sem significância estatística. Nestes experimentos o uso de Luzindol mostra uma tendência à redução na porcentagem de proliferação em relação ao suplementado com MLT. Para o índice de proliferação, a mediana se mostra mais elevada para o grupo suplementado com MLT e, novamente, há uma indicação de um efeito inibidor provocado pelo uso do Luzindol nas DCs geradas, interferindo na função de alo-estimulação destas células. O aumento da frequência e índice de proliferação apresentam certa correlação com o aumento da frequência de CD40 e do índice para a MFI de CD40, CD80 e HLA-DR em doses reduzidas de IL-4.

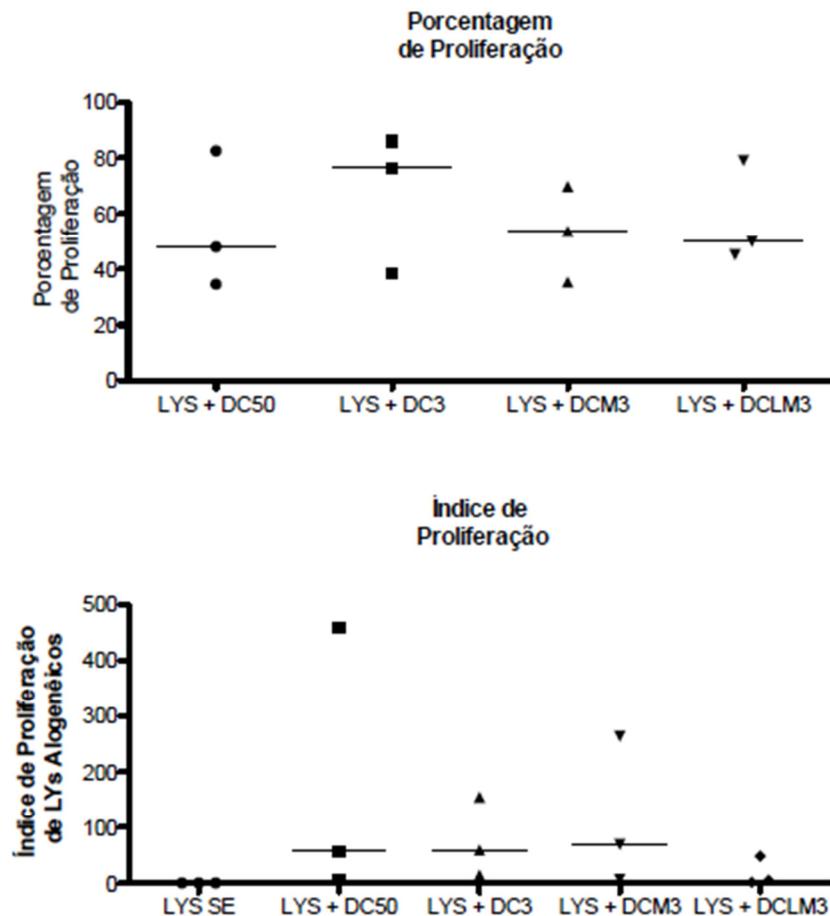


Figura 34 - Frequência e Índice de proliferação de linfócitos (ly) mantidos em co-cultura com DCs. DCs foram co-cultivadas com Lys por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. Lys SE, indicam linfócitos corados com CFSE, mas que não receberam nenhum estímulo de proliferação, consistindo em um controle negativo. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização dos índices de expressão com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0540$** para porcentagem de proliferação. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,8384$** para Índice de proliferação.

Dentro da população de células que proliferaram obtivemos a população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo das DCs geradas sob diferentes estímulos. Estes resultados podem ser observados na figura 35. As medianas obtidas para três experimentos indicam que há uma redução da frequência a partir da diminuição da concentração de IL-4. Essa redução é mais acentuada em Lys estimulados com DCs obtidas com adição de MLT na adesão. Observa-se uma tendência à inibição provocada pelo uso do Luzindol antes da adição de MLT. No entanto, Lys estimulados com DCs suplementadas com MLT apresentam mediana maior para a

expressão de CD4, indicando uma elevada expressão dessa molécula por célula. Como se nota no gráfico a utilização de Luzindol reduz o índice de expressão de CD4, apresentando indícios de inibição por esta substância. Esta observação é relevante, uma vez que é descrito a aumento da expressão de CD4 em linfócitos T ativados (RIDGWAY; FASSÒ; FATHMAN, 1998).

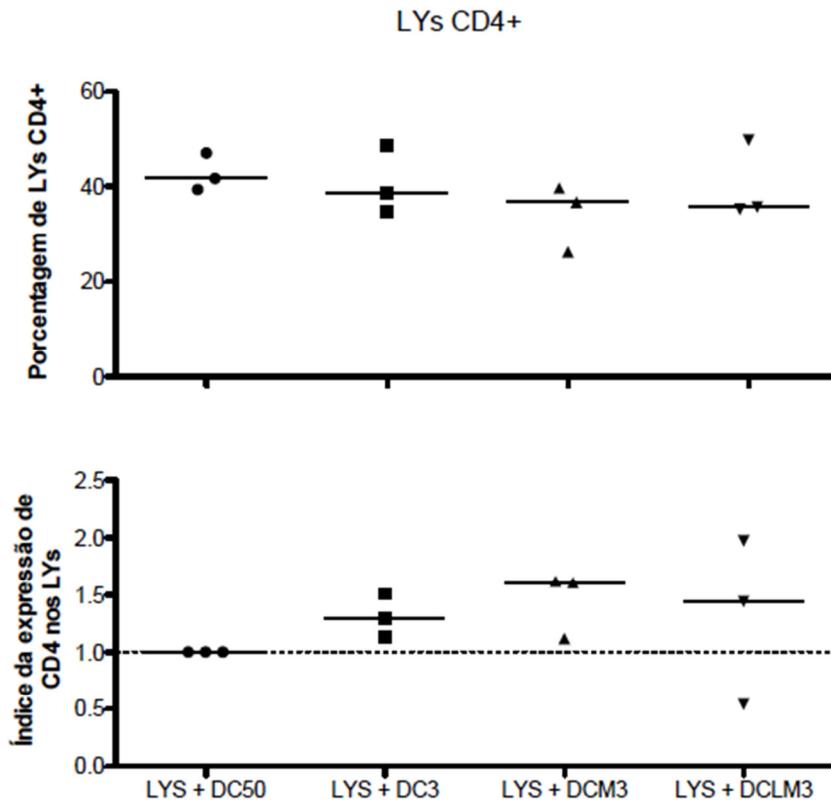


Figura 35 - Porcentagem e índices de MFI de Lys positivos para CD4 que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,5994$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,2420$** para Índice de expressão.

A proporção de Lys positivos para CD8 também foi analisada e, a figura 36 ilustra os resultados obtidos. A redução na concentração de IL-4 não afetou a frequência de Lys CD8 positivos, mas houve diminuição do índice de expressão. As medianas para esta análise indicam que DCs obtidas com o uso de MLT 1nM estimularam uma maior proliferação de Lys positivos para CD8 em relação aos demais grupos, o mesmo sendo observado com relação ao índice de expressão

desta molécula nestes linfócitos. Essa observação aponta, mais uma vez, para o efeito mantenedor e potencializador da atividade estimuladora das DCs causado pela MLT. O uso de Luzindol, antes da adição de MLT durante a etapa de adesão, sugere que há um efeito inibidor da substância, provocando a redução da frequência e dos índices de expressão.

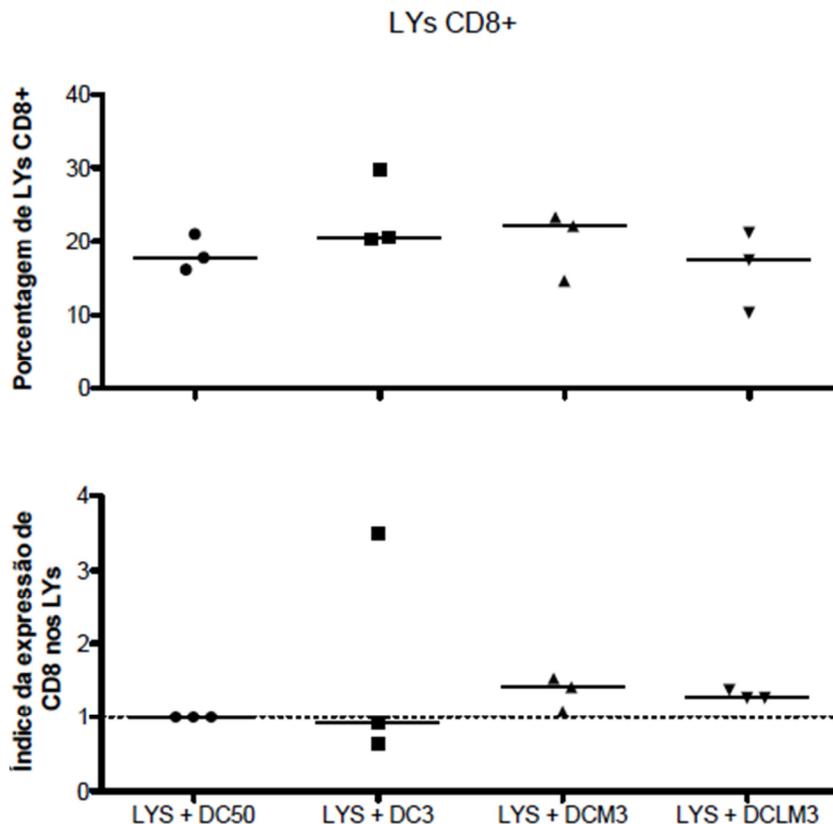


Figura 36 - Porcentagem e índices de MFI de Lys positivos para CD8 que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis P = 0,5360** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis P = 0,2638** para Índice de expressão.

Foram analisadas as frequências de CD279 (PD-1), molécula na qual se liga o CD274 (PD-L1) e que através da interação com outras moléculas co-estimuladoras podem ativar linfócitos T efetores da imunidade protetora ou resultar em sua anergia (OKAZAKI; HONJO, 2006). A proporção desta molécula foi determinada dentro da população CD4 e CD8. Assim, foram considerados os duplo positivos para CD279, envolvendo linfócitos CD4 e linfócitos CD8. Os resultados são mostrados na figura

37 para a proporção de CD4+CD279+ e os índices de expressão indicativos da MFI. Lys estimulados por DCs geradas com concentrações reduzidas de IL-4 apresentaram menor frequência, mas um índice compatível com o controle positivo (Lys + DC50). Lys estimulados por DCs geradas com suplementação de MLT apresentaram maior frequência e também maior índice de expressão da MFI. Houve diminuição da frequência e do índice quando o estímulo foi fornecido por DCs obtidas com o uso de Luzindol antes da MLT na etapa de adesão, indicando inibição por essa substância. Esta observação se deu tanto na frequência quanto no índice de expressão (indicador da MFI).

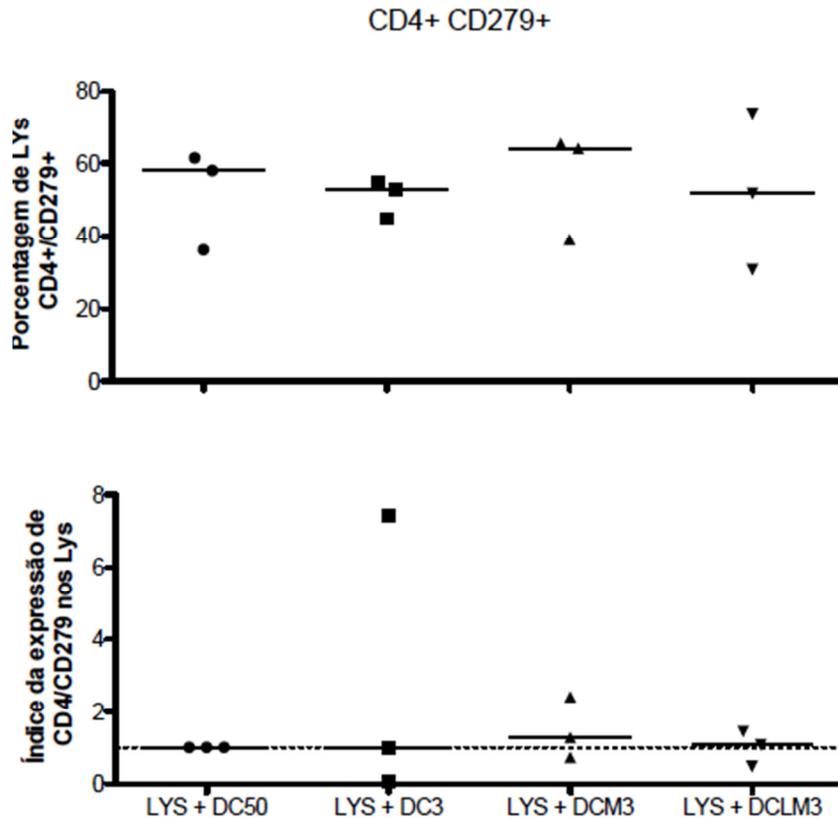


Figura 37 - Porcentagem e índices de MFI de Lys duplo positivos para CD4 e CD279 presentes na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,8629$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,9087$** para Índice de expressão.

