EVELYN CRISTINA FIGUEIREDO ROMÃO VOLSI

CÉLULAS DENDRÍTICAS E A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60KDA (HSP60): ESTRATÉGIAS PARA IMUNORREGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE MURINO.

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Dra. Verônica Coelho.

São Paulo

2008

EVELYN CRISTINA FIGUEIREDO ROMÃO VOLSI

CÉLULAS DENDRÍTICAS E A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 60KDA (HSP60): ESTRATÉGIAS PARA IMUNORREGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE MURINO.

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

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Dra Verônica Coelho.

São Paulo

2008

"Morre lentamente
quem não viaja, quem não lê,
quem não ouve música,
quem não encontra graça em si mesmo.

Morre lentamente
quem destrói seu amor próprio,
quem não se deixa ajudar.

Morre lentamente
quem se transforma em
escravo do hábito,
repetindo todos os dias os mesmos trajetos,
quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma nova cor
ou não conversa com quem não conhece.

Morre lentamente
quem evita uma paixão e seu redemoinho de emoções,
justamente as que resgatam o brilho dos olhos e os corações aos tropeços.

Morre lentamente
quem não vira a mesa quando está infeliz com seu
trabalho, ou amor, quem não arrisca o certo pelo incerto para
ir atrás de um sonho, quem não se permite, pelo menos uma vez na vida,
fugir dos conselhos sensatos..."

Quem morre?
Pablo Neruda

“ Olhar para trás, após uma longa caminhada, pode fazer-nos perder a noção da distância que percorremos, mas se detivermos em nossa imagem quando a iniciamos e a seu término, certamente nos lembraremos do quanto nos custou chegar até o final e hoje, temos a impressão de que tudo começou ontem. Não somos os mesmos, mas estamos mais juntos. Sabemos mais uns dos outros, e é por este motivo que dizer adeus se torna tão complicado. Digamos, então que nada se perderá, pelo menos, dentro de nós”

“ Você se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos e passo a passo, pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar o meu caminho a seguir... Sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto existe seu gesto e em minha voz a sua voz...”

Vinícius de Morais

Ofereço esse trabalho a Deus por me permitir viver tão intensamente a vida, ter uma família e amigos maravilhosos, conhecer o amor e ter fé e força suficiente para ultrapassar todas as dificuldades que encontrei no meu caminho. Obrigada por me permitir chegar aonde cheguei e por estar sempre ao meu lado me amparando, iluminando e guiando!!

Dedico esse trabalho aos meus pais: Valdenir Miguel Volsi e Maria da Graça Figueiredo Romão Volsi e ao meu irmão Rodrigo Otávio Figueiredo Romão Volsi, que com todo amor, paciência e doação me incentivaram, apoiaram e me ampararam, permitindo que hoje eu tenha conquistado tudo o que conquistei até aqui. Muito Obrigada!! Amo Muito vocês!!!

"Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque Tu estás comigo"
Salmo 23:4

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, pela saúde, pela minha família, pelos amigos, pelas oportunidades, pelos desafios, pelas vitórias, pelas dificuldades, pelas pessoas que passaram e chegaram e também, por ser tão feliz e abençoada!!!

É com muito AMOR e gratidão que agradeço à minha família que em todos os momentos esteve ao meu lado, me dando apoio, abraços, carinhos, broncas, incentivo, suporte financeiro e, acima de tudo, MUITO Amor e compreensão!! Meu amor por vocês é tão grande e intenso que não consigo expressar em palavras.. AMO todos vocês de todo o meu coração e se consegui cumprir mais uma etapa tão importante da minha vida, certamente foi graças a vocês e também por vocês!!! Obrigada por tudo o que fizeram por mim, mas principalmente por fazerem de mim o que sou hoje. Espero que eu possa ser durante toda a minha vida, motivo de muito orgulho e felicidade para todos vocês!!!

Também faço questão de agradecer aos meus amigos MUITO MUITO amados e especiais: Vivian Zerbinatti e família, Carla M. Fabbrini, Ana Carolina Cury, Samantha Oliveira, Keity e Maurício Ribeiro, Graciela Brocardo, Alexandro M. de Carvalho, pessoal do meu grupo do curso de pesquisa clínica da INVITARE (Babi, Fernanda, Daniel, Thiago e Lucas). E um Super Obrigada à minha amiga e comadre Dra. Maria Anita Mendes que me deu o presente mais lindo que já recebi na vida: meu afilhado lindo (Álvaro Henrique – a dinda TE AMA!!). Vocês todos são responsáveis pelos meus sorrisos diários e por grande parte da felicidade que sinto todos os dias da minha vida, AMO vocês meus amigos!!!

Gostaria de agradecer à minha orientadora Dra. Verônica Coelho por me acolher como aluna de doutorado direto apostando assim na minha capacidade. Também agradeço pelos ensinamentos, pelas discussões imunológicas e da complexidade; mas principalmente por acreditar no meu trabalho. Obrigada também pela minha viagem a New York, onde pude vivenciar a melhor e mais intensa experiência científica da minha vida!! Serei eternamente grata!!

Agradeço ao Professor Jorge Kalil por abrir as portas do seu laboratório para mim, fornecer todo o material necessário para a execução desse projeto, estar sempre aberto a conversas, pelas discussões imunológicas, pelos ensinamentos e finalmente, por me ensinar a ver a ciência de forma mais ampla e crítica.

Não posso de maneira nenhuma deixar de agradecer imensamente ao Professor Dr. Michel M. Nussenzweig, que prontamente se dispôs a me receber em seu laboratório na Rockefeller University (NY–USA) e financiou todos os experimentos que foram desenvolvidos lá durante os meus quatro meses de estágio. Além disso, agradeço também a oportunidade de ter trabalhado ao lado de grandes cientistas em seu laboratório bem como, por aprender muita imunologia e biologia molecular. Muito Obrigada por tudo!!!

Do mesmo modo, agradeço à Prof. Dra. Silvia Boscardin por todos os ensinamentos, supervisão, orientação, dedicação, companhia, paciência, broncas, elogios, incentivo e horas de trabalho dedicadas a mim durante os meses em que trabalhamos juntas em NY. Silvia, eu aprendi muito com você e tenho muito orgulho de ter trabalhado com você. Torço pelo seu sucesso!!!

Aproveito ainda esta oportunidade para agradecer a todos os membros da minha banca de qualificação: Dr. Alexandre M. Barbuto, Dra. Maria N. Sato e Prof. Dr. Fábio M. Castro. Muitíssimo obrigada pelas discussões, pelas perguntas e pelas sugestões, mas principalmente pelos elogios, incentivos e por me transmitirem toda a calma e confiança necessária para a finalização da minha tese. Espero que fiquem ainda mais satisfeitos e empolgados com a tese!!

Querido amigo Luiz Roberto, sem você esse trabalho teria sido incompleto!! Sem suas mãos e sua boa vontade inesgotável essa tese teria sido muito mais difícil de ser feita. Sem tua paciência e teus conhecimentos eu jamais teria aprendido tudo que aprendi ai no biotério.. Sem teu sorriso, eu não teria tanta alegria em trabalhar com os camundongos.. Meu amigo, MUITO Obrigada por você existir na minha vida e ter me ensinado tanto!! Te adoro!!!!

Agradeço MUITO à minha aluna e companheira de trabalho, Débora Tittus Marchi, que contribuiu sobremaneira pra execução de parte dos experimentos da minha tese. Obrigada pela oportunidade de aprender com

você, por ter trabalhando comigo lado a lado, sempre com boa vontade mesmo quando íamos até bem tarde da noite, rsrs.. Você é muito mais que uma aluna aplicada, é uma amiga muito querida e com um futuro brilhante. Torço por você e tenho muito orgulho de ter sido sua co-orientadora! Brigadinha!!

Preciso ainda de fazer agradecimentos pessoais a algumas pessoas que são muito mais do que especiais na minha vida. Primeiramente, agradeço a minha grande amiga e "irmã" Fernanda G. Martello, amiga de todos os dias e horas. Fer, obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pelas risadas, pelas viagens, pelos passeios, pelos choros, pelas reclamações, pelas broncas, pela proteção, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelas tabelas e também por ter me ajudado tannntas vezes a soltar as DCs das placas...hahahaha Obrigada por gostar de mim como sou e por estar sempre, sempre ao me lado!! Amo você, viu malinha.. rsrsrs!!!

Agradeço também à minha amiga mais engraçada, sincera e querida: Dra. Rosemeire Aparecida Silva! Rose, você é um presente muito especial que Deus me deu!! MUITO Obrigada por absolutamente TUDO! Pela amizade sincera, desinteressada e preciosa.. Por me ajudar, ouvir até cansar, pelos avisos, pelos exemplos, pelas ajudas, pelas discussões científicas (6 horas no ônibus indo pro ImmunoRio, lembra? Hahaha), pelos passeios, pelo Salmo 91, pelo apoio, por me colocar pra cima sempre, mas principalmente pelas risadas!! Amiga, torço muito por você e Te Amo, te respeito e admiro pra sempre!!

Gostaria de agradecer a outra pessoa MUITOOOO especial na minha vida: Ruth Bonadia Barros (minha Ruthinha querida)!! Você é muito mais do que uma amiga especial, foi como uma mãe pra mim todos esses anos. Esteve ao meu lado em todos os momentos: nos tristes, nos alegres, nos difíceis e nos fáceis.. Mas sempre com um amor incondicional e com mensagens de carinho e apoio. Muito obrigado por gostar de mim de verdade e por todo esse amor com que sempre me tratou.. e é claro, por ter me "adotado" e protegido todos esses anos!!! Você é MUITO MUITO especial! Te Amo hoje e SEMPRE!!!!

Um outro obrigada MUITO especial vai para a minha super amiga Simone Correa. Obrigada pela amizade sincera, pelas discussões

imunológicas, pelo kit e experimento de TGF-β, pela revisão da tese, pelas noites dormidas na tua casa, por todo aprendizado, por ter participado do finalzinho da tua tese, pelo carinho, pelos conselhos, pela lembrança, pelos jantares, pelas risadas e pelo melhor Reveillon da minha vida até hj!!!! Amiga, você é uma pessoa incrível! Te admiro MUITO e Te Amo de montão!!!

Outro agradecimento especial que não posso deixar de fazer é à minha amiga de todo coração Maísa Takenaka. Maisinha, você foi entrando na minha vida e no meu coração aos poucos ao longo de todos esses anos de convivência, com esse seu jeitinho todo especial, engraçado, honesto e Único!! Hoje tenho certeza de que a nossa amizade é MUITO forte e indestrutível!! Amiga, sei que sempre pude e poderei contar com você para tudo, inclusive para passar dois dias inteiros fazendo TGF-β, e ajudando a checar a bibliografia risos.. Quero que saiba que você com seu carinho, amizade, sinceridade, apoio e estímulo, faz a minha vida Muuuuuuuuito mais feliz e abençoada. Agradeço a Deus pela sua amizade todos os dias! Te Amo de coração!!!!

Agradeço ainda, com toda a força do meu coração as minhas anjinhas da guarda: Amada Farage Frade e Ana Paula Sheppard Guembes!! Amigas amadas se não fosse pelos computadores que vocês me emprestaram, eu não conseguiria escrever essa tese tão longa e complexa no prazo estipulado pela pós-graduação. A vocês dedico minha gratidão será eterna!! Amo muito vocês duas!!!

Agradeço de coração ao meu companheiro inseparável de laboratório, o DC1, Adalberto Socorro da Silva.. Ada, foi muito bom trabalhar com você todos esses anos, aprendi muito ao teu lado! Obrigada pela oportunidade de ter participado da tua tese. Formamos uma dupla dinâmica e com isso colocamos as células dendríticas para funcionar e a todo o vapor.. Jamais me esquecerei de você e você terá minha amizade sincera pra sempre!! Tenho muito orgulho de ser sua amiga! Conte sempre comigo, mesmo estando longe, ai no Piawai!

Um ultra, super, hiper, mega, power, blaster, ninja e não menos especial OBRIGADA às minhas mais queridíssimas amigas: Samatha Oliveira, Karem Kohler, Carol Luque (minha Freakinha), Carol Borba, Flávia Vigna, Kátia Françoso, Natália Moreira, Sandra Emiko, Natalie Müller, Adriana

Coutinho. Todas vocês me ajudaram muito, seja fazendo o famoso duble check, seja me levando pra sair, me fazendo dar muitas risadas e me fazendo sentir especial!! Vocês são a luz da minha vida !!!

Um agradecimento mais do que especial e merecido a todos os meus colegas e amigos do grupo de TX, meus companheiros do dia-a-dia e amigos de todas as horas: Ernesto Luna, Sandra Maria, Lin, Fernanda, Hernandez, Cris Caldas, Gabriel Victora, Georgia, Pedro, Maísa, Francine, Mônica, Carlinhos!! Vocês todos foram fantásticos e estarão para sempre na minha memória, nas minhas orações e no meu coração. Obrigada pela amizade, apoio e compreensão que me deram todos esses anos juntos... saiba que poderão contar comigo pra sempre!!!

Gostaria de fazer também um agradecimento especial à Dra. Luiza Guilherme, ao Dr. Edécio Cunha Neto e Dr. Luiz Vicente Rizzo por todo suporte, carinho, atenção e ensinamentos que me deram ao longo desses 5 anos de convivência, em especial nos retiros da disciplina de alergia!! Você são muito especiais além de pesquisadores muito competentes! Dra. Luiza, muito obrigada por todas as vezes que você esteve ao me lado me apoiando e me ajudando a resolver empecilhos.. jamais me esquecerei! Muito Obrigada por tudo!!

Por fim, agradeço aos meus queridos colegas de laboratório (Biotério, Ateroesclerose, Febre Reumática, HIV, Proteômica, HLA, Alergia e Terapia Celular.), por terem me recebido tão bem no laboratório, pela conversas, pelas discussões científicas e risadas: tudo foi um grande aprendizado que levarei para sempre na minha vida!! Mas sem dúvida, antes de tudo isso, pela amizade e carinho ao longo dos anos!

Também não posso deixar de agradecer às secretárias do laboratório e da Disciplina de Imunologia e Alergia: Neuzetinha (amiga, Te Amooo!!), Regiane, Gisele, Douglas, Senhor Jair, Sonia, Tânia (Taninha, minha querida), Andréa! Vocês foram muito mais do que anjos da guarda, foram amigos queridos!! Muito Obrigada de coração por "quebrarem meus galhos", por responder meus emails desesperados (né Tânia, rsrs), por todo papel sulfite do mundo (né Senhor Jair, rsrs) etc etc..

Agradeço também à CAPES-CNPq pela bolsa de doutorado direto que me auxiliou financeiramente nestes 4 anos e também por acreditar na

minha competência e no meu trabalho. Sem todo esse suporte esse trabalho jamais poderia ter sido desenvolvido.

À USP, em especial à Faculdade de Medicina, que me acolheu e me instruiu me proporcionando tantas alegrias e vitórias nesses últimos cinco anos e, principalmente, pela oportunidade de um ensino de tanta qualidade e sem custos adiconais.

MUITO OBRIGADA A TODOS!!!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABS - Absorbância

αCD3 – anticorpo anti-CD3

Aire – do inglês, "*Autoimmune Regulator"*

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

APC – Aloficocianina

BDCA – do inglês, "*Blood Dendritic Cell Antigen"*

CD – do inglês, "*Cluster of Diferenciation*"

Cpm – contagens por minuto

CTLA-4 - do inglês, "*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*"

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

FCS – do inglês, "*Fetal Bovine Serum*"

FITC – Isotiocianato de fluorosceína

FoxP3 - do inglês, *"Forkhead Box Protein P3"*

GITR – do inglês,*"Gglucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor"*

ICAM – do inglês, "*Intercellular Adhesion Molecule"*

ICOS – do inglês, "*Inducible Costimulatory Molecule*"

iDC – Célula dendrítica imatura

iDC IL-10 – Célula dendrítica imatura tratada com IL-10

IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN-γ – Interferon-gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

HIV – do inglês, "*Human Immunodeficiency Vírus"*

IL – Interleucina

iNOS – do inglês, "*Inducible NO Synthase*"

kDa - Quilodalton

LB – Linfócito B

LFA-1 - do inglês, *"Lymphocyte Function-Associated Antigen-1"*

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – Linfócito T

mDC – Célula Dendrítica madura

MFI – Mediana de intensidade de fluorescência

MHC – do inglês, "*Major Histocompatibility Complex*"

MLR – Reação linfocitária mista

NaCl – Cloreto de Sódio

NK – Célula Natural Killer

NKT – Linfócito NKT

NO – Óxido Nítrico

PAMP – Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PRR - do inglês, "*Pattern-Recognition Receptors"*

PBS – do inglês, "*Phosphate Buffered Saline*"

PD1 - do inglês, "*Programmed Death 1*"

PE – Ficoeritrina

Percp – do inglês, "*Protein Chlorophyll Peridinin*"

pg – picograma

PI – Iodeto de propídeo

rGM-CSF – Recombinante do fator de crescimento de monócitos e granulócitos

RNAi - RNA de interferência

RPM - Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura celular

TCR – receptor de célula T

TGF-β - do inglês, "*Transforming Growth Factor beta*"

Th – do inglês ,"*T helper cell*"

TLR – do inglês, "*Toll Like Receptor*"

TNF- α - do inglês, "*Tumor Necrosis Factor alpha*"

Tr1 - Célula T reguladora tipo 1

Treg – Linfócito T regulador

ÍNDICE

1. RESUMO 1
2. ABSTRACT 3
3. INTRODUÇÃO.....5
3.1 Introdução à Imunologia 5
3.2 Tolerância Imunológica.....15
3.3 Auto-imunidade Fisiológica.....18
3.4 Proteínas de Choque Térmico – HSPs.....22
3.5 Células Dendríticas.....30
3.6 Células Dendríticas Tolerogênicas 40
3.7 DC em indução de tolerância no transplante.....44
4. OBJETIVOS 49
5. DESENHO EXPERIMENTAL DO PROJETO.....50
6. MATERIAL E MÉTODOS.....52
6.1 Animais.....52
6.2 Produção de reagentes 53
6.2.1 Produção das regiões C-Hsp60 e I-Hsp60 humanas recombinantes..... 53
6.2.2 Remoção de endotoxinas..... 54
6.2.3 Teste de endotoxina por LAL (Limulus Amebocyte Lysate) cromogênico QCL1000..... 54
6.2.4 Produção dos peptídeos da Hsp60 55
6.3 Experimentos com DCs *in vitro*.....60
6.4 Obtenção de células de medula óssea.....60
6.5 Indução de diferenciação de DCs 61
6.6 Obtenção de células do baço 63
6.7 Obtenção de populações celulares enriquecidas de células T 64

6.8 Estimulação das células dendríticas com fragmentos da Hsp60 65
6.9 Caracterização imunofenotípica de DCs e LTs por citometria de fluxo (FACS).....65
6.10 Caracterização morfológica das DCs por Citospin 67
6.11 Análise Estatística.....68
6.12 Ensaios de linfoproliferação e MLR (Cultura Mista Linfocitária) com DCs pulsadas ou não com fragmentos da Hsp60.....68
6.13 Ensaios de proliferação de LT frente aos diferentes tipos de DCs (iDCs, iDCs IL-10 e mDCs), pulsadas ou não com as regiões C-Hsp60, I-Hsp60 ou peptídeos. 69
6.14 Cultura celular para coleta de sobrenadante e detecção de citocinas (CBA).....69
6.15 ELISA pra TGF-β 71
6.16 Experimentos com DCs in vivo 73
6.16.1 Injeção das diferentes DCs pulsadas com fragmentos da Hsp60 para indução de tolerância ao aloenxerto de pele 73
6.16.1.1 Transplante de pele..... 73
6.16.2 Direcionamento às DCs in vivo com o anticorpo aDEC205 acoplados ao peptídeo N3..... 75
6.16.2.1 Construção do anticorpo αDEC205-N3.....75
6.16.2.2 Construção dos primers 76
6.16.2.3 Amplificação do DNA da Hsp60 e C-Hsp60 usando PCR77
6.16.2.4 Extração e purificação dos DNAs a partir de gel de agarose 78
6.16.2.5 Ligação da Hsp60 e C-Hsp60 com o plasmídeo pCR4 e Transformação 78
6.16.2.6 Clonagem das construções no plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo DEC205 de camundongo..... 80

6.16.2.7 Produção em larga escala de DNA usando kits de Maxi prep. 81

6.16.2.8 Transfecção transitória em células 293T usando HBS ..81

6.16.2.9 Transfecção transitória em células 293T usando Polyethylenimine branched (PEI) 82

6.16.2.10 Precipitação dos Anticorpos com Sulfato de Amônia .. 82

6.16.2.11 Purificação dos Anticorpos αDEC205 82

6.16.2.12 Western Blot..... 84

6.16.2.13 Detecção e Remoção de LPS dos anticorpos αDEC205-N3 84

6.16.2.14 Injeção in vivo dos anticorpos α-DEC205 N3..... 85

7. RESULTADOS 87

7.1 Produção de anticorpos αDEC205 87

7.2 Geração das células dendríticas.....93

7.3 Caracterização morfo-funcional das células dendríticas.....98

7.3.1 Caracterização morfológica das DCs 98

7.3.2 Caracterização imunofenotípica dos diferentes tipos de DCs 100

7.3.3 Indução de estabilidade do fenótipo imaturo das DCs 109

7.3.4 Avaliação da produção espontânea das citocinas pelos diferentes tipos de DCs..... 110

7.3.5 Avaliação da resposta linfoproliferativa alogenéica - MLR - induzida pelos diferentes tipos de DCs..... 114

7.4 Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas células dendríticas 117

7.4.1 Avaliação do efeito dos fragmentos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nos diferentes tipos de células dendríticas..... 118

7.4.2 Avaliação do efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de citocinas pelos diferentes tipos de DCs 143

7.5 Avaliação da auto-reatividade de linfócitos T: importância das diferentes DCs e da interação destas com a Hsp60.....159

7.5.1 Avaliação da auto-reatividade dos linfócitos T frente às células dendríticas 159

7.5.2 Inibição da auto-reatividade de linfócitos T frente às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 e indução de auto-reatividade dirigida aos fragmentos da Hsp60 168

7.6 Importância das diferentes DCs na resposta proliferativa de linfócitos T frente ao estímulo policlonal de αCD3 no contexto autólogo e alogenéico 202

7.6.1 Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal αCD3 no contexto autólogo 202

7.6.2 Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal αCD3 no contexto alogenéico 205

7.7 Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta de linfócitos T ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das diferentes DCs.....208

7.7.1 Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT na presença das diferentes DCs 208

7.7.2 Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de citocinas induzidas por αCD3 nas coculturas de LT com as diferentes DCs 214

7.8 Protocolos para a indução de tolerância ao alotransplante murino de pele.....231

7.8.1 Injeção das diferentes DCs tratadas *in vitro* com fragmentos da Hsp60 231

7.8.2 Injeção dos anticorpos αDEC205 acoplados ao peptídeo N3 da proteína Hsp60 234
8. DISCUSSÃO 237
9. CONCLUSÕES 280
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....282
ANEXOS 295

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Primers* para amplificação do peptídeo N3.....71

Figura 2. Seqüência dos 4 *primers* para peptídeo N3. 71

Figura 3. Mapa da cadeia pesada do anticorpo αDEC205. 72

Figura 4. Mapa da cadeia leve do anticorpo αDEC205. 73

Figura 5. Inserção do peptídeo N3 nos plasmídeos pDEC e pISO.....87

Figura 6. Produção da cadeia leve (Kappa) dos anticorpos pDEC e pISO 88

Figura 7. Anticorpos nos sobrenadantes de cultura celular de células 293T transfectadas com os plasmídeos pDEC e pISO contendo o peptídeo N3 89

Figura 8. Anticorpos αDEC205-N3 no sobrenadante de cultura e no botão celular de células 293T 90

Figura 9. Anticorpos αDEC205-N3 nos sobrenadantes de cultura celular de células 293T 91

Figura 10. Células da medula óssea em diferenciação para DCs 94

Figura 11. Caracterização morfológica de células de medula e células dendríticas por citometria de fluxo.....94

Figura 12. Comparação da expressão de moléculas de superfície CD80, CD86 e MHC II entre as células da medula óssea e as células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC).....95

Figura 13. Contaminação com Granulócitos.....96

Figura 14. Características morfológicas dos diferentes tipos de células dendríticas 97

Figura 15. Características morfológicas das iDCs, iDCs tratadas com IL-10 e mDCs de camundongos, geradas *in vitro* a partir de células de medula óssea 99

Figura 16. Imunofenotipagem de células dendríticas 101

Figura 17. Imunofenotipagem de células dendríticas: % de positividade de células 102

Figura 18. Imunofenotipagem de células dendrítica: intensidade de inumofluorescência (MFI).....103

Figura 19. Estabilidade de fenótipo imaturo das iDCs IL-10.....108

Figura 20. Exemplo de produção positiva de citocinas por células dendríticas murinas pelo ensaio de CBA.....110

Figura 21. Produção espontânea média de TNF-α, IL-10 e IL-6 pelas diferentes DCs 113

Figura 22. Proliferação alogenéica – MLR 116

Figura 23. Efeito dos diferentes antígenos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas iDCs.....136

Figura 24. Efeito dos diferentes antígenos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas iDCs IL-10 137

Figura 25. Efeito dos diferentes antígenos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas mDCs 138

Figura 26. Efeito do peptídeo N7 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC em DCs imaturas (iDC) , DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e DCs maduras (mDCs) 141

Figura 27. Efeito do peptídeo p277 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC em DCs imaturas (iDC) , DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e DCs maduras (mDCs). 142

Figura 28. Efeito do fragmento C-Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC em DCs imaturas (iDC) , DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e DCs maduras (mDCs) 143

Figura 29. Média da auto-reatividade proliferativa às diferentes DCs 160

Figura 30. Produção de citocinas nas diferentes coculturas autólogas 166

Figura 31. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC07 172

Figura 32. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC21 173

Figura 33. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC22.. 174

Figura 34. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC56. 175

Figura 35. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC57 176

Figura 36. Média da produção de citocinas de coculturas de DCs tratadas com fragmentos da Hsp60 com LT autólogos.....197

Figura 37. Resposta proliferativa ao αCD3 por linfócitos T nas diferentes coculturas de DCs, no contexto autólogo.....202

Figura 38. Resposta proliferativa ao αCD3 por linfócitos T nas diferentes coculturas de DCs, no contexto alogenéico 205

Figura 39. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das iDCs.....208

Figura 40. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das iDCs IL-10.....209

Figura 41. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das mDCs.....209

Figura 42A. Efeito dos fragmentos p277 e C-Hsp60 da proteína da Hsp60 na produção de citocinas nas coculturas com diferentes DCs na presença do estímulo de αCD3 226

Figura 42B. Efeito dos fragmentos p277 e C-Hsp60 da proteína Hsp60 na produção de citocinas nas coculturas com diferentes DCs na presença do estímulo de αCD3 227

Figura 43. Curvas de sobrevida dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Balb/c fêmeas, previamente imunizados com DCs tratadas ou não com diferentes fragmentos da Hsp60.....232

Figura 44. Curvas de sobrevida dos enxertos de pele de camundongos DBA2 em camundongos Balb/c machos, previamente imunizados com anticorpos αDEC205-N3.....234

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Balanço do perfil de citocinas produzidas pelas diferentes DC após o estímulo com fragmentos da Hsp60 149

Quadro 2. Balanço da auto-reatividade de linfócitos T às diferentes DCs: perfil da produção de citocinas e de proliferação celular 163

Quadro 3. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade de linfócitos T dirigida a diferentes DCs: Balanço do perfil de citocinas produzidas e da resposta linfoproliferativa. 181

Quadro 4. Indução e inibição da produção de citocinas em coculturas autólogas de linfócitos T com as diferentes DCs na interação com os fragmentos p277 e C-Hsp60 da proteína Hsp60 200

Quadro 5. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta ao □CD3 pelas coculturas de linfócitos T com as diferentes DCs: Balanço do perfil de citocinas produzidas e da resposta linfoproliferativa 215

Quadro 6. O efeito dos fragmentos da Hsp60 na inibição e indução da produção de citocinas em resposta ao αCD3 por coculturas de linfócitos T com as diferentes DCs.....229

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1A. Seqüências dos peptídeos da Hsp60 58

Tabela 1B. Seqüência e homologia dos peptídeos da Hsp60 humana com a Hsp60 murina 59

Tabela 2. Dosagem dos anticorpos αDEC205-N3 pelo método de BCA. 93

Tabela 3. Marcações realizadas nos ensaios de imunofenotipagem.....100

Tabela 4. Expressão de CD80 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de CD80 em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea 104

Tabela 5. Expressão de CD86 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de CD86 em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea 105

Tabela 6. Expressão de CD40 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de CD40 em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea 106

Tabela 7. Expressão de MHC II em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de MHC II em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea 107

Tabela 8. Estabilidade do imunofenótipo das iDCs IL-10: medianas de intensidade de fluorescência e porcentagem (%) de positividade de moléculas coestimuladoras e MHC II, em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea 109

Tabela 9. Produção espontânea de citocinas por DCs 111

Tabela 10. MLR: resposta proliferativa de linfócitos T alogenéicos às diferentes células dendríticas.....115

Tabela 11. Efeito do peptídeo N7 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.....120

Tabela 12. Efeito do peptídeo p277 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.....123

Tabela 13. Efeito do fragmento C-Hsp60 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs 129

Tabela 14. Freqüência de modificações na expressão de MFI das moléculas coestimuladoras e de MHC I e II, induzidas por fragmentos da Hsp60 nos diversos tipos de DCs 135

Tabela 15. Efeitos dos fragmentos da proteína Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nas iDCs.....139

Tabela 16. Efeitos dos fragmentos da proteína Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nas iDCs IL-10 139

Tabela 17. Efeitos dos fragmentos da proteína Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nas mDCs 140

Tabela 18. Produção citocinas induzidas nas iDCs por fragmentos da Hsp60 .150

Tabela 19. Produção citocinas induzidas nas iDCs IL-10 por fragmentos da Hsp60.....149

Tabela 20. Produção citocinas induzidas nas mDCs por fragmentos da Hsp60 156

Tabela 21. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T autólogos frente às diferentes células dendríticas 159

Tabela 22. Produção de citocinas por diferentes coculturas de linfócitos T autólogos e os diferentes tipos de células dendríticas 164

Tabela 23. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às iDC 168

Tabela 24. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às iDC IL-10 169

Tabela 25. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às mDCs 170

Tabela 26. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos 183

Tabela 27. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) pelas coculturas de iDCs IL-10 com LT autólogos 184

Tabela 28. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos 185

Tabela 29. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IFN-γ (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos 186

Tabela 30. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IFN-γ (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos 187

Tabela 31. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.....188

Tabela 32. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs IL-10 com LT autólogos.....189

Tabela 33. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.....190

Tabela 34. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-6 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.....191

Tabela 35. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-6 (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.....192

Tabela 36. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.....193

Tabela 37. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) pelas coculturas de iDCs IL-10 com LT autólogos.....194

Tabela 38. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.....195

Tabela 39. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-2 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.....196

Tabela 40. Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT com e estímulo policlonal de αCD3 no contexto autólogo 203

Tabela 41. Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3 no contexto alogenéico.....206

Tabela 42. Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de iDCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo 210

Tabela 43. Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de iDCs IL-10 na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo 211

Tabela 44. Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de mDCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo 212

Tabela 45. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) em resposta ao αCD3 nas coculturas de DCs com LT 218

Tabela 46. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IFN-γ (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....219

Tabela 47. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-5 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....220

Tabela 48. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-4 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....221

Tabela 49. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-2 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....222

Tabela 50. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....223

Tabela 51. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-6 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....224

Tabela 52. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.....226

Tabela 53. Sobrevida dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Balb/c fêmeas, previamente imunizados com DCs tratadas e não tratadas com diferentes fragmentos da Hsp60.....231

Tabela 54. Sobrevida dos enxertos de pele de camundongos DBA2 em camundongos Balb/c machos, previamente imunizados com duas doses de anticorpos αDEC205-N3 via intra-peritoenal.....234

RESUMO

VOLSI, E.C.F.R. Células dendríticas e a proteína de choque térmico 60kDa (Hsp60): estratégias para imunorregulação no sistema imune murino [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.281p.