A molécula CD279 em Lys CD8 positivos tem seus resultados apresentados na figura 38. As medianas estão mais elevadas nas culturas estimuladas pela concentração de 3,125 ng/mL de IL-4, que nas estimuladas pela dose usual (50 ng/mL). O uso de MLT não provocou elevação da frequência de duplos positivos CD8+CD279+. Nota-se, que embora as frequências estejam elevadas, a redução de IL-4 parece diminuir a MFI das moléculas CD8 e CD279 dos linfócitos. O uso de Luzindol sugere inibição da mediana relacionada à porcentagem, mas não houve correspondência com a mediana desse grupo quando observamos os índices de expressão, que mostram-se mais elevados.

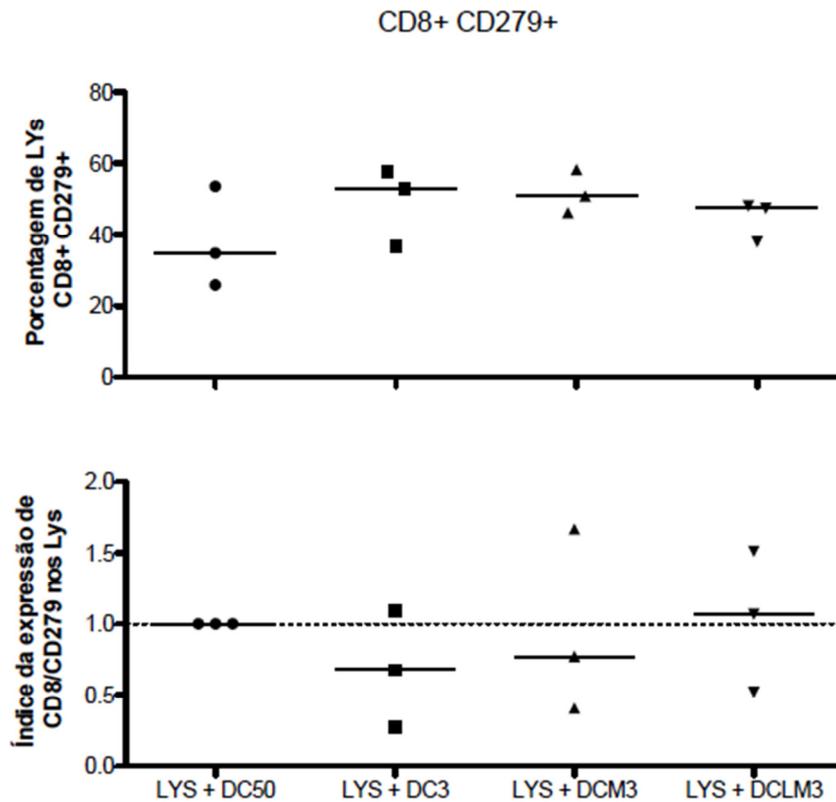


Figura 38 - Porcentagem e índices de MFI de Lys duplo positivos para CD8 e CD279 presentes na população de Lys CD8+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,5062$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,8230$** para Índice de expressão.

Para que se pudesse caracterizar mais precisamente o perfil dos linfócitos T CD4 obtidos, investigou-se a presença de alguns fatores de transcrição tais como FoxP3, Tbet e Gata-3. Assim, foram selecionados dentro da população CD4 positiva, aquela que apresentava concomitantemente positividade para CD25. A figura 39 exhibe os resultados da seleção de uma população CD4 CD25 duplo positiva. O uso de concentração diminuída de IL-4 reduziu a frequência de CD4+CD25+, no entanto, potencializou o índice de expressão. As DCs suplementadas com MLT apresentaram proporções de duplo positivos semelhantes às DCs obtidas com a concentração usual de IL-4, com semelhança para o índice de expressão. A frequência de positivos com o uso de Luzindol indicam inibição dos duplos positivos

CD4 CD25, mas o efeito parece ser potencializador quando se observa a MFI por meio do índice.

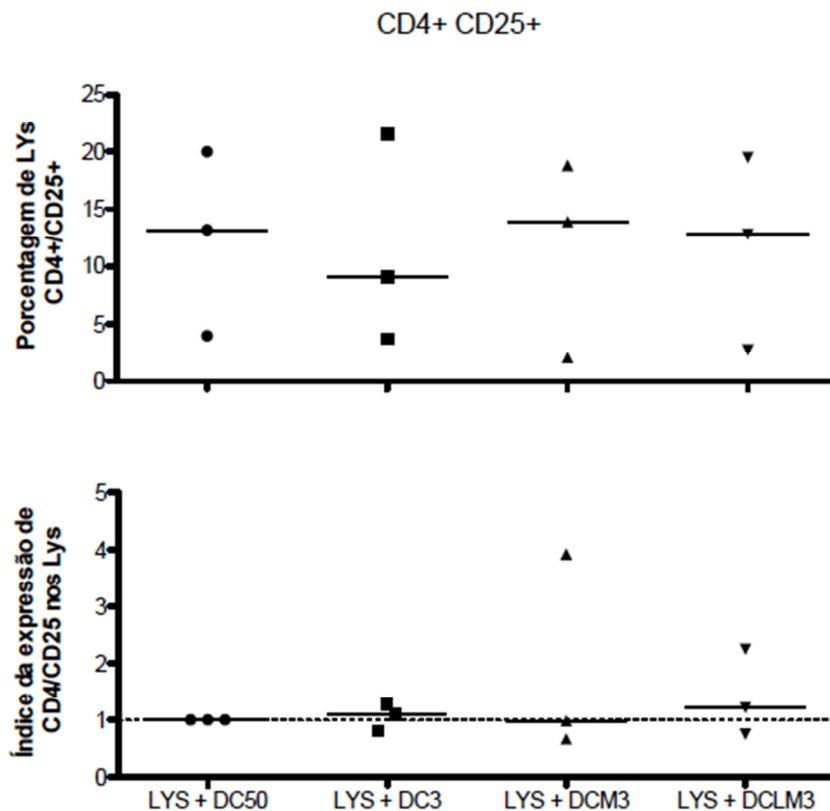


Figura 39 - Porcentagem e índices de MFI de Lys duplo positivos para CD4 e CD25 presentes na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,9634$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,9314$** para Índice de expressão.

A população duplo positiva CD4 e CD25 foi analisada quanto à presença de moléculas FoxP3, por meio de citometria intracelular. Os resultados encontrados para a presença de CD4+CD25+FoxP3+ são exibidos na figura 40. A redução da concentração de IL-4 diminuiu a frequência e índice de expressão das DCs, se comparadas ao controle positivo (Lys + DC50). Os resultados indicam uma diminuição da população de Lys CD4+CD25+FoxP3+ quando estimulados por DCs que foram aderidas sob efeito da MLT 1 nM. Culturas mantidas em concentrações usuais das citocinas apresentaram uma tendência a maior população. O uso de

Luzindol parece equilibrar este efeito, equiparando os resultados desses Lys com os estimulados por DCs suplementadas com 3,125 ng/mL de IL-4 e que não receberam MLT. O índice de expressão apresentou tendência a elevação nas co-culturas estimuladas por DCs suplementadas com MLT, porém, ainda abaixo dos valores observados para DCs obtidas com 50 ng/mL de IL-4.

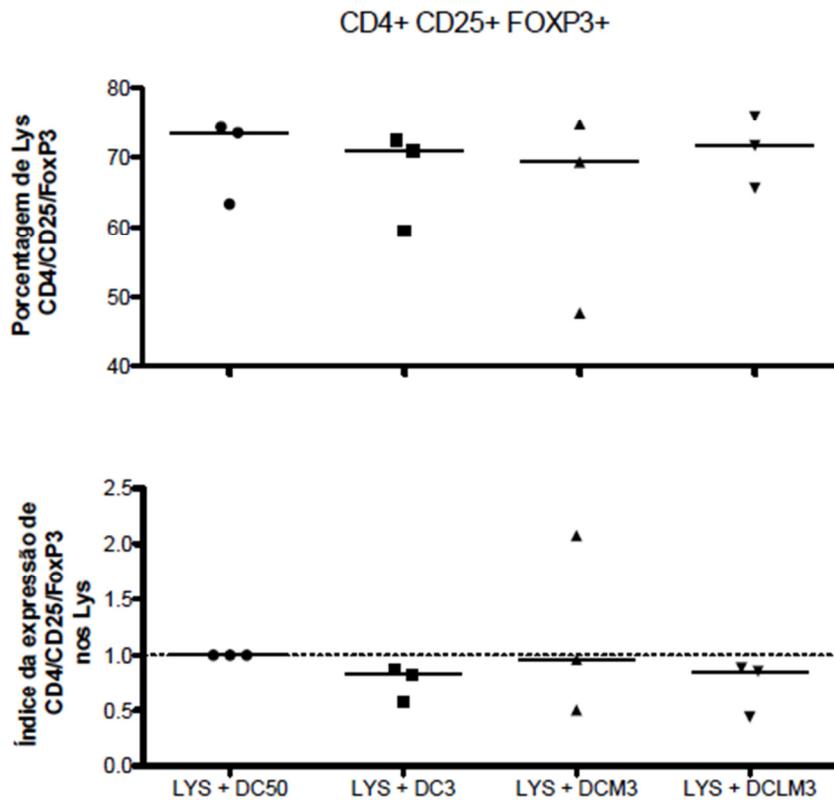


Figura 40 - Porcentagem e Índice de MFI de Lys CD4+CD25+FoxP3+ encontrados na população de Lys CD4+CD25+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,8137$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,1559$** para Índice de expressão.

Seguindo a mesma metodologia, dentro da população CD4+ foi avaliada a presença de Tbet, outro fator de transcrição. Os resultados para essa análise estão na figura 41. Há uma tendência à diminuição da população CD4+/Tbet+ quando a concentração de IL-4 está reduzida. A MLT eleva essa frequência quando utilizada

nas culturas. O uso de Luzindol apresentou tendência a potencializar a expressão de células CD4+Tbet+. O índice de expressão dos linfócitos estimulados com DCs geradas com o uso de MLT foi o maior observado dentre todos os demais, mas foi o menor observado quando se fez uso do Luzindol.

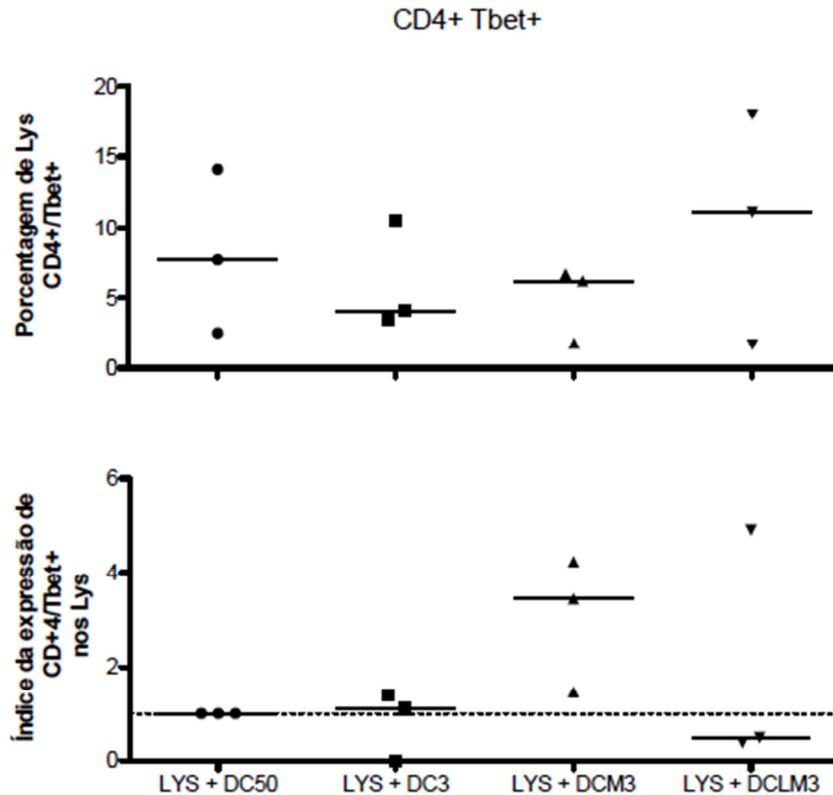


Figura 41 - Porcentagem e Índice de MFI de Lys positivos para CD4 e Tbet encontrados na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,7888$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,2753$** para Índice de expressão.

Por fim analisamos dentro dessa população CD4 positiva a presença do fator de transcrição Gata-3. Os resultados são mostrados na figura 42. As frequências de positivos para CD4 e Gata-3 foram diminuídas quando o estímulo foi dado por DCs obtidas em concentração de IL-4 de 3,125 ng/mL. Foi menor ainda nas culturas em as DC foram geradas com uso da MLT. A adição de Luzindol elevou a mediana, ultrapassando mesmo as culturas estimuladas por DCs originadas com concentrações usuais de citocinas (50 ng/mL). Com relação aos índices de

expressão, observou-se uma elevação dos índices de expressão quando o estímulo foi por meio de DCs geradas em concentração reduzida de IL-4. Quando os Lys foram estimulados com DCs suplementadas com MLT e redução de IL-4 houve elevação dos índices. O uso de Luzindol reduziu os índices de MFI nas co-culturas estimuladas por DCs suplementadas com 3,125 ng/mL de IL-4 e MLT. Embora se observe um efeito contrário ao observado para a frequência, indica que, quando presente, o Luzindol interfere na ação da MLT.

É interessante notar que tanto para o fator Tbet, quanto para Gata-3, o Luzindol apresentou efeitos opostos sobre a frequência de células positivas e sobre a intensidade de marcação. Esta observação ainda precisa ser confirmada e, então, melhor analisada para que se possa interpretá-la corretamente.

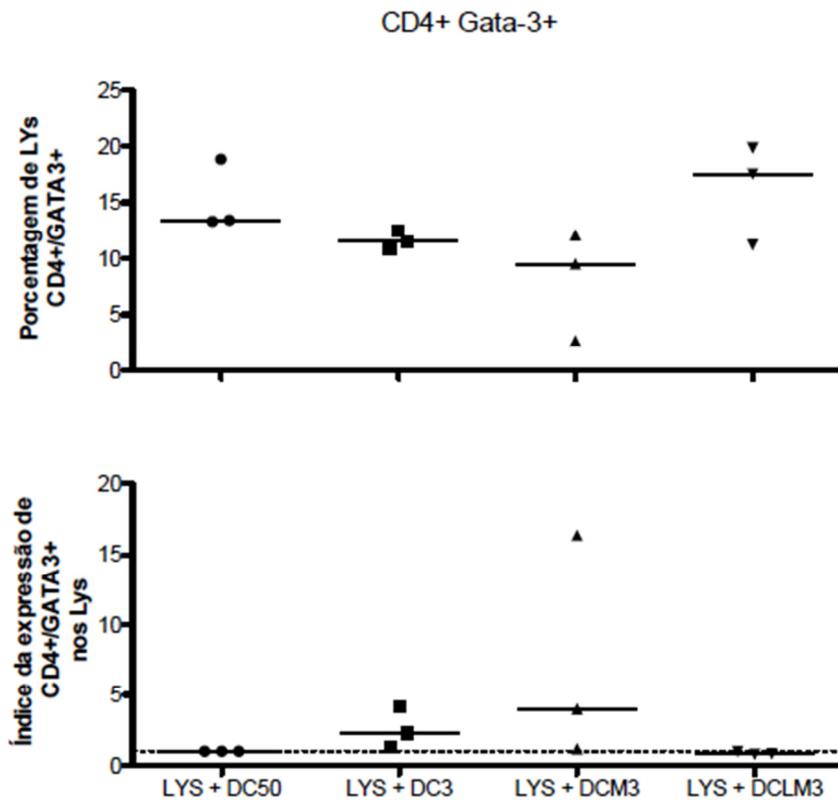


Figura 42 - Porcentagem e Índice de MFI de Lys positivos para CD4 e Gata-3 encontrados na população de Lys CD4+ que proliferaram sob estímulo de DCs obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os Lys foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo (Lys + DC50). Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0987$** para porcentagem. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0234$** para Índice de expressão.

3.13 Perfil das citocinas produzidas pelos linfócitos T alogênêicos mantidos em co-cultura com as DCs obtidas com concentração de 3,125 ng/mL de IL-4

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA com os sobrenadantes armazenados das co-culturas com a finalidade de detectar a presença de citocinas indicadoras das subpopulações de linfócitos que proliferaram. Foram analisadas as citocinas Interferon gama (IFN- γ), Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-17 (IL-17). Os resultados dos ensaios com os sobrenadantes dos três experimentos anteriormente analisados quanto ao fenótipo de membrana e aos fatores de transcrição, são mostrados na figura 43. Para IFN- γ , a maior parte dos sobrenadantes apresentaram leitura abaixo do nível de detecção do teste. O mesmo aconteceu com IL-4, com exceção para os sobrenadantes das co-culturas de Lys com DCs obtidas com concentrações usuais de IL-4 (50 ng/mL , DC50). Para IL-17, todas as co-culturas apresentaram níveis dessa citocina abaixo do nível de detecção do teste.

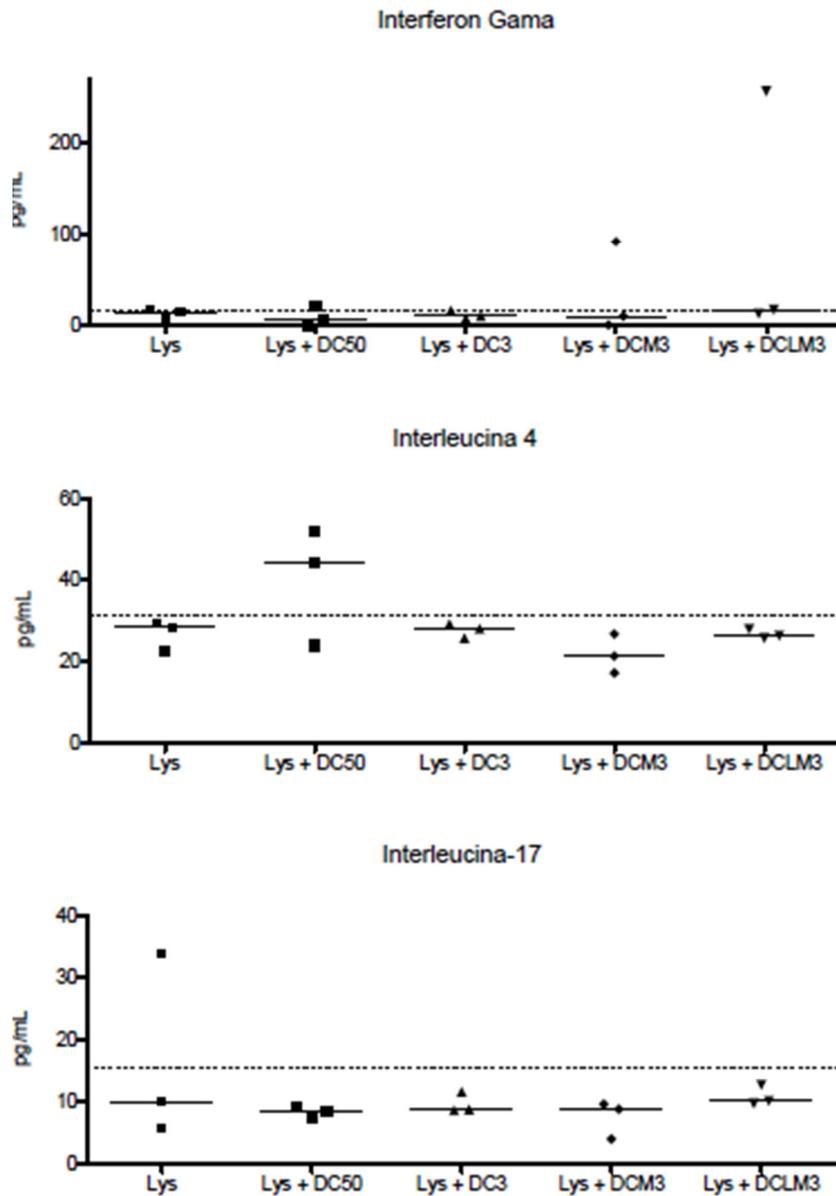


Figura 43 - Produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-17) por Lys T que proliferaram sob estímulo de DCs maduras obtidas em concentrações diferentes de IL-4. Os linfócitos (Ly) foram mantidos em co-cultura com DCs, por um período de cinco dias, na proporção de 10:1 (Ly:DC). As DCs foram geradas após adesão e cultivadas em meio contendo citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α). Todas as culturas foram suplementadas com concentrações de 50 ng/mL de GM-CSF e TNF- α . DC50 indicam a concentração de 50 ng/mL de IL-4. DC3 foram obtidas em concentração de 3,125 ng/mL de IL-4. DCM3 foram obtidas após adesão por duas horas em MLT 1 nM e suplementada com 3,125 ng/mL de IL-4. DCLM3 foram submetidas à inibição com Luzindol, suplementadas com MLT 1 nM e, posteriormente, com 3,125 ng/mL de IL-4. Traços curtos representam as medianas de $n = 3$ experimentos. As linhas tracejadas representam o limite de detecção do teste. **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,9217$ para IFN- γ . Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,2638$ para IL-4. Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,2638$ para IL-17.**

3.14 Análise da presença de moléculas das vias de sinalização intracitoplasmática ERK1/2, STAT-5 e STAT-6 fosforiladas

Foram avaliadas as culturas de PBMCs após a separação por gradiente de densidade, sob os diferentes estímulos enumerados, concentração reduzida de IL-4 3,125 ng/mL; MLT 1 nM; MLT 1 nM e IL-4 3,125 ng/mL; MLT 1 nM e IL-4 50 ng/mL;

concentração usual de IL-4 (50 ng/mL), esta última como controle positivo. Sempre que foi adicionada a IL-4 (50 ng ou 3,125 ng/mL), foi adicionado também GM-CSF em concentração de 50 ng/mL.

Para restringir a análise às células de interesse, avaliamos a expressão dos diferentes fatores apenas em células CD14+, cuja expressão é mostrada na figura 44. Diferentemente das DCs já avaliadas quanto à presença de CD14, durante a adesão não ocorre redução da frequência da molécula, e os valores encontram-se muito próximos.

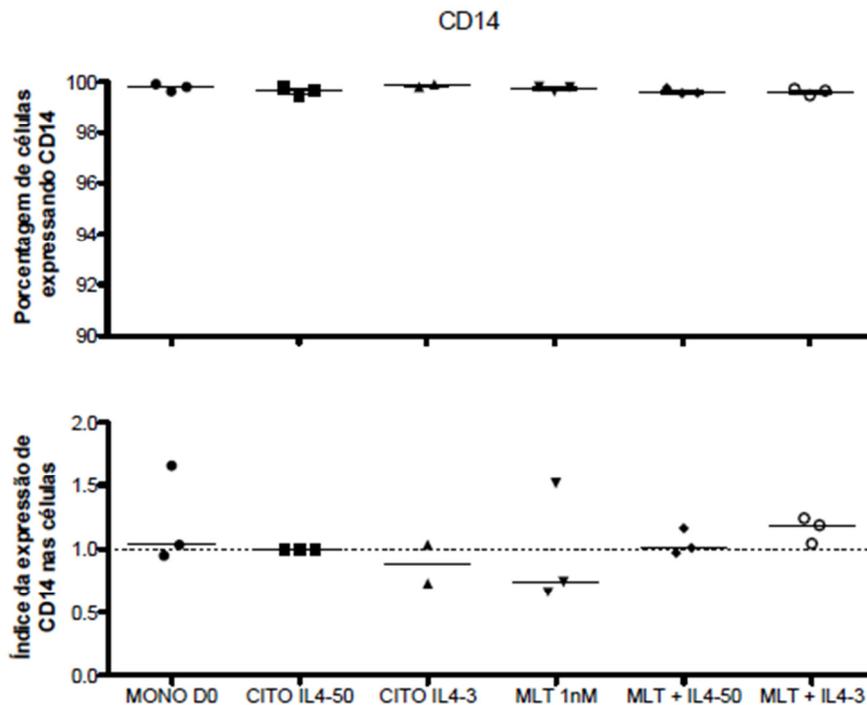


Figura 44 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **CD14** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão. Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis P = 0,3142**. Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis P = 0,0768**.