A indução de tolerância ao alotransplante, sem auxílio de drogas imunossupressoras é um dos maiores desafios da Imunologia.

Considerando o potencial tolerogênico das células dendríticas e a atividade imunorreguladora da Hsp60, objetivamos determinar a capacidade das células dendríticas (DCs) na interação com a Hsp60, de induzir imunorregulação, *in vitro*, e tolerância ao aloenxerto de pele, no sistema murino. Para tal, geramos três tipos de DCs derivadas de células da medula óssea de camundongos Balb/c: DCs imaturas (iDCs e iDCs IL-10 – tratadas com IL-10) e DCs maduras (mDCs). As DCs foram caracterizadas quanto à sua: (i) morfologia, (ii) imunofenótipo, (iii) estabilidade do fenótipo imaturo; (iv) produção espontânea de citocinas; (v) resposta linfocitária alogenéica.

Os três tipos de DCs gerados, neste trabalho, (mDCs, iDCs e iDCs IL-10) apresentaram diferenças imunofenotípicas e funcionais em relação à estimulação de uma resposta proliferativa alogenéica. As mDCs tiveram maior expressão de moléculas coestimuladoras e maior indução de proliferação de linfócitos T (LT) alogenéicos. As iDCs IL-10 apresentaram estabilidade do fenótipo imaturo, após desafio com LPS e mostraram baixa capacidade de induzir proliferação de LT alogenéicos. Não observamos um perfil diferencial em relação à produção espontânea de citocinas pelos três tipos de DCs, no tempo analisado. No entanto, TNF-α foi a citocina mais freqüentemente detectada nos 3 tipos de DCs, principalmente nas mDCs, enquanto que a IL-6 foi produzida em maiores quantidades pelas mDCs e a IL-10 pelas iDCs IL-10.

Após a caracterização das diferentes DCs, estas células foram tratadas com os fragmentos da Hsp60, por 24 horas. Avaliamos se esses fragmentos tiveram a capacidade de modificar nas DCs: (i) a expressão de moléculas coestimuladoras; (ii) a produção de citocinas; (iii) a capacidade de induzir e inibir proliferação e citocinas em coculturas autólogas; (iv) a capacidade de inibir proliferação e a produção de citocinas em resposta ao estímulo de αCD3; (v) a capacidade de induzir tolerância ao transplante de pele em camundongos via injeção de DCs tratadas com fragmentos da Hsp60 ou com a injeção do anticorpo αDEC205-N3.

A interação dos fragmentos da Hsp60 com as diferentes DCs induziu modificação na expressão de moléculas coestimuladoras e na produção de citocinas. Alguns peptídeos se destacaram como predominantemente indutores de citocinas imunorreguladoras, (IL-10 e TGF-β; peptídeos p277 e N7), e outros como predominantemente indutores de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IFN-γ e IL-12; peptídeos I8 e I2). Além disso, o peptídeo N7 foi o maior inibidor da expressão de moléculas coestimuladoras, enquanto a proteína C-Hsp60 ora aumentou ora inibiu essa expressão. O peptídeo N7 teve um efeito dominante na inibição da auto-reatividade de LT dirigida às DCs, tanto proliferativa como na produção de citocinas, principalmente inflamatórias. Alguns fragmentos da Hsp60 (C-Hsp60, p277 e principalmente o peptídeo N7) foram capazes de, em alguns experimentos, inibir a proliferação e a produção de citocinas

inflamatórias das coculturas de LT com DCs estimuladas com o anticorpo αCD3.

Apesar da dupla atividade funcional da Hsp60 na interação com as DCs observada, *in vitro*, nesse trabalho, houve um predomínio de imunorregulação. Destacamos que o peptídeo N7 teve o perfil mais imunorregulador. Nossos dados sugerem o envolvimento de múltiplos mecanismos de ação para a atividade imunorreguladora da Hsp60, na interação com as DCs.

Apesar dos nossos protocolos não terem induzido tolerância ao aloenxerto de pele em camundongos, observamos que os animais injetados com as iDCs IL-10 tratadas com p277 ou N7, tiveram uma maior sobrevida do enxerto (16 e 17 dias versus 14 dias). Assim, acreditamos que esses protocolos de indução de tolerância possam ser otimizados para o uso em modelos murinos, visando futuras aplicações na clínica em transplantes e doenças auto-imunes.

Descritores (Células dendríticas, Hsp60, peptídeos, tolerância, imunorregulação, transplante, DEC205).

ABSTRACT

VOLSI, E.C.F.R. Dendritic cells and the 60kDa heat shock protein (Hsp60): strategies for immunoregulation in the mouse immune system [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2008.281p.

The induction of tolerance to allotransplant without the help of immunosupressive drugs is one of the major challenges in immunology. Considering the tolerogenic potential of dendritic cells and the immunoregulatory activity of Hsp60, our objective was to determine the capacity of dendritic cells (DCs) of inducing immunoregulation through the interaction with Hsp60, *in vitro*, and tolerance to the skin allograft, in the murine system. For this, we have generated three types of DCs derived from bone marrow of Balb/c mice: immature DCs (iDCs and IL-10 iDCs – treated with IL-10) and mature DCs (mDCs). The DCs were characterized as to their: (i) morphology, (ii) immunophenotype, (iii) immature phenotype stability; (iv) spontaneous cytokine production; (v) induction of allogeneic LT proliferation.

The three types of DCs generated in this work (mDCs, iDCs and IL-10 iDCs) have presented immunophenotypic and functional differences in relation to the stimulation of allogeneic proliferative response. The mDCs presented the highest expression of coestimulatory molecules and the strongest induction of allogeneic T lymphocyte proliferation. The IL-10 iDCs presented stability of the immature phenotype after LPS challenge and showed low capacity of inducting allogeneic TL proliferation. We did not observe a differential profile in relation to the spontaneous cytokine production by all three types of DCs in the period analyzed. However, TNF-α was the most frequent cytokine detected in the three types of DCs, especially in the mDCs, while IL-6 was mostly produced by mDCs, and IL-10 by IL-10 iDCs.

After the characterization of the different DCs, these cells were treated with the fragments of Hsp60 for 24 hours. We evaluated if these fragments had the capacity of modifying in the DCs: (i) the expression of coestimulatory molecules; (ii) the production of cytokines; (iii) the capacity of inducing and inhibiting proliferation and cytokine in autologous cocultures; (iv) the capacity of inhibiting proliferation and cytokine production in response to αCD3 stimulation; (v) the capacity of inducing tolerance to skin allotransplantation in mice by the injection of DCs treated with fragments of Hsp60 or by the injection of the antibody αDEC205-N3.

The interaction of Hsp60 fragments with the different DCs induced a modification in the expression of coestimulatory molecules and in the production of cytokines. Some peptides stood out as predominately inductors of immunoregulatory cytokines (IL-10 and TGF-β; peptides p277 and N7), and others as predominately inductors of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IFN-γ and IL-12; peptides I8 and I2). In addition, the peptide N7 was the greatest inhibitor of the expression of coestimulatory molecules, while the protein C-Hsp60 at times increased, and at times decreased this expression. The peptide N7 presented a dominant effect in the inhibition of autoreactivity of TLs directed to the DCs, both in proliferative response and in the production of cytokines, especially inflammatory ones. Some fragments of Hsp60 (C-Hsp60, p277 and especially the peptide N7) were capable of inhibiting proliferation and

production of inflammatory cytokines in cocultures of TLs with DCs stimulated with αCD3 antibody.

Despite the dual functional activity of Hsp60 in the interaction with DCs, *in vitro*, in this work we observed a predominance of immunoregulation. We highlight that the peptide N7 presented the most immunoregulatory profile. Our data suggest the involvement of multiple mechanisms of action for the immunoregulatory activity of Hsp60 in the interaction with DCs.

Although our protocols have not induced tolerance to the skin allograft in mice, we have observed that the animals injected with the IL-10 iDCS treated either with p277 or N7 presented increased allograft survival (16 and 17 days versus 14 days). Therefore, we believe that these protocols for tolerance induction can be optimized for the use in murine models, aiming future applications in the clinic in transplants and auto-immune diseases.

Keywords (Dendritic cells, Hsp60, peptides, tolerance, imunoregulation, transplantation, DEC205).

3. INTRODUÇÃO

Introdução à Imunologia

O sistema imune é formado por várias células e moléculas que, conjuntamente, são responsáveis pela imunidade do indivíduo. Estas células são derivadas de células tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês, “Hematopoietic Stem Cell”) presentes na medula óssea que, após amadurecerem e se diferenciarem em vários precursores intermediários, originam os progenitores linfóides e mielóides (Blom & Spits, 2006). Estes progenitores são os precursores de todos os tipos celulares que constituem o sistema imune: **(i)** progenitores mielóides: macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos, **(ii)** progenitores linfóides: linfócitos T (LT), células dendríticas plasmocitóides (pDCs), linfócitos B (LB) e células “natural killer” (NK) (Delves & Roitt, 2000a 2000b).

A interação entre estes componentes e antígenos “próprios” ou “não próprios” dá origem à chamada resposta imune. Essa resposta pode ser inflamatória ou reguladora dependendo da natureza das células, citocinas, moléculas envolvidas e do contexto em que todas estão inseridas.

A resposta imune pode ser classificada em dois tipos principais, chamadas inata e adaptativa. Apesar de distintas quanto aos componentes e às formas de atuação, apresentam múltiplas interfaces, de modo que o organismo geralmente responde destas duas maneiras (Delves & Roitt, 2000a 2000b).

A resposta imune inata pode ser desencadeada tanto por antígenos ditos “próprios” como por “não próprios”. Participam desta resposta vários tipos

celulares (macrófagos, monócitos, mastócitos, basófilos, eosinófilos, NKs, DCs e neutrófilos) e também moléculas como, proteínas do complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda. É caracterizada pela inespecificidade antigênica em suas ações, por não gerar memória e pelo reconhecimento de padrões moleculares comuns entre os patógenos (PAMPs, do inglês, “Pathogen associated molecular patterns”) (Delves & Roitt, 2000a 2000b). Este reconhecimento é característico de reposta inata e ocorre via receptores de reconhecimento padrão (do inglês, “Pattern-Recognition Receptors” - PRR - Receptores de Reconhecimento Padrão), como os “Toll-like receptors” –TLR (Medzhitov, 2001) e os “C-type lectin receptors” (CLR) (revisado Moser, 2003; Geijtenbeek *et al,* 2004). Os TLRs estão presentes em DCs, macrófagos e linfócitos (Berche, 2003). Cada subtipo de TLR reconhece diferentes padrões moleculares, sendo várias dessas moléculas consideradas “sinalizadoras de perigo” “danger signals”, termo utilizado por Polly Matzinger em 1994 (Matzinger, 1994). Os principais alvos de reconhecimento dos Toll-like receptores são: (i) TLR9: motivos CpG do DNA bacteriano (Krieg, 2002); (ii) TLR3: RNAs fita dupla (Nishiya *et al*, 2005); (iii) TLR5: a flagelina bacteriana (Takeda & Akira, 2005); (iv) TLR2: HSPs (proteínas de choque térmico, do inglês: “Heat Shock Proteins”), peptideoglicanos e os lipopolissacarídeos de parede bacteriana - LPS; (v) TLR4: tecidos necróticos, LPS bacteriano e HSPs (Gaston, 2002; Zanin-Zhorov *et al,* 2003). Dentre esses receptores, o TLR4 e o TLR2 estão diretamente relacionados ao nosso trabalho por estarem envolvidos no reconhecimento de LPS e HSP, sendo um dos principais ativadores e agentes maturadores de DCs (Cavanagh & Von, 20002; Lutz & Schuler, 2002).

A resposta imune adaptativa é realizada por células com receptores diferentes dos que compõem a resposta imune inata: receptores de células B (BCR, do inglês, “B cell receptor”); receptores de linfócitos T (TCR, do inglês, “T cell receptor”); DCs e NKT (Delves & Roitt, 2000a 2000b). Ao contrário da inata, a resposta adaptativa ocorre por interações conformacionais entre antígenos variáveis e receptores com enorme diversidade molecular presentes na superfície destas células, podendo resultar na indução de linfócitos de memória, característica esta exclusiva da imunidade adaptativa. Estes linfócitos de memória são capazes de promover uma resposta mais rápida e eficiente em um segundo encontro com o mesmo antígeno (Delves & Roitt, 2000a 2000b).

A grande diversidade de reconhecimento antigênico se deve a rearranjos somáticos aleatórios nos segmentos gênicos - V, D e J: cadeia β e pesada e V e J: cadeiaα e leve - da linhagem germinal dos receptores de LT e B, respectivamente. Esses rearranjos ocorrem na medula (LB) e no timo (LT) e possibilitam uma vasta gama de reconhecimento de peptídeos antigênicos. Existem ainda outros mecanismos que aumentam mais essa diversidade, como as recombinações entre as cadeias α e β, as hipermutações somáticas (só BCR) e as mutações na região juncional (Roitt & Male, 2000). Todos esses mecanismos colaboram para a formação de um repertório de aproximadamente 10^{15} receptores distintos (Delves & Roitt, 2000a 2000b), proporcionando assim, um grande potencial de reconhecimento antigênico.

No entanto, o reconhecimento pelo TCR é poliespecífico, já que um mesmo receptor pode reconhecer antígenos diferentes, e o mesmo antígeno pode ser

reconhecido por clones diferentes (Robey *et al*, 2002). Deste modo, a alta especificidade deste receptor vem sendo repensada há alguns anos, devido ao TCR ser capaz de apresentar reconhecimento imune cruzado e deste reconhecimento ser uma característica fisiológica do sistema (Mason, 1998; revisado Cohn, 2005). Acredita-se que esse reconhecimento múltiplo e cruzado aumente as chances de um dado peptídeo ser reconhecido pelos linfócitos de um indivíduo, a despeito das diversas mutações que ele possa sofrer ou das constantes modificações do sistema imune, em função das interações com meio ambiente.

Os linfócitos T recém saídos do timo são divididos classicamente em dois tipos, de acordo com a expressão de duas moléculas de superfície: CD4 e CD8. Os linfócitos T $CD4^+$ efetores desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra patógenos intra e extra-celulares, reconhecendo principalmente antígenos de origem exógena (Abbas *et al*, 1996). Já os linfócitos T $CD8^+$ efetores, auxiliados pelos T $CD4^+$, são essenciais na defesa do hospedeiro contra os agentes patogênicos intracelulares, como por exemplo, os vírus. Estes linfócitos podem matar células que hospedem tais agentes, reconhecendo os peptídeos apresentados na superfície destas células. As células T $CD8^+$ citotóxicas lisam as células alvo através da liberação de dois tipos de substâncias: as granzimas, enzimas responsáveis pela ativação de uma cascata enzimática nas células alvo que induz apoptose e as perforinas que formam poros na membrana citoplasmática das células alvo (Abbas *et al*, 1996).

Tanto os LT CD8+ como os LT CD4+ podem ser subdivididos em quatro populações funcionalmente distintas, de acordo com o perfil de citocinas

produzidas: T1, T2 (revisado Mosmann & Sad, 1996; Woodland & Dutton, 2003), T reguladoras (Sakaguchi *et al,* 1995) e, mais recentemente, em uma nova população chamada: Th17 (Harrington et al, 2005).

Os linfócitos do tipo T1 são tipicamente produtores de citocinas consideradas mais inflamatórias (IFN-γ, IL-2, TNF-β e TNF-α) que são sinalizadas intracelularmente via fatores de transcrição como: STAT-1, STAT-4 e T-bet (Szabo *et al*, 2000). Estes linfócitos induzem um padrão de resposta predominantemente celular, porém podem também induzir a produção de anticorpos como o isotipo IgG2a, em camundongos (Lavigne *et al*, 2004).

Os linfócitos do tipo T2, na maioria dos contextos, produzem citocinas que apresentam principalmente atividade anti-inflamatória (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), ou ao menos, antagônica à resposta do tipo T1. Esta produção de citocinas é sinalizada via fatores de transcrição tais como: STAT-6, GATA-3 e c-Maf, que controlam a produção de IL-4 (Agnello & Lankford, 2003). Por fim, são ainda importantes indutores da síntese de anticorpos como IgE e IgA, promovendo mudança de classe de imunoglobulinas (Abbas & Sher, 1996).

Com relação aos linfócitos T reguladores, na crescente literatura apontam-se diversas células com atividade reguladora (Sakaguchi *et al,* 1995; revisado Wood & Sakaguchi, 2003), dentre essas podemos destacar: **(i)** LT γ/δ (Delves & Roitt, 2000a 2000b); **(ii)** células $CD8^+$ (Gilliet & Liu, 2002); **(iii)** $CD8^+$ $CD28^-$ (Ciubotariu *et al*, 1998); **(iv)** $CD8^+CD25^+$ (Cosmi *et al,* 2003), **(v)** células NKT (Sonoda *et al,*2001); **(vi)** $CD4^+$ (Taylor & Namba, 2001); **(vii)** $CD4^+CD25^+$ (Sakaguchi *et al,* 1995), **(viii)** Tr1 (Roncarolo & Bancchetta, 2001); **(ix)** Th3

(Jonuleit & Schmitt, 2003). Dentre essas células, as mais estudadas têm sido as T $CD4^+$ que expressam o receptor α da cadeia de IL-2 ($CD4^+CD25^+$) e que adquirem esse fenótipo ainda no timo, sendo chamadas de Tregs naturais (Sakaguchi, 2005). Estas células representam cerca de 5-10% das células T $CD4^+$ periféricas em camundongos sadios (revisado Sakaguchi, 2004) e são capazes de suprimir a atividade de uma variedade de células, tanto da imunidade inata como da adaptativa (Cederbom *et al,* 2000; Maloy *et al,* 2003). Os mecanismos de supressão utilizados por estas células podem requerer contato célula-célula ou podem ser mediados por fatores solúveis, como a IL-10 e o TGF-β (Fehérvari & Sakaguchi, 2004). No entanto, ainda não foi identificado um marcador específico para essas células e, por isso, usam-se diversos marcadores inespecíficos como: CTLA-4, GITR, Foxp3, CD40, IL-2 (algumas vezes) e TGF-β de membrana para caracterizá-las (Fontenot *et al,* 2003; Wood & Sakaguchi, 2003; Puccetti & Grohmann, 2007). Dentre esses marcadores, o Foxp3 (do inglês, *"Forkhead box protein P3"*) vem sendo o mais utilizado já que em experimentos realizados por diversos grupos foi mostrado que ele: **(i)** é predominantemente expresso por células CD4+CD25+; **(ii)** células que expressam Foxp3 podem inibir respostas linfoproliferativas; **(iii)** é capaz de inibir a produção de IL-2 e de aumentar a expressão de IL-10; **(iv)** parece ser essencial para a atividade funcional das Tregs naturais (Suri-Payer *et al,*1998; Fontenot *et al,* 2003; Hori *et al,*2003; Khattri *et al,* 2003). Além disso, outro fator que parece ser muito importante para as Tregs é a enzima de degradação do triptofano IDO (do inglês, *"indoleamine 2,3-dioxigenase"*) produzida por células dendríticas, em especial DCs plasmocitóides.

Esta enzima é descrita na literatura como de fundamental importância para a imunossupressão e tolerância nos contextos materno-fetal e de transplante (Yu & Gaffen, 2008; Terness *et al,* 2007)**.** Atualmente, novas atividades foram descritas para essa enzima, dentre elas a ativação de células LT CD4+CD25+Foxp3+ "resting", potencializando a atividade tolerogênica destas células (Sharma *et al, 2007*), bem como a indução de diferenciação de LT CD4+ em Tregs naturais específicas, em modelo murino de artrite induzida por colágeno (Wang *et al*, 2008, Park *et al,* 2008).

Já a recém caracterizada população linfocitária denominada de Th17 (Harrington *et al,* 2005), apresenta uma forte associação com o desenvolvimento de doenças auto-imunes, como a colite e artrite reumatóide em modelos experimentais (Velhoen *et al*, 2006). No entanto, os mecanismos que controlam esse processo ainda não estão completamente esclarecidos (Harrington *et al,* 2005). As células Th17 produzem a citocina IL-17, e esta por sua vez: **(i)** promove a expansão e recrutamento de células da imunidade inata, como neutrófilos; **(ii)** assim com os TLR, IL-1β e TNF-α, promove o aumento da resposta inflamatória; **(iii)** estimula a produção de beta-defensinas e outros peptídeos anti-microbianos (Yu & Graffen, 2008). Em experimentos realizados por Harrington e colaboradores (2005), foi mostrado que os precursores das células TH17 pareciam ser inibidos pelas citocinas IFN-γ e IL-4 e estes, não seriam precursores compartilhados com as células T1 e T2 (Harrington *et al,* 2005). Além disso, outros pesquisadores têm mostrado que as citocinas IL-6, o TGF-β e possivelmente a IL-21, também são essenciais ao desenvolvimento das células Th17 (Korn *et al*, 2007).

Recentemente, Mucida e colaboradores mostraram que as células Th17 não são inibidas por citocinas do tipo T1 e T2, mas sim por ácido retinóico (Mucida *et al*, 2007).

Peptídeos próprios e não próprios são apresentados a todos esses linfócitos através de moléculas denominadas MHC (do inglês, “Major Histocompatibility Complex”, Complexo Principal de Histocompatibilidade). O MHC é uma grande região cromossômica altamente polimórfica e poligênica que codifica moléculas denominadas de classe I, II e III, assim como outras proteínas. Pode-se dizer que a principal função destas moléculas é a apresentação de peptídeos antigênicos ligados às suas moléculas de classe I ou II, aos LT. Os LT CD4+ reconhecem, preferencialmente, peptídeos antigênicos apresentados pelas moléculas de MHC II, enquanto que os LT CD8+ reconhecem preferencialmente peptídeos apresentados por MHC I (Abbas *et al*, 1996; Delves & Roitt, 2000a 2000b).

O reconhecimento do peptídeo associado a moléculas MHC na superfície das células apresentadoras de antígenos profissionais (do inglês, “Antigen Apresenting Cells”- APCs) se dá através do TCR. As APCs profissionais são assim denominadas por: **(i)** apresentarem moléculas de MHC II, constitutivamente, na membrana celular; **(ii)** expressarem moléculas co-estimuladoras na sua superfície; **(iii)** por serem eficientes no processamento e apresentação de antígenos. Estas compreendem: DCs, macrófagos e linfócitos B (Mellman *et al,* 1998; revisado Trombetta & Mellman, 2005). Este reconhecimento dos peptídeos+MHC pelo TCR promove uma ativação destes linfócitos com a fosforilação das tirosinas na cadeia citoplasmática da molécula CD3 e levam à

transdução de sinais que culminam na ativação de diversos genes, como por exemplo, o gene da IL-2 (Abbas *et al*, 1996). Esse reconhecimento inicial gera um sinal que só é suficiente para ativar completamente os linfócitos de memória, pois a expansão clonal de LT não experientes (do inglês, *"naive")* requer também outro sinal. Este segundo sinal é emitido pelas APCs e se dá através da internação de moléculas co-estimuladoras com as moléculas ligantes correlacionadas nos LT, como: (i) CD80 e CD86– CD28; (ii) CD2– CD58; (iii) CD40L - CD40; (iv) ICAM - LFA-1. A emissão deste segundo sinal desencadeia a sinapse imunológica (Steinman & Banchereau, 1998; Mahnke e*t al*, 2002). O termo sinapse imunológica foi cunhado para denominar a região de contato entre os LT e as APCs. No entanto, a descoberta de que em certos casos, ocorria uma migração específica de receptores celulares para esse ponto de contato, fez com que cientistas denominassem esse fenômeno como sinapse madura (revisado Cermeski & Shaw, 2006). Atualmente, sabe-se que a sinapse imunológica é um processo muito mais complexo do que o simples contato entre LT e APC e que varia de acordo com o tipo de APC envolvida no contato, modificando assim, o padrão de migração de receptores e a distribuição destes na superfície celular dos LT e das APCs (revisado Cermeski & Shaw, 2006).

Os linfócitos, uma vez ativados, desencadeiam uma resposta dirigida ao antígeno que o ativou, entretanto, essa resposta é reduzida conforme ocorre a diminuição da concentração do antígeno. Existem muitos mecanismos fisiológicos envolvidos no controle de tal resposta, como por exemplo, a expressão de CTLA-4 (Antígeno 4 do linfócito T citotóxico, do inglês, "Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4") em LT, receptor de alta afinidade que compete com a molécula CD28 pela

ligação com CD80/CD86 presentes nas APCs, inibindo assim a transcrição de IL-2 e a apoptose do LT (Sharpe & Freeman, 2002).

Na ausência deste sinal co-estimulador, o LT se torna anérgico, ou seja, modifica sua atividade funcional de modo a não ser mais capaz de proliferar nem de produzir IL-2 (Janeway & Walport, 2000; Mahnke e*t al*, 2002). No entanto, existem outros mecanismos que podem tornar uma célula T efetora inativa, ou seja, incapaz de exercer uma resposta imune efetora após reconhecimento de peptídeos apresentados pelas APCs. Esses mecanismos de inativação de LT são importantes para a manutenção da tolerância imunológica, pois além de inativarem LT efetores, podem eliminar linfócitos auto-reativos pró-inflamatórios.

Tolerância Imunológica

A tolerância imunológica foi descrita pela primeira vez em 1945 por Owen (Owen, 1945). Em um estudo com bezerros dizigóticos com circulação compartilhada, Owen observou que apesar dos animais apresentarem quimerismo sangüíneo, não produziam anticorpos contra o outro, o que sugeriu a existência de tolerância entre as células desses bezerros (Owen, 1945; Silverstein, 1989). Em 1953, Medawar e Billingham (Billinghan *et al,* 1953) inocularam células alogenéicas em fetos de camundongos e perceberam que estes, quando adultos, não rejeitavam o enxerto oriundo do mesmo doador das células inoculadas (Billinghan *et al,* 1953; Billinghan & Medawar, 1953; revisado Brent, 2003).

O processo de tolerância é subdividido, para fins didáticos, em duas formas principais: tolerância central e tolerância periférica. A tolerância central ocorre no timo e a periférica nos órgãos linfóides secundários (linfonodos, baço, tecidos linfóides associados às mucosas e ao sistema imune cutâneo), atuando por meio de diversos mecanismos.

A tolerância central ocorre basicamente da seguinte forma: precursores linfóides formados na medula óssea migram em direção ao timo por quimiotaxia, onde passam a receber o nome de timócitos. Esses timócitos são chamados duplamente negativos (DN), pois não apresentam nem receptores CD4 nem CD8, nem tampouco, CD3, CD44, CD25 (Hare *et al*, 2000; Anderson *et al,* 2007). Esses linfócitos sofrem, então, maturação e se diferenciam na medula tímica, passando a expressar diversas moléculas e se tornando duplamente positivos (DP) $CD4^{+}CD8^{+}$. Um grande número de linfócitos DP passa por um processo conhecido por Seleção Negativa, no qual os LT DP que são incapazes de reconhecer o complexo MHC+peptídeo-próprio no epitélio tímico ou os que o reconhecem com alta avidez, sofrem apoptose (Anderson *et al,* 2007). Já os linfócitos DP capazes de reconhecer o complexo MHC+peptídeo com avidez intermediária, são selecionados positivamente, migram e povoam os órgãos linfóides periféricos, expressando CD4 ou CD8, de acordo com reconhecimento preferencial de peptídeos no contexto de moléculas MHC II ou em MHC I, respectivamente (Anderson *et al,* 2007).

Na literatura, há relatos de que alguns fatores podem influenciar o processo de seleção negativa. Em um trabalho envolvendo tolerância a antígenos H-Y, sugere-se que a deleção clonal se daria antes do estágio DP, enquanto que

experimentos envolvendo tolerância a superantígenos ocorreriam no estágio de transição entre os estágios DN e o DP (Kishimoto & Sprent, 2000). Deste modo, acredita-se que a natureza do antígeno, onde e como eles são apresentados determinam em que estágio os LT que reconhecem esses antígenos serão eliminados.

Apesar do processo de deleção de timócitos ser muito intenso no timo, vários grupos na literatura mostram que o processo de tolerância central não elimina totalmente os linfócitos auto-reativos, já que clones auto-reativos são comumente encontrados na periferia do organismo de indivíduos sadios (Cohen, 1992; Cohen, 2002; Mathis & Benoist, 2004; Parish & Heath, 2007). Para explicar esse achado, foram formuladas quatro hipóteses não excludentes. A primeira propõe-se que esses linfócitos auto-reativos sejam mantidos "sob controle" por outros mecanismos de tolerância, como a tolerância periférica, que "complementaria" a tolerância central (Steinman & Banchereau, 1998; Mahnke *et al,* 2002). Na segunda, diz-se que o escape de LT auto-reativos poderia ocorrer quando a apresentação do peptídeo pelo complexo MHC é muito baixa, através de um processo denominado "tuning" (Anderton & Wraith, 2002). A terceira estaria relacionada com a concentração dos auto-antígenos na periferia (Parish & Heath, 2007). E na quarta, preconiza-se que essa auto-reatividade em indivíduos sadios estaria relacionada à auto-reatividade fisiológica (Cohen, 2000a e b).

Em experimentos realizados pelo nosso grupo (Granja *et al,* 2000) corroboramos dados da literatura (Munk *et al,* 1989; Abulafia-Lapid *et al,* 1999; Ramage *et al,* 1999), confirmando a presença de células T auto-reativas no sistema imune de indivíduos sadios. Essas observações nos levam a pensar que

tais linfócitos sejam controlados por mecanismos reguladores na periferia. Dentre esses mecanismos podemos citar: **(i)** inibição da co-estimulação pela ligação do CTLA-4:CD28 (revisado Greenwald *et al*, 2005); **(ii)** a expressão de ICOS (do inglês, "inducible costimulator") e PD1 (do inglês, "Programmed Death 1") nos linfócitos e Tregs, bem como a sua interação com ICOSL e PDL1 nas APCs, promovendo sinais negativos que inibiriam ou atenuariam as respostas de LT (revisado Greenwald *et al*, 2005); **(iii)** sinalização via Fas e FasL que induz a morte do LT por apoptose (Sharpe & Freeman, 2002); **(iv)** ação de citocinas anti-inflamatórias, como o TGF-β e a IL-10; **(v)** produção tardia de IL-2, auxiliando na indução de apoptose de células T; **(vi)** expressão do BTLA (do inglês, "B and T Lymphocyte attenuator"), análogo do CD28, regulando negativamente as respostas de LT e LB **(Watanabe *et al,* 2002)**; **(vii)** indução de anergia e supressão (Kamradt & Mitchison, 2001); **(viii)** indução de células reguladoras (revisado Groth, 2001; revisado Moser, 2003).

Mais recentemente, a descoberta do fator de transcrição AIRE (regulador de auto-imunidade; do inglês "autoimmune regulator"), adicionou um novo capítulo à compreensão tanto do processo de tolerância central, como da tolerância periférica. A atuação desse fator transcricional nas células epiteliais medulares do timo (MECs, do inglês "medullary epithelial cells") induz a transcrição de um grande número de genes codificadores de proteínas tecido-específicas, ou seja, proteínas que até então acreditava-se serem expressas somente em determinados tecidos (Kuribayashi, 2006). Deste modo, um maior repertório de

antígenos próprios seria apresentado e, consequentemente, um número maior de LT auto-reativos seria deletado (Anderson *et al*, 2005).

Por fim, podemos dizer que a regulação da auto-reatividade, ou da auto-imunidade fisiológica (segundo Cohen), é um processo muito complexo e que ocorre em vários níveis distintos, com a participação de diversas células e moléculas, do sistema imune. No entanto, a auto-imunidade fisiológica envolve mais elementos do que a seleção, deleção e anergia de LT auto-reativos.

Auto-imunidade Fisiológica

Desde o final do século passado, o antigo paradigma da imunologia que girava em torno da seleção clonal (Burnet, 1959) e do *Horror autotóxicus* (Ehrlich, 1901) vem sendo discutido e aos poucos substituído. A teoria do *Horror autotóxicus* propunha, dentre outras coisas, que as respostas imunes de um organismo fossem exclusivamente direcionadas para substâncias “externas” e que a manutenção de um estado de não agressão ao próprio organismo se daria pelo equilíbrio entre a produção de auto-anticorpos e a sua neutralização (Ehrlich, 1901; Silverstein, 1989; revisado por Steinman & Nussenzweig, 2002). Na década de 50, a teoria da seleção clonal elaborada por Burnet, tendo como base o *Horror autotóxicus*, foi proposto que os linfócitos auto-reativos seriam totalmente eliminados no timo por meio da seleção negativa, evitando assim doenças auto-imunes (revisado Cohn *et al*, 2007).

Atualmente, é conhecimento bem consolidado entre os imunologistas que LT auto-reativos escapam do processo de seleção negativa e podem ser encontrados em órgãos periféricos de indivíduos sadios. Assim, pesquisadores

como Antonio Coutinho e Irun Cohen propuseram formas diferentes de compreender a manutenção da homeostase, o papel das células auto-reativas no organismo e até mesmo, a presença e o papel das células reguladoras (Cohen, 2000a e b; Coutinho *et al,* 2001). Todas estas novas hipóteses estão fundamentadas em estudos de muitos pesquisadores no mundo, em nosso laboratório (Granja *et al,* 2000; Luna *et al,* 2007).

Para esses autores, a auto-reatividade pode também ter um papel fisiológico, contribuindo para a manutenção da homeostase do organismo (Cohen, 2000a e b; Coutinho *et al,* 2001). Seguindo essa linha de raciocínio, Cohen propôs a Teoria do Homúnculo Imunológico, que tem sido utilizada como hipótese de trabalho pelo nosso grupo, inclusive servindo como base conceitual para o desenvolvimento desta tese.

Na teoria do homúnculo imunológico é preconizado que o sistema imune de um indivíduo reconheça além de antígenos não próprios, seus auto-antígenos como uma imagem interna de si mesmo, propriedade esta importante para a manutenção da homeostase (Cohen & Young, 1991; Cohen 1992; Cohen, 2000a e b). A homeostase seria mantida por processos importantes responsáveis pela cicatrização de feridas, reparo de tecidos lesados, regeneração celular e pela eliminação de células e moléculas anormais. Esses processos apresentariam dois níveis (celular e molecular) e seriam iniciados por células e moléculas imunes: citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas e anticorpos (Cohen & Young, 1991; Cohen 1992; Cohen, 2000a e b).

A hipótese de que a auto-imunidade também contribui para a manutenção o equilíbrio do organismo, vem sendo sustentada por vários dados da literatura.

Como exemplo, podemos citar um trabalho no qual Cohen e colaboradores, mostraram que células T auto-reativas direcionadas a antígenos da mielina básica, podem proteger o cérebro contra a degeneração secundária causada na doença EAE (do inglês, “Experimental Autoimmune Encephalomyelitis”- Encefalomielite Auto-imune Experimental) (Cohen, 2000a). Assim, as células T efetoras auto-reativas que podem atacar o próprio organismo, podem também protegê-lo, dependendo do seu microambiente, da intensidade e momento da inflamação e, provavelmente, de outros fatores ainda não conhecidos. Desta forma, a auto-imunidade fisiológica poderia ser considerada benéfica, auxiliando no processo de manutenção da homeostase (Cohen, 2000a e b).

Hoje é conhecido que todos os indivíduos sadios apresentam populações naturais de células auto-reativas e de auto-anticorpos, porém uma alteração nos auto-antígenos ou na maneira como estes são apresentados, poderia resultar em um “sinal de perigo” (Matzinger, 1994) que alertaria o organismo e poderia resultar em uma resposta imune inflamatória e em auto-agressividade tecidual (Cohen, 2000a e b). Porém, segundo esta teoria, para que ocorra a manutenção da homeostase, não é tão fundamental a ausência total de respostas inflamatórias, mas sim a resposta inflamatória na intensidade, no tipo e na situação adequados (Cohen, 2000a e b).

Contrariamente ao que Brunet e Ehrlich acreditaram, Cohen acredita que o papel do sistema imune é analisar qual é o tipo mais apropriado de resposta, inflamatória ou anti-inflamatória, para cada situação e não distinguir entre o que deve ser destruído e o que não deve (próprio/ não próprio) (Cohen, 2000b).

Ainda dentro desta hipótese, Cohen propõe a existência de três tipos distintos de antígenos homunculares (moléculas tecido-específicas, moléculas da resposta imune e moléculas de manutenção) e que seria principalmente contra estes, que o repertório de células T direcionaria sua atividade, dentro do contexto de auto-imunidade fisiológica (Cohen, 2000a e b). A contextualização desses antígenos teria um papel crucial no desfecho da resposta imune. Deste modo, grupos como o nosso que trabalham com a teoria do homúnculo imunológico, com base conceitual, acreditam que LT auto-reativos, naturalmente ativados, possam ser também mediadores de respostas protetoras contra auto-imunidade patológica, e ainda, que possam regular negativamente reações inflamatórias, diminuindo danos imunopatológicos decorrentes de respostas imunes efetoras.

Dentre esses três tipos de antígenos homunculares, as HSPs (do inglês, *"Heat Shock Protein"),* denominadas por Cohen de moléculas de manutenção, vêm sendo amplamente estudadas (Cohen, 2000b). Nosso grupo, ao longo dos anos, estuda a participação da Hsp60 no contexto de tolerância ao transplante, seja experimental ou humano, com ou sem a participação de células dendríticas. Nesta tese, avaliamos a capacidade das células dendríticas cultivadas com fragmentos da proteína Hsp60 de direcionarem a resposta imune para um contexto imunorregulador e tolerogênico.

Proteínas de Choque Térmico - HSPs

Os genes que codificam as proteínas de choque térmico foram descobertos em 1962 por Ferrucio Ritosa e seus colaboradores (Ritosa, 1962). No entanto, somente em 1974, os produtos dos genes foram identificados e o termo proteínas

de choque térmico foi cunhado (revisado Pockley, 2003). Estas proteínas receberam esta denominação por terem sido, inicialmente, descobertas em células sob condição de estresse e por apresentarem uma resposta universal a este. O aumento da concentração de HSPs é resultado não só do aumento de temperatura, mas também de estresse oxidativo e de deficiências nutricionais (Pockley, 2001).

As HSPs são proteínas solúveis, expressas constitutivamente em todos os organismos (procariotos e eucariotos), representando cerca de 1% a 5% do total de proteínas intracelulares (Csermely, 2001; Srivastava *et al,* 2002; Pockey, 2003). Elas pertencem a famílias protéicas altamente conservadas evolutivamente e são classificadas de acordo com seu peso molecular: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp65, Hsp60, Hsp47, Hsp40 e um grupo complexo com peso entre 30 a 15 kDa, chamadas Hsps de baixo peso molecular (Jolly & Morimoto, 2000; Srivastava, 2002a e b).

Várias funções foram descritas para essas proteínas, sendo elas: (i) citoproteção; (ii) chaperonas; (iii) montagem protéica intracelular; (iv) direcionamento de antígenos tumorais a APCs; (v) indução de apoptose via caspases ou via independente de caspase, por ligação a fatores apoptóticos ou diretamente nos lisossomos (Lanneau *et al,* 2008); (vi) auxiliar na manutenção da homeostase do organismo. No entanto, novas funções vêm sendo atribuídas às HSPs. Calderwood e colaboradores (2007) mostraram que as HSPs após serem liberadas do conteúdo intracitoplasmático, por necrose ou apoptose, podem se ligar a células intactas, seja via Toll, CD40, CD91 e iniciar cascatas de sinalização bem como transportar consigo peptídeos antigênicos. Além disso, as Hsp60 e

Hsp70 são capazes de entrar na corrente sangüínea e, assim, de exercerem seus efeitos em sítios distantes do seu local de liberação (Calderwood *et al*, 2007).

Essas proteínas são normalmente expressas em condições fisiológicas, porém têm sua expressão aumentada em situações de estresse (Cohen, 2000a e b; Cohen, 2002; Gaston 2002). Até o presente momento, estas proteínas só parecem ser expressas na superfície celular de células tumorais (Udono & Srivastava, 1994; Jolly & Morimoto, 2000), porém, parecem exercer funções distintas quando estão expressas intra ou extracelularmente nessas células (Sherman & Multhoff, 2007).

Uma importante função das HSPs parece ser atuar como chaperonas intracelularmente (Lindquist & Craig, 1988; Georgopoulos & Welch, 1993), agindo para tal de duas maneiras distintas: trabalhando passivamente, prevenindo a agregação de proteínas mal formadas, ou gastando ATP para montar, dobrar, estabilizar e maturar corretamente as proteínas alvo (Bukau & Horwich, 1998). As proteínas alvo das Hsps podem ser de diversas categorias e executar funções diversas como: **(i)** transdução de sinal; **(ii)** controle do ciclo celular; **(iii)** regulação transcricional; **(iv)** sobrevivência celular; **(v)** crescimento e diferenciação celular; **(vi)** apoptose (Sreedhar *et al*, 2004; Sun & Liao, 2004). Além disso, as Hsps também têm um papel na resposta imune quando são liberadas complexadas com peptídeos antigênicos, seja de modo covalente (sítios hidrofóbicos presentes em polipetídeos) ou não (associados a domínios de ligação a substratos), pois se mostraram capazes de induzir respostas citotóxicas em LT *in vivo* (Ciupitu *et al,* 1998; Binder & Srivastava, 2005; Enomoto *et al,* 2006).

Essas proteínas participam tanto da resposta adaptativa; sendo apresentadas por moléculas MHC e levando à ativação de LT $CD4^+$ e $CD8^+$ quanto da inata (Blanchere *et al,* 1997; Roman & Moreno, 1997). Dentro do âmbito da imunidade inata, algumas HSPs são capazes de se ligar a TLR4 e TLR2 (apresentação de LPS), CD91 e CD14 (Gaston, 2002) e CD40 (Calderwood *et al*, 2007). Zanin-Zhorov e colaboradores (2003) mostraram que TLR2 e não TLR4 é importante para aumentar a adesão celular de células T na presença de uma alta concentração de Hsp60 (Zanin-Zhorov *et al,* 2003).

Atualmente na literatura, podemos encontrar duas visões distintas no que diz respeito à participação das Hsps nas respostas imunes. Alguns pesquisadores acreditam que as HSPS induzem respostas inflamatórias, outros que induzem respostas anti-inflamatórias e outros ambas, como no caso do nosso grupo (Pockley, 2003).

Na primeira corrente, encontramos autores como Chen, McMullan e Osterloh e colaboradores, que acreditam que as HSPs promovam respostas imunes inflamatórias. Nos trabalhos realizados por Chen e colaboradores, observou-se que a ligação da Hsp60 a TLRs transmitiu às células um sinal de perigo que induziu LT a produz citocinas inflamatórias (Chen *et al*, 1999). Mitsiades e colaboradores mostraram que a inibição da proteína Hsp90 aumentou a atividade anti-mieloma (Mitsiades *et al*, 2006). Esta mesma observação foi feita por outros grupos que, então, começaram a usar a Hsp90 ou Hsp70 como alvo principal para vacinas anti-câncer (Richardson *et al*, 2005; Enomoto *et al*, 2006; Zaarur *et al*, 2006). Além disso, Oslerloh e colaboradores, através de experimentos realizados com a Hsp60 (endotoxina: <2U/mg), postularam que a

Hsp60 seria um sinal de perigo endógeno, responsável por apresentar ao sistema imune danos teciduais. Para eles, a Hsp60 modularia o sistema imune: (i) aumentando a ativação de LT antígeno específico através da produção de IFN-α por APCs; (ii) aumentando a sinalização via TLR4 nas APCs aumentando assim, a ativação de LT, por carrear LPS (Osterloh *et al,*2007).

No entanto, também podemos encontrar na literatura atual, diversos pesquisadores que trabalham com a segunda corrente. Dentre eles, encontramos o grupo do Irun Cohen, que possui diversos trabalhos nos quais é mostrado o potencial regulador da Hsp60 e seus peptídeos, tanto em modelos murinos como em humanos (Huurman *et al,* 2008). Em experimentos realizados com camundongos NOD, Cohen e colaboradores mostraram que a administração de Hsp60 modifica o padrão de citocinas de T1 para T2, prevenindo assim o aparecimento de diabetes auto-imune (Cohen, 1997). Em um outro estudo realizado em ratos Lewis foi mostrado que vacinações com Hsp60 inibiram o aparecimento de uma doença auto-imune conhecida como AA (do inglês, “Adjuvant Arthritis” - Artrite Adjuvante), aumentando também a proliferação de células T e a produção de TGF-β - citocina predominantemente anti-inflamatória - e diminuindo a produção de IFN-γ - citocina predominantemente inflamatória (Quintana *et al*, 2002). Zanin-Zhorov e colaboradores mostraram que o tratamento com Hsp60 humana livre de endotoxina, in vitro, regulou negativamente T-bet, NF-kappaB, and NFATp e aumentou a expressão de GATA-3, levando a uma redução na produção de IFN-γ e TNF-α e ao aumento de IL-10 por LT humanos ativados (Zanin-Zhorov *et al*, 2005).

No contexto do transplante, podemos encontrar na literatura tanto trabalhos em que houve aumento de sobrevida do enxerto, como trabalhos aonde isso não ocorre. Num estudo realizado por Birk e colaboradores (1999) mostrou-se que camundongos transgênicos que apresentavam alta expressão de Hsp60 apresentaram um retardo da rejeição do aloenxerto de pele, apresentando uma modulação de respostas T1 para T2 (Birk *et al*, 1999). Já experimentos realizados em camundongos com Hsp70 por Tesar e Goldstein, observou-se que: (i) in vitro: a Hsp70 não foi capaz de ativar DCs; (ii) in vivo: os níveis de Hsp70 não aumentaram após do transplante e que a ausência da forma induzível da Hsp70 não foi capaz de retardar a rejeição do enxerto. Deste modo, os resultados encontrados mostraram que, ao contrário do que se postulava na literatura, a Hsp70 parece não apresentar um papel fundamental na rejeição aguda (Tesar & Goldstein, 2007).

Em 1997, Moudgil e colaboradores propuseram que diferentes regiões da Hsp60 poderiam induzir respostas imunes distintas, sendo uma delas a indução de células T reguladoras (Moudgil *et al*, 1997). Dentro desta linha, diversos trabalhos na literatura têm mostrado que tanto as respostas a patógenos quanto as respostas reguladoras e anti-inflamatórias mediada pelas HSPs são dirigidas aos peptídeos mais imunodominantes dessas proteínas (Cohen, 1997). Essa hipótese de que diferentes regiões da Hsp60 poderiam induzir respostas distintas norteia essa tese, de modo que trabalhamos com fragmentos diversos que cobrem aproximadamente 50% da extensão da proteína Hsp60 humana, buscando observar a indução de regulação por quaisquer uns desses fragmentos.

Ainda dentro dessa proposta, grupo do pesquisador Irun Cohen testou a Hsp60 com alguns clones de LT e identificou um peptídeo que se mostrou imunodominate. Este peptídeo é composto de 24 aminoácidos (região 437-460) que foi chamado de p277 (Cohen, 2002). Este peptídeo e outros passaram a ser amplamente usados por suas propriedades imunorreguladoras, inclusive sendo alvo de estudo desta tese. O uso do p277 levou à prevenção e supressão de AA e EAE, em modelos animais (Cohen, 2002). Foram realizados vários experimentos envolvendo vacinações com Hsp60 e peptídeos derivados, incluindo o p277, em camundongos NOD e C57BL/6. Nesses estudos mostrou-se que vacinações com o peptídeo p277 aumentaram a sobrevida do enxerto de pele transplantado e não induziram doenças auto-imunes espontaneamente (Birk *et al*, 1999; revisado por Pockley, 2001). Em humanos, estudos de ensaios clínicos de fase II, envolvendo vacinações com o peptídeo p277 em pacientes diabéticos tipo 1, se mostraram seguros e benéficos, porém somente um mostrou uma redução significativa da necessidade de injeções de insulina nesses pacientes (Raz *et al*, 2001) enquanto que o outro não (Huurman *et al,* 2007). Além disso, um outro estudo realizado por Huurman e colaboradores mostrou que a vacina DiaPep277 foi 100% imunogênica nos pacientes com diabete tipo 1 testados nesse ensaio clínico. Além disso, mostrou também que a principal citocina produzida em resposta à terapia foi a IL-10, de modo que essa vacina parece ter efeitos imunomoduladores e induzir um efeito imunorregulador e protetor nos pacientes, a despeito da não diminuição das doses diárias de insulina mostradas no trabalho anterior (Huurman *et al*, 2008).

Em nosso laboratório, temos estudado a Hsp60 humana, trabalhando com a possibilidade de que auto-imunidade fisiológica possa ser utilizada para a

modulação negativa da resposta inflamatória, no contexto de transplante. Luna e colaboradores (2007) também conseguiram observar um aumento de sobrevida do enxerto de pele maior que 20 dias em camundongos com disparidades secundárias de MHC (Balb/c e DBA2), após a administração de 5 injeções intranasais de um peptídeo da Hsp60 (p277) encapsulado em microesferas lipídicas (Luna *et al*, 2007). Já no contexto do transplante renal humano, Caldas e colaboradores mostraram que populações de LT periféricos e infiltrantes do enxerto são capazes de produzir grandes quantidades de IL-10 em resposta ao estímulo com a proteína Hsp60 *in vitro*, sugerindo assim, um papel regulador para a Hsp60 no transplante (Caldas *et al*, 2006). Ainda dentro do contexto de transplante renal, em outro trabalho do nosso grupo, sugere-se uma dupla participação da HSP no contexto do transplante renal em humanos. Para tal, foi realizado um estudo seqüencial dos pacientes pré-transplante e em diferentes momentos após o transplante. Observou-se que a proliferação às Hsp60 e 70 no período pré-transplante, estava relacionada com episódios de rejeição, enquanto que a produção de IL-4 induzida pela Hsp60, estava relacionada com a ausência de rejeição (Granja *et al*, 2004). Com estes dados, sugerimos a existência de duas populações auto-reativas à HSP coexistindo, sendo que uma parece ser reguladora e outra inflamatória (Granja *et al*, 2004).

As HSPs, em especial a Hsp60, que é o alvo de estudo dessa tese, parecem exercer seus efeitos seja por ligação direta a TLR (4 e 2), seja por apresentação por APCs e posterior reconhecimento por LT (via MHC I e II). A ligação direta da Hsp60 a receptores TLR2 expressos por linfócitos T reguladores foi mostrada, recentemente, pelo grupo do Irun Cohen **(**Zanin-Zhorov *et al,* 2006).

Nesse trabalho, o tratamento de células T reguladoras com baixas concentrações de Hsp60 foi capaz de inibir a proliferação celular e a produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T CD4+CD25- e por linfócitos T CD8+. A inibição das respostas dos linfócitos efetores parece ter sido mediada pela secreção das citocinas IL-10 e TGF-β pelas células T reguladoras tratadas com Hsp60 (Zanin-Zhorov *et al,* 2006). Além disso, em modelo murino de arteriosclerose, Yang e colaboradores sugerem que células dendríticas tratadas com rapamicina, possam induzir células Tregs CD4+CD25+ específicas à Hsp60 que têm efeito inibitório, independente de IL-10, *in vitro* e que previnem o aparecimento de placas de ateroma, *in vivo* (Yang *et al,* 2006).

De acordo com as informações descritas até agora para a Hsp60 na literatura e pelos dados encontrados pelo nosso próprio grupo, acreditamos que a Hsp60 possa apresentar também um papel regulador do sistema imune, assim como observado para algumas células do sistema imune, como as Tregs. E apesar de dados recentes mostrarem que certos peptídeos dessa proteína possam se ligar diretamente a receptores do tipo Toll, seja em APCs como em linfócitos, acreditamos que as DCs possam atuar em conjunto com a Hsp60 potencializando o efeito imunorregulador de ambas. Deste modo, acreditamos que o efeito imunorregulador da Hsp60 possa ser desencadeado na própria célula dendrítica (via TLR2), pela apresentação de peptídeos derivados da Hsp60 por DCs, ou ainda por ambos os mecanismos simultaneamente.

Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs, do inglês: “Dendritic Cells”), alvo central deste projeto, foram descritas pela primeira vez em 1973 por Steinman e Cohn (Steinman & Cohn, 1973; revisado por Jung, 2004) em baço de camundongos. No entanto, sua imunobiologia tem sido mais estudada nestes últimos anos, devido ao seu papel fundamental na modulação e na iniciação da resposta imune.

As DCs são células conhecidas como apresentadoras de antígenos profissionais, no entanto, apresentam características que as distinguem das demais APCs. Essas características são: (i) capacidade de ativar células T “naive” (Steinman & Banchereau, 1998; Mellman & Steinman, 2001); (ii) dentro dos órgãos linfóides, se acumulam mais em sítios onde não existem nem LB nem macrófagos (Trombetta & Mellman, 2005); (iii) maior eficiência na apresentação de antígenos a LT, sendo cerca de 100x mais eficientes do que outras APCs (Steinman & Witmer, 1978; Nussenzweig & Steinman, 1980); (iv) capacidade de estimular proliferação potente em LT autólogos mesmo na ausência de antígenos (Nussenzweig & Steinman, 1980); (v) capacidade única de monitoração do organismo e migração, carregando antígenos capturados na periferia até os linfonodos onde serão apresentados aos LT (Randolph, 2001; Itano *et al*, 2003); (vi) altamente eficientes em fazer apresentação cruzada (Delamarre *et al,* 2003); (vii) capacidade de induzir proliferação de Tregs (Yamazaki *et* al, 2003; Tarbell *et al,* 2004).

As células dendríticas são populações celulares muito heterogêneas e essa heterogeneidade se reflete também na localização anatômica dessas células. As DCs e seus precursores circulam em números muito baixos no sangue, cerca de 1%. No entanto, podemos encontrar DCs tanto em tecidos linfóides como em

praticamente todos os órgãos, como: pele, rim, fígado e outros (Sato & Fujita, 2007). Mesmo dentro dos órgãos linfóides, como nos centros germinativos, podemos ver essa diversidade, já que mesmo nessa região dominada por LB, podemos encontrar duas populações distintas de DCs: DCs foliculares (competentes na captação de antígenos, precipitação de imunocomplexos e ativação e seleção de LB) e as DCs germinativas (potentes APCs para LT). Além disso, temos as DCs interdigitantes, DCs tímicas, Langerhans, intersticial DCs entre outras (Sato & Fujita, 2007).

Apesar da grande diversidade de populações de DCs, todas as DCs murinas se originam a partir de precursores derivados de células tronco hematopoiéticas CD34+ presentes na medula óssea (Ardavin et al, 2003; Banchereau *et al,* 2000), circulantes no sangue. As células CD34+ diferenciam-se na medula óssea em basicamente dois progenitores: progenitores mielóides e progenitores linfóides, e estes, por sua vez, dão origem aos precursores que se diferenciam nas DCs.

As chamadas de células dendríticas convencionais são descritas como originadas a partir de progenitores linfóides, no entanto, esse ainda é amplamente discutido na imunologia (O'Keeffe *et al*, 2002). Até bem pouco tempo, as DCs CD8α+ eram consideradas exclusivamente de origem linfóide enquanto as CD8α- de origem mielóide. No entanto, esta classificação foi revista por Wu e colaboradores que mostraram que o precursor mielóide (CPM) também é capaz de originar DCs CD8α+, mesmo que em um menor número (Wu *et al,* 2001). As células linfóides $CD4^{-}CD8\alpha^{high}CD205^{+}CD11b^{-}$ representam somente 20% das

DCs no baço (Vremec *et al,* 2000), porém são as DCs dominantes no timo (Vremec & Shortman, 1997). Atualmente, outros marcadores estão sendo usados para definir as diversas populações de DCs, como CD11b+ (marcador de origem mielóide), CD11b- (marcador de origem linfóide), CD11c+ (expresso em altos níveis nas DCs mielóides) (Banchereau *et* al, 2000) e DEC205 (DC interdigitante) (Leenen *et al*, 1998).

As células dendríticas mielóides são o subtipo de DCs mais estudado até o momento, devido à facilidade de cultivo *in vitro*. Para tal, a maioria dos pesquisadores utiliza apenas GM-CSF (do inglês, “Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor”), porém há outros que adicionam também IL-4, especialmente para a diferenciação de DCs a partir de monócitos (Inaba *et al,* 1992; Lutz *et al*, 2000; Wells *et al*, 2005). Deste modo, muito do que se sabe sobre as DCs diz respeito a esse tipo de célula. Elas representam uma população pequena derivada de progenitores da medula óssea, proliferativos ou não (Soruri & Zwirner, 2005). A maiorias dessas DCs se encontram em estado imaturo no organismo, de modo que expressam moléculas que permitem uma captura de antígenos eficiente (CD11b, CD32, CD64, TLR, DEC205 etc) e baixos níveis de moléculas co-estimuladoras (Steinman, 2003).

Ainda temos um terceiro subtipo de DC, chamadas de DCs plasmocitóides (Blom *et al*, 2000). Sua origem ainda não está bem esclarecida, mas há diversas hipóteses, dentre elas podemos citar: (i) que teriam origem exclusivamente linfóide (Corcoran *et al*, 2003); (ii) que teriam origem de um precursor linfóide/mielóide (Sato & Fujita, 2007); (iii) que teriam origem de uma linhagem hematopoiética única, muito mais flexível do que as linfóides e mielóides

(Corcoran *et al*, 2003); (iv) são B220+ (Nakano *et al*, 2001). Estas células são muito diferentes das DCs convencionais, tanto em morfologia como em função. Apresentam morfologia arredondada, núcleo difuso, muito retículo endoplasmático e poucos dendritos. Além disso, expressam CD62L e B220 (Nakano *et al*, 2001; Del hoyo *et al*, 2002), possuem um menor número de moléculas MHC II na superfície, produzem IFN tipo 1 mesmo na ausência de estímulo viral (Banchereau *et al*, 2000) e exibem uma baixa capacidade de estimular LT, de modo que parecem ter um papel na manutenção da tolerância no "steady-state" (Martin *et al,* 2002). A despeito da sua origem, estas células têm se mostrado muito interessantes e tem se tornado alvo de muitos estudos, devido às suas características peculiares.

No entanto, a questão é ainda mais complexa, pois o mesmo subtipo de DC pode apresentar funções distintas dependendo do microambiente em que se encontra. Como exemplo, podemos citar as DCs $CD4^{-}CD8\alpha^{high}CD205^{+}CD11b^{-}$ (linfóides). Quando estas estão no "*steady-state*", possuem efeito imunorregulador em LT e induzem apoptose em LT CD4+, auxiliando assim na manutenção da tolerância periférica ao próprio através da indução de tolerância cruzada (Belz *et al*, 2002). No entanto, quando estão ativadas: fazem apresentação cruzada a LT CD8+ ativando-os e induzem citocinas T1, sendo as maiores produtoras de IL-12 (Pulendran *et al*, 1999; Hochrein *et al,* 2001; Yasumi *et al*, 2004).

Embora certas diferenças fenotípicas sejam observadas entre esses tipos de DCs, a origem dessas células ainda não está bem estabelecida, no entanto, parece estar relacionadas mais à plasticidade das DCs murinas do que a

características de diferentes linhagens hematopoiéticas (O'Garra & Trinchieri, 2004). Além disso, até o presente momento não foi identificado um marcador específico que defina as DCs, deste modo, as populações são definidas de acordo com a expressão de um conjunto de marcadores expressos em sua superfície. Várias moléculas são expressas na superfície das DCs, dentre elas: moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD83, CD24, ICAM-1, ICAM-3 e CD58); moléculas de adesão (CD11a, b e c; CD49d e CD 44); receptores de endocitose (DEC205 - só em camundongos, FcγR, CD18, CD36, CD64 e CD32), moléculas de migração como o CCR7, além de receptores para citocinas, quimiocinas e moléculas de MHC I e II (Janeway & Walport, 2000; Wolenski *et al*, 2003).

Atualmente, existem duas correntes de pensamento no que diz respeito à indução de tolerância por células dendríticas e o seu papel funcional. Pesquisadores do grupo de Carlos Ardavín (Ardavin *et* al, 2001; Ardavin, 2003) acreditam que existam diferenças funcionais entre DCs de origens distintas e que a indução de tolerância poderia estar relacionada a esses subtipos diferentes e suas origens (linfóide, mielóide ou plasmocitóide). De outro lado, outros pesquisadores (Steinman & Banchereau, 1998; Mahnke *et al*, 2002), acreditam que estas diferenças estejam mais relacionadas aos estágios de maturação das DCs.

Na tese apresentada, escolhemos trabalhar com a hipótese de que os diferentes estados de maturação são importantes na modulação da resposta

imune. Hipótese esta que já está bem estabelecida na literatura, enquanto que a hipótese da origem dos subtipos de DCs ser ainda ser muito controversa.

Atualmente, há dados experimentais sobre a existência de vários subtipos de DCs e dos diversos estados de maturação que esses podem apresentar, dependendo do microambiente, citocinas e estímulos indutores de ativação (Gad *et al*, 2003). O estado de ativação das DCs parece ser muito importante pois acredita-se que ele esteja relacionado diretamente com sua função efetora (Shortman & Heath, 2001; Mahnke *et al*, 2002) e, assim, com a indução de tolerância ou de uma resposta imunogênica. Moser, em seu trabalho publicado em 2003, levanta a hipótese de que DCs em diferentes estágios de maturação poderiam atuar sobre diferentes tipos de células reguladoras: **(i)** imaturas: Tr1 (secretam IL-10) e Th3 (secretam IL-4), **(ii)** maduras: $CD4^+CD25^+$ naturais (Moser, 2003; Cottrez & Groux, 2004).

A primeira vez que foi descrito que as DCs apresentavam dois estágios de maturação foi em 1985 por Schuler e Steinman, denominando-as DCs imaturas e maduras (Schuler & Steinman, 1985; revisado por Moser, 2003). No entanto, mais recentemente, Lutz e Schuler (2002) propuseram um terceiro estado de maturação denominado DCs semi-maduras, que será descrito a seguir (Lutz & Schuler, 2002).