A figura 45 mostra as medianas para a análise da presença de ERK-1 e -2 (ERK 1/2) fosforilada em células CD14+ durante o ensaio de adesão dos monócitos. Houve elevação da frequência quando IL-4 e GM-CSF são utilizados em concentração usual (50 ng/mL) em relação aos monócitos sem tratamento (Mono D0). A redução da concentração de IL-4 diminuiu a presença de ERK 1/2, um efeito semelhante ocorreu com o uso de MLT 1nM. A MLT, quando utilizada em conjunto

com citocinas, aproxima as medianas do controle positivo (CITO IL4-50), mas ainda se mantém abaixo desta. O uso de MLT e IL-4 em concentração reduzida apresenta resultado superior ao uso de IL-4 3,125 ng/ml somente. Os índices de expressão mostram medianas mais elevadas nos grupos MLT IL4-50 e CITO IL4-3, observação discordante do que foi encontrado nas frequências. Não se deve ignorar, no entanto, que a MLT 1nM quando utilizada em conjunto com as citocinas em concentração usual eleva o número de moléculas ERK-1/2 fosforiladas, o que indica um efeito potencializador desta substância. A ligação de GM-CSF ao seu receptor de membrana provoca inibição da apoptose, via Ras/MAPK (KINOSHITA et al., 1995), também ativa p-21 ras (DORSCH; HOCK; DIAMANTSTEIN, 1994), que por sua vez pode ativar a ERK-2 (LEEVEERS; MARSHAL, 1992). GM-CSF foi descrito como potencializador da fosforilação de ERK 1/2, na proteção da morte celular em células de retina de ratos (SCHALLENBERG; CHARALAMBOUS; THANOS, 2009). A ativação de ERK por IL-4 já foi relatada como sendo parte de uma via alternativa, independente de PI3K, para ativação de linfócitos B, (GUO; ROTHSTEIN, 2005). Com relação à MLT, foi descrito um aumento na fosforilação de ERK 1/2 em células da linhagem monocítica humana U937, induzidas a apoptose por estresse com UVB, mantendo a ativação e aumentando a sobrevivência das células (LUCHETTI et al., 2009). Embora este dados não sejam diretamente ligados às DCs, ilustram que estas duas citocinas utilizadas atingem os mesmos elementos das vias de sinalização, ainda que esses efeitos não estejam diretamente relacionados com as DCs. No entanto, pode-se supor que a inibição da apoptose por esta via mantém a célula viva pelo tempo de cultura, o que não acontece com monócitos mantidos em cultura sem suplementação de citocinas.

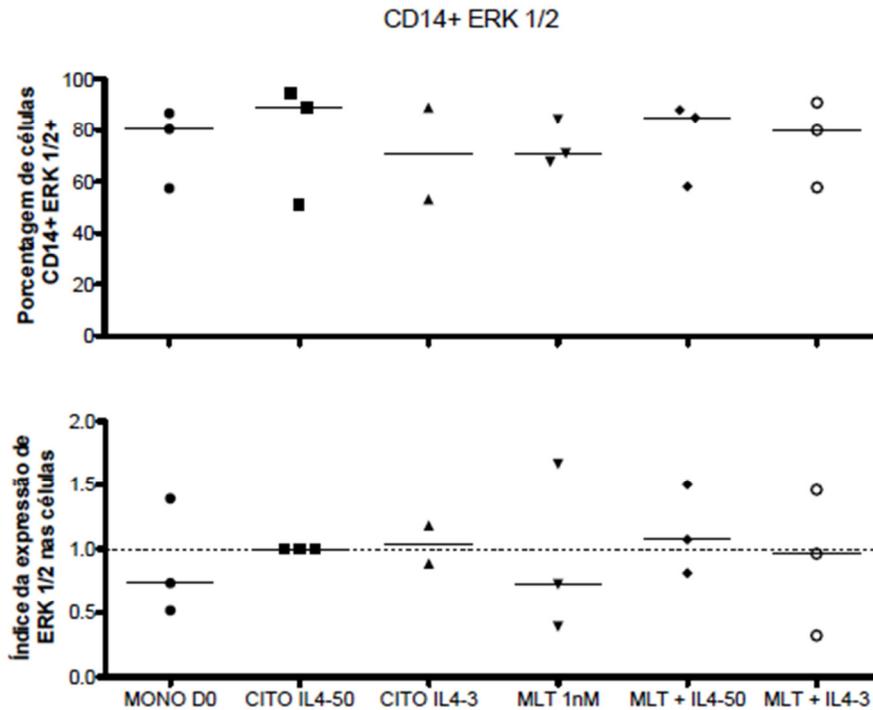


Figura 45 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **ERK 1/2 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão. Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,9672$** . Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,9134$** .

Na figura 46 observam-se os resultados para STAT-5 fosforilada. Nota-se que há uma frequência e uma expressão da MFI basal nos monócitos (MONO D0), que se mantém sem alteração quando se usa apenas MLT sem as citocinas. A adição de doses usuais de citocinas elevou essa frequência (CITO IL4-50), mas se manteve abaixo quando a concentração foi de 3,125 ng/mL. O uso de MLT mais as citocinas, tanto em concentração de 50 ng/mL quanto de 3,125 ng/mL mantém a frequência de STAT-5 próxima às encontradas para a concentração de 3,125 ng/mL (CITO IL4-3). Os índices para MFI, no entanto, tiveram medianas acima do controle positivo quando as células foram suplementadas com MLT. Embora esse efeito pareça incompatível com a concentração de IL-4 utilizada, visto que a maior concentração apresenta a menor elevação, vale notar que, aparentemente, a IL-4 não exerce um efeito direto sobre STAT-5. No entanto, poderia exercer algum tipo de inibição da ação inicial de GM-CSF, quando utilizada em concentrações elevadas, o que em concentrações reduzidas não ocorreria. STATs juntamente com as Jaks são moléculas participantes de uma rápida cascata de ativação que podem ser

fosforiladas e ativadas entre 1 e 15 minutos (SHUAI et al., 1993), portanto, pode ser possível que o efeito residual observado nos monócitos D0 possa existir em decorrência de uma ativação provocada por citocinas secretadas por outras células. A fosforilação de resíduos de tirosina é apontada como um fator de ativação de STAT-5 (OOI et al., 1998). Ativação de STAT-5, STAT-3, além da STAT-6, de modo semelhante, também foi descrita em Lys B, através de ligação de IL-13 e IL-4 ao receptor para IL-4 dos Lys B (ROLLING et al., 1996). Com relação à ativação de STATs via fosforilação de resíduos de tirosina, a MLT também já foi descrita como uma substância estimuladora de STAT-3 por meio deste mecanismo (LAU et al., 2012). Assim, mesmo não extensivamente estudada em DCs, a ativação de STAT-5 pela via da IL-4 não deve ser descartada e, mesmo a cooperação da MLT nesta ativação merece consideração.

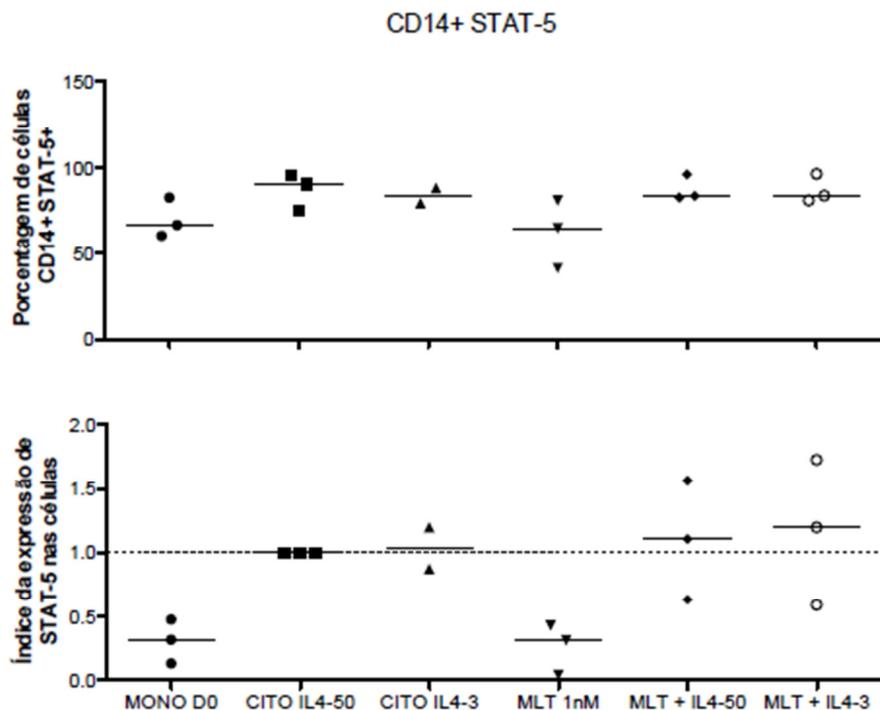


Figura 46 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-5 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão. Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis P = 0,1992**. Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis P = 0,0449**.

A análise da presença de STAT-6 fosforilada pode ser vista na figura 47. Semelhante à STAT-5 existe uma frequência basal de STAT-6. A suplementação

com MLT reduz a mediana para abaixo dessa frequência. A diminuição da concentração de IL-4 apresenta efeitos semelhantes aos da concentração usual nas frequências. Em combinação com MLT há uma pequena elevação das frequências, tanto em concentração usual quanto reduzida. Os índices de expressão não apresentam correlação com essa observação, visto estarem abaixo do controle. Nota-se que a redução de IL-4 reduz também os índices, observação condizente com a relação de ativação da IL-4 para STAT-6. A MLT utilizada na etapa de adesão e com as concentrações usuais mostra índices próximos aos das células suplementadas com 50 ng/ml de IL-4. No entanto, parece potencializar a redução do índice em células tratadas com IL-4 em concentração reduzida. Assim, pode-se dizer que a MLT não provocou mudanças significativas na presença de STAT-6, durante a etapa de adesão. IL-4 pode induzir, através da ligação ao seu receptor, a fosforilação de STAT-6 através da tirosina ou da serina (WANG et al., 2004), indicando a provável participação deste fator na diferenciação. Outro aspecto interessante diz respeito a inibição de STAT-6 por IFN- γ (ROJAS-CANALES, 2011), o que seria uma hipótese da diminuição desta molécula embora haja estímulo (IL-4) para sua presença.

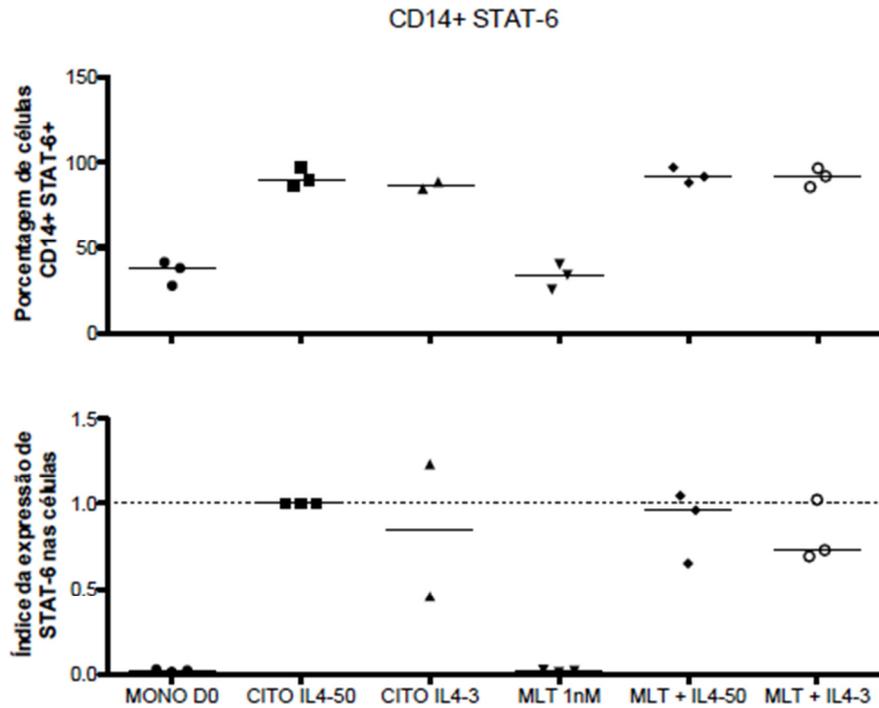


Figura 47 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-6 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão. Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0355$** . Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0458$** .