As DCs imaturas são conhecidas como sentinelas da periferia (Mahnke *et al*, 2002). Isto porque uma de suas principais características funcionais é a alta capacidade de realizar fagocitose, macropinocitose e endocitose (Steinman *et al*, 2000). Esta endocitose pode ser mediada por receptores específicos como DEC205 (camundongos) e BDCA2 (humanos), integrinas, FcγR e TLR , 3 4, 5, 8 e

9 **(Mahnke *et al*, 2003;** Dzionek *et al,* 2002), sendo uma forma de experimentar constantemente o ambiente (Lutz & Schuler, 2002). Cada um desses receptores de fagocitose liga-se preferencialmente a um determinado tipo de antígeno**: (i)** C-lectinas (como DC-SIGN e DEC205) ligam-se a açúcares, integrinas e a células apoptóticas; (ii) DC-SIGN também pode se ligar a receptores de manose; (iii) CD32, CD36 e CD16, ligam-se à porção Fc dos complexos antígeno-anticorpo (Sallusto *et al,* 1995; Geijtenbeek *et al*, 2004). No processo de fagocitose, as DCs fagocitam tanto antígenos próprios (ingestão de material apoptótico por CD36) quanto não-próprios, como por exemplo LPS (Lutz & Schuler, 2002). Além disso, as DCs podem endocitar antígenos apresentados no complexo MHC-peptídeo e a sua maquinaria celular exclusiva (endossomos com abundância de cisteínas proteases, hidrolases aspárticas, PH ótimo) torna essas células capazes de degradar uma grande variedade de antígenos (revisado Quah & O'Neilm, 2005). As DCs imaturas são células caracterizadas pela baixa expressão de moléculas co-estimuladoras de superfície (principalmente CD80 e CD86) bem como também pela baixa expressão de moléculas MHC na superfície celular (Jung, 2004; Yao et al, 2002). Quando apresentam este fenótipo, permanecem geralmente estacionárias nos tecidos linfóides periféricos, porém podem ocorrer migrações das DCs antes mesmo de ocorrerem ativação e maturação. Assim, se estas células encontrarem LT capazes de reconhecer o complexo MHC+ peptídeo, estes linfócitos poderão: se tornar não responsivos (Lutz & Schuler, 2002; Yao et al, 2002), ser induzidos à apoptose (Mahnke *et al*, 2002), ou ainda, poderão ser suprimidos por LT reguladores (revisado Moser, 2003). Desta forma, é possível que as DCs imaturas desempenhem um papel importante na manutenção da

homeostase do organismo. A produção de citocinas pelas iDCs é um assunto muito pouco estudado na literatura e, até o presente momento, não foi identificado nenhum padrão característico desse estágio de maturação.

No segundo estágio de maturação, recém proposto, as DCs são conhecidas como semi-maduras. Estas células apresentam uma expressão de moléculas de MHC e co-estimuladoras em níveis altos, porém não produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-12 quando estimuladas com TNF-a (Menges *et al*, 2002). Esse estágio é alcançado pela exposição das DCs ao TNF-α, *ex vivo* (Verginis *et al,* 2005). Também possuem uma capacidade migratória, porém neste estado as DCs apresentam uma capacidade intermediária de fagocitose e de apresentação de antígenos (Lutz & Schuler, 2002, Gad *et al*, 2003). Experimentos iniciais com a obtenção DCs neste estágio de maturação, *in vitro*, foram realizados e mostraram a capacidade destas células de prevenir o desenvolvimento de uma doença auto-imune (EAE) em camundongos, por indução de células T reguladoras produtoras de IL-10 (Morelli *et al*, 2001; Menges *et al*, 2002).

O último estágio de maturação das DCs é representado pelas DCs maduras. A maturação é iniciada na periferia, quando a DC perde sua capacidade fagocítica e seus receptores de adesão celular (Inaba *et al*, 1986; Jung, 2004). A partir deste estágio, a DC passa a apresentar uma grande capacidade de apresentação de antígenos e passa a expressar muitas moléculas co-estimuladoras e MHC (Saas & Tiberghien, 2002). As DCs passam a expressar CCR7 (Flores-Romo, 2001) e migram para os linfonodos onde se encontram com

os LT, podendo ativá-los (Steinman, 2003). No entanto, esse sinal não é suficiente para maturar as DCs, sendo necessárias interações entre as moléculas co-estimuladoras e seus ligantes (Yao *et al*, 2002). O reconhecimento de PAMPs (LPS, Hsp etc) por PRRs nas DCs, origina um sinal que também é responsável pela maturação. Além disso, também promove a produção de citocinas inflamatórias como IL-12 (Saas & Tiberghien, 2002; Belz *et al*, 2002) e a indução de uma resposta imunogênica (Gad *et al*, 2003). A produção de citocinas inflamatórias como IL-12, IFN-γ pelas DCs, estimula a atividade citotóxica de linfócitos T $CD8^+$, células NK (Homann & Herrath, 2003) e linfócitos B. Atualmente, para a obtenção de um fenótipo de iDC estável, ou seja, da qual a iDC não seja passível de maturação, existem inúmeros protocolos, mas os que apresentaram resultados mais promissores foram: (i) tratamento com IL-10 (Wakkach *et* al, 2003); (ii) tratamento com agonistas da vitamina D3 e do receptor de vitamina D3 (Adorini , 2003; Adorini *et al,* 2003); (iii) tratamento com Rapamicina (Hackstein *et al*, 2003). A administração de qualquer uma dessas substâncias em momentos cruciais para a sua diferenciação (“checkpoints”) inibe a maturação, e até mesmo a diferenciação de monócitos em DCs (revisado Hackstein & Thomson, 2004; revisado Morelli & Thomson, 2007). Em estudos recentes têm-se mostrado que além dos já citados indutores moleculares de maturação, indutores celulares também podem interferir no processo de maturação das DCs. Como exemplos, podemos citar as células necróticas que são capazes de induzir maturação e uma resposta imunogênica, enquanto que as

células apoptóticas, parecem ter o potencial de induzir uma resposta tolerogênica (Mahnke *et al*, 2003).

A despeito de todas as diferenças citadas entre as DCs imaturas, semi-maduras e maduras, nenhuma molécula específica para esses estados foi descoberta e está sendo utilizada até o momento. Desta forma, a caracterização dos estados de maturação tem sido determinada com base em uma maior expressão de CD80, CD86, CD40 e MHC II em mDCs murinas (Zheng *et al*, 2004; Vanclée *et al,* 2006).

O tipo de resposta gerada por LT parece depender de mais variáveis do que simplesmente do estado de maturação das DCs. Podemos citar ao menos 3 variáveis que parecem influenciar a resposta dos LT, desencadeada pelas DC: (i) o tipo e o estágio de maturação das DCs; (ii) a natureza do antígeno apresentado; (iii) microambiente das citocinas e quimiocinas produzidas. Todos esses fatores podem agir independentemente ou em sinergismo e induzir a ativação de fatores de transcrição que direcionam as respostas para o tipo T2 (GATA3) ou para uma resposta do tipo T1 (T-bet) ou ainda, Th17 (NFκB). Dados na literatura mostram que uma alta produção de IL-12p70 levaria a uma resposta T1, enquanto que uma baixa produção, a uma resposta T2 (Rissoan *et al*, 1999). O envolvimento de diferentes subtipos de DCs na polarização da resposta de LT em camundongos foi descrito por diversos grupos (Pulendran *et al*, 1999; Maldonado-Lopes *et al,* 2001). Ambos os estudos mostraram uma polarização da resposta, na qual DCs CD8α+ induziram citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFNγ e as DCs CD8-α induziram citocinas reguladoras como IL-4 e IL-10.

Devido a essa grande plasticidade das DCs no que diz respeito a estágios de maturação e à possibilidade de indução de tolerância por alguns deles; atualmente, vários pesquisadores no mundo têm vislumbrado possíveis aplicações terapêuticas para estas células. Vários experimentos têm sido realizados utilizando-se vacinações com DCs para doenças auto-imunes, câncer e em transplantes, com resultados interessantes. Esses resultados têm tornado as células dendríticas grandes alvos de investigação e intervenção terapêutica no mundo.

Células Dendríticas Tolerogênicas

Atualmente, alguns pesquisadores têm considerado que a tolerogenicidade das DCs não está sendo considerada específica ou restrita a um subtipo de DC ou ao estado imaturo (revisado Morelli & Thomson, 2007). Assim, para esses autores, uma DC será considerada como tolerogênica se apresentar um conjunto de características, dentre essas podemos destacar: (i) capacidade de capturar e apresentar antígenos a LT específicos para esses antígenos; (ii) apresentar constitutivamente uma baixa expressão de moléculas de MHC e moléculas co-estimuladoras na sua superfície; (iii) ter baixa produção de IL-12 p70 e alta de IL-10 e IDO; (iv) ter resistência à maturação em resposta a sinais de perigo; (v) ter habilidade de gerar, selecionar expandir Tregs naturais ou não; (vi) ter capacidade de induzir apoptose em LT efetores; (vii) ter capacidade de responder a Tregs super expressando moléculas inibitórias (como: IL-10 e IDO) promovendo um "*feedback*" inibitório (Mine t *al*, 2003); (viii) ter capacidade de migrar para áreas de

LT em órgão linfóides secundários por meio da expressão de receptores de quimiocinas; (ix) ter longevidade *in vivo*, resistência à morte por NK e LT CD8+; (x) para DCs modificadas geneticamente, ter a capacidade de manter estável a expressão dos transgenes imunossupressores (revisado Morelli & Thomson, 2007).

Nos últimos anos, diversos protocolos de indução de atividade tolerogênica nas DCs têm sido testados e com eles, tem aumentando muito a utilização destas DCs em modelos experimentais e ensaios clínicos para o tratamento de câncer, HIV e doenças auto-imunes. Uma busca rápida na literatura e podemos encontrar diversos protocolos de indução de tolerância em DCs, cada uma utilizando uma substância ou técnica distinta, dentre eles podemos citar: (i) o uso de citocinas como TGF-β e IL-10 (Barrat *et al*, 2002); (ii) ao uso de vitamina D3 (Adorini *et al*, 2003); (iii) aspirina (Buckland *et al*, 2006); (iv) e drogas imunossupressoras como: rapamicina e ciclosporina (Hackstein *et al*, 2003); (v) bloqueio de fatores de transcrição como NFκB (Bonham *et al*, 2002) e (vi) RNAi bloqueando IL-12 (Hill *et al*, 2003; Hackstein & Thomson, 2004), (vii) geração de DCs semi-maduras com TNF-α (Verginis *et al*, 2005).

Dentre os mecanismos propostos para a indução de tolerância pelas DCs, grande parte dos trabalhos mostram a geração de Tregs antígeno-específicas ou não, e a participação destas na indução de tolerância e imunorregulação, em humanos e camundongos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Wakkach e colaboradores, em 2003, mostraram que DCs tratadas com IL-10, *in vitro*, exibem um fenótipo imaturo e são capazes de induzir tolerância através diferenciação de LT do tipo

Tr1 (Wakkach *et al,* 2003). Em humanos, experimentos realizados com DCs tratadas *in vitro* com IL-4 e/ou IL-10 e amadurecidas com LPS, mostraram que estas DCs em co-cultura com LT autólogos produzem: (i) iDCs + LT: IL-4; (ii) iDCs IL-10 + LT: IL-10 e IL-4; (iii) mDCs + LT: citocinas T1 e T2 e ativam LT CD4+ (Adikari *et al*, 2004). Além disso, Dhodapkar e colaboradores (2002) mostraram a indução de células Tregs CD8+, em voluntários humanos sadios, *in vivo*, através da injeção de iDCs pulsadas com um peptídeo da matriz do vírus da influenza (Dhodapkar & Steinman, 2002). Já em modelo murino, DCs alogenéicas foram capazes de induzir Tregs que expressavam Foxp3 e que, por sua vez, suprimiram a proliferação de LT efetores em ensaios de cultura mista (MLR - do inglês, "Mixed Lymphocyte Reaction*")*, assim como inibiram o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD – do inglês, "Graft Versus Host Disease") (Yamazaki *et al*, 2006).

No que concerne a imunoterapia de câncer, há muitos estudos clínicos de fase I e II com imunização de pacientes com DCs estimuladas previamente com antígenos tumorais de melanoma (MelanA/MART-1, tyrosinase, MAGE-3 e gp100), obtendo-se resultados animadores, como uma redução significativa na massa tumoral (Banchereau *et al*, 2001; Palucka *et al*, 2003). Além disso, em estudos realizados no Brasil, Barbuto e colaboradores (2004) mostraram que vacinações com DCs alogenéicas fusionadas com células tumorais de pacientes com carcinoma renal ou melanoma mestastático, promoveram uma estabilização da doença em 71% dos casos e uma resposta objetiva em 14%, ao longos dos 19 meses do estudo. Além disso, após as vacinações, os testes cutâneos de hipersensibilidade tardia se tornaram positivos bem como as respostas

proliferativas contra antígenos tumorais, sugerindo uma melhora imunológica destes pacientes (Barbuto *et al,* 2004).

No que diz respeito à participação das DCs na prevenção e cura de doenças auto-imunes, podemos ressaltar um trabalho no qual descreveu-se que DCs semi-maduras, previamente tratadas com TNF-α e pulsadas com tireoglobulina, inibiram o desenvolvimento de tireoidite experimental auto-imune em camundongos, através da ativação de células Tregs naturais CD4+/CD25+ e Foxp3+ e Tregs produtoras de IL-10 (Verginis *et al*, 2005). Yang e colaboradores, também em modelo de camundongos hipercolesterolêmicos, mostram que DCs tratadas com rapamicina e pulsadas com Hsp60, são capazes de induzir Tregs específicas contra Hsp60, prevenindo o aparecimento de placas de ateroma *in vivo* (Yang *et al*, 2006). Além da participação das Tregs com fenótipos bem conhecidos, também há um relato de indução de LT com atividade supressora com fenótipo CD5 pelas células dendríticas. Em um estudo realizado por Hawiger em 2004, mostrou-se que LT CD5 supressores eram capazes de suprimir o desenvolvimento de doença EAE (encefalomielite auto-imune experimental) em camundongos, após o direcionamento (*target*), *in vivo*, das DCs por meio de um anticorpo o anti-receptor endocítico (DEC205), acoplado a um peptídeo de MOG (glicoproteína de oligodendrócito), na ausência de ligação a CD40 (Hawiger *et al,* 2004). No entanto, não encontramos outros relatos mostrando a importância da indução de CD5 em LT por DCs para a indução de tolerância.

DC em indução de tolerância no transplante

Dentre os poucos trabalhos encontrado na literatura sobre o uso de DCs como abordagem terapêutica no transplante, há alguns com o seu cultivo *in vitro* e posterior infusão das DCs, e outros como transfecção de DCs e posterior infusão. Como já havia sido descrito em alguns trabalhos anteriores, as iDCs do doador parecem induzir um aumento da sobrevida do aloenxerto. No trabalho realizado por Zhu e colaboradores em 2003, iDCs transfectadas com o gene da IL-10, induziram menores índices de proliferação em MLR, induziram apoptose em LT e aumentaram a sobrevida do transplante de intestino delgado em 2,5 vezes em ratos (Zhu *et al,* 2003). Já no trabalho realizado por Xu e colaboradores (2006), iDCs transfectadas com o (IL)-12 p35 siRNA, induziram aumento de sobrevida do transplante de intestino delgado em ratos, além de induzir uma menor produção de IL-2 e IFN-γ no soro desses animais (Xu *et al*, 2006). Em outro estudo recente, em modelo de transplante cardíaco em camundongos, foi mostrado que uma única injeção de DCs plasmacitóides imaturas do doador, no período pré-cirúrgico, foi capaz de inibir a rejeição aguda mais do que com outros tipos de DCs, e que o uso simultâneo do anticorpo monoclonal anti-CD154, induzia sobrevida indefinida do enxerto em 50% dos animais transplantados (Bjorck *et al,* 2005). Também em modelo de transplante cardíaco murino, um resultado semelhante foi encontrado com a infusão de DCs plasmacitóides do doador, porém, sem um efeito supressor doador-específico (Abe *et al,* 2005). Em outro estudo, também em modelo de transplante cardíaco agora em ratos, foi observado que a combinação de injeção de iDCs singenéicas com LF 15-0195 (uma nova droga imunossupressora, análoga à desoxipergualina, capaz de induzir apoptose, aumentando capases 8 e

10) mostrou um efeito sinérgico benéfico, induzindo aceitação permanente do aloenxerto em 92% dos receptores (Beriou *et al,* 2005).

Já no transplante renal em ratos, foi observado que a transfecção de DCs do doador em um vetor de adenovirus contendo um gene de uma forma defeituosa de NF-kappa B (dnIKK2 – k*inese-defective dominant negative form of IKK2* que bloqueia ativação de NF-kappa B) foi capaz de aumentar a sobrevida do enxerto alogenéico, provavelmente por bloquear a maturação de DCs e induzir células T reguladoras (Tomasoni *et al,* 2005). Por fim, Roelen e colaboradores (2003) mostraram que DCs maturadas na presença do hormônio glucocorticóide dexametasona e injetadas por via subcutânea, em camundongos Balb/c, uma semana antes do transplante de pele, adquiriram um fenótipo sem moléculas co-estimluladoras e levaram a um aumento de sobrevida do enxerto de pele (Roelen *et al,* 2003).

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura, trabalhos relacionando o uso de DCs em humanos transplantados e nem trabalhos demonstrando um aumento de significativo de sobrevida ou tolerância a transplantes de pele em camundongos sem o uso de drogas imunossupressoras.

- **Direcionamento *in vivo* de DC para indução de tolerância**

A partir da metade dos anos 80, tornou-se evidente que anticorpos aumentavam a resposta de LT específicos a antígenos opzonizados por APCs, através do reconhecimento de receptores do tipo Fc (Celis & Chang, 1984). Essa constatação levou à hipótese de que o direcionamento de um antígeno a

moléculas expressas na superfície de APCs poderia aumentar a resposta mediada por LT. Após alguns anos, a identificação de receptores, mais ou menos expressos em DCs, resultou no desenvolvimento de estratégias de vacinação através do direcionamento de antígenos a esses receptores (revisado Tacken *et al*, 2007). Para os experimentos de "*targeting"* (direcionamento) *in vivo*, são usados basicamente 4: (i) receptor de C-lectina; (ii) receptor ligante de manose; (iii) receptor endocítico DEC205; (v) DC-SIGN (Dakappagari *et al,* 2006). Além dessas, outras formas de atingir, *in vivo,* as DCs têm sido exploradas, como por exemplo, o uso de nanopartículas biodegradáveis, mostrando a capacidade de sua retenção em linfonodos, mesmo após 120 horas após a injeção, apontando o seu grande potencial imunoterapêutico (Reddy *et al*, 2006). Também, foi relatado o uso de siRNAs (*small interfering RNA* de dupla hélice) dirigido à molécula DC-SIGN como sendo capaz de inibir significativamente a infecção de DCs *in vitro*, através da modulação de p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase, proteína kinase ativada por mitógeno*) (Nair *et al*, 2005). Cada uma dessas estratégias possui prós e contras à sua utilização como imunoterapia com DCs, no entanto, nessa introdução, iremos focar a literatura somente no receptor DEC205, pois esse receptor será alvo de estudo desse projeto (revisado Tacken *et al*, 2007).

Nos últimos anos, tem sido explorado o direcionamento *in vivo* das DCs*,* em modelos animais, por meio do anticorpo anti-receptor DEC205 acoplado a algum antígeno de interesse, seja para a indução/amplificação de uma resposta efetora, em vacinação, seja para a indução de uma resposta imune reguladora, principalmente em modelos de doenças auto-imunes (Bonifaz, *et al,* 2004). O

receptor DEC-205 é um receptor endocítico da família dos MMR (do inglês, “macrophage mannose receptor”), abundante em DCs CD8+ de tecidos linfóides, capazes de realizar apresentação cruzada (Hawinger *et al*, 2001). Além disto, em estudos *in vitro* mostrou-se que anticorpos de coelho direcionados à DEC205 são de 30 a 100 vezes mais eficientemente apresentados do que os direcionados a receptores MMR (Mahnke *et al*, 2000). Assim, foi mostrado que se o anticorpo anti-DEC205 acoplado a um determinado antígeno, como a ovalbumina (OVA), quando injetado simultaneamente com um agonista de CD40 (para indução de maturação de DCs), este anticorpo atinge as DCs sistemicamente por longos períodos de tempo, levando à apresentação de peptídeos de OVA, tanto por moléculas MHC de classe I como de classe II e induz um efeito robusto na indução de uma resposta efetora de células CD4 e CD8. Sem o uso do agonista de CD40, as DCs não amadurecem, sendo possível induzir tolerância ao antígeno em questão, mediada por células CD8+ (Bonifaz *et al*, 2002). Esta abordagem abre possibilidades terapêuticas promissoras, evitando a necessidade de expansões *in vitro* das DCs. Também foi mostrado, recentemente, que este direcionamento *in vivo* das DCs, associado ao estímulo para a sua maturação, também foi capaz de induzir uma resposta humoral ampla e duradoura (Boscardin *et al,* 2006).

Por fim, esses estudos de direcionamento têm revelado que a eficiência da vacinação com DCs *in vivo* depende de inúmeros fatores, incluindo a expressão padrão e propriedades biológicas específicas dos receptores, do estado de maturação e ativação das DCs, das propriedades e processamento e apresentação das DCs (revisado Tacken *et al*, 2007) e da importância da

expressão das diferentes isoformas do receptor para Fc da IgG (CD32), CD32a (ativador) e CD32b (inibidor) (Boruchov *et al,* 2005).

Assim, levando-se em consideração as possibilidades de direcionamento de antígenos à DCs, objetivamos nesta tese somar o potencial tolerogênico das DCs imaturas com o potencial imunorregulador da Hsp60, *in vitro*, bem como direcionar antígenos da Hsp60 à DCs *in vivo*, para induzir uma resposta imune com atividade reguladora e induzir tolerância ao alotransplante de pele murino, *vivo.*

4. OBJETIVOS

Geral

Levando-se em conta o papel regulador tanto das células dendríticas como da Hsp60, objetivamos determinar a capacidade das células dendríticas na interação com a Hsp60, de direcionar funcionalmente uma resposta celular auto-imune para a indução de tolerância ao aloenxerto de pele, no sistema murino.

Específicos

- Diferenciar as células dendríticas (DCs), *in vitro*, a partir de células de medula óssea de camundongos e caracterizá-las.
- Gerar as DCs imaturas, potencialmente tolerogênicas, com o fenótipo estável de maturidade, com o uso da citocina IL-10.
- Determinar o efeito da Hsp60 e de seus fragmentos nas DCs maduras e imaturas, quanto à expressão de moléculas coestimuladoras e MHC, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras.
- Verificar se há auto-reatividade diferencial de LT dirigida a DCs maduras e imaturas, assim como reatividade a fragmentos da Hsp60 apresentados a LT via DCs, nesses dois estados de maturação.
- Verificar se os fragmentos da Hsp60 são capazes de inibir a auto-reatividade de LT dirigidas a DCs maduras e imaturas, bem como de inibir a resposta de LT ao estímulo policlonal com αCD3 frente às diferentes DCs.
- Determinar se a interação de alguns fragmentos da Hsp60 com as diferentes DCs, *in vitro*, aumentam a sobrevida do aloenxerto de pele, em camundongos com disparidade total de MHC, quando as DCs são injetadas *in vivo*.
- Determinar se a interação do peptídeo N3 da Hsp60 com as DCs, *in vivo*, pelo direcionamento às DCs através do anticorpo αDEC205, aumenta a sobrevida do aloenxerto de pele, em camundongos com disparidades secundárias de MHC.

5. DESENHO EXPERIMENTAL (A e B)

A

Separação Medula Óssea

Diferenciação: Células Dendríticas

Tipos DCs: iDC, iDC IL-10, mDC

Baço

Purificação de LT

Caracterização: Morfológica, Imunofenotípica, Funcional

- Microscopia ótica
- Moléculas coestimuladoras FACS
- Citocinas - 48h FACS
- MLR - Timidina

Interação DCs + fragmentos Hsp60

- Injeção DCs
- Citocinas – 48h FACS
- Moléculas coestimuladoras FACS

Auto-reatividade Hsp60

DCs + fragmentos Hsp60 + LT autológos

- Citocinas – 48h FACS
- Proliferação Timidina

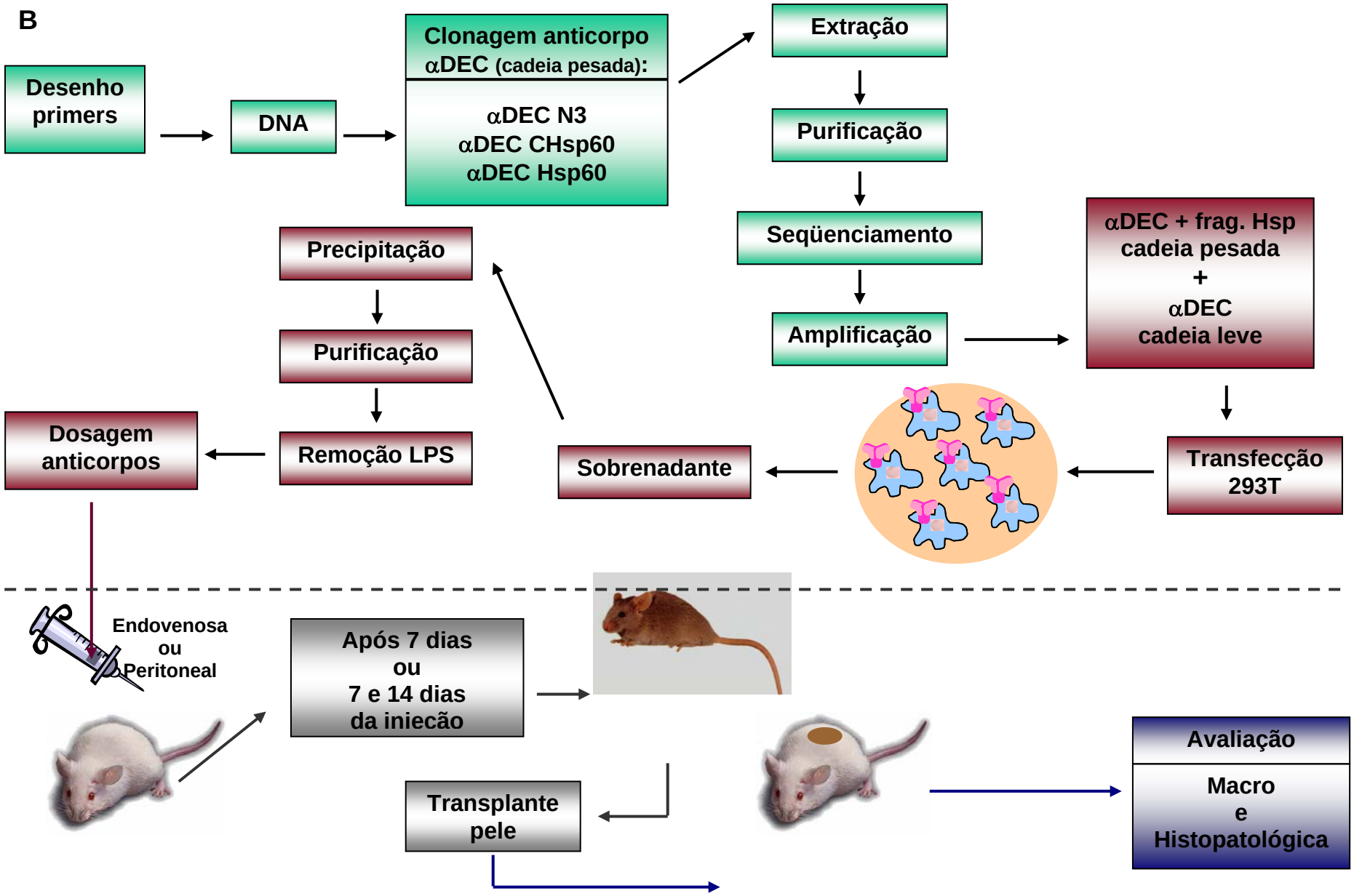
Interação DCs + fragmentos Hsp60 + Estímulo policlonal

- Citocinas – 48h FACS
- MLR - Timida

Após 7 dias

TX - Pele Alogenéico

Rejeição x Tolerância


B
Desenho primers
DNA
Clonagem anticorpo αDEC (cadeia pesada):
αDEC N3
αDEC CHsp60
αDEC Hsp60
Extração
Purificação
Seqüenciamento
Amplificação
αDEC + frag. Hsp cadeia pesada
+
αDEC
cadeia leve
Transfecção 293T
Precipitação
Purificação
Remoção LPS
Dosagem anticorpos
Sobrenadante
Endovenosa
ou
Peritoneal
Após 7 dias
ou
7 e 14 dias
da iniecão
Transplante pele
Avaliação
Macro
e
Histopatológica

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais

Para cada experimento de geração de DCs, foram sacrificados por deslocamento cervical, 3 camundongos Balb/c fêmeas, com idades entre 6-8 semanas. Já para cada experimento de purificação de LT, sacrificamos 3 camundongos C57BL/6 para a retirada dos baços. Por fim, para cada experimento *in vivo* de injeção de DCs pulsadas fragmentos da Hsp60 (p277 ou C-Hsp60), utilizamos 30 camundongos Balb/c (receptores dos transplantes) e 15 C57BL/6 (doadores de pele).

Para cada experimento de transplante, foram utilizados de 20 a 30 animais Balb/c (idade entre 6-8 semanas) e 12-15 animais C57BL/6 ou DBA2 (idade entre 6-8 semanas) para doação da pele das caudas usadas nos transplantes. Os camundongos DBA2 foram cedidos gentilmente pela Dra. Sandra Alexandre da Silva, do Instituto de Biosciências III da USP.

Todos os animais utilizados nos experimentos foram mantidos (microisoladores autoclavados) e manipulados dentro do Laboratório de Experimentação Animal do Laboratório de Imunologia do InCor - FMUSP, localizado no Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP. Toda a alimentação (água e ração) oferecida a esses animais foi previamente autoclavada e as manipulações necessárias foram realizadas em fluxo laminar com material estéril. Além disso, todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas de Bioética estabelecidas e possuem a aprovação da comissão de ética da FMUSP número 542/04.

6.2 Produção de reagentes

6.2.1 Produção das regiões C-Hsp60 e I-Hsp60 humanas recombinantes

As regiões C-terminal e intermediária da Hsp60 (I-Hsp60) humana foram produzidas em nosso laboratório em *Escherichia coli* a partir do gene que codifica para Hsp60, gentilmente cedido pelo Dr. Camargo, Instituto Butantan, São Paulo de acordo com o protocolo padronizado e em uso no nosso laboratório (Caldas et al, 2006). Foram feitas produções em larga escala em 2 litros de cultura cada. Resumidamente, em ambos os casos, células de *E. coli* da linhagem bacteriana BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pRSET-Cal (Invitrogen, CA, EUA) pelo método de cloreto de cálcio. Foi inoculada uma colônia transformante em 50ml de meio LB (Sigma, NJ, EUA) com ampicilina (100 μg/ml). Essa colônia foi incubada por 16 horas a 37^{o}C, com agitação constante. A partir deste pré-inóculo, foi feito um inóculo em 1 litro de meio com 100μg/ml de ampicilina, de modo que a ABS 600nm atingisse 0,1. Este inóculo foi incubado a 37^{o}C com agitação, até a cultura celular atingir uma densidade óptica de 0,8 a 600nm. Neste momento, 1ml da cultura bacteriana foi separado, centrifugado e o sedimento bacteriano ressuspendido em 80 μl de tampão de amostra 1X para SDS-PAGE (Invitrogen, CA, EUA). Esta amostra antes da indução foi separada para posterior análise em gel SDS-PAGE. O restante da cultura bacteriana foi induzida adicionando-se 1,2 mM de IPTG (Invitrogen, CA, EUA) e incubando-se a 37^{o}C sob agitação constante por 2 horas. Após este tempo de indução, 1 ml de cultura bacteriana foi processada para posterior análise em gel SDS-PAGE (amostra pós-indução).

A cultura bacteriana induzida foi centrifugada a cerca de 1500g por 10 minutos, a 4°C. O sedimento bacteriano foi ressuspendido em 90 ml de Tris 100mM pH8,0 NaCl 300mM imidazol 5mM e Triton X-100 0,3% - tampão detergente (Sigma, NJ, EUA). Este tampão foi utilizado para a lise bacteriana. O tubo foi homogeneizado e incubado no gelo por 60 minutos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 3400g por 20 minutos a 4°C, visando a separação da fração protéica solúvel da insolúvel. Após a produção das regiões da Hsp60, estas foram purificadas por meio de coluna de níquel Chelating Sepharose Fast Flow (GE Health care,EUA). As proteínas foram, então, eluídas com imidazol (GE Health care,EUA), dialisadas em PBS e quantificadas. As preparações protéicas foram submetidas a protocolos para eliminação de LPS – lipopolissacarídeos bacterianos, com Triton x-114 (Sigma, EUA). A avaliação de endotoxina nas preparações foi feita utilizando-se o kit LAL QCL-1000 (BioWhittaker inc, EUA).

6.2.2 Remoção de endotoxinas

Para a remoção de endotoxinas das regiões C-Hsp60 e I-Hsp60, utilizamos o protocolo do Triton X-114 adaptado de Aida & Pabst (AIDA & PABST, 1990) e padronizado em nosso laboratório. Inicialmente, preparamos uma solução de Triton X-114 (Sigma, EUA) 10% (em água apirogênica) e a incubamos a 4°C na geladeira para a completa dissolução do detergente. Adicionamos então Triton X-114 (1%) à solução protéica e ao PBS (como controle) e misturamos esta solução cuidadosamente com uma micropipeta. Os tubos foram incubados no gelo por pelo menos 30 minutos e agitados no vórtex a cada 5-10 minutos. Em seguida, os

tubos foram aquecidos a 37^{o}C por 5 minutos, para permitir a formação de duas fases. Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 18000g, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, houve a formação de uma fase de detergente no fundo do tubo. A fase aquosa foi removida cuidadosamente para não misturar com a fase oleosa. Este ciclo foi repetido por mais 6 vezes.

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

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

6.2.4 Produção dos peptídeos da Hsp60

Os peptídeos derivados das regiões C-Terminal, N-Terminal e Intermediária da proteína Hsp60 humana foram sintetizados a partir da seqüência Hsp60 humana (Johnson *et al*, 1989; em http://www.ncbi.nlm.nih.gov), conforme ilustrado na Tabela 1, que mostra as seqüências de todos os peptídeos sintetizados.

A escolha dos peptídeos foi feita anteriormente em nosso laboratório, para estudos no sistema HLA humano, utilizando-se o programa TEPITOPE (Sinigaglia *et al*, 1997). Este programa é um algoritmo que prediz a ligação de peptídeos às moléculas HLA-DR (25 diferentes moléculas). Assim, este programa mostra quais as regiões dentro da Hsp60 com maior probabilidade de ligação às diferentes moléculas HLA-DR.

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

são dissolvidos em N-metil-pirrolidona (NMP). A programação do sintetizador é realizada através de um programa de computador próprio da empresa Advanced Chemtech que funciona em ambiente Windows XP.

As sínteses foram feitas utilizando-se a metodologia Fmoc de acordo com Atherton e Sheppard [1989], Chang *et al.* [1978] e Fields e Noble [1989]. No sintetizador PSSM-8, os aminoácidos foram previamente ativados com tetrafluoborato de tetrametilurônio (TBTU), hidroxibenzotriazol (HOBt) e N-metil morfolina (NMM) (Richelieu Biotechnology, França) por 5 minutos em dimetilformamida (DMF) (Lab Synth, São Paulo, Brasil) com 0,1% Triton X-100. Os acoplamentos foram realizados utilizando-se um equivalente a cinco vezes de excesso de aminoácido na direção usual de carboxi para o amino terminal sobre a resina TGR, grau de substituição de 0,20 mmol/g (Novabiochem, San Diego, EUA) durante 1 hora. No sintetizador Apex 396 os reagentes TBTU, HOBt e NMM foram adicionados concomitantemente aos aminoácidos nos vasos de reação e os acoplamentos realizados durante uma hora. Em ambos os equipamentos, os desbloqueios do grupo Fmoc foram feitas com 500μl de piperidina (Merck, Darmstadt, Alemanha) 20% em DMF + 0,1% Triton X-100 + 0,1 M de HOBt por 2 séries de 15 minutos, seguidas de 5 lavagens com 600μl DMF por 1 minuto cada.

Os peptídeos foram clivados da resina por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA): fenol:anisol:água:etanoditiol a 82,5:5,0:5,0:5,0:2,5 (v/v) de acordo com King *et al.* [1990], extraídos com ácido acético glacial 95% e liofilizados em liofilizador Super Modulyo modelo Pirani 501 (Boc-Edwards Inc, EUA).

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

As purificações dos peptídeos foram realizadas em HPLC semi-preparativo, bombas Shimadzu modelo LC-8A, detector de UV-Vis Shimadzu modelo SPD-6AU. Utilizou-se coluna C-18 (22,5 x 250,0 mm) com os seguintes sistemas de solvente: TFA 0,1% em água como solvente A e acetonitrila e solvente A na proporção de 9:1 como solução B em um gradiente de 1% do solvente B por minuto, durante 30 a 90 minutos, a um fluxo de 3 ml/ min até que se observava a completa saída do peptídeo. As leituras foram realizadas a 220nm.

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

Os peptídeos produzidos e utilizados neste trabalho foram: I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N6, N7 e N10, todos derivados das diferentes regiões da Hsp60 humana. Todos os peptídeos utilizados nesse estudo apresentaram pureza superior a 90%. Por fim, a maioria dos peptídeos sintetizados apresentou grande homologia de seqüência com a Hsp60 murina, já que esta apresenta cerca de 80% de homologia com a Hsp60 humana (Tabela 1).

Tabela 1A. Seqüências dos peptídeos da Hsp60.

Peptídeo * Resíduo aa	Quantidade aa	Seqüência
Região N-Terminal		
N2 (16-35)	20	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD
N3 (31-50)	20	KFGADARALMLQGVDLLADA
N4 (46-65)	20	LLADAVAVTMGPKGRTVIIE
N6 (76-95)	20	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA
N7 (87-110)	24	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
N10 (136-155)	20	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL
Região Intermediária		
I4 (269-289)	21	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN
I8 (353-372)	20	DDAMLLKGKGDKAQIEKRIQ
I9 (372-391)	20	QEIIEQLDVTTSEYEKEKLN
Região C-Terminal		
p277 (437-460)	24	VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED
C3 (449-468)	20	PALDSLTPANEDQKIGIEII
C4 (464-483)	20	GIEIIKRTLKIPAMTIAKNA
C9 (539-558)	20	LTTAEVVVTEIPKEEKDPGM

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

Tabela 1B. Seqüência e homologia dos peptídeos da Hsp60 humana com a Hsp60 murina.

Peptides	Sequence	Position	Molecular region	Identity with mouse Hsp60
N-76	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA	76-95	N-terminal	100%
N-87	KDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG	87-110	N- terminal	100%
N-136	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL	136-155	N- terminal	100%
I-223	YISPYFINTSKGQKCEFQDA	223-242	Intermediate	100%
I-269	KPLVIIAEDVDGEALSTLVLN	269-289	Intermediate	100%
I-285	TLVLNRLKVGLQVVAVKAPGFGD	285-307	Intermediate	100%
I-321	GGAVFGEEGLTLNLEDVQPH N A	321-340	Intermediate	90%
C-449	PALDSLTPANEDQKIGIEII K	449-468	C-terminal	95%
C-539	LTTAEVVVTEIPKEEKDPGM A	539-558	C-terminal	94%
C-554	KDPGMGAMGGMGGGMGGGMF	554-573	C-terminal	100%
p277	VLGGG VALLRVIPALDSLTPANED C C K	437-460	C-terminal	87%

Tabela retirada do paper de Luna e colaboradores (2007) na Cell Stress & Chaperones 12(1):112-122.

6.3 Experimentos com DCs *in vitro*

6.3.1 Obtenção de células de medula óssea

Todo este procedimento foi realizado em fluxo laminar. Após sacrificar os camundongos por deslocamento cervical, mergulhamos cada animal dentro de um recipiente com Etanol 70%, por alguns segundos, e retiramos toda a pele da face anterior abdominal do animal. A seguir, retiramos os dois fêmures e as duas tíbias, com todo cuidado para não haver contaminação com a pele dos animais.

Limpamos os ossos com auxílio de gaze estéril, retirando todo o músculo e cartilagens. Em seguida, lavamos os ossos com um jato de Etanol 70% e os

mergulhamos em uma placa de Petri (Corning, NY, EUA) com meio RPMI (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) completo: 100 IU/ml ampicilina (Nova Farma, Brasil), 100μg/ml perflacin (Gibco BRL, NY, EUA) e 2 x 10^{-5} β-Mercaptoetanol – Sigma, EUA) + Fungizona (Gibco BRL, NY, EUA) 2,5μg/ml, até a sala de cultura celular.

Dentro do fluxo laminar da sala de cultura, colocamos os ossos em uma placa de Petri com Etanol 70% por 2 minutos e, em seguida, transferimos os ossos para uma placa de Petri com meio RPMI completo (sem fungizona). Neste momento, cortamos as epífises dos ossos e, em seguida, inserimos a agulha dentro da medula de cada osso para lavagem da medula com 1 ml de meio RPMI completo. Este procedimento foi repetido algumas vezes, sendo interrompido quando o meio ficava límpido, aparentemente sem células. Lavamos os ossos dentro de um tubo Falcon (B&D, San Diego, EUA) de 50ml, de forma a não perder células, em caso de refluxo. Desagregamos os grumos de células, homogeneizando bem a suspensão celular. Em seguida, centrifugamos (Eppendorf, Westbury, NY, EUA) a suspensão celular a 300g por 10 minutos, e contamos as células com solução de Turk (1/10). O número esperado de células por osso é: 1 a 1,5 x 10^7 células. Essas células foram utilizadas para a diferenciação de células dendríticas.

6.3.2 Indução de diferenciação de DCs

No dia zero, dispensamos as células da medula óssea em placas de 6 poços (Corning, NY, EUA), a uma concentração de 2,5 x 10^6 células/poço em 3ml de meio RPMI 10% FCS (Gibco BRL, NY, EUA) por poço, acrescidos de rGM-CSF

murino (Peprotech, NJ, EUA) de acordo com as seguintes concentrações: **(i) iDCs-IL-10** (iDCs potencialmente tolerogênicas): 20ng/ml rGM-CSF e 10ng/ml IL-10 (B&D, NJ, EUA), a partir do 3º dia de cultura; **(ii) iDCs**: 20ng/ml rGM-CSF; **(iii) mDCs**: 20ng/ml rGM-CSF e 200ng/ml LPS (*E. coli* 111:B4, Sigma, EUA) adcionado no sexto dia de cultura. As células foram cultivadas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37º C (Thermo Forma, Thermo Scientific, EUA).

No 3º dia de cultura, realizamos observação e troca de meio mantendo a mesma concentração inicial de citocinas. Observamos as células dos diferentes tratamentos ao microscópio ótico invertido (Nikon, EUA), fotografando cada tipo e anotando as observações quanto às diferenças morfológicas. A troca de meio foi realizada retirando-se a metade do meio de cada poço. Este volume foi centrifugado a 300g por 8 minutos, e o botão celular ressuspendido em 1,5 ml de meio contendo as citocinas nas concentrações iniciais. As células foram replaqueadas nas mesmas placas. Nas placas destinadas à geração de iDCs-IL-10, acrescentamos IL-10 (10ng/ml) ao meio.

No 6º dia de cultura, além da observação das células ao microscópio ótico invertido, como descrito anteriormente, trocamos mais uma vez a metade do volume do meio de cultura, da mesma forma descrita para o terceiro. Neste 6^0 dia, as células destinadas à geração de células dendríticas maduras (mDCs) foram estimuladas com LPS 100 ou 200ng/ml. Em alguns experimentos, parte das células iDCs-IL10 foram desafiadas com LPS 200ng/ml para a verificação de estabilidade do fenótipo de imaturidade de DCs.

No 8º dia de cultura, os diferentes tipos de DCs estavam prontas para a uso em experimentos. Antes da retirada das células das placas, realizamos a observação ao microscópio de analisamos as diferenças morfológicas.

Após a retirada das diferentes DCs, passamo-nas para tubos falcon de 50ml, devidamente identificados. As placas foram lavadas 2 vezes com meio RPMI completo gelado, sendo realizada a centrifugação a 300g por 10 minutos. A cada lavagem, colocamos as placas no gelo por cerca de 3 minutos, e batemos a placa na superfície do fluxo para facilitar a retirada das células.

Após as centrifugações, e verificação do número de células obtidas, as células foram ressuspendidas na concentração desejada para os experimentos. Com o número total de células em cada uma das condições de cultura, foram calculados o rendimento de obtenção de dendríticas (% em relação ao número de células plaqueadas para cada condição) e a viabilidade celular com Trypan Blue (Sigma, EUA) e citometria de fluxo com iodeto de propídeo (B&D, San Diego, EUA).

6.3.3 Obtenção de células do Baço

Os baços foram retirados dos animais e colocados em placas de Petri com 5 ml de meio RPMI completo 5% FCS. A seguir, os baços foram macerados, gentilmente, com o auxílio de um êmbolo de seringa (B&D, San Diego, EUA) em cima de uma membrana de nylon, obtendo-se, desta forma, os esplenócitos. A suspensão de esplenócitos foi transferida para um tubo Falcon (B&D, San Diego,

EUA), contendo 15 ml do mesmo meio e centrifugada a 500g a 4ºC, durante 5 minutos.

Após descartarmos o sobrenadante, o botão celular foi ressuspendido em meio RPMI completo e recentrifugado a 500g a 4ºC, por 5 minutos. Dispersamos novamente o sobrenadante, e o botão celular foi ressuspendido em 5 ml de meio para a contagem das células em câmara de Neubauer (Geoquímica, Brasil). Por fim, as células foram utilizadas para a obtenção de populações enriquecidas de LT.

6.3.4 Obtenção de populações celulares enriquecidas de células T

Os esplenócitos foram utlizados para a purificação de LT. A obtenção de uma população foi enriquecida de LT foi feita pelo processo de seleção negativa com *"beads"* magnéticas (Pan T cell isolation Kit mouse, Miltenyi Biotec GMBH, Bergisch Gladbach, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza da população de LT obtida foi verificada por citometria de fluxo.

Essas células foram duplamente marcadas: marcação primária (coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com *biotina*) e marcação secundária (anticorpos monoclonais anti-*biotina* conjugados às contas). Para a marcação primária usamos 30μl do coquetel de anticorpos para 10^7 células e para a marcação secundária usamos 40 μl de anticorpos para10^7 células. Entre as duas etapas de marcação não foi feita qualquer lavagem das células.

Em seguida, os esplenócitos em suspensão foram aplicados em uma coluna MACS, submetida a um campo magnético. Esse processo permitiu a passagem das células T através da coluna e retenção das células não T na

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

63.3.5 Estimulação das células dendríticas com fragmentos da Hsp60

No oitavo dia de cultura, as DCs foram lavadas e centrifugadas 3 vezes a 300g por 8 minutos, para a remoção das citocinas presentes no meio. As DCs foram então replaqueadas em placas de 24 poços (Corning, NJ, EUA) contendo novo meio RPMI completo, sem citocinas. A seguir, as DCs foram pulsadas com 10μg/ml das regiões da Hsp60 e/ou seus peptídeos, em poços separados. Estas placas foram colocadas em estufa 5% CO_2 por 48 horas a 37ºC. Ao final do período de incubação, as DCs e/ou o sobrenadante de cultura, foram recuperados para os mais diversos usos, como por exemplo, os ensaios de proliferação de LT e produção de citocinas.

6.3.6 Caracterização imunofenotípica de DCs e LTs por citometria de fluxo (FACS)

As DCs foram caracterizadas imunofenotipicamente no 9 º dia de cultura, de modo que tanto as células pulsadas com os fragmentos da proteína Hsp60 como as não pulsadas, apresentavam o mesmo tempo de cultura quando foram caracterizadas. Para a caracterização fenotípica das iDCs, iDCs IL-10 e mDCs, com ou sem pulso, utilizamos marcadores de superfície celular marcados com os fluorocromos: FITC - , PE - , APC - . As moléculas que foram analisadas são de 3

tipos: **(i)** moléculas co-estimuladoras: **CD80 FITC, CD86 PE, CD40 FITC**; **(ii)** marcadores de linhagem mielóide; pam leucocitário e de diferenciação para DCs: **CD11b PE, CD45 APC** e **CD11c APC**; **(iii)** moléculas MHC classe I e II, respectivamente: **H2Kd FITC** e **Ia/Ie PE .**

Além disso, utilizamos ainda outros anticorpos para a verificação da pureza da população de DCs obtidas bem como da população linfocitária purificada por *"beads"* imunomagnéticas: **GR-1 PE (granulócitos), F4/80 FITC (macrófagos), CD4 FITC (LT), CD8 PE (LT), CD14 FITC (monócitos), CD16 PE (NK)**. A viabilidade de todas as células analisadas foi realizada através de Iodeto de Propidium (PI). Todos os anticorpos utilizados nesta tese foram comprados da Becton & Dickinson, San Diego, CA, EUA.

Para que as células diferenciadas a partir de células medula óssea fossem consideradas como DCs a expressão da molécula de CD11c deveria ser = ou > 80% e apresentarem expressão de moléculas co-estimulatórias ainda que em baixo número e/ou intensidade. Além disso, as DCs $CD86^{High}$, $CD80^{High}$, Ia/Ie^{High} e $CD40^{+}$, foram consideradas maduras, enquanto que $CD86^{Interm/Low}$, $CD80^{Interm/Low}$, Ia/Ie^{High} e $CD40^{-}$, foram consideradas imaturas, fossem elas iDCs ou iDCs IL-10.

Para a realização dos experimentos de FACS, 2,5 $x10^5$ células/condição foram ressuspendidas em 100μl tampão FACS (PBS com 2% de FCS), por poço de uma placa de microtitulaçãopoi de 96 poços com fundo em U (Corning, NY, EUA). Em seguida, as células foram centrifugadas a 500g por 5 minutos, a 4ºC, e o sobrenadante desprezado por inversão. Toda a reação de imunofluorescência foi realizada em banho de gelo e ao abrigo da luz. Após a lavagem, adicionamos

25 μl dos anticorpos monoclonais, previamente titulados, ao sedimento celular, para a detecção dos marcadores de superfície celular selecionados. As placas foram incubadas a 4 ^{o}C por 30 minutos em banho de gelo e no escuro. Terminada a reação, as células foram lavadas três vezes com tampão FACS por centrifugação a 500g por 5 minutos, a 4ºC, e ressuspendidas em 300μl de tampão FACS. Foram adquiridas 10000 eventos na região, seja de LT ou de DCs, em um citômetro FACSCalibur (B&D, CA, EUA). A análise dos dados foi feita através do programa CELLQUEST^{R}.

6.3.7 Caracterização morfológica das DCs por Citospin

Nesse trabalho foi avaliada a morfologia dos três grupos de células dendríticas estudadas (iDC, iDC IL-10, mDC) por meio da técnica de citospin. Para tal, ressuspendemos 1 x 10^{6} células/ml de meio RPMI sem soro e colocamos 50 μl da suspensão celular em cubetas de citocentrífuga para *citospin*. As células foram centrifugadas a 120 g por 5 minutos. Após a remoção das cubetas, as lâminas de vidro nelas contidas foram retiradas, secadas ao ar livre por 5 minutos, e a região dessas lâminas que continha o sedimento celular foi delimitada utilizando-se uma caneta. Por fim, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa por 5 minutos. A seguir, foram lavadas em água corrente e analisadas em microscópio ótico (Carl Zeiss, Alemanha) quanto ao seu aspecto morfológico. As células foram analisadas morfologicamente quanto ao tamanho, formato e presença de dendritos, presença de vacúolos intracitoplasmáticos e posição do núcleo.

6.3.8 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas com o auxílio de um "software" computacional chamado *Graphpad Prism* versão 3.0 (Graphpad Sottware Incorporation, EUA). O teste utilizado para comparar a expressão das moléculas de superfície entre as iDCs, iDCs L-10 e mDCs sem tratamento com antígenos da Hsp60 foi o ANOVA bidirecional com pós–teste de Kruskall-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise comparativa da expressão de moléculas de superfície nas DCs tratadas e não tratadas com antígenos da Hsp foi realizada através do teste não paramétrico de Mann Whitney. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6.3.9 Ensaios de linfoproliferação e MLR (Cultura Mista Linfocitária) com DCs pulsadas ou não com fragmentos da Hsp60

Foram realizados ensaios de proliferação de LT frente aos diferentes tipos de DCs (iDCs, iDCs IL-10 e mDCs), pulsadas ou não com as regiões C-Hsp60, I-Hsp60 ou peptídeos.

Tanto para os experimentos de proliferação autóloga (LT autólogos) como para as MLR (LT alogenéicos), foram feitas triplicatas com $2,5 \times 10^5$ LT purificados co-cultivados com $2,5 \times 10^4$ DCs (proporção 1:10), por poço de placas de 96 poços com fundo U, em RPMI com 5% FCS. Para medir a incorporação basal de timidina, utilizamos células respondedoras (LT) e estimuladoras (DC), ambas sozinhas. Já para o controle positivo, utilizamos DC-LT estimuladas com anti-CD3 diluído a 1:10

(gentilmente cedido pelo Dr. Auro Nomizo, da USP/Ribeirão Preto). Para os experimentos de proliferação autóloga e alogenéica utilizamos DCs pulsadas ou não com fragmentos da Hsp60, que foram realizados da mesma forma.

Em todos os experimentos, as placas foram incubadas por 2 dias a 37ºC em estufa com 5% de CO_2, e posteriormente, pulsadas com 0,5 μCi de Timidina Triciada (3H-thymidine, Amershan Pharmacia Biotech, UK) no terceiro dia da cultura, 18 horas antes do término do experimento. As células foram aspiradas com o auxílio do coletor de células automático (Cell-Harvester, Skatron Instruments, UK) e contadas no contador de cintilação líquida Beta Plate 1205-LK-Wallac (Betaplate, Wallac, Finland).

O índice de estimulação (IE) para a avaliação tanto da auto como da alorreatividade às DCs foi calculado dividindo-se a média de CPM (contagens por minuto) das triplicatas obtidas para a condição LT+ DC por aquela das DCs sozinhas ou LTs (qual dos dois apresentasse maior valor). Para os experimentos nos quais as DCs haviam sido pulsadas previamente com os fragmentos da Hsp, cálculo do IE foi feito com a média das CPMs das DC-LT pulsadas pela média de CPM de DC-LT sem pulso. Consideramos positivos resultados com EI $\geq$ 2.

6.3.10 Cultura celular para coleta de sobrenadante e detecção de citocinas (CBA)

Foram realizados ensaios para a análise do perfil de citocinas em sobrenadantes de cultura dos diferentes grupos de DC em cinco condições diferentes: **(i)** DCs e LTs não estimulados; **(ii)** DCs estimuladas ou não, cultivadas

com LTs; **(iii)** DCs estimuladas ou não, mais linfócitos T mais αCD3; **(iv)** DC estimuladas com as regiões C-Hsp60, I-Hsp60 e peptídeos da Hsp60. Estes ensaios foram realizados em placas de 24 poços (Nunc, Denmark) contendo 1ml de meio RPMI completo contento 2,5 x 10^4 DC e 2,5 x 10^5 linfócitos (proporção DC:LT = 1:10). Foram coletados 200μl dos sobrenadantes das culturas celulares após 48h de cultura. A seguir, foram congelados a –80 ºC e mantidos a essa temperatura até o momento do ensaio de detecção de citocinas. Dosamos IL-2, IL-4, IL-5, IFNγ, IL-6, Il-12, IL-10 e TNF-α por CBA (do inglês, "*Cytometric Beads Array"*, Pharmingen, San Diego, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

CBA é um Imunoensaio que usa "*beads*" conjugadas com diferentes anticorpos de alta afinidade que podem capturar especificamente antígenos solúveis. O antígeno capturado é detectado com anticorpos fluorescentes de detecção. Através do citômetro de fluxo podemos distinguir as *"beads"* baseadas no tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. A quantidade de citocina é calculada em função da intensidade de fluorescência que é deslocada para a direita, para cada citocina.

Para a avaliação da produção de citocinas na auto-reatividade de LT frente às diferentes DCs, bem como na alorreatividade, descontamos a produção da condição DC+LT da produção encontrada para a DC sozinha ou para o LT sozinho, escolhendo-se sempre aquele com maior produção da citocina em questão. Quando avaliamos o efeito dos fragmentos da Hsp diretamente sobre as DCs, o nível de citocina induzido pelos estímulos foi descontado daquele produzido pelas DC sozinhas (produção espontânea). Por fim, quando avaliamos

o efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de DC+LT, para determinar a produção induzida de citocinas pelos antígenos nessas coculturas descontamos a produção obtida pela cocultura DC+LT sem antígeno. Uma vez que os limites mínimo e máximo de detecção do teste são ≥ 20pg/ml e ≤5000pg/ml, respectivamente, os valores inferiores a 20pg/ml foram por nós considerados indetectáveis.

6.3.11 ELISA pra TGF-β

Primeiramente, 10 ml de tampão carbonato foram colocados em um tubo de polipropileno de 15 ml ao qual foram adicionados 10 μl do anticorpo de captura (TGF-β1 coat - diluição 1:1000). Utilizando-se placas de ELISA 96 poços Maxisorp (Nunc), colocou-se 100 μl em cada poço e deixou-se incubando overnight à 4ºC (em câmara úmida). Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com 200 μl de tampão de lavagem, para então realizar o bloqueio das placas. Para essa etapa foram colocados 22,4 ml de água destilada em um tubo de 50 ml ao qual adicionou-se 5,6 ml do TGF-block. Misturou-se gentilmente por inversão, sempre com a atenção para não formarem bolhas. Na seqüência, 270 μl da mistura foram colocados em cada poço e foi feita incubação durante 1 hora e meia em temperatura ambiente. Durante esse intervalo, preparou-se o tampão de amostra (3,3 ml de TGF sample 10X + 29,7 ml de água destilada) para utilização na adição das amostras, anticorpo secundário e conjugado.

Em seguida preparou-se a curva padrão na concentração de 1μg/ ml (já tratada com ácido) para que fosse então diluída na diluição de 1:1000 em tampão de amostra 1X (concentração de 1000 pg/ ml). Então foi realizada a acidificação das amostras utilizando-se 1 μl de HCl 1N para cada 50μl da amostra. Incubou-se por 15 minutos com agitação em temperatura ambiente e foi realizada a neutralização das amostras com 1 μl de NaOH 1N. As placas foram então lavadas 5 vezes com 200 μl por poço de tampão de lavagem. Na seqüência, a curva padrão foi adicionada, fazendo-se diluição seriada, com volume final de 50 μ, e as amostras foram também adicionadas. Foi feita incubação de 1 hora e 45 minutos em temperatura ambiente com agitação e, após o tempo de espera, as placas foram novamente lavadas 5 vezes com 200 μl por poço de tampão de lavagem.

A etapa seguinte consta da adição do anticorpo secundário. Primeiramente, foram colocados 10 ml de tampão de amostras em um tubo ao qual foram adicionados 10 μl de anti-TGF-β. Agitou-se gentilmente evitando a formação de bolhas e, foram adicionados 100 μl da mistura de anticorpo secundário em cada poço. Incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas 5 vezes com 200 μl por poço de tampão de lavagem. Para o preparo do conjugado, foram colocados 9,9 ml de tampão de amostras em um tubo e adicionados 100 μl do anticorpo conjugado com HRP. Agitou-se gentilmente e foram colocados 100μl da mistura em cada poço. Incubou-se por 2 horas. Novamente as placas foram lavadas 5 vezes com 200 μl por poço de tampão de lavagem. Adicionou-se então 100 μl de TMB (em

temperatura ambiente) em cada poçol e incubou-se em temperatura ambiente por 15 minutos. Ao final deste procedimento, a leitura foi feita em leitora de Elisa na absorvância de 450 nm.

6.4 Experimentos com DCs *in vivo*

6.4.1 Injeção das diferentes DCs pulsadas com fragmentos da Hsp60 para indução de tolerância ao aloenxerto de pele

Estes experimentos foram realizados sob condições de esterilidade, em fluxo laminar. Injetamos $7x10^6$ DCs (iDCs, iDCs IL-10 e mDCs) diferenciadas a partir de células de medula óssea de camundongos Balb/c, pulsadas com os fragmentos da Hsp60: p277, N7 e C-Hsp60. Essas células foram diluídas em 100μl Billingham e Medwar em 1951 e, posteriormente, modificado por Rosemberg em 1991. de PBS estéril e injetada, em camundongos Balb/c, inoculados via endovenosa retrorbital. Após 7 dias da injeção, procedemos com o transplante alogenéico de pele de camundongos C57BL/6. Por fim, avaliamos a pele transplantada quanto a critérios macroscópicos de rejeição descritos abaixo.

6.4.2 Transplante de pele

A retirada da pele e a colocação do enxerto foram feita segundo o método descrito por Billingham e Medawar (1951) sob condições estéreis. Foram retirados fragmentos de pele com cerca de $1,3cm^2$ da cauda de camundongos C57BL/6. Estes fragmentos foram lavados com RPMI e implantados na parede posterior do tórax de camundongos receptores Balb/c, que tiveram anteriormente um fragmento de pele, de tamanho similar, retirado do mesmo local. A região que recebeu o

enxerto foi recoberta com gaze estéril e band-aid que foram retirados somente após decorridos sete dias da data do transplante. Foram feitas observações diárias até o momento da rejeição.

O enxerto foi analisado somente macroscopicamente. Os critérios para a análise macroscópica foram:

- Mudanças na pigmentação
- Aspectos da superfície do enxerto
- Tamanho do enxerto
- Aumento da espessura
- Consistência
- Grau de desidratação
- Formação de crostas
- Presença de pelos e sulcos
- Formação de cicatriz.

As medidas do tamanho do enxerto foram feitas com régua. O enxerto foi considerado como rejeitado quando ocorreu perda de mais de 90% do tamanho inicial associada à presença de um ou mais dos critérios macroscópicos.

A análise estatística da sobrevida dos enxertos foi feita pelo método de Kaplan e Méier (1958) e as significâncias estatísticas entre os grupos transplantados foram determinadas com o uso do método de LogRank (Peto, R. *e cols*., 1977).

6.5 Direcionamento às DCs in vivo com o anticorpo αDEC205 acoplado ao peptídeo N3.

6.5.1 Construção dos primers

Foram desenhados para o peptídeo N3 4 *primers* que se sobrepunham e tinham seus sítios de ligação abertos. Além disso, foram adicionados a todos os primers, fosfatos na extremidade 5' e estes então foram purificados por SDS-PAGE. Os desenhos com as construções dos insertos bem como as seqüências do primers (em cores distintas), estão ilustradas nas figuras 1 (A e B).