Em continuidade à investigação destas moléculas fosforiladas nos monócitos, foram analisadas as DCs geradas em presença de MLT na etapa de adesão e em concentração reduzida de IL-4. Foi feito uso de CD209 como marcador para as populações de DCs, cujos resultados podem ser vistos na figura 48. A frequência das DCs foram semelhantes em todas as concentrações de IL-4 utilizadas, com ou sem MLT. Como anteriormente visto, monócitos mantidos em meio de cultura sem suplementação mostraram baixa positividade para CD209. Nota-se que o uso de MLT eleva as medianas dos índices de expressão, quando comparados entre DCs geradas sem o uso de MLT, tanto em concentrações usuais quanto em concentrações reduzidas, de modo diretamente proporcional à concentração de IL-4 utilizada.

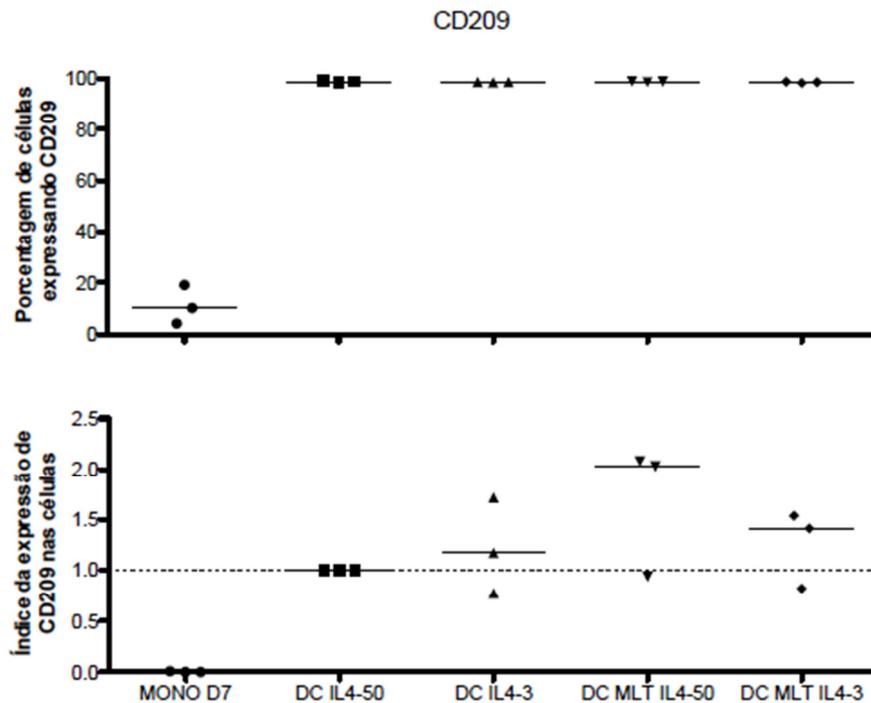


Figura 48 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-6 fosforilada** em células antes da etapa de adesão (Mono D0); células durante as duas horas de adesão suplementadas com IL-4 50 ng/mL (CITO IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (CITO IL4-3) por 15 minutos antes do término da etapa de adesão; suplementadas somente com MLT 1nM (MLT 1nM); suplementadas com MLT + IL-4 50 ng/mL (MLT + IL4-50) ou MLT + IL-4 3,125 ng/mL (MLT + IL4-3), sendo que nestes dois últimos grupos a IL-4 foi adicionada nos 15 minutos finais da adesão. Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL). A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0319$** . Teste de Dunn **$P < 0,05$** entre MONO D7 e DC IL4-50. Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0952$** .

As medianas da molécula fosforilada ERK 1/2 nas DCs podem ser vistas na figura 49. Monócitos que foram mantidos sem suplementação apresentam mediana reduzida em relação às culturas suplementadas. Observamos uma tendência ao aumento de ERKs fosforiladas nas culturas suplementadas com IL-4 na concentração de 3,125 ng/mL. Quando adicionada às culturas a MLT apresentou uma tendência a elevar a frequência de positivos para ERK, se comparadas entre as condições idênticas de concentração da IL-4. Os índices de expressão de grupos suplementados com MLT ficaram abaixo do controle positivo. Com concentração de 3,125 ng/mL de IL-4 obtivemos mediana dos índices maior que a do controle positivo. A MLT exerceu um efeito aparentemente inibidor da expressão de ERKs fosforiladas, visto ter diminuído os índices de expressão desta molécula independentemente da concentração de IL-4 utilizada. Embora, possam ser consideradas as explicações relatadas para os monócitos, não é possível afirmar que o efeito anti-apoptótico mencionado anteriormente tenha se mantido nestas

células, visto que houve uma diminuição das ERKs fosforiladas frente ao estímulo da MLT. No entanto, já foi visto que uma inibição da via das ERKs aumenta moléculas da maturação bem como moléculas co-estimuladoras (PUIG-KROGER et al., 2001), e talvez seja possível que essa diminuição esteja associada ao fato da via, possivelmente, já ter cumprido seu papel ativador.

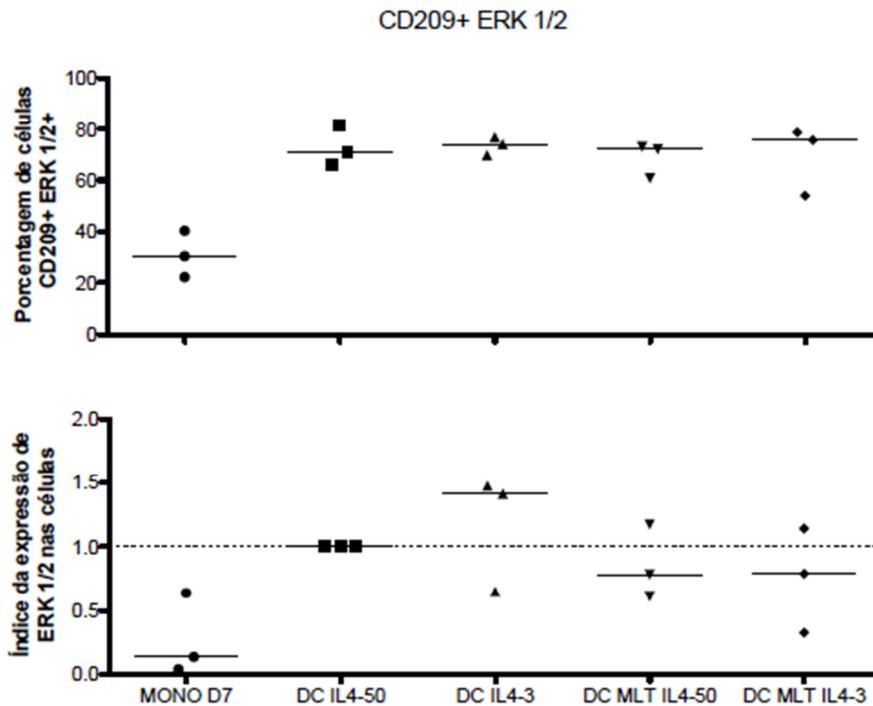


Figura 49 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **ERK 1/2 fosforilada** em células após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4 50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DC MLT IL4-50) ou com MLT + IL-4 3,125 ng/mL (DC MLT IL4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,1241$** . Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,1386$** .

Na figura 50 são mostradas as medianas para a frequência de STAT-5 fosforilada. A STAT-5 parece ser necessária a diferenciação de células precursoras em DCs, como mostrado em uma linhagem de leucemia e em células CD34 murinas (BONTKES et al., 2006; COHEN et al., 2008). Observamos que com a redução da concentração de IL-4 houve uma elevação na presença de STAT-5 fosforilada. O uso de MLT e concentração de 50 ng/mL de IL-4 diminuiu a mediana da frequência de STAT-5 em relação ao controle positivo. Essa diminuição foi mais acentuada quando a concentração de IL-4 foi de 3,125 ng/mL. As medianas do índice de expressão de todos os grupos ficaram abaixo da exibida para o controle positivo. Com relação ao uso de MLT em combinação com IL-4 em concentração de

50 ng/mL, a diminuição foi menos acentuada que o observado em concentração de 3,125 ng/mL. A MLT pareceu exercer um efeito inibidor sobre a expressão de STAT-5 e este efeito pareceu ser diretamente proporcional à concentração de IL-4 utilizada. Aqui a MLT parece agir como um elemento regulador da fosforilação de STAT-5. De modo semelhante às ERKs, STAT-5, nas culturas mantidas com MLT, apresentou uma redução de seus valores de modo dose resposta para a concentração de IL-4 adicionada. O que poderia indicar que sua presença estaria condicionada ao comprometimento dos monócitos com a diferenciação, portanto diminuindo após ter cumprido sua função.

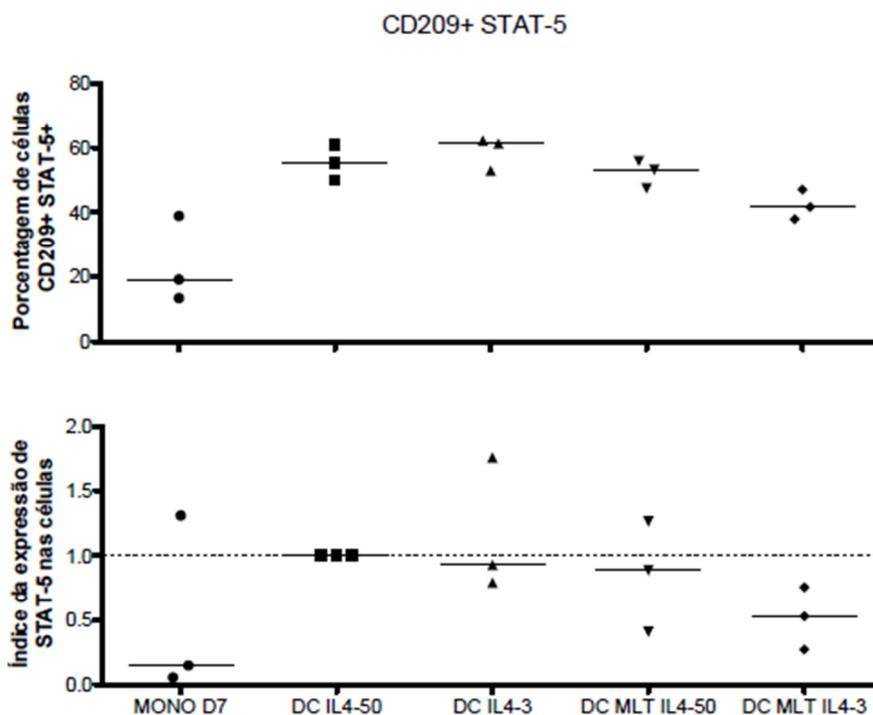


Figura 50 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-5 fosforilada** em células após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4 50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DC MLT IL4-50) ou com MLT + IL-4 3,125 ng/mL (DC MLT IL4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0241$** . Teste de Dunn **$P < 0,05$** entre Mono D7 e DC IL4-3. Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,3195$** .

Os resultados para a presença de STAT-6 fosforilada podem ser vistos na figura 51. Notamos que a diminuição da concentração de IL-4, em culturas não suplementadas com MLT, diminuiu a mediana em comparação ao controle positivo, o que já era esperado devido a ligação desta via à presença de IL-4. Quando suplementada com MLT a mediana para a frequência apresenta tendência à

elevação para valores acima do observado para o controle positivo. O mesmo se nota quando comparamos as culturas suplementadas com MLT e a concentração reduzida de IL-4 (3,125 ng/mL) em relação a que não foi suplementada com MLT. Ao observarmos os índices de expressão, ambos os grupos suplementados com MLT na etapa de adesão mostram elevação das medianas. Essa observação parece indicar que a MLT, adicionada no início do processo de geração das DCs, interfere de um modo contínuo modulando tardiamente alterações nas células obtidas. O que seria importante para obtenção de uma DC eficiente, visto que STAT-6 parece desempenhar papel importante no desenvolvimento de DCs competentes na indução de imunidade antitumoral (DIJKGRAAF et al., 2013), por exemplo.