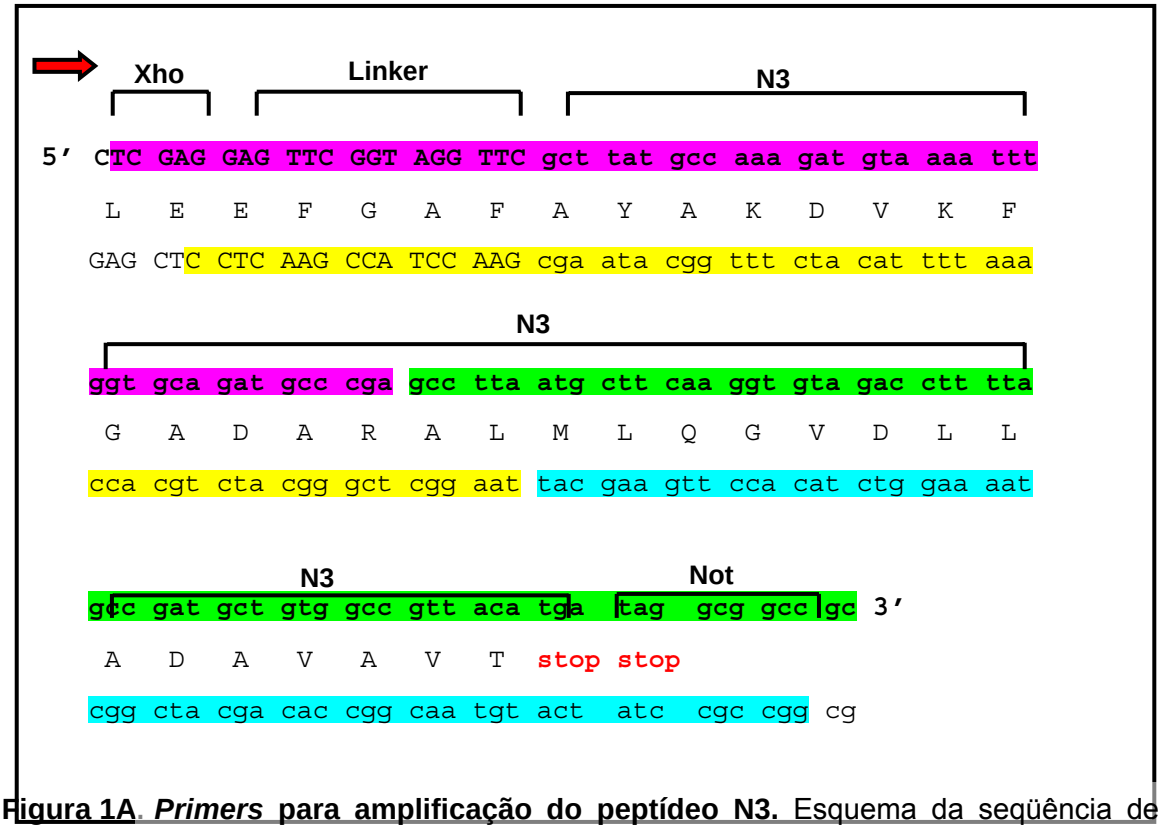


Figura 1A. ***Primers* para amplificação do peptídeo N3.** Esquema da seqüência de DNA e dos *primers* desenhados para o peptídeo N3, incluindo os sítios de restrição das enzimas Xho1 e Not1, necessários para a clonagem no plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205.

N3 Forward 1

5′ TC GAG GAG TTC GGT AGG TTC GCT TAT GCC AAA GAT GTA AAA TTT GGT GCA GAT GCC CGA 3′

N3 Forward 2

5′ GCC TTA ATG CTT CAA GGT GTA GACCTT TTA GCC GAT GCT GTG GCC GTT ACA TGA TAG GC 3′

N3 Reverse 1

5′ TAA GGC TCG GGC ATC TGC ACC AAA TTT TAC ATC TTT GGC ATA AGC GAA CCT ACC GAA CTC C 3′

N3 Reverse 1

5′ GGC CGC CTA TCA TGT AAC GGC CAC AGC ATC GGC TAA AAG GTC TAC ACC TTG AAG CAT 3′

Figura 1B. **Seqüência dos 4 *primers* para peptídeo N3.** Seqüências de DNA no sentido 5'- 3' dos *primers* desenhados para o peptídeo N3, incluindo sítios de restrição das enzimas Xho1 e Not1, necessários para a clonagem no plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205.

Adicionamos aos "*primers Forward"* um sítio para a enzima de restrição Xho1 e para os "*Reverse"* um sítio de Not1, de modo que, através desses mesmos sítios presentes no plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205, os nossos insertos pudessem ser inseridos corretamente. Na Figura 2 apresentamos o esquema do plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205 desenvolvido pelo grupo do professor Michel Nussenzweig na *Rockefeller Univeristy*, New York, EUA. Já na Figura 3 podemos observar a construção do plasmídeo contendo a cadeia leve do anticorpo.

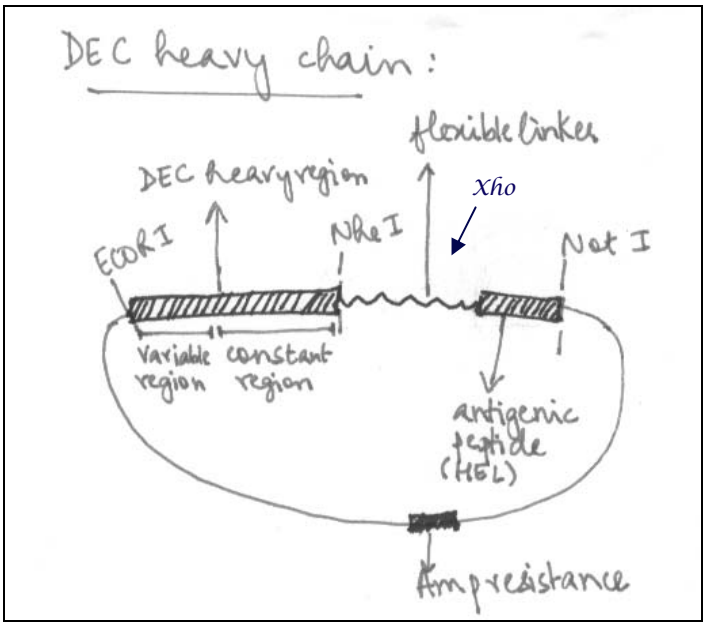


Figura 2. Mapa da cadeia pesada do anticorpo αDEC205. Construção do anticorpo αDEC205 contendo um peptídeo antigênico da HEL. Ilustração original cedida pelo professor Michel Nussenzweig, Rockefeller University, NY EUA.

Figura 3. Mapa da cadeia leve do anticorpo αDEC205. Construção do anticorpo αDEC205 contendo um peptídeo antigênico da HEL. Ilustração original cedida pelo professor Michel Nussenzweig, Rockefeller University, NY, EUA.

6.5.2 Anelamento e ligação dos primers do peptídeo N3 com αDEC205

Os 4 *primers* foram diluídos para 50ng/μl e foram anelados aos pares, *Forward1/Reverse1 e Foward2/Reverse2* separadamente. Para tal, adicionamos 1μl de cada par de *primer* num tubo com 1,5μl de solução 20x SSC (3 M NaCl + 0.3 M Citrato de Sódio pH 7.0) e 40μl de H_2O. Aquecemos essa solução a 95° C por 5 minutos e deixamos esfriar até atingir a temperatura ambiente. A seguir, fizemos a ligação dos anelamentos 1 e 2 com o plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205, conforme ilustrado abaixo:

Ligação

Plasmídeo αDEC205 (cadeia pesada)	1μl
Anelamento 1 (F1+R1)	2μl
Anelamento 2 (F2+R2)	2μl
Tampão ligase 10x (com ATP)	1μl
Enzima Ligase (5 unidades)	1μl
H_2O	3μl
	10μl

- Durante a noite toda a 16°C.
- A transformação foi realizada conforme descrito anteriormente, porém utilizando-se 5μl do produto da ligação.

Após a avaliação do DNA por digestão com as enzimas Nhe e Not e o seqüenciamento das amostras, produzimos o DNA em grande escala (Maxi Prep) para a transfecção. O protocolo utilizado para as digestões está representado abaixo:

Digestão N3

DNA pós ligação (2μg)	3μl
BSA 100x	0,2μl
Tampão NEB2 10x	2μl
Nhe (10u)	1μl
Not1 (10u)	2μl
H_2O	11,8μl
	20μl

- 2 horas à temperatura ambiente.
- Gel 2% agarose.

6.5.3 Produção em larga escala de DNA usando kits de Maxi prep

Com uma alça de inoculação recolhemos uma colônia de DNA de cada placa e colocamos para crescer em 1 litro de meio LB- Luria Broth (Invitrogen, EUA), contendo 100μg/ml de ampicilina durante toda a noite. No dia seguinte, iniciamos o procedimento de Maxi prep de acordo com as instruções do fabricante (Quiagen, EUA). As amostras de DNA foram checadas por digestões com as enzimas Xho1, Not1, Bam HI (New England Biolabs, MA, EUA) ou enviadas para seqüenciamento.

6.5.4 Transfecção transitória em células 293T usando Fosfato de Cálcio- $Ca_3(PO_4)_2$

As células de mamífero 293T foram plaqueadas em uma diluição de 1:10 em 50 placas de Petri de 150 x 25mm tratadas a vácuo com plasma (B&D, NJ, EUA). Essas células foram mantidas em 25ml de meio DMEM (Gibco, Grand Island, NY, EUA) contendo: 10% soro fetal bovino ultra-low IgG, L-glutamina, piruvato de sódio, antibiótico e antimicótico (Ginco, Grand Island, NY, EUA), por 2 dias ou até que apresentassem uma confluência entre 80-90%, em estufa úmida de CO_2 a 37°C. Após esse tempo de incubação, misturamos bem 1500μg de DNA da cadeia leve e 1500μg de DNA da cadeia pesada do anticorpo αDEC205, contendo o peptídeo N3, com 500μl de cloroquina (Sigma, USA), 15ml de $CaCl_2$ 2.5M e 133ml de água destilada, de acordo com modificações no método descrito por Chen & Okayama em 1978. A seguir, enquanto fazíamos bolhas em 12ml da solução de HBS2X pH=7,05, pingamos lentamente 12ml da solução contendo o DNA. A seguir, gotejamos 6ml/placa dessa solução final nas

placas contendo as células 293T e reincubamos essas placas na estufa por aproximadamente 6-7 dias. Passadas 8 horas da transfecção, aspiramos todo o meio e colocamos 20ml de DMEM pré aquecido a 37°C, contendo: 10% Nutridoma (Roche, Nutley, NJ, EUA), L-glutamina, piruvato de sódio, antibiótico e anti-micótico, nas concentrações já descritas. Após 7 dias de transfecção, os sobrenadantes com os anticorpos αDEC205 contendo as nossas construções, foram recolhidos, precipitados e purificados.

6.5.5 Transfecção transitória em células 293T usando Polyethylenimine branched (PEI)

As células 293T foram plaqueadas em uma diluição de 1:10 em 50 placas de Petri de 150 x 25mm tratadas a vácuo com plasma (BD, New Jersey, EUA). Essas células foram mantidas em 25ml de meio DMEM 10% FCS, conforme descrito anteriormente, por 2 dias ou até que apresentassem uma confluência entre 80-90%, em estufa úmida de CO_2 a 37°C. Antes de realizar a transfecção, aspiramos todo o meio e colocamos 20ml de DMEM pré aquecido a 37°C contendo: 10% Nutridoma, L-glutamina, piruvato de sódio, antibiótico e anti-micótico. A seguir, misturamos em um tubo Falcon de 50ml, 500μg de DNA da cadeia leve e 500μg de DNA da cadeia pesada do anticorpo contendo o peptídeo N3 com 50ml de $CaCl_2$ 2.5M. A cada 5ml dessa solução, adicionamos 440μl de PEI (0,45mg/ml), homogeneizamos, e incubamos 10 minutos à temperatura ambiente, de acordo com o método descrito por Diebold e colaboradores em 1999. Por fim, pingamos cuidadosamente 1ml/placa dessa solução. Após 7 dias de transfecção, os sobrenadantes com o anticorpo

αDEC205 contendo a nossa construção foram recolhidos, precipitados e purificados.

6.5.6 Precipitação dos Anticorpos com Sulfato de Amônia

Após 7 dias de cultura, recolhemos os sobrenadantes de todas as placas transfectadas em garrafas e centrifugamos a 850g por 20min, a 4°C. A seguir, descartamos as placas. Filtramos os sobrenadantes em filtros estéreis de 0,22 micra (Nalgene, Rochester, NY, EUA). Calculamos a quantidade de sulfato de amônia (Sigma, EUA) a ser acrescentada de acordo com o volume final so sobrenadante, sendo que para 1 litro acrescentamos 600g. Dentro da câmara fria e sob agitação constante, acrescentamos ¼ da quantidade final de amônia em intervalos mínimos de 1 hora. Após, acrescentarmos toda a quantidade de amônia e deixamos agitando durante toda a noite, a 4°C.

6.5.7 Purificação dos Anticorpos αDEC205-N3

Centrifugamos todo o sobrenadante contendo a solução de sulfato de amônia por 1200g por 45 minutos, a 4°C. Guardamos os sobrenadantes a 4°C. A seguir, ressuspendemos os botões celulares em 5ml de PBS1x estéril gelado, colocamos num tubo falcon de 50ml no gelo e acrescentamos a esse tubo 2 pastilhas estéreis de inibidor de protease EDTA free (Roche, Nutley, NJ, EUA), dissolvidas em 1ml PBS1x estéril. Lavamos os tubos com mais 5ml de PBS1x gelado estéril. Centrifugamos todo o sobrenadante novamente por 1200g por 45 minutos, a 4°C. Ressuspendemos os botões celulares e lavamos os tubos como descrito acima. Novamente, guardamos o sobrenadante em uma garrafa a 4°C. Centrifugamos os tubos contendo o botão a 850g por 10 minutos, a 4°C para

eliminar impurezas. Enquanto isso, nós retiramos 2ml de *Protein Beads G* estéreis (GE health care, EUA) e as lavamos 3x com PBS1x estéril centrifugando a 250g, por 5 minutos cada. Adicionamos 2ml das *beads* lavadas à solução contendo o botão resuspendido e deixamos sob agitação durante a noite toda, a 4°C. No dia seguinte, centrifugamos a 250g por 5 minutos para baixar as *beads*. Enquanto isso, lavamos a coluna Poly Prep Chromatography Columns (BioRad, Hercules, CA, EUA) com 5ml de PBS1x. Após a centrifugação, passamos os sobrenadantes para tubos novos e ressuspendemos os botões em 5ml e aplicamos na coluna. Lavamos os tubos com 5ml de PBS1x e aplicamos novamente na coluna e, por fim, lavamos as *beads* com 5ml de PBS1x gelado. Quando as *beads* já estavam brancas, eluímos os anticorpos com 10ml de tampão Tris Glicina 0,1M pH 3.0 e coletamos as 10 primeiras frações (500μl por fração) em eppendorfs contendo 50μl/cada da solução de Tris 1M pH 8.0, para neutralizar a solução eluente. Verificamos a presença de anticorpo colocando 5μl de cada fração coletada em 95μl de reagente de Bradford (Sigma, EUA) numa placa de 96 poços fundo U. As amostras contendo os anticorpos, ou seja, que ficaram azuis ao reagir com o Bradford, foram concentradas com solução de Spectra/Gel (Spectrumlabs.com, EUA) e dialisadas em PBS 1x por 3 horas a 4°C.

As amostras selecionadas foram avaliadas por eletroforese com um gel BIS TRIS 4-12% (Invitrogen, EUA). Quando não foi possível avaliar os anticorpos por meio de um gel de eletroforese, foram realizados Western Blot.

6.5.8 Western Blot

Para tal corremos um gel de eletroforese de proteínas, conforme descrito anteriormente e o transferimos para uma membrana de Western Blot, através do sistema Semi-Dry System (GE Healthcare, EUA) a 160mA, por 1 hora. Após a transferência, a membrana foi lavada por 5 minutos com PBS1x. A seguir, foi incubada, sob agitação constante, com PBS leite a 3% por 2 horas à temperatura ambiente, ou a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, diluímos o anticorpo primário 1:2000 (HRP – Jackson BioLabs, EUA) em 10ml de PBS leite 3% e o incubamos com a membrana, sob agitação constante, por 2 horas à temperatura ambiente ou a 4°C, durante toda a noite. A seguir, lavamos a membrana 3x com 15ml de PBS Teween 0,05% por 10 minutos, à temperatura ambiente. Adicionamos então, 400μl a solução reveladora (western lightning chemiluminescense reagent plus – 5', Perkin Elmer, EUA) distribuindo bem por todo gel. Numa sala escura, expomos o gel a um filme fotográfico (Kodak, EUA) por um tempo que variou de 30 segundos a 5 minutos, dependendo da concentração das amostras e da sensibilidade da solução reveladora. Por fim, revelamos o filme fotográfico no aparelho de revelação automática (KodaK, EUA).

6.5.9 Detecção e Remoção de LPS dos anticorpos αDEC205-N3

Para a detecção e quantificação de LPS bacteriano nos anticorpos produzidos e purificados, utilizamos o kit *Limulus Amebocyte* Lysate – LAL QCL-1000 (Cambrex, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a remoção do LPS adicionamos 1ml de uma solução de 10% Triton X-114 (Sigma,EUA) a 9ml da solução gelada contendo os anticorpos num tubo

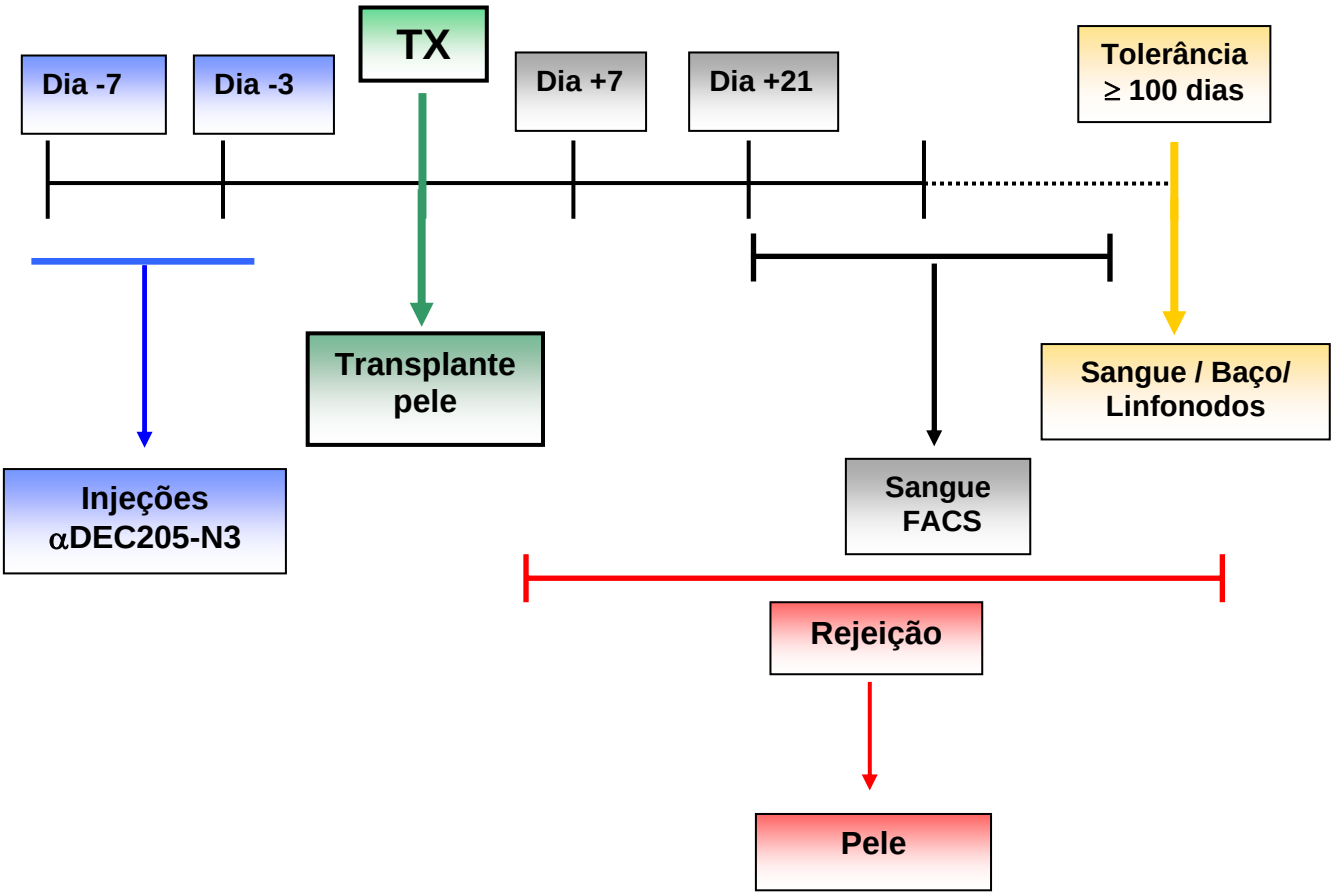
falcon de 15ml. Esses valores foram alterados de acordo com o volume final da sua solução contendo os anticorpos, mantendo sempre essa proporção. Vortexamos por 30 segundos cada amostra. A seguir, incubamos por 15 minutos no gelo e vortexamos novamente por mais 30 segundos. Incubamos os tubos no Banho-Maria a 42°C, por 10 minutos. Por fim, centrifugamos a 800g por 5 minutos à temperatura ambiente. Removemos a fase superior do tubo contendo o anticorpo purificado e livre de LPS. Essa operação foi repetida por 2 vezes de modo a retirar o máximo possível de LPS dos anticorpos. O limite aceito de contaminação por LPS consiste em uma concentração < 10EU/ml.

6.5.10 Injeção in vivo dos anticorpos αDEC205-N3

Este experimento foi realizado sob condição de esterilidade, em fluxo laminar. Os animais receptores (Balb/c) foram separados por grupos e receberam 2 doses dos anticorpos a-DEC205-N3 nos dias -7 e -3 do transplante de pele, ou via peritoneal **(A)** ou via endovenosa **(B)**. Os grupos experimentais utilizados nesses experimentos foram: **(A): (i)** 5μg de anticorpo αDEC205-N3 via peritoneal; **(ii)** 15μg de anticorpos αDEC205-N3 via peritoneal; **(iii)** PBS (diluente); **(B): (iv)** 5μg de anticorpo αDEC205 via endovenosa; **(v)** 15μg de anticorpos αDEC205-N3 via endovenosa; **(vi)** PBS (diluente). Cada grupo teve 5-7 camundongos Balb/c de 7-8 semanas. Após 7 dias da primeira injeção, procedemos com o transplante de pele, utilizando cerca de 15 camundongos DBA2, por experimento, como doadores de cauda. Após 1 semana da data do transplante, avaliamos diariamente a pele transplantada quanto aos critérios macroscópicos descritos anteriormente. Caso o enxerto ultrapassasse os 21, iremos retirar sangue, da análise de células por citometria de fluxo. Caso

houvesse indução de tolerância, ≥ 100 dias de transplante, iríamos retirar sangue, baço e linfonodos para análise e proliferação.

O esquema de injeção dos anticorpos e da coleta de material está ilustrado abaixo:



7. RESULTADOS

7.1 Produção de anticorpos αDEC205

A construção dos anticorpos αDEC205 murino acoplados a diferentes antígenos da proteína humana Hsp60 foi realizada nos Estados Unidos em colaboração com o laboratório do Professor Michel Nussenzweig da Rockefeller University (New York, USA). Os anticorpos αDEC205 murinos foram produzidos para a injeção, *in vivo*, visando a indução de tolerância ao alotransplante de pele murino.

Durante esse período nos Estados Unidos, foram produzidos 3 diferentes anticorpos: um acoplado à proteína Hsp60 inteira, outro contendo a proteína C-Hsp60 e outro com o peptídeo N3 da região amino-terminal (αDEC205-N3). As estratégias adotadas para a produção desses anticorpos foram diferentes, porém neste trabalho apresentaremos apenas os resultados obtidos para o anticorpo αDEC205-N3 uma vez que somente este anticorpo foi usado para os ensaios de indução de tolerância *in vivo*. No entanto, vale ressaltar que os demais anticorpos também foram produzidos e serão utilizados em futuros experimentos.

7.1.1 Produção do anticorpo αDEC205 acoplado ao peptídeo N3

Para a produção do anticorpo αDEC acoplado ao peptídeo N3 (αDEC205-N3) foram desenhados 4 primers sobrepostos, anelando separadamente os dois pares de primers (*Foward1* com *Reverse1*) e (*Foward2* com *Reverse2*). Os dois pares de primers foram, então, ligados ao plasmídeo

pDEC (plasmídeo que contém a cadeia pesada do anticorpos αDEC205) através de DNA ligase.

Transformamos Bactérias DH5α com o nosso inserto de αDEC205-N3 e fizemos a amplificação das diversas colônias geradas. Fizemos PCR para 46 colônias de pDEC (plasmídeo com a cadeia pesada do αDEC205) N3 e 46 de pISO (plasmídeo de controle isotípico sem a cadeia pesada do αDEC205) N3 e depois digerimos com as enzimas NheI e Not para verificar a presença do peptídeo N3 nos plasmídeos. Na Figura 5 observamos bandas de DNA com peso molecular esperado para os pDEC e pISO acoplados ao peptídeo N3 (1513 bp).

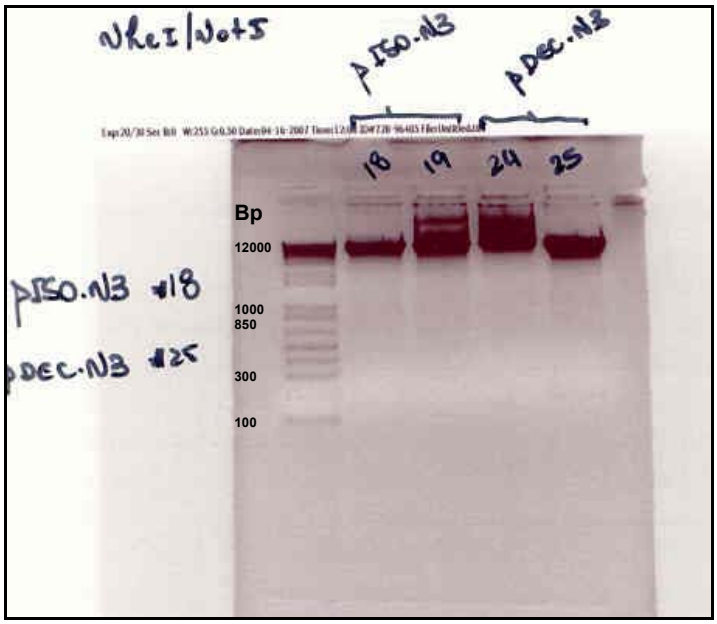


Figura 5. Inserção do peptídeo N3 nos plasmídeos pDEC e pISO. DNA pDEC= plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205-N3. DNA pISO= anticorpo controle isotípico sem o αDEC205-N3. Bp: pares de bases. Coluna 1= padrão molecular 1kb. Amostras 18, 19 (pISO) 24 e 25 (pDEC). Digestão com enzimas Nhe e Not. Gel de DNA - agarose 2%.

O DNA de todas as colônias de bactérias produzidas, entre essas as amostras 18, 19, 24 e 25, foi checado por seqüenciamento gênico e teve a inserção correta do peptídeo N3, tanto no pDEC quanto no pISO, comprovada. Somente, então, o DNA foi amplificado pelo kit de Maxi Prep e usado para as transfeções nas 293T.

Além disso, fizemos uma Maxi Prep das cadeias leves dos anticorpos pDEC e pISO. Esse Maxi Prep foi realizado a partir de DNA, previamente estocado e fornecido pela pós-doc Silvia Boscardin do laboratório do pesquisador Michel Nussenzweig. Essas cadeias produzidas foram usadas em experimentos de co-transfecção com o pDEC (contendo a cadeia pesada do anticorpos αDEC205) acoplado ao peptídeo N3, para a formação completa do anticorpo αDEC205. Na Figura 6 mostramos em gel de DNA, no qual praticamente não há diferenças de peso molecular das bandas entre os plasmídeos que contêm a cadeia Kappa DEC ou a cadeia Kappa ISSO (em torno de 1395 bp), mas que o pDEC apresenta uma segunda banda em torno de 650pb.

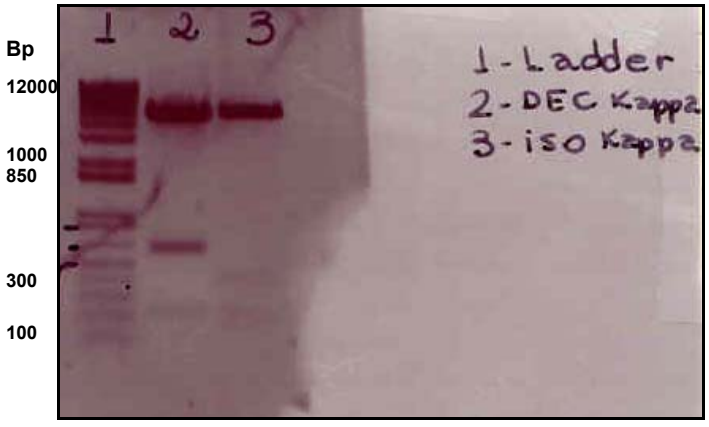


Figura 6. **Produção da cadeia leve (Kappa) dos anticorpos pDEC e pISO.** DNA pDEC= plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205. DNA pISO= anticorpo controle isotípico sem o αDEC205. Bp= pares de bases. Coluna 1= padrão molecular de 1Kd. Coluna 2= pDEC Kappa. Coluna 3= pISO Kappa. Gel de DNA - agarose 1%.

Na Figura 7 podemos observar um gel Bis-Tris para a detecção de proteínas contendo sobrenadantes das culturas celulares de células 293T, resultantes de uma única transfecção com os plasmídeos pDEC e pISO contendo o peptídeo N3, após a purificação em coluna de afinidade para anticorpos do tipo IgG. Como o redimento do pISO foi muito baixo durante a otimização da transfecção, a partir de então, optamos por transfectar somente o pDEC.

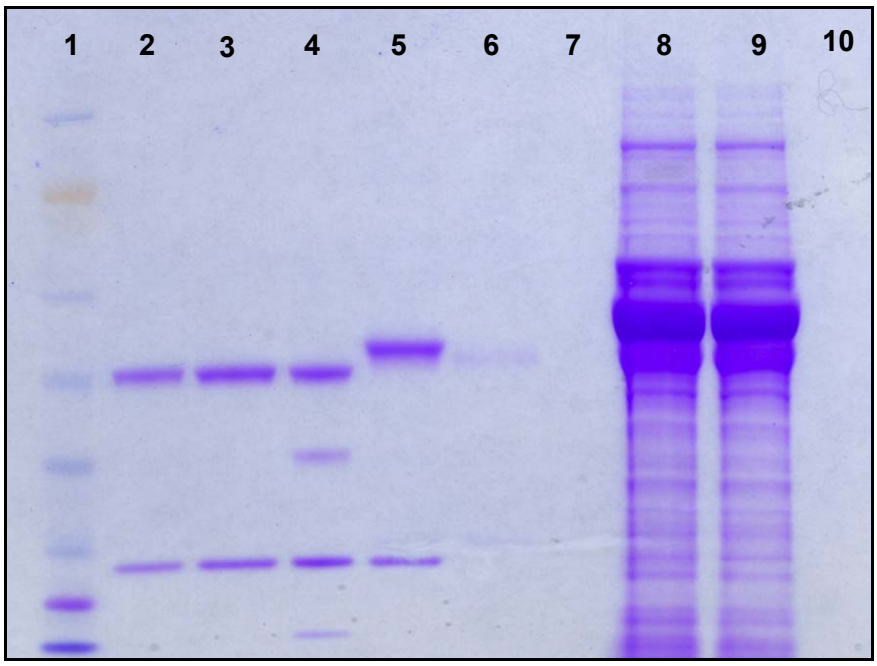


Figura 7. Anticorpos nos sobrenadantes de cultura celular de células 293T transfectadas com os plasmídeos pDEC e pISO contendo o peptídeo N3. pDEC= plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC205. pISO= anticorpo controle isotípico sem o αDEC205. Coluna 1= padrão com diversos pesos moleculares. Colunas 2 e 3= controle positivo αDEC205 sem qualquer inserto (NLDC) 5 e 10μl. Coluna 4= pDEC contendo um peptídeo irrelevante (peptídeo CS de malária). Colunas 5= pDECN3. Coluna 6= pISON3. Colunas 8 e 9 sobrenadantes dos anticorpos para pDECN3 e pISON3, respectivamente.Gel para proteínas, acrilamida BisTris 4-12%.