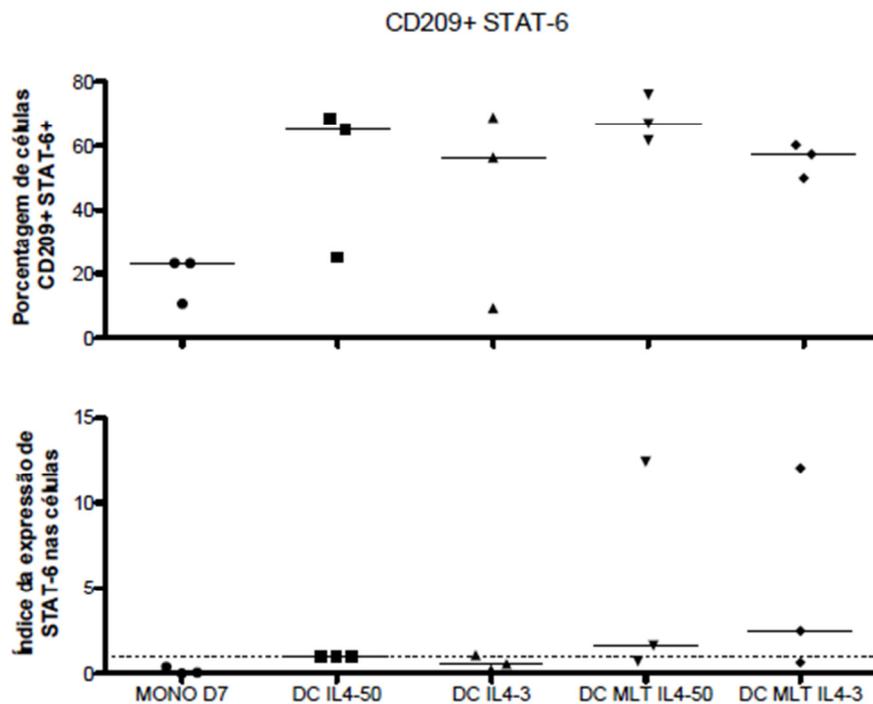


Figura 51 - Médias de porcentagem de positividade e índice da expressão (MFI x Porcentagem) de **STAT-6 fosforilada** em células após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4 50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DC MLT IL4-50) ou com MLT + IL-4 3,125 ng/mL (DC MLT IL4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas. A linha contínua representa a referência ($y = 1$) utilizada para visualização das expressões com base no controle positivo. Traços curtos representam as médias de $n = 3$ experimentos. Para porcentagem **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,1324$** . Para Índice de Expressão **Teste de Kruskal-Wallis $P = 0,0761$** .

4 RESUMO DOS ACHADOS

A MLT mantida durante os sete dias de cultura exerceu efeito modulador da expressão de CD83, mas não de CD209, molécula também presente em DCs.

A MLT foi capaz de modular a diferenciação/maturação de monócitos humanos em DCs. No entanto, os efeitos mais nítidos deste hormônio foram detectados quando a MLT foi adicionada aos monócitos durante a etapa inicial de adesão dos mesmos.

Pode-se determinar que:

A suplementação com MLT durante a etapa de adesão, mostrou capacidade de modulação dos receptores de membrana para as citocinas utilizadas, CD116, CD120 e CD124, bem como outras moléculas de membrana como CD209, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86 e CD83.

DCs geradas sob efeito da MLT na etapa de adesão apresentaram aumento na expressão de CD80, CD86 e CD83.

Linfócitos T alogênêicos apresentaram índice de proliferação maiores quando estimulados por estas DCs.

A redução de concentração de IL-4, como finalidade de explorar a presença elevada do receptor para esta citocina, em culturas aderidas com MLT 1nM, mostrou que MLT pode manter o nível de estímulo dado por esta citocina.

Quando utilizado nas culturas, o Luzindol mostrou exercer inibição sobre algumas das ações da MLT, mas não afetou todas, apontando para a possibilidade de ação da MLT por outra via não conectada diretamente aos receptores de membrana. A funcionalidade dessas DCs, com relação à estimulação de linfócitos em co-culturas, foi inibida pela ação do Luzindol.

MLT usada sozinha na adesão não altera a expressão de ERK 1/2 em monócitos, mas quando em conjunto com IL-4 em concentração usual ou reduzida, apresenta efeito potencializador dessa expressão. O mesmo acontece para STAT-5, mas não para STAT-6. Após geradas as DCs, não se observa o efeito sobre ERK 1/2. Para STAT-5 houve diminuição nos níveis de expressão. Mas, houve aumento na expressão de STAT-6, que pode ser decorrente de um efeito prolongado da ação da MLT na adesão.

A morfologia das DCs obtidas com uso de MLT é compatível com as obtidas por estímulo de citocinas, não mostrando alterações morfológicas pelas técnicas de microscopia utilizadas (figura 1A – Apêndice A).

A MLT exerceu efeito na geração *in vitro* de DCs, modulando fenótipo e função destas células. No entanto, mais estudos poderão aprofundar os resultados obtidos e esclarecer mais detalhadamente o(s) mecanismo(s) de ação envolvido(s).

5 CONCLUSÃO

A MLT mostrou-se capaz de afetar a diferenciação *in vitro* de monócitos em DCs, e, quando adicionada a monócitos antes do estímulo destas células pelas citocinas IL-4 e GM-CSF, permitiu o uso de concentrações reduzidas de IL-4, para obtenção de DCs com fenótipo equivalente ao obtido com as concentrações padrão da citocina. Esta atividade da MLT pode ter aplicação biotecnológica na geração de DCs para uso clínico.

REFERÊNCIAS¹

ACOLLA, R. S.; LOMBARDO, L.; ABDALLAH, R.; RAVAL, G.; FORLANI, G.; TOSI, G. Boosting the MHC class I-restricted tumor antigen presentation to CD4+ T helper cells: a critical issue for triggering protective immunity and re-orienting the tumor microenvironment toward an anti-tumor state. **Front. Oncol.**, v. 4, p. 1-9, 2014.

AHN, J. S.; AGRAWAL, B. IL-4 is more effective than IL-13 for *in vitro* differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. **Int. Immunol.**, v. 17, p. 1337-1346, 2005.

AMSEN, D.; SPILIANAKIS, C. G.; FLAVELL, R. A. How are Th1 and Th2 effector cells made? **Curr. Op. Immunol.**, v. 21, p. 153-160, 2009.

ANDERSSON, T. P. M.; SVENSSON, S. P. S.; KARLSSON, A. M. Regulation of melanosome movement by MAP Kinase. **Pigment Cell Res.**, v. 15, p. 215-221, 2003.

ANDRIEU, J. M.; LU, W. A dendritic cell-based vaccine for treating HIV infection: background and preliminary results. **J. Intern. Med.**, v. 261, p. 123-131, 2007.

ARDESHNA, K. M.; PIZZEY, A. R.; DEVEREUX, S.; KHWAJA, A. The phosphoinositol 3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 96, p. 1039-1046, 2000.

AYOUB, M. A.; COUTURIER, C.; LUCAS-MEUNIER, E.; ANGERS, S.; FOSSIER, P.; BOUVIER, M.; JOCKERS, R. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 21522-21528, 2002.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.-J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of Dendritic Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARBUTO, J. A. M.; ENSINA, L. F., NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; MARQUES, R.; LEITE, K. R. M. Dendritic-tumor hybrid cell therapeutic vaccination for metastatic melanoma and renal cell carcinoma patients. **Canc. Det. & Prev. online. In: International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies**; 2002 Feb; France. Paris. section on Metastasis. Disponível em: <<http://www.cancerprev.org/Journal/Issues/26/101/1011/4579> - 06/08/2003>. Acesso em: 14 jul. 2010.

BARBUTO, J. A. M.; ENSINA, L. F. C.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; LEITE, K. R. M.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 2004.

BARJAVEL, M. J.; MAMDOUH, Z.; RAGHBATE, N.; BAKOUICHE, O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1191-1197, 1998.

BARRET, P.; CONWAY, S.; MORGAN, P. J. Digging deep – structure-function relationships in the melatonin receptor family. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 221-230, 2003.

BEDNAREK, I. W.; STACHOWICZ, N.; ROGALA, E.; NOWICKA, A.; KOTARSKI, J. Phenotype of dendritic cells generated from peripheral blood monocytes of patients with ovarian cancer. **Transpl. Proceed.**, v. 42, p. 3301-3305, 2010.

BENI, S. M.; KOHEN, R.; REITER, R. J.; TAN, D-X.; SHOHAMI, E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF- κ B and AP-1. **FASEB J.**, v. 18, n. 1, p. 149-151, 2004.

BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin. In: MIRE-SLUIJ, A.R.; THORPE, R. (Ed.). **Cytokines**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 335-360.

BINKLEY, S. Circadian Rhythms. In: **The Pineal – endocrine and Nonendocrine Function**. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, 1988, Cap. 8, p. 116-127.

BONTKES, H. J.; RUIZENDAAL, J. J.; KRAMER, D.; SANTEGOETS, S. J.; SCHEPER, R. J.; de GRUJIL, T. D.; MEIJER, C. J. HOOIJBERG, E. Constitutively active STAT5b induces cytokine-independent growth of the acute myeloid leucemia derived MUTZ-3 cell line and accelerates its differentiation into mature dendritic cells. **J. Immunother.**, v. 29(2), p. 188-200, 2006.

BOOG, C. J.; KAST, W. M.; TIMMERS, H. T.; BOES, J.; DE WAAL, L. P.; MELIEF, C. J.; Abolition of specific immune response defect by immunization with dendritic cells. **Nature**, v. 318, n. 6041, p. 59-62, 1985.

BRYDON, L.; PETIT, L.; DELAGRANGE, P.; STROSBERG, A. D.; JOCKERS, R. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4264-4271, 2001.

BULLWINKEL, J.; LÜDEMANN, A.; DEBARRY, J.; SINGH, P. B. Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. **Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 45-51, 2011.

CHAN, A. S. L.; LAI, F.P.L.; LO, R. K. H.; VOYNO-YASENETSKAYA-VOYNO, T. A.; STANBRIDGE, E. J.; WONG, Y. H. Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. **Cell. Signaling**, v. 14, p. 249-257, 2002.

CHEN, L. D.; LEAL, B. Z.; REITER, R. J.; ABE, M.; SWEREYNEK, E.; MELCHIORRI, D.; MELTZ, M. L.; PÖEGGELER, B. Melatonin inhibitory effect on growth of ME-180

human cervical cancer cells is not related to intracellular glutathione concentrations. **Cancer Lett.**, v. 91, p. 153-159, 1995.

CHOMARAT, P.; DANTIN, C.; BENNETT, L.; BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 171, p. 2262-2269, 2003.

COHEN, P. A.; KOSKI, G. K.; CZERNIECKI, B. J.; BUNTING, K. D.; FU, X. Y.; WANG, Z.; ZHANG, W. J.; CARTER, C. S.; AWAD, M.; DISTEL, C. A.; NAGEM, H.; PAUSTIAN, C. C.; JOHNSON, T. D.; TISDALE, J. F.; SHU, S. STAT3- and STAT5-dependent pathways competitively regulate the pan-differentiation of CD34pos cells into tumor-competent dendritic cells. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1832-1843, 2008.

COS, S.; FERNANDEZ, F.; SANCHES-BARCELÓ, E. J. Melatonin inhibits DNA synthesis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. **Life Sci.**, v. 58, p. 2447-2453, 1996.

CRAVENS, P. D.; HAYASHIDA, K.; DAVIS, L. S.; NANKI, T.; LIPSKY, P. E.; Human peripheral blood dendritic cells and monocyte subsets display similar chemokine receptor expression profiles with differential migratory responses. **Scand. J. Immunol.**, v. 65, p. 514-524, 2007.

DAULAT, A. M.; MAURICE, P.; FROMENT, C.; GUILLAUME, J-L.; BROUSSARD, C.; MONSARRAT, B.; DELAGRANGE, P.; JOCKERS, R. Purification and identification of G Protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. **Mol. Cell. Prot.**, v. 6, p. 835-844, 2007.

DIEU-NOSJEAN, M-C.; VICARI, A.; LEBECQUE, S.; CAUX, C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 252-262, 1999.

DIJKGRAAF, E. M.; HEUSINKVELD, M.; TUMMERS, B.; VOGELPOEL, L. T. C.; GOEDMANS, R.; JHA, V.; NORTIER, J. W. R.; WELTERS, M. J. P.; KROEP, J. R.; van der BURG, S. H. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favore generation of cáncer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. **Cancer Res.**, v. 73, n. 8, p. 2480-2492, 2013.

DILIOGLOU, S.; CRUSE, J. M.; LEWIS, R. E. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 75, p. 217-227, 2003.

DORSCH, M.; HOCK, H.; DIAMANTSTEIN, T. Tyrosine phosphorylation of SHC is induced by IL-3, IL-5 and GM-CSF. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 200, p. 562-568, 1994.

DUAN, W.; YANG, Y.; YI, W.; YAN, J.; LIANG, Z.; WANG, N.; LI, Y.; CHEN, W.; YU, S.; JIN, Z.; YI, D. New role of JAK2/STAT3 Signaling in endothelial cell oxidative stress injury and protective effect of melatonin. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-13, 2013.

EREN, E.; YATES, J.; CWYNARSKI, K.; PRESTON, S.; DONG, R.; GERMAIN, C.; LECHLER, R.; HUBY, R.; RITTER, M.; LOMBARDI, G. Location of major histocompatibility complex class II molecules in rafts on dendritic cells enhances the

efficiency of t-cell activation and proliferation. **Scan. J. Immunol.**, v. 63, p. 7-16, 2006.

FONG, L.; ENGLEMAN, E. G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 18, p. 245-273, 2000.

GALLO, P. M.; GALLUCCI, S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 1-18, 2013.

GARCIA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN- γ production by human circulating CD4+ cells. A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.**, v. 159, p. 574-581, 1997.

GARCIA-MAURIÑO, S.; POZO, D.; CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. **Life Sci.**, v. 65, p. 2143-2150, 1999.

GARCIA-MAURIÑO, S.; POZO, D.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. **J. Pineal Res.**, v. 29, n. 3, p. 129-137, 2000.

GAUTIER, G.; HUMBERT, M.; DEAUVIEAU, F.; SCUILLER, M.; HISCOTT, J.; BATES, E. E. M.; TRINCHIERI, G.; CAUX, C.; GARRONE, P. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 1435-1446, 2005.

GEIJTENBEEK, B. H.; TORENSMA, R.; VAN VLIET, S. J.; VAN DUIJNHOFEN, G. C. F.; ADEMA, G. J.; VAN KOOYK, Y.; FIGDOR, C. G. Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. **Cell**, v. 100, p. 575-585, 2000.

GONZALEZ, R. P. **Efeito da melatonina sobre a diferenciação, ativação e função de células dendríticas**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GORIELY, S.; MOLLE, C.; NGUYEN, M.; ALBARANI, V.; HADDOU, N. O.; LIN, R.; DE WIT, D.; FLAMAND, V.; WILLENS, F.; GOLDMAN, M. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)-and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. **Blood**, v. 107, p. 1078-1084, 2006.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. Melatonin-Immune system relationships. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 167-179, 2002.

GUO, B.; ROTHSTEIN, T. L. B cell receptor (BCR) cross-talk: IL-4 creates an alternate pathway for BCR-induced ERK activation that is phosphatidylinositol 3-kinase independent. **J. Immunol.**, v. 174, p. 5375-5381, 2005.

HERNANDEZ, A.; BURGER, M.; BLOMBERG, B. B.; ROSS, W. A.; GAYNOR, J. J.; LINDNER, I.; CIROCCO, R.; MATHEW, J. M.; CARRENO, M.; JIN, Y.; LEE, K. P.; ESQUENAZI, V.; MILLER, J. Inhibition of NF-kappaB during human dendritic cell differentiation generates anergy and regulatory T-cell activity for one but not two human leukocyte antigen DR mismatches. **Human Immunol.**, v. 68, p. 715-729, 2007.

HILL, S. M.; BLASK, D. E. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. **Cancer Res.**, v. 48, p. 6121-6126, 1988.

HOMMA, S.; SAGAWA, Y.; ITO, M.; OHNO, T.; TODA, G. Cancer immunotherapy using dendritic/tumor-fusion vaccine induces elevation of serum anti-nuclear antibody with better clinical responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 144, p. 41-47, 2006.

INOUE, Y.; OTSUKA, T.; NIRO, H.; NAGANO, S.; ARINOBU, Y.; OGAMI, E.; AKAHOSHI, M.; MIYAKE, K.; NINOMIYA, I.; SHIMIZU, S.; NAKASHIMA, H.; HARADA, M. Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoid synthesis by IL-4 and IL-10 in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2147-2154, 2004.

ITO, T.; INABA, M.; INABA, K.; TOKI, J.; SOGO, S.; IGUCHI, T.; ADACHI, Y.; YAMAGUCHI, K.; AMKAWA, R.; VALLADEAU, J.; SAELAND, S.; FUKUHARA, S.; IKEHARA, S. A CD1a+/Cd11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. **J. Immunol.**, v. 163, p. 1409-1419, 1999.

JANSSENS, S.; BURNS, K.; VERCAMMEN, E.; TSCHOPP, J.; BEYAERT, R. MyD88s, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF- κ B and AP-1-dependent gene expression. **FEBS Letters**, v. 548, p. 103-107, 2003.

JIANG, H.; HARRIS, M. B.; ROTHMAN, P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, p. 1063-1070, 2000.

JUNG, F. J.; YANG, L.; HÄRTER, L.; INCI, I.; SCHNEITER, D.; LARDINOIS, D.; KELL, M.; WEDER, W.; KOROM, E. Melatonin *in vivo* prolongs cardiac allograft survival in rats. **J. Pineal Res.**, v. 37, p. 36-41, 2004.

KEENE, J. A.; FORMAN, J. Helper activity is required for the *in vivo* generation of cytotoxic T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 155, p. 768-782, 1982.

KINOSHITA, T.; YOKATA, T.; ARAI, K.; MIYAJIMA, A. Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. **EMBO J.**, v. 14, n. 2, p. 266-275, 1995.

KRIEHLER, E.; BAUER, W.; CHARBONNIER, A-S.; WINTER, D.; ARNATSCHEK, S.; TAMANDL, D.; SCHWEIFER, N.; STINGL, G.; MAURER, D. Balance between NF- κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. **Blood**, v. 106, p. 175-183, 2005.

KUIPERS, H.; LAMBRECHT, B. N. Modification of dendritic cell function as a toll to prevent and treat allergic asthma. **Vaccine**, v. 23, p. 4577-4588, 2005.

LANIER, L. L.; O'FALLON, S.; SOMOZA, C.; PHILLIPS, J. H.; LINSLEY, P. S.; OKUMURA, K.; ITO, D.; AZUMA, M. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T Cell proliferation, Cytokine Production, and generation of CTL. **J. Immunol.**, v. 154, p. 97-105, 1995.

LANOIX, D.; OUELLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Hum. Reprod.**, v. 21, n. 8, p. 1981-1989, 2006.

LAU, W. W. I.; NG, J. K. Y.; LEE, M. M. K.; CHAN, A. S. L.; WONG. Interleukin-6 autocrine signaling mediates melatonin MT 1/2 receptor-induced STAT3 Tyr705 phosphorylation. **J. Pineal Res.**, v. 52, p. 477-489, 2012.

LEEVERS, S. J.; MARSHALL, C. J. Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK-2, by p21 ras oncoprotein. **EMBO J.**, v. 11, p. 569-574, 1992.

LEHNER, T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. **Immunology**, v. 123, p. 40-44, 2008.

LI, G.; KIM, Y-J.; MANTEL, C.; BROXMEYER, H. E. P-Selectin enhances generation of CD14+ CD16+ dendritic-like cells and inhibits macrophage maturation from human peripheral blood monocytes. **J. Immunol.**, v. 171, p. 669-677, 2003.

LIN, Y-F.; LEE, H-M.; LEU, S-J.; TSAI, Y-H. The essentiality of PKC-alpha and PKC-beta1 translocation for CD14+ monocyte differentiation towards macrophages and dendritic cells, respectively. **J. Cell. Biochem.**, v. 102, p. 429-441, 2007.

LISSONI, P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasmas. **Pathologie Biologie**, v. 55, p. 201-204, 2007.

LISSONI, P.; CHILELLI, M.; VILLA, S.; CERIZZA, L.; TANCINI, G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 12-15, 2003.

LIU, R.; ITOH, T.; ARAI, K-I.; WATANABE, S. Janus Kinase 2 play redundant roles for antiapoptotic activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Mol. Biol. Cell.**, v.10, p. 3959-3970, 1999.

LO, J.; CLARE-SALZLER, M. J. Dendritic cell subsets and type I diabetes: Focus upon DC-based therapy. **Autoimmunity Rev.**, v. 5, p. 419-423, 2006.

LOTUFO, C. M. C.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H. P.; MARKUS, R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 430, p. 351-357, 2001.

LU, L.; THOMSON, A. W. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. **Transplantation**, v. 73, p. S19-S22, 2002.

LUCHETTI, F.; BETTI, M.; CANONICO, B.; ARCANGELETTI, M.; FERRI, P.; GALLI, F.; PAPA, S. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, n. 3, p. 339-351, 2009.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **J Immunol Methods**, v. 243, p. 147-154, 2000.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 171, p. 131-137, 1994.

MACKENSEN, A.; HERBST, B.; CHEN, J. L.; KOHLER, G.; NOPPEN, C.; HERR, W.; SPAGNOLI, G. C.; CERUNDOLO, V.; LINDEMANN, A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. **Int. J. Cancer**, v. 86, n. 3, p. 385-392, May 2000.

MAESTRONI, G. J. M. Melatonin and immune-hematopoietic system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 460, p. 395-405, 1999.

MARTIN, V.; HERRERA, F.; CARRERA-GONZALEZ, P.; GARCIA-SANTOS, G.; ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ-BLANCO, J.; RODRIGUEZ, C. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 1081-1088, 2006.

MATSUMOTO, A.; HARAGUSHI, K.; TAKAHASHI, T.; AZUMA, T.; KANDA, Y.; TOMITA, K.; KUROKAWA, M.; OGAWA, S.; TAKAHASHI, K.; CHIBA, S.; KITAMURA, T. Immunotherapy against metastatic renal cell carcinoma with mature dendritic cells. **Int. J. Urol.**, v. 14, p. 277-283, 2007.

MILLER, S. C.; PANDI, P. S. R.; ESQUIFINO, A. I.; CARDINALI, D. P.; MAESTRONI, G. J. M. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. **Int. J. Exp. Path.**, v. 87, p. 81-87, 2006.

MORSE, M. A.; ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F.; LYERLY, H. K.; SMITH, C. Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy. **Ann. Surg.**, v. 226, n. 1, p. 6-16, 1997.

NAKAHARA, T.; UCHI, H.; URABE, K.; CHEN, Q.; FURUE, M.; MOROI, Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Int. Immunol.**, v. 16, p. 1701-1709, 2004.

NELMS, K.; KEEGAN, A. D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J. J.; PAUL, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 701-738, 1999.

NESTLE, F. O.; ALIJAGIC, S.; GILLIET, M.; SUN, Y.; GRABBE, S.; DUMMER, R.; BURG, G.; SCHADENDORF, D. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 4, n. 3, p. 328-332, Mar 1998.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F. C.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R. M.; BUZAID, A. C.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic cells derived from metastatic

cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in midex lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, p. 61-66, 2005.

OKAZAKI, T.; HONJO, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 4, p. 195-201, 2006.

OOI, J.; TOJO, A.; ASANO, S.; SATO, Y.; OKA, Y. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of a common β subunit of GM-CSF receptor and its association with Stat-5 in TF-1/TPO cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 246, p. 132-136, 1998.

PALUCKA, K. A.; TAQUET, N.; SANCHEZ-CHAPUIS, F.; GLUCKMAN, J. C. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. **J Immunol.**, v. 160, n. 9, p. 4587-4595, 1998.

PEREIRA, S. R.; FAÇA, V. M. GOMES, G. G.; CHAMMAS, R.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; GREENE, L. J. Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide. **Proteomics**, v. 5, p. 1186-1198, 2005.

PINHO, M. P.; MIGLIORI, I. K.; FLATOW, E. A.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 95, p. 1-8, 2014.

PIOLI, C.; CAROLEO, C.; NISTICO, G.; DORIA, G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 15, n. 4, p. 463-468, 1993.

POZO, D.; GARCIA-MAURIÑO, S.; GUERRERO, J. M.; CALVO, J. R. mRNA expression of nuclear receptor RZR/ROR α , melatonin membrane receptor MT1, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. **J. Pineal Res.**, v. 37, p. 48-54, 2004.