Para verificar o rendimento, ou seja, a quantidade de anticorpo αDEC205-N3 produzida pelas co-transfecções com pDEC205-N3 e pDEC Kappa, foram realizados experimentos de Western Blot, já que nem sempre a quantidade de anticorpo produzida foi possível ser visualizada e dosada no gel de acrilamida (Figuras 8 e 9).

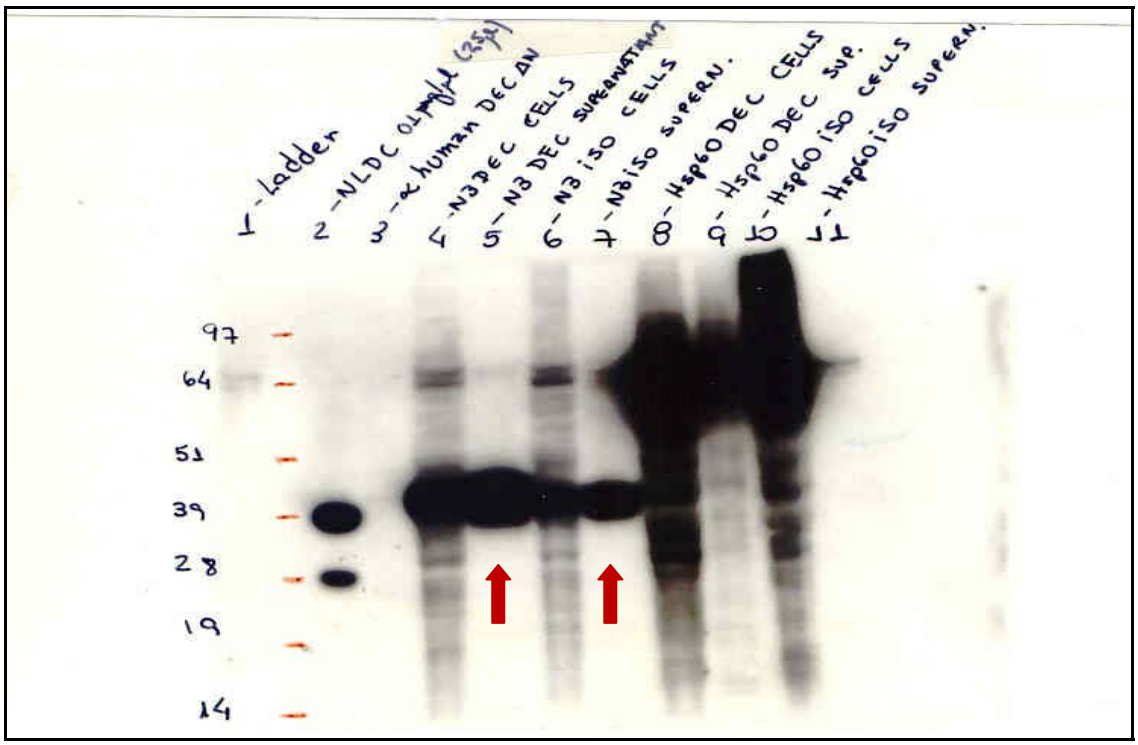


Figura 8. Anticorpos αDEC205-N3 no sobrenadante de cultura e no botão celular de células 293T. Colunas: 1= padrão com diversos pesos moleculares; 2= controle positivo αDEC205 sem qualquer inserto (NLDC); 3= controle positivo αDEC205 humano com peptídeo irrelevante (peptídeo CS de malária); 4= αDEC205-N3 no botão celular; 5= αDEC205-N3 no sobranadante de cultura celular; 6= αISO N3 no botão celular; 7= αISO N3 no sobrenadante de cultura celular; 8= αDEC205-Hsp60 no botão celular; 9= αDEC205-Hsp60 no sobranadante de cultura celular; 10= αISO Hsp60 no botão celular; 11= αISO Hsp60 no sobrenadante de cultura celular. Anticorpos eluídos de coluna de purificação com beads para anticorpos IgG (Protein beads G). Setas: bandas de interesse. Membrana de Western Blot corada com kit Western Lightning Chemiluminescence reagent Plus – 5' durante 5 minutos. n=1 para cada anticorpo.

Devido a uma maior contaminação nas amostras de anticorpos αDEC205-N3 no botão celular com as demais proteínas das células, optamos por purificar somente as amostras presentes nos sobrenadantes das culturas celulares com as células 293T (Figura 9).

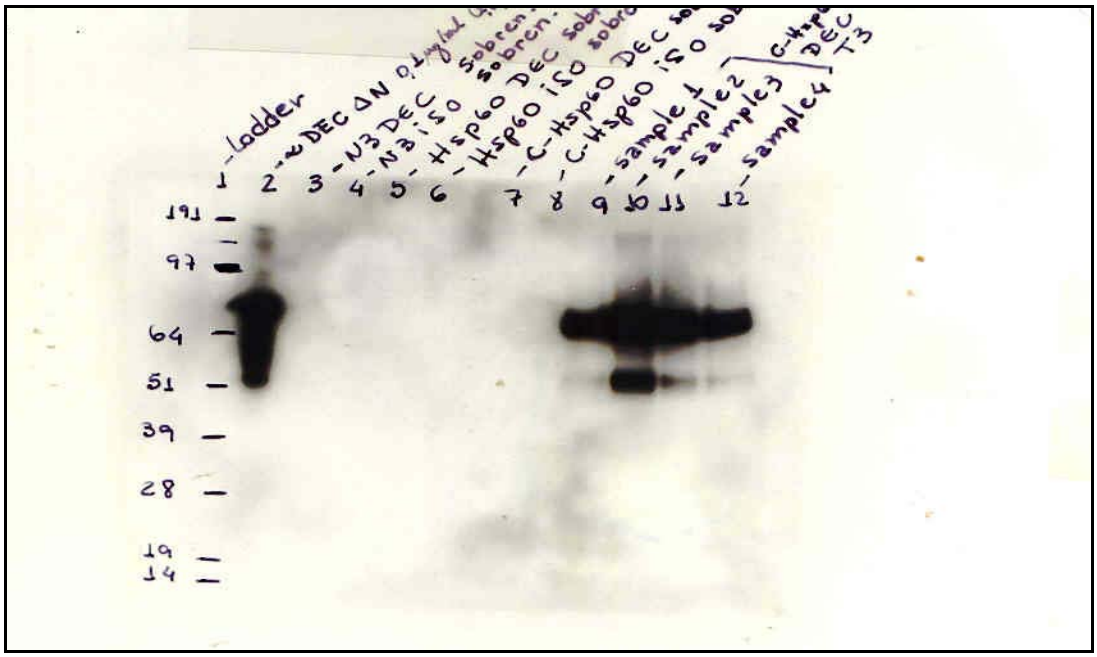


Figura 9. Anticorpos αDEC205-N3 nos sobrenadantes de cultura celular de células 293T. Colunas: 1= padrão com diversos pesos moleculares; 2= controle positivo αDEC205 humano com peptídeo irrelevante (peptídeo CS de malária); 3= αDEC205-N3; 4= αISO N3; 5= αDEC205-Hsp60; 6= αISO Hsp60; 7= αDEC205-C-Hsp60; 8= αISO C-Hsp60; 8, 10, 11 e 12= amostras de αDEC205-C-Hsp60 purificadas de maneiras diferentes. Anticorpos eluídos de coluna de purificação com beads para anticorpos IgG (Protein beads G). Membrana de Western Blot corada com kit Western Lightning Chemiluminescence reagent Plus – 5' durante 5 minutos. n=1 para cada anticorpo.

Após a purificação dos anticorpos e a visualização do DNA por gel de acrilamida e dos anticorpos por Wester Blot, dosamos o LPS presente nestes produtos utilizamos o kit de LAL, descrito no tópico material e métodos. Após a remoção, os anticorpos passaram a apresentar ≤ 10UE/ml (unidades de endotoxina, do inglês "*endotoxin unity*").

Após a remoção do LPS, quantificamos todos os anticorpos produzidos através do método BCA (Tabela 2) e por fim, calculamos a quantidade final obtida para αDEC205-N3, após as diversas transfecções realizadas nos EUA, que foi igual a 638,7μg/ml.

Tabela 2. Dosagem dos anticorpos αDEC205-N3 pelo método de BCA (pg/ml).

Pontos da Curva	Valores Curva			Média (pg/ml)
2000	1416,3	1860,7	/	1638,5
1500	1716,9	1558,1	1609,4	1628,1
1000	861,4	1129,8	1143,9	1045,1
750	763,9	780,0	945,9	829,9
500	486,4	568,9	618,1	557,8
250	224,1	209,0	259,2	230,8
125	125,5	107,4	127,5	120,2
25	/	/	/	/
0	0,0	0,0	0,0	0,00
Anticorpos αDEC205-N3	**Valores anticorpos**			**Média (pg/ml)**
αDEC205-N3 $T7_2$ diálise	/	/	/	/
αDEC205-N3 T4 diálise	/	106433,0	132571,0	**119502,0**
αDEC205-N3 T1 diálise	319557,0	478394,0	443209,0	**413720,0**
αDEC205-N3 T8 diálise	126539,0	/	84317,0	**105428,0**

Valores em negrito= média final da concentração de αDEC205-N3 em pg/ml. /= valores indetectáveis. Dosagem realizada por BCA. T= número do experimento de transfecção. Limites de detecção do teste= pontos mínimo e máximo da curva. n=4.

7.2 Geração das Células Dendríticas

Diferenciamos as DCs a partir de células de medula óssea de camundongos Balb/c, conforme descrito no tópico material e métodos. Para a obtenção dos diferentes tipos de DCs, as concentrações de citocinas utilizadas foram: **(i)** DCs imaturas (iDCs)= GM-CSF 20ng/ml**; (ii)** DCs maduras (mDCs)= GM-CSF 20ng/ml e LPS 200ng/ml por 24hs no sexto dia de cultura; **(iii)** DC imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10)= GM-CSF 20ng/m e IL-10 10ng/ml de IL-10 (a partir do terceiro dia de cultura).

No total, foram realizados 60 experimentos de diferenciação de células dendríticas, sendo que os 10 primeiros fizeram parte do processo de padronização da técnica em nosso laboratório. Ao longo do desenvolvimento desta tese tivemos muitas perdas, sendo essas resultantes tanto da

padronização e otimização da técnica (morte celular, baixo rendimento) como da padronização dos anticorpos utilizados para a imunofenotipagem, e mesmo intecorrências como contaminação com fungos.

Todos os experimentos mostrados nesta tese (n=28) apresentaram uma viabilidade em geral de 80% (máxima 100%, mínima 60%), mensurada tanto pela adição de Tripan Blue na contagem celular, como por PI (Iodeto de Propídeo) nos experimentos de citometria de fluxo.

Os critérios que usamos para considerar que houve diferenciação de células de medula para DCs foram: (i) diferenças na morfologia da célula ao longo do período de cultura (microscopia ótica invertida); (ii) diferenças no tamanho e granulosidade das células (FACS); (iii) diferenças na expressão de moléculas coestimuladoras e de MHC II (FACS); (iv) expressão de CD11c ≥ 80% (FACS).

Na Figura 10, podemos observar a diferença entre as células da medula e as iDCs. As células da medula são circulares e formam grumos como cachos de uvas, enquanto que as iDCs apresentam morfologia irregular e são mais aderentes.

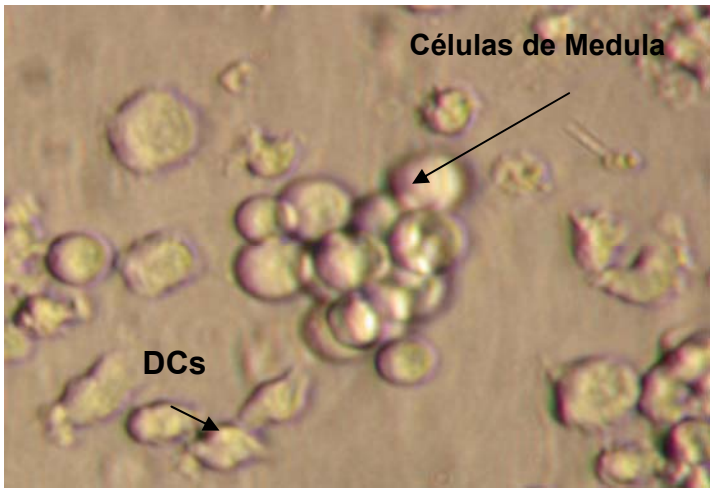


Figura 10. Células da medula óssea em diferenciação para DCs. Células no 6º dia de cultura. Presença de grumos de células de medula indiferenciadas. Experimento DC-017. Microscópio ótico invertido. Aumento: 40X.

Abaixo, um experimento representativo de 7 que ilustra a diferenciação das células de medula óssea (Figura 11A) para células dendríticas (Figura 11B), por citometria de fluxo. Observamos modificações no tamanho (FSC – do inglês *"Foward Scatter",* dispersão frontal) e na granulosidade (SSC – do inglês *"Side Scatter",* dispersão lateral) das células da medula e das células diferenciadas em DCs.

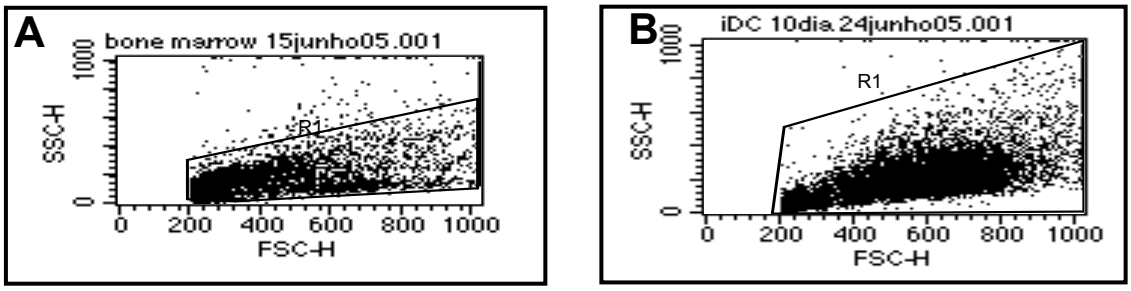


Figura 11. Caracterização morfológica de células de medula e células dendríticas por citometria de fluxo. Tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de: A) células da medula óssea de camundongos Balb/c ex vivo, B) células dendríticas imaturas (iDCs) após 7 dias de cultura celular. Experimento DC-007.

Na Figura 12 verificamos a comparação da expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 e de MHC II entre as diferentes DCs e as células da medula óssea. As células da medula apresentaram uma expressão muito baixa dessas moléculas, ao contrário das DCs. Essa diferença de expressão foi estatisticamante significativa quando as células de medula foram comparadas às mDCs ($p<0,001$ a $0,05$) e também com as iDCs (CD86: $p<0,05$).

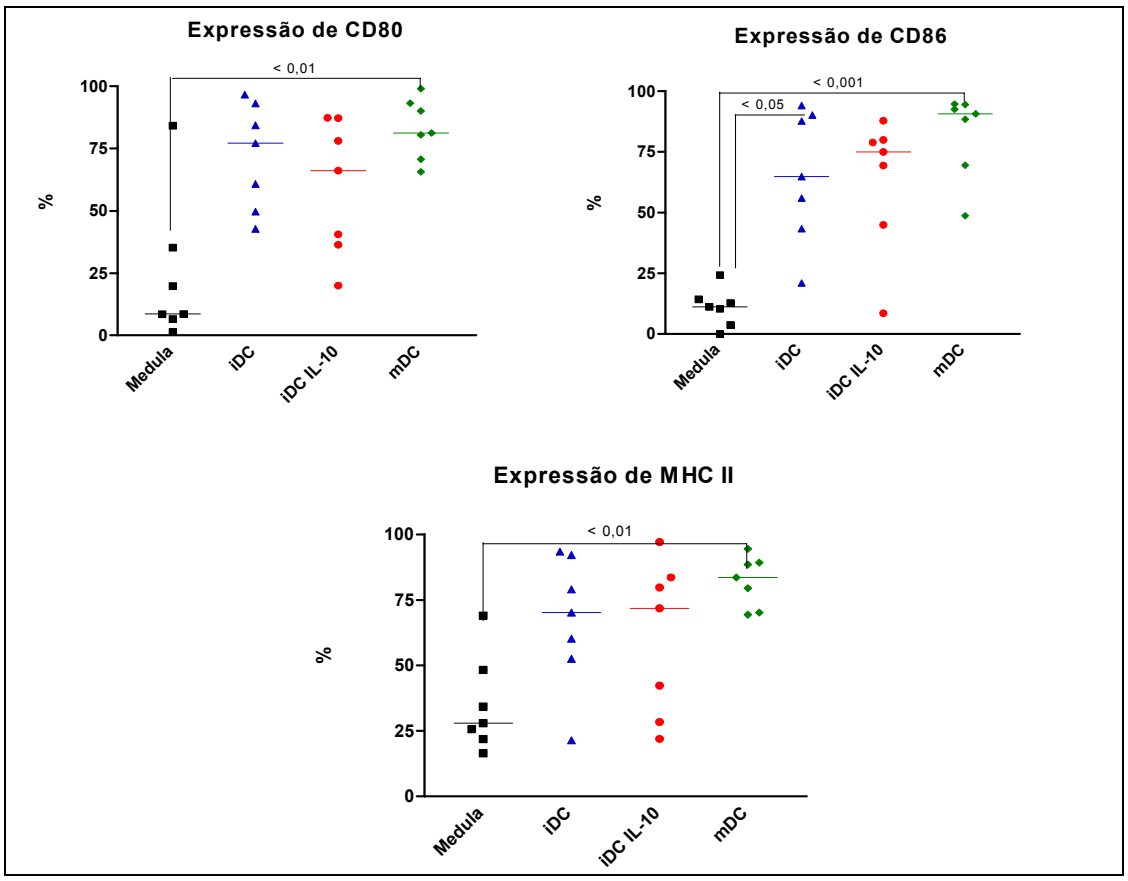


Figura 12. Comparação da expressão de moléculas de superfície CD80, CD86 e MHC II entre as células da medula óssea e as células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). A expressão imunofenotípica foi determinada por citometria de fluxo. Os valores são dados como % de expressão. Os traços são os valores das medianas. Os marcadores utilizados foram: CD80, CD86 e MHC II, todos expressos em maior número nas células dendríticas. n=7. Análise por Kruskal Wallis e teste de Dunn pelo programa GraphPad Prism 3.0.

Avaliamos a contaminação de outros tipos celulares nas culturas de células dendríticas diferenciadas por citometria de fluxo. Em todos os experimentos avaliados (n=9) as marcações para linfócitos e monócitos foram negativas, assim como para macrófagos (anticorpo F4/80). Somente o anticorpo GR-1 (usado para detectar granulócitos) mostrou alguma positividade, ainda que baixa ≤ 11% (Figura 13). Assim, a contaminação dos nossos experimentos foi sempre inferior a 16% apresentando uma pureza ≥ 84%.

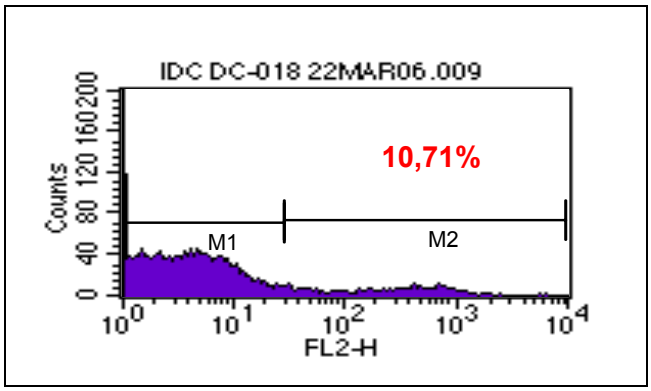


Figura 13. Contaminação com Granulócitos. Histograma da mediana de intensidade de fluorescência e % de positividade para a molécula GR-1 das células dendríticas imaturas (iDCs) obtidas no experimento DC-018. Porcentagem de contaminação com granulócitos = 10,71%.

Durante a otimização do protocolo de diferenciação, testamos diferentes marcas de GM-CSF, de meios de cultura e de LPS usado para geras mDCs, visando sempre aumentar o rendimento e diminuir a morte celular durante o período de cultivo. Após a otimização do protocolo, passamos a trabalhar com um rendimento médio de 39,18%. Porém, esse rendimento foi variável e chegou, em alguns experimentos, a ser > 100%. O cálculo do rendimento (%)

foi feito dividindo-se o número de DCs obtidas x 100 pelo número de células plaqueadas incialmente.

7.3 Caracterização Morfo-Funcional das Células Dendríticas

7.3.1 Caracterização morfológica das DCs

As células dendríticas formam uma população celular morfologicamente muito heterogênea em todos os estados de maturação. As iDCs apresentam, em geral, menos dendritos e mais grossos, enquanto que as mDCs apresentam muito mais dendritos, porém finos e longos (Figura 14 A e B). Já as iDCs IL-10 diferem das iDCs por apresentarem uma forma mais arredondada e menos dendritos (Figura 14C).

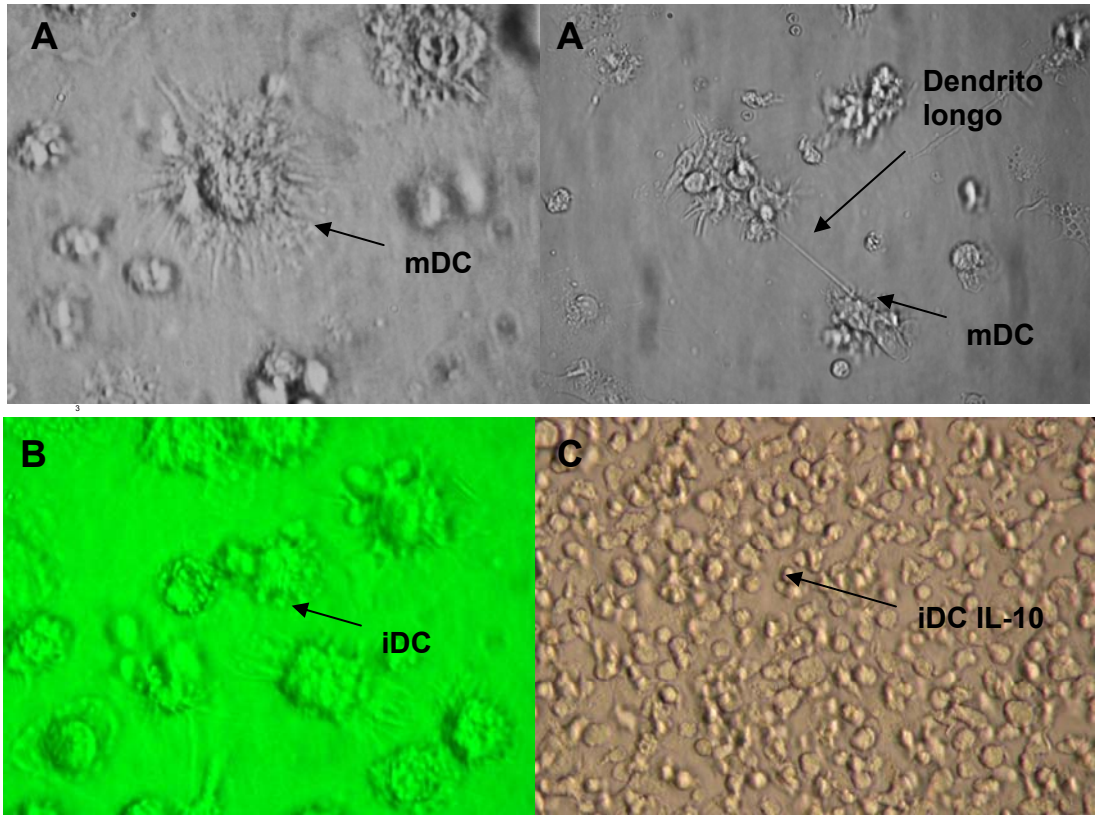


Figura 14. Características morfológicas dos diferentes tipos de células dendríticas. Células no 8º dia de cultura. A) Células dendríticas maduras (mDCs); B) Células dendríticas imaturas (iDCs); C) células dedríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10); Experimento DC-014. Microscópio invetido. Aumentos 400X - 200X.

Através da análise morfológica por citospin, observamos que a heterogeneidade morfológica também ocorre com relação à posição do núcleo e presença de vacúolos no citoplasma das diferentes DCs.

No que concerne as mDCs, estas mostraram diferenças morfológicas notáveis quando comparadas com ambas DCs imaturas. Apresentaram: (i) maior tamanho e volume celular; (ii) núcleo deslocado para a periferia; (iii) citoplasma com numerosos vacúolos; (iv) dendritos curtos e finos; dado oposto ao observado por microscopia ótica para as iDCs (Figura 15 A).

Por outro lado, as DCs imaturas apresentam morfologia celular irregular e aproximadamente o mesmo tamanho e volume celular (Figura 15 B e C). As iDCs apresentaram ainda um núcleo central e uma superfície celular relativamente lisa, com poucas e curtas projeções membranosas e poucos vacúolos citoplasmáticos (Figura 15 B). Já as iDCs tratadas com IL-10 apresentaram tanto células com núcleo periférico ou centralizado, além de um menor número de dendrítos e de um maior número de vacúlos, maior inclusive do que os das mDCs (Figura 15 C).

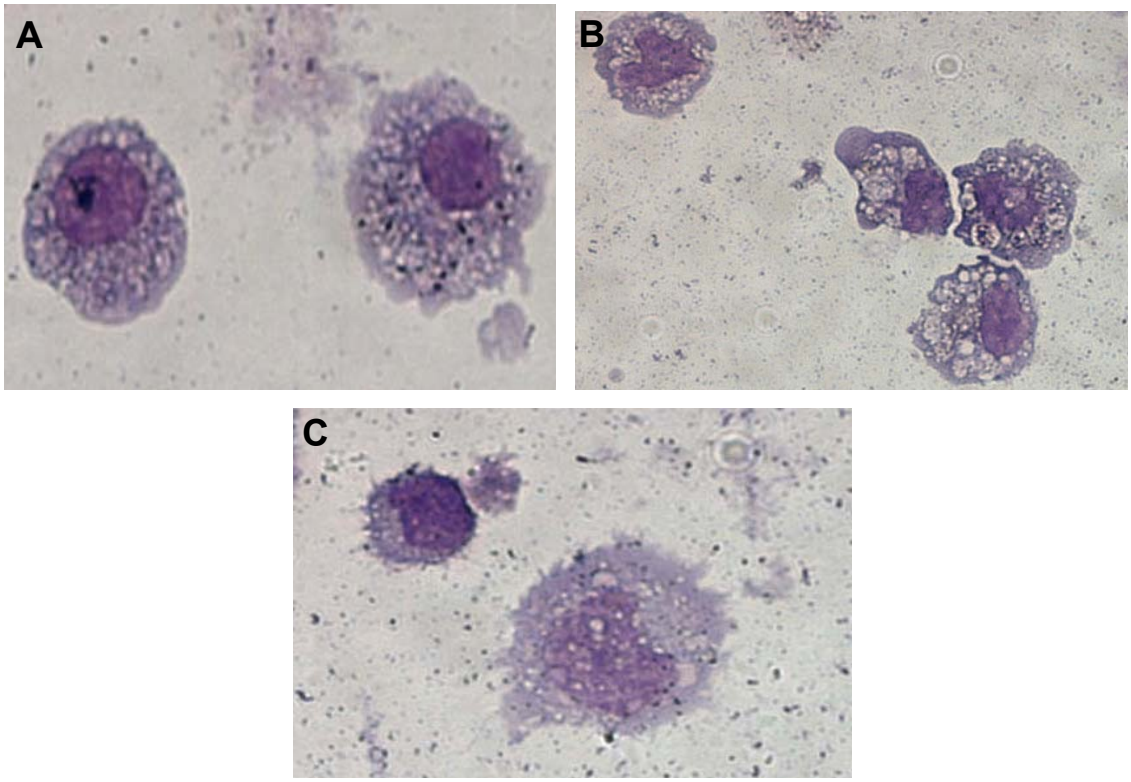


Figura 15. Características morfológicas das iDCs, iDCs tratadas com IL-10 e mDCs de camundongos, geradas *in vitro* a partir de células de medula óssea. (A) Células dendríticas imaturas (iDCs) são esféricas, núcleo central, seus dendritos são pouco evidentes e apresentam vacúolos intracitoplamásticos. (B) Células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) são multiformes e apresentam muitos vacúolos intracitoplasmáticos. (C) Células dendríticas maduras (mDCs) são esféricas, apresentam núcleo periférico, projeções membranosas finas, curtas e numerosas e também possuem muitos vacúolos intracitoplasmáticos. Experimento realizado por Citospin com Giemsa. Aumento 400X.

6.3.2 Caracterização imunofenotípica dos Diferentes tipos de Células Dendríticas

Avaliamos a expressão de algumas moléculas de superfície por citometria de fluxo, de modo a discriminar os diferentes tipos de células dendríticas obtidas, em relação ao seu estado de maturação. Para tal, utilizamos os marcadores descritos na literatura (CD80, CD86, CD40, Ia/Ie - MHC II) e comparamos a % de células positivas e a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) das diferentes DCs. O número de experimentos

realizados (n) variou para os diferentes tipos de DCs estudas em função das diferentes moléculas analisadas (Tabela 3).

As iDCs apresentaram uma menor mediana da % de positividade e MFI para as moléculas de superfície CD80, CD86, CD40 e MHC classe II (Ia/Ie), do que as mDCs (Tabela 3). Já as iDCs tratadas com IL-10 apresentaram uma % de positividade e uma mediana de intensidade de fluorescência (MFI) muito semelhante às encontradas nas iDCs.

Tabela 3. Imunofenotipagem de células dendríticas: medianas das MFI e das porcentagens (%) de positividade de marcadores de superfície celular em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea.

	iDC		iDC IL-10		mDC	
Marcador	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**
CD80	50,27	19,31	41,24	15,06	**64,19**	**36,52**
CD86	55,67	29,96	52,64	19,39	**70,72**	**62,30**
CD40	4,75	2,63	3,50	2,94	**28,14**	**11,55**
Ia/Ie	68,83	77,04	60,95	60,43	**79,12**	**104,62**

Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). CD80: n=26 iDC; n=24 iDC IL-10; n=20 mDC; CD86: n=28 iDC; n=24 iDC IL-10; n=23 mDC; CD40: n=22 iDC; n=19 iDC IL-10; n=16 mDC; MHC II: n=25 iDC; n=23 iDC IL-10; n=20 mDC.O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados como mediana de células marcadas com os diferentes anticorpos monoclonais fluorescentes (%) e como medianas das intensidades de fluorescência (MIF). Em negrito estão as moléculas com maior expressão nas mDC. Não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns (P>0,05).

Quando comparamos as MFI das iDCs com das mDCs, pudemos observar que as mDCs apresentaram valores maiores de expressão para todas as moléculas: (i) 22% maior para CD80; (ii) 21% maior para CD86; (iii) 83% maior para CD40; (iv) 13% maior para Ia/Ie. O mesmo pôde ser observado na compraração entre as MFI das iDCs IL-10 com as mDCs, onde as mDCs também apresentaram maior expressão das diferentes moléculas: (i) 36% maior para CD80; (ii) 26% para CD86; (iii) 88% para CD40; (iv) 23% para Ia/Ie.

No histograma apresentado na Figura 16, observamos o gráfico de sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência de CD80, CD86, CD40 e MHC II entre as iDCs, iDCs IL-10 e mDCs no mesmo experimento (DC-018), bem como dos marcadores de células dendríticas (CD11c e b) e o iodeto de propídeo (% morte celular).