PUIG-KRÖGER, A.; RELLOSO, M.; FERNÁNDEZ-CAPETILLO, O.; ZUBIAGA, A.; BERNABÉU, C.; CORBÍ, A. L. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. **Blood**, v. 98, n. 7, p. 2175-2182, 2001.

RADIO N.M.; DOCTOR, J.S.; WITT-ENDERBY P.A. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. **J. Pineal Res.**, v. 40, p. 332-342, 2006.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochem. Pharm.**, v. 80, p. 1844-1852, 2010.

RADOGNA, F.; PATERNOSTER, L.; DE NICOLA, M.; CERELLA, C.; AMMENDOLA, S.; BEDINI, A.; TARZIA, G.; AQUILANO, K.; CIRIOLO, M.; GHIBELLI, L. Rapid and transiente stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, v. 239, p. 37-45, 2009.

RAMOS, R. N.; CHIN, L. S.; SANTOS, A. P. S. A.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; LAGINHA, F.; BARBUTO, J. A. M. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 92, p. 673-682, 2012.

RELLOSO, M.; PUIG-KRÖGER, A.; PELLO, O. M.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. L.; ROSA, G.; LONGO, N.; NAVARRO, J.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; CORBÍ, A. L. DC-SIGN (CD209) Expression is IL-4 Dependent and is negatively Regulated by IFN, TGF- β , and anti-inflammatory agentes. **J. Immunol.**, v. 168, p. 2634-2643, 2002.

RIDGWAY, W.; FASSÒ, M.; FATHMAN, C. G. Following antigen challenge, T cells up-regulate cell surface expression of CD4 *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 161, p. 714-720, 1998.

ROJAS-CANALES, R.; KRISHNAN, R.; JESSUP, C. F.; COATES, P. T. Early exposure of interferon- γ inhibits signal transducer and activator of transcription-6 and nuclear factor κ B activation in a short-term monocyte-derived dendritic cell culture promoting 'FAST' regulatory dendritic cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 167, p. 447-458, 2011.

ROLLING, C.; TRETON, D.; PELLEGRINI, S.; GALANAUD, P.; RICHARD, Y. IL4 and IL13 receptor share the γ c chain and activate STAT6, STAT3 e STAT5 proteins in normal human B cells. **FEBS Lett.**, v. 393, p. 53-56, 1996.

ROSEN, R.; HU, D. N.; CHEN, M.; MCCORMICK, S. A.; WALSH, J.; ROBERTS, J. E. Effects of melatonin and its receptor antagonista on retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide damage. **Molec. Vision**, v. 18, p. 1648-1648, 2012.

SAKURAI, Y.; ARAI, K-I.; WATANABE, S. In vitro análisis of STAT5 activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Genes to cells**, v. 5, p. 937-947, 2000.

SCHALLENBERG, M.; CHARALAMBOUS, P.; THANOS, S. GM-CSF regulates the ERK1/2 pathways and protects injured retinal ganglion cells from induced death. **Exp. Eye Res.**, v. 89, p. 665-677, 2009.

SHUAI, K.; STARK, G. R.; KERR, I. M.; DARNELL, J. E. Polypeptide signaling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. **Nature**, v. 366, p. 580-583, 1993.

STEINMAN, R. M., et al. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 149, p. 1-16, 1979.

STEINMAN, R. M.; ADAMS, J. C.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. **J. Exp. Med.**, v. 141, p. 804-820, 1975.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 137, p. 1142-1162, 1973.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 139, p. 380-397, 1974.

STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 139, p. 1431-1445, 1974.

STRUNK, D.; RAPPERSBERGER, K.; EGGER, C.; STROBL, H.; KRÖMER, E.; ELBE, A.; MAURER, D.; STINGL, G. Generation of human dendritic cells/langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 87, n. 4, p. 1292-1302, Feb. 15, 1996.

SUMMERS, K. L.; HOCK, B. D.; MCKENZIE, J. L.; HART, D. N. J. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. **Am. J. Pathol.**, v. 159, p. 285-295, 2001.

SVAJGER, U.; OBERMAJER, N.; ANDERLUH, M.; KOS, J.; JERAS, M. DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 89, p. 893-905, 2011.

SVENSSON, A.; ADAMSON, L.; PISA, P.; PETERSSON, M.; HANSSON, M. Monocyte enriched apheresis for preparation of dendritic cells (DC) to be used in cellular therapy. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 33, p. 165-173, 2005.

THOMAS-KASKEL, A-K.; WALLER, C. F.; SHULTZE-SEEMANN, W.; VEELKEN, H. Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 467-473, 2007.

THORPE, R. Interleukin-2. In: MIRE-SLUIS, A. R.; THORPE, R. (Ed.). **Cytokines**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 19-33.

THURNER, B.; RÖDER, C.; DIECKMANN, D.; HEUER, M.; KRUSE, M.; GLASER, A.; KEIKAVOUSSI, P.; KÄMPGEN, E.; BENDER, A.; SCHULER, G. Generation of large number of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. **J. Immunol. Methods**, v. 223, p. 1-15, 1999.

TZE, L. E.; HORIKAWA, K.; DOMASCHENZ, H.; HOWARD, D. R.; ROOTS, C. M.; RIGBY, R. J.; WAY, D. A.; OHMURA-OSHINO, M.; ISHIDO, S.; ANDONIOU, S. E.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.; GOODNOW, C. C. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 1, p. 149-165, 2011.

WANG, Y.; MALABARBA, M. G.; NAGY, Z. S.; KIRKEN, R. A. Interleukin-4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 25196-25203, 2004.

WESTERS, T. M.; OSSENKOPPELE, G. J.; van de LOOSDRECHT, A. A. Dendritic cell-based immunotherapy in acute and chronic myeloid leukaemia. **Biomed. Pharmacother.**, v. 61, n. 6, p. 306-314, 2007.

WHITE, A. L.; TUTT, A. L.; JAMES, S.; WILKINSON, K. A.; CASTRO, F. V. V.; DIXON, S. V.; HITCHCOCK, J.; KHAN, M.; AL-SHAMKHANI, A.; CUNNINGHAM A. F.; GLENNIE M. J.; Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal centre induction and robust humoral responses without adjuvant. **Immunology**, v.131, p. 141-151, 2010.

XIE, J.; QIAN, J.; YANG, J.; WANG, S.; FREEMAN III, M. E.; YI, Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. **Exp. Hematol.**, v. 33, p. 564-572, 2005.

YANG, Y.; DUAN, W.; JIN, Z.; YI, W.; YAN, J.; ZHANG, S.; WANG, N.; LIANG, Z.; LI, Y.; CHEN, W.; YI, D.; YU, S. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. **J. Pineal Res.**, v. 55, p. 275-286, 2013.

YOUNG, L. J.; WILSON, N. S.; SCHNORRER, P.; PROIETTO, A.; TEN BROEKE, T.; MATSUKI, Y.; MOUNT, A. M.; BELZ, G. T.; O'KEEFFE, M.; OHMURA-HOSHINO, M.; ISHIDO, S.; STORVOGEL, W.; HEATH, W. R.; SHORTMAN, K.; VILLADANGOS, J. A. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 11, p. 1244-1252, 2008.

ZHANG, L. F.; OKUMA, K.; TANAKA, R.; KODAMA, A.; KONDO, K.; ANSARI, A. A.; TANAKA, Y. Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by *in vitro* short-term culture of human monocytes in the presence of Interleukin-4 and Interferon- β . **Exp. Biol. Med.**, v. 233, p. 721-731, 2008.

ZHENG, Y.; MANZOTTI, C. N.; LIU, M.; BURKE, F.; MEAD, K. I.; SANSOM, D. M. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2778-2784, 2004.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 2588-2592, 1996.

APÊNDICE A – Figura suplementar

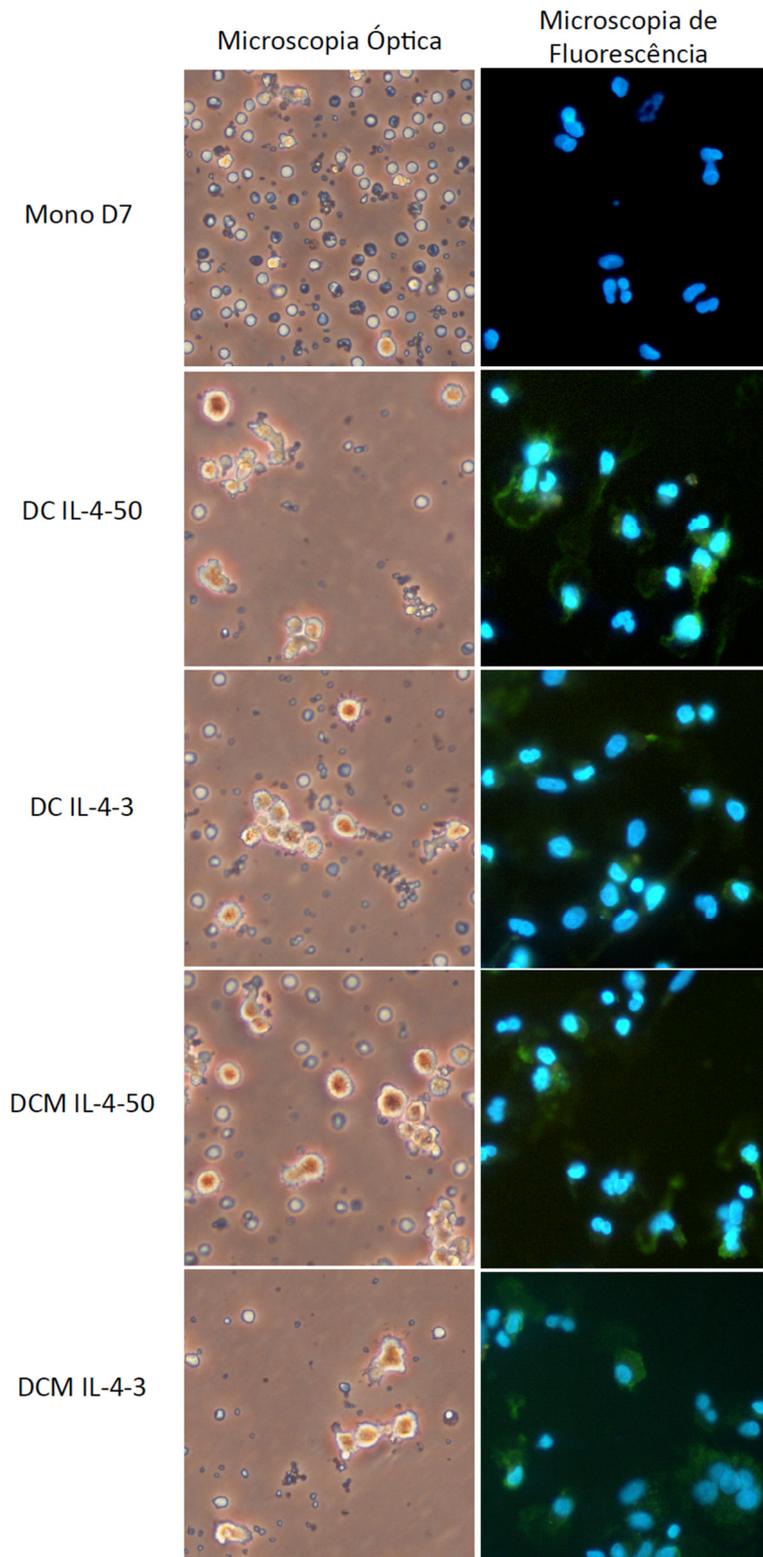


Figura 1A – Morfologia de células dendríticas (DCs) observadas em cultura no sétimo dia por meio microscópio óptico invertido e microscópio de fluorescência (núcleo corado com DAPI em azul e presença de CD209-Fitc em verde). As imagens das células foram obtidas após a etapa de adesão em culturas sem suplementação (Mono D7); DCs suplementadas com IL-4-50 ng/mL (DC IL4-50) ou IL-4 3,125 ng/mL (DC IL-4-3); DCs suplementadas na etapa de adesão com MLT + IL-4 50 ng/mL (DCM IL-4-50) ou com MLT + IL-4 3,125 ng/mL (DCM IL-4-3). Todas as células suplementadas com IL-4 receberam GM-CSF (50 ng/mL) até o quinto dia da cultura e, a partir deste, TNF- α até o sétimo dia quando foram coletadas. Imagens feitas utilizando-se aumento 10 x 40.