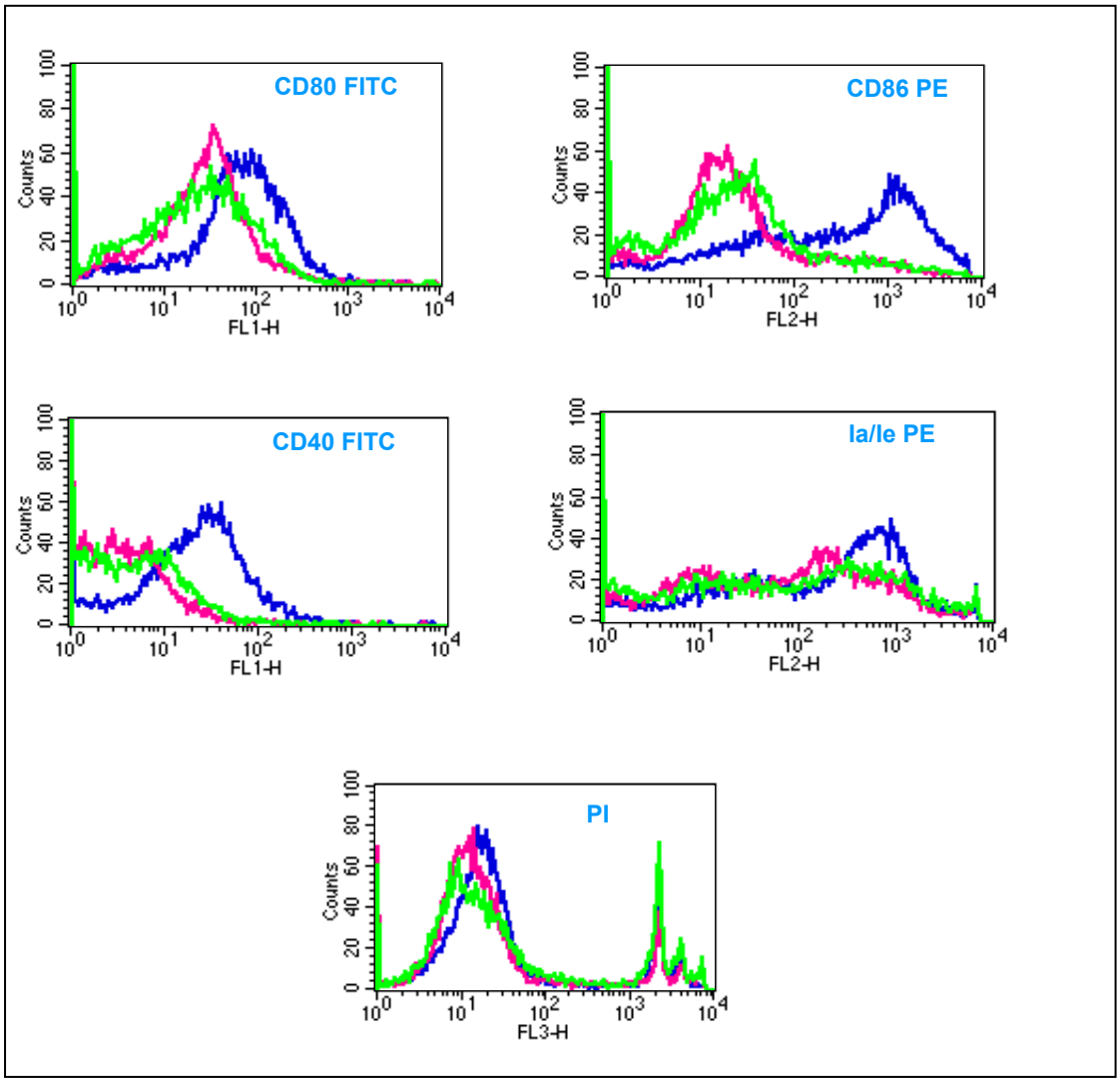


Figura 16. Imunofenotipagem de células dendríticas. Histograma de sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência (MFI) para as moléculas de superfície CD80, CD86, CD40, MHC classe II e PI (iodeto de propídeo). O PI foi usado para verificar a mortalidade celular. iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. Experimento DC-018. iDCs, iDCS IL-10 e mDCs.

Os valores da % de células positivas e da MFI para as moléculas acima mencionadas, para os diversos tipos de DCs foram plotados em dois gráficos apresentados na Figura 17 e 18, respectivamente, bem como as análises estatísticas feitas por compração entre os grupos.

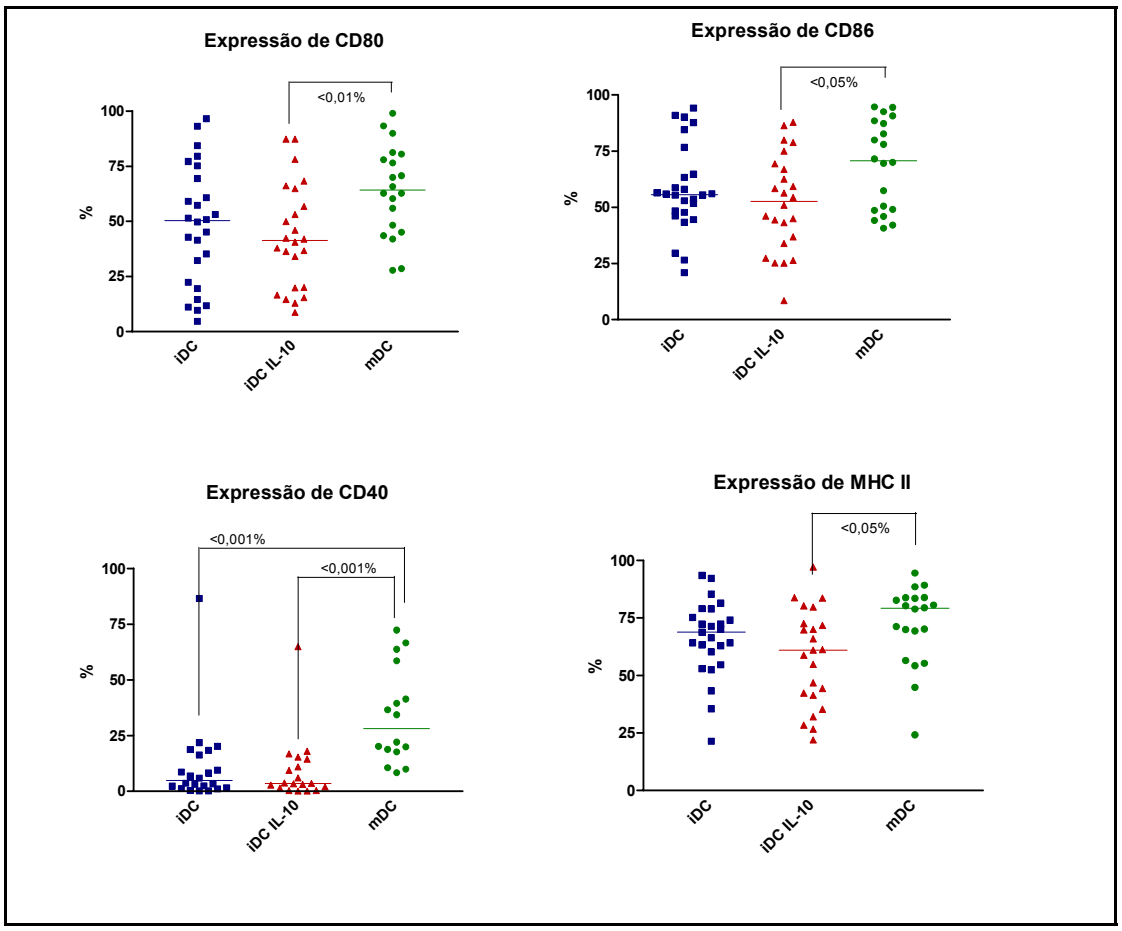


Figura 17. Imunofenotipagem das células dendríticas: % de positividade de células. Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). n= CD80: n=26 iDC; n=24 iDC IL-10; n=20 mDC; CD86: n=28 iDC; n=24 iDC IL-10; n=23 mDC; CD40: n=22 iDC; n=19 iDC IL-10; n=16 mDC; MHC II: n=25 iDC; n=23 iDC IL-10; n=20 mDC. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados como porcentagem de expressão (%). Análises por Kruskal Wallis e teste de Dunn pelo programa GraphPad Prism 3.0.

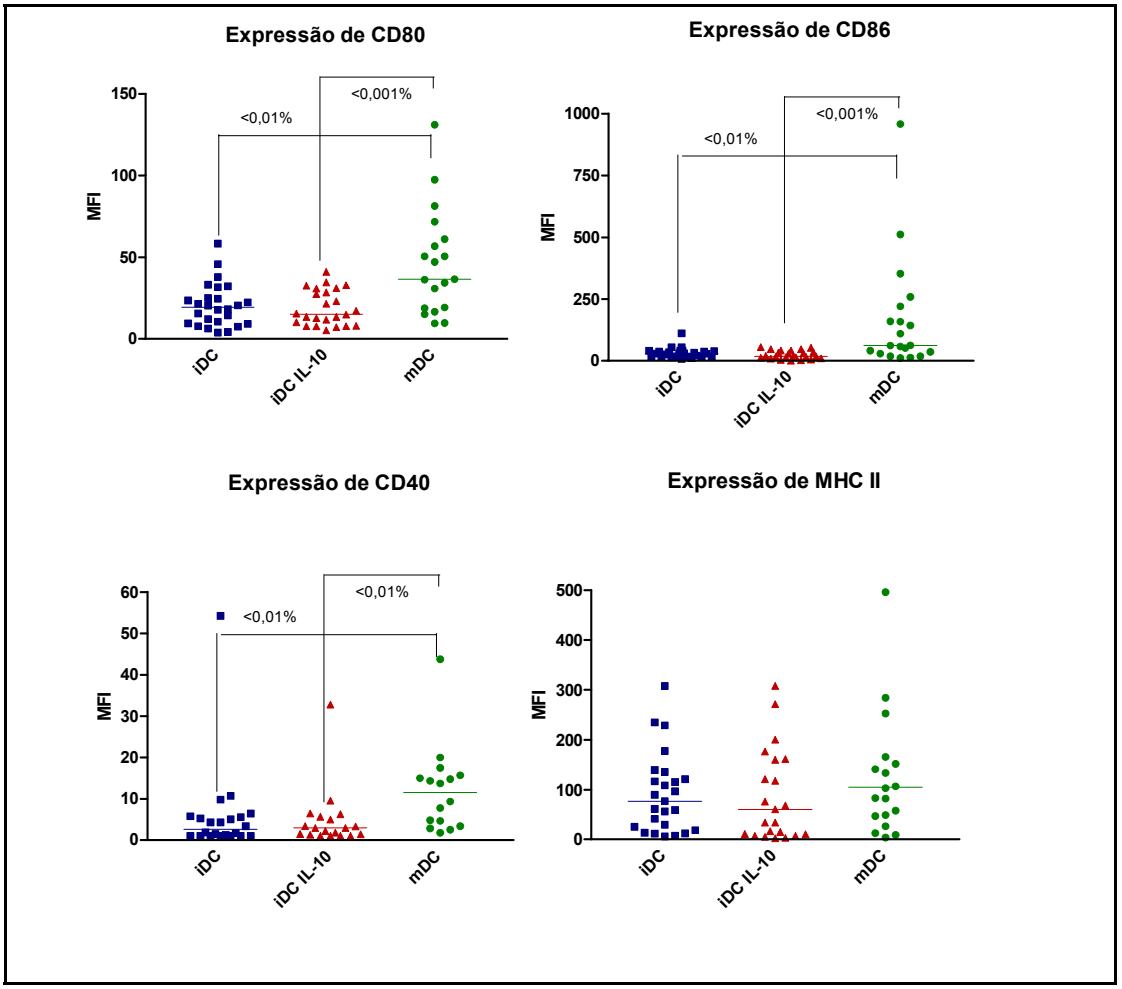


Figura 18. Imunofenotipagem das células dendrítica: intensidade de inumofluorescência (MFI). Caracterização imunofenotípica das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). n= CD80: n=26 iDC; n=24 iDC IL-10; n=20 mDC; CD86: n=28 iDC; n=24 iDC IL-10; n=23 mDC; CD40: n=22 iDC; n=19 iDC IL-10; n=16 mDC; MHC II: n=25 iDC; n=23 iDC IL-10; n=20 mDC. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Análises por Kruskal Wallis e teste de Dunn pelo programa GraphPad Prism 3.0.

Nas Tabelas 4-7 mostramos os valores individuais obtidos por molécula em cada experimento para cada tipo de DC, bem como as médias, desvio padrão e medianas.

Tabela 4. Expressão de CD80 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de CD80 em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea.

Imunofenotipagem de DCs: CD80						
Exp.	**iDC**		**iDC IL-10**		**mDC**	
	%	**MFI all**	**%**	**MFI all**	**%**	**MFI all**
DC-07	77,13	20,35	87,26	31,06	99,01	71,69
DC-08	42,76	20,54	20,03	10,05	93,23	130,97
DC-09	84,32	32,2	40,56	11,55	89,98	81,31
DC-013	93,14	58,29	66,11	32,78	na	na
DC-014	96,59	33,08	87,21	34,6	na	na
DC-016	60,76	18,27	na	na	na	na
DC-017	49,71	14,33	36,32	13,34	70,71	60,98
DC-018	79,47	25,03	78,09	23,05	81,21	56,74
DC-020	41,42	15,54	45,93	17,18	80,46	50,48
DC-021	32,23	9,22	34,03	13,34	65,69	36,52
DC-022	35,23	12,08	37,9	12,64	76,52	46,98
DC-024	19,5	9,47	12,92	7,84	41,94	15,12
DC-028	4,62	4,22	na	na	69,94	36,19
DC-029	69,38	31,62	41,92	32,49	na	na
DC-030	59,04	45,73	53,08	41,05	62,69	50,48
DC-032	75,17	37,86	68,27	30,78	na	na
DC-033	50,82	22,27	49,94	21,48	60,32	30,78
DC-035	57,32	24,58	64,83	28,39	na	na
DC-038	53,15	23,5	56,75	27,38	77,99	97,34
DC-041	45,22	17,78	19,81	7,17	45,03	19,11
DC-042	51,45	21,48	42,3	15,4	55,93	34,29
DC-046	22,39	10,46	36,65	14,72	62,64	*
DC-054	11,76	7,43	8,71	5,19	48,29	18,77
DC-056	11,09	6,26	15,4	7,77	43,52	16,55
DC-057	9,59	3,82	14,54	7,57	28,52	9,47
DC-060	14,65	7,70	16,58	7,70	27,78	9,65
Média	**48,00**	**20,50**	**43,13**	**18,94**	**64,07**	**45,97**
DP	**27,04**	**13,28**	**23,55**	**10,80**	**20,42**	**32,18**
Mediana	**50,27**	**19,31**	**41,24**	**15,06**	**64,19**	**36,52**

Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). n= CD80: n=26 iDC; n=24 iDC IL-10; n=20 mDC. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e % de positividade para a molécula. na= não avaliado. *= erro de detecção.

Tabela 5. Expressão de CD80 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de CD86 em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea.

Imunofenotipagem de DCs: CD86						
Exp.	**iDC**		**iDC IL-10**		**mDC**	
	%	**MFI all**	**%**	**MFI all**	**%**	**MFI all**
DC-07	87,61	29,96	87,75	31,34	94,62	62,08
DC-08	43,29	42,55	74,9	47,83	94,37	958,02
DC-09	90,07	39,95	79,9	18,6	88,41	158,2
DC-013	94,04	31,91	69,36	17,0	na	na
DC-014	20,97	14,86	8,51	1,0	na	na
DC-016	64,73	38,54	na	na	na	na
DC-017	55,85	14,07	44,91	9,65	69,51	41,79
DC-018	84,44	15,96	78,83	20,17	92,47	352,27
DC-020	90,84	42,55	86,25	42,55	90,61	143,3
DC-021	52,94	21,29	36,83	14,72	48,64	19,46
DC-022	44,53	16,4	50,94	20,17	82,67	259,46
DC-024	56,37	34,91	25,09	5,28	42,11	11,97
DC-028	46,17	17,94	na	na	87,18	220,67
DC-029	58,71	28,9	43,1	42,55	na	na
DC-030	56,01	55,23	54,33	52,8	45,96	36,19
DC-032	57,94	33,38	62,46	56,23	na	na
DC-033	29,58	8,35	33,9	9,82	40,66	14,07
DC-035	55,31	55,31	66,75	35,55	na	na
DC-038	55,48	26,9	58,3	33,68	71,51	511,66
DC-041	63,27	37,86	25,24	4,37	49,03	19,46
DC-042	53,62	32,2	44,34	13,46	50,44	58,29
DC-046	47,75	17,78	46,11	16,85	79,86	110,4
DC-054	48,41	18,27	56,32	29,43	77,92	159,63
DC-056	51,83	41,05	26,36	3,25	57,34	51,86
DC-057	76,56	111.4	59,27	47,83	69,93	62,52
DC-060	26,49	11,55	27,35	14,33	44,15	29,69
Média	**58,19**	**29,11**	**51,96**	**24,52**	**68,87**	**164,05**
DP	**19,40**	**13,17**	**21,46**	**16,87**	**19,71**	**227,52**
Mediana	**55,67**	**29,96**	**52,64**	**19,39**	**70,72**	**62,30**

Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). n= CD86: n=28 iDC; n=24 iDC IL-10; n=20 mDC. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e % de positividade para a molécula CD86. □ = maior expressão da MFI de iDCs e/ou iDCs IL-10 em comparação aos valores exibidos pelas mDCs. na= não avaliado. na= não avaliado.

Tabela 6. Expressão de CD80 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de CD40 em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea.

Imunofenotipagem de DCs: CD40						
Exp.	**iDC**		**iDC IL-10**		**mDC**	
	%	**MFI all**	**%**	**MFI all**	**%**	**MFI all**
DC-013	86,53	54,25	64,89	32,78	na	Na
DC-014	6,81	3,4	15,28	2,94	na	Na
DC-016	8,16	4,33	na	na	na	Na
DC-017	3,27	1,51	na	na	58,54	15,68
DC-018	1,12	1,68	3,5	1,81	72,3	19,99
DC-020	0,32	1,0	0	1,0	66,56	14,33
DC-021	2,28	1,0	0,24	1,0	8,3	1,79
DC-022	0,19	1,0	0,24	1,0	39,47	14,72
DC-024	2,47	1,86	1,31	2,25	10,51	2,81
DC-028	0,22	1,0	na	na	18,74	7,77
DC-029	8,61	4,29	3,04	3,43	na	Na
DC-030	20,13	10,7	9,31	6,44	17,63	14,99
DC-032	5,91	5,78	0	3,34	na	Na
DC-035	18,33	9,82	17,96	9,56	na	Na
DC-038	18,69	5,57	14,37	6,32	63,69	43,71
DC-041	21,81	6,44	6,0	2,97	22,03	4,83
DC-042	16,21	5,05	16,8	5,0	36,5	13,7
DC-046	9,41	5,28	10,87	5,67	41,38	17,47
DC-054	3,11	1,0	1,9	1,0	34,24	9,39
DC-056	3,59	1,24	3,37	1,27	19,87	4,68
DC-057	1,62	1,00	2,76	1,41	20,13	3,43
DC-060	1,13	1,00	3,63	1,46	9,92	2,55
Média	**10,91**	**5,83**	**9,24**	**4,77**	**33,74**	**11,99**
DP	**18,34**	**11,20**	**14,79**	**7,19**	**21,49**	**10,39**
Mediana	**4,75**	**2,63**	**3,50**	**2,94**	**28,14**	**11,55**

Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). n= CD40: n=22 iDC; n=19 iDC IL-10; n=16 mDC. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e % de positividade para a molécula CD40. ☐ = maior expressão da MFI de iDCs e/ou iDCs IL-10 em comparação aos valores exibidos pelas mDCs. na= não avaliado.

Tabela 7. Expressão de CD80 em células dendríticas: MFI e porcentagens (%) de positividade de MHC II em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea.

Imunofenotipagem de DCs: MHC II						
Exp.	**iDC**		**iDC IL-10**		**mDC**	
	%	**MFI all**	**%**	**MFI all**	**%**	**MFI all**
DC-007	93,42	177,83	97,12	76,35	94,47	495,81
DC-008	79,05	135,77	83,56	271,39	89,22	140,75
DC-009	70,17	307,81	71,77	176,24	79,42	736,53
DC-013	92,14	29,69	28,4	11,14	na	Na
DC-014	21,42	7,64	21,92	3,34	na	Na
DC-016	60,22	41,42	na	na	na	Na
DC-017	52,51	11,97	42,3	6,85	70,2	46,98
DC-018	na	na	na	na	83,46	102,74
DC-020	85,26	12,4	79,71	199,89	88,5	133,35
DC-021	72,25	235,01	72,48	159,63	69,34	106,5
DC-022	71,26	115,48	80,25	161,08	83,83	283,87
DC-024	64,15	89,77	32,03	5,23	44,78	12,75
DC-028	75,17	108,43	na	na	80,52	165,48
DC-029	66,34	59,35	54,78	120,79	na	Na
DC-030	64,18	228,76	70,04	716,92	55,24	57,77
DC-032	62,92	18,64	65,88	117,57	na	Na
DC-033	35,45	6,04	35,3	7,37	24,2	4,03
DC-035	72,27	77,04	69,77	60,43	na	Na
DC-038	63,21	61,53	60,95	67,93	78,82	2147,99
DC-041	54,63	56,23	26,66	2,44	54,18	26,69
DC-042	43,32	13,7	41,31	10,27	56,5	82,79
DC-046	52,91	25,48	44,37	15,4	80,25	252,55
DC-054	74,01	96,47	83,76	307,81	83,81	9,39
DC-056	68,83	120,79	46,77	16,25	71,24	82,05
DC-057	81,42	139,49	61,23	33,68	82,66	151,25
DC-060	78,93	116,52	58,78	33,98	69,94	49,14
Média	**66,22**	**91,73**	**57,79**	**112,26**	**72,03**	**254,42**
DP	**16,63**	**79,76**	**21,08**	**159,64**	**17,35**	**480,36**
Mediana	**68,83**	**77,04**	**60,95**	**60,43**	**79,12**	**104,62**

Imunofenotipagem de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC). n= MHC II: n=25 iDC; n=23 iDC IL-10; n=20 mDC. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados em mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e % de positividade para a molécula MHC de classe II. ☐ = maior expressão de MFI de iDCs e/ou iDCs IL-10 em comparação aos valores exibidos pelas mDCs. na= não avaliado.

Quando avaliamos os experimentos individualmente, pudemos perceber que em alguns experimentos, algumas das moléculas expressas pelas iDCs e/ou iDCs IL-10 apresentaram uma MFI mais alta do que nas

mDCs. Observamos que para a molécula: (i) CD80: a expressão foi sempre maior nas mDCs; (ii) CD86: em 5 de 26 experimentos tivemos maior expressão de MFI para iDCs e 1 de 24 em iDCs IL-10; (iii) CD40: em 1 de 22 experimentos tivemos maior expressão para iDCs; (iv) MHC II: em 8 de 25 experimentos tivemos maior expressão nas iDCs e em 5 de 23 nas iDCs IL-10 (Tabelas 4-7).

7.3.3 Indução de estabilidade do fenótipo imaturo das DCs

A estabilidade do fenótipo imaturo nas iDCs tratadas com IL-10 foi testada desafiando-se estas células com LPS na mesma concentração e tempo que foram usados para amadurecer as mDCs (200ng/ml por 48h). Conforme pode ser observado na Figura 19, as dendríticas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) mantiveram seu fenótipo imaturo após o desafio com LPS.

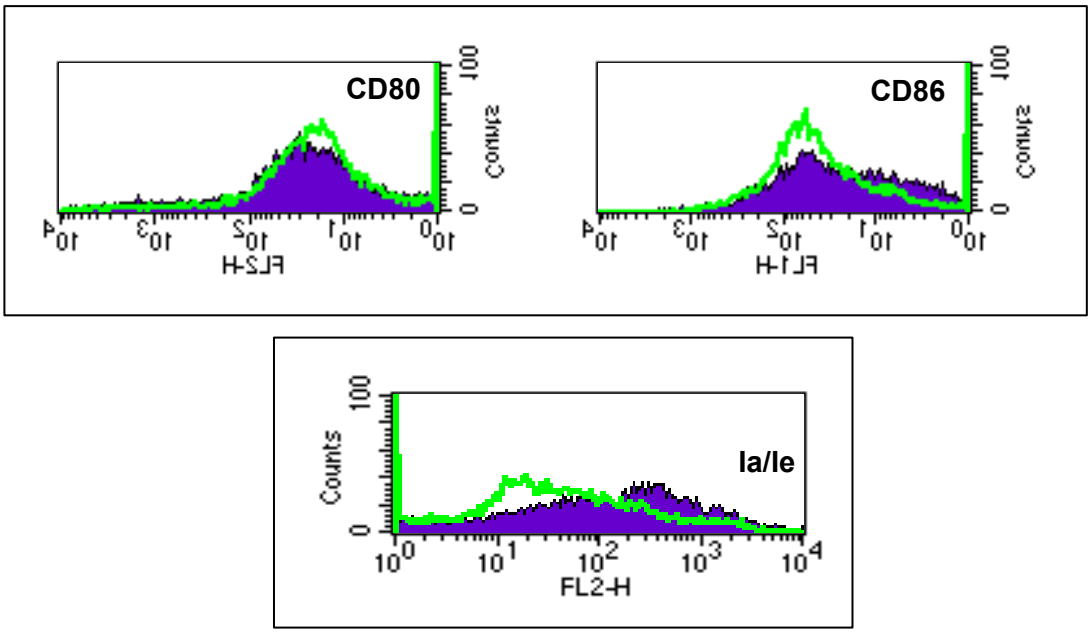


Figura 19. Estabilidade de fenótipo imaturo das iDCs IL-10. Mediana de intensidade de fluorescência das moléculas **CD80, CD86 e MHC** de classe II, marcadores que diferenciam células dendríticas maduras de imaturas. Todos os histogramas mostram que as iDCs IL-10 e iDCS IL-10 após incubação com LPS apresentam a mesma intensidade de fluorescência para estes marcadores. Um experimento representativo de 3.

Além disso, na Tabela 8 podemos observar os valores da mediana dos 3 experimentos para cada molécula coestimuladora e MHC II, nas iDCs IL-10 e iDCs IL-10 desafiadas com LPS. Notamos que tanto a mediana da % de positividade como a da MFI das iDCs IL-10 desafiadas com LPS, foram similares ou inferiores às obtidas para as iDCs IL-10 e inferiores às obtidas para as mDCs. Este dado confirma, mais uma vez, a estabilização do imunofenótipo imaturo das iDCs IL-10.

Tabela 8. Estabilidade do imunofenótipo das iDCs IL-10: medianas de intensidade de fluorescência e porcentagem (%) de positividade de moléculas coestimuladoras e MHC II, em células dendríticas murinas derivadas, *in vitro*, de medula óssea.

	iDC IL-10		iDC IL-10 pós LPS		mDC	
Marcador	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**
CD80	40,56	**11,55**	61,25	**15,12**	64,19	**36,52**
CD86	79,90	**31,34**	11,03	**10,27**	70,72	**62,30**
Ia/Ie	83,56	**176,24**	57,98	**30,51**	79,12	**104,62**

Estabilidade imunofenotípica das células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10), iDCs IL-10 desafiadas com LPS em comparação com as maduras (mDC). n=3. O imunofenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Os valores são dados como mediana de % de positividade de células marcadas com os diferentes anticorpos monoclonais fluorescentes e como medianas das intensidades de fluorescência (MIF). Observamos que as iDCs IL-10, mesmo após estímulo com LPS, mantiveram baixa expressão das moléculas estudadas.

7.3.4 Avaliação da Produção Espontânea de Citocinas pelos diferentes tipos de Células Dendríticas.

Para determinar se há um perfil diferencial de citocinas secretadas espontaneamente pelos diferentes tipos de DCs (iDCs, iDCs IL-10 e mDCs, n=14), analisamos a presença de citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2 e TGF-β) nos sobrenadantes de culturas celulares após 48h

sem estímulo exógeno, por citometria de fluxo, em ensaios de CBA (*Cytometric Bead Array*) e ELISA (para TGF-β). O número de experimentos avaliados variou entre algumas citocinas, sendo: n=13 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ); n=2 para o TGF-β; n=6 (IL-10, IL-12 e IL-6).

Na Figura 20, podemos observar um exemplo de gráfico ilustrando a produção de citocinas de células dendríticas através do método de CBA.

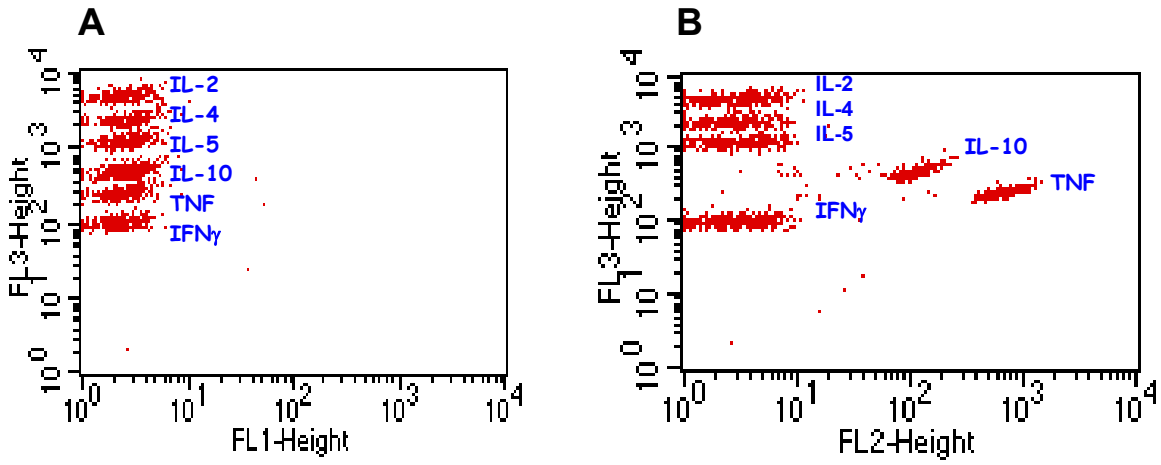


Figura 20. Exemplo de produção positiva de citocinas por células dendríticas murinas pela ensaio de CBA. A) controle negativo; B) um exemplo de detecção das citocinas IL-10 e TNF em sobrenadante de cultura de células dendríticas por CBA (*Cytometric Bead Array*). Foram realizados 8 experimentos com os três tipos de DCs (iDCs, iDCs IL-10 e mDCs). Limites de detecção do ensaio: 20pg/ml a 5000 pg/ml.

Tabela 9. Produção espontânea de citocinas por DCs.

	IFNγ			TNF-α			IL-10			IL-6			IL-5			IL-4			IL-2			IL-12 p70			TGF-β		
	iDC			iDC			iDC			iDC			iDC			iDC			iDC			iDC			iDC		
Exp.	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC	iDC	IL-10	mDC
DC07	*	*	*	30,1	24,9	*	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC08	*	*	*	*	*	20,2	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC09	*	*	*	35,2	33,2	41,9	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC13	*	*	*	*	*	*	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC17	*	*	*	*	*	*	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC18	*	*	*	23,4	42,6	*	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC19	*	*	*	39,7	*	27,6	Na	na	na	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na	na	na	na
DC22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	23,7	*	558,9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na
DC22b	*	*	*	*	*	*	29	29,1	28,1	*	*	85,7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na
DC-24	na	na	*	na	na	*	Na	na	25,8	na	na	*	na	na	*	na	na	*	na	na	*	na	na	*	na	na	na
DC-29	*	*	*	*	*	67.0	36,7	93,9	226	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	na
DC56	*	*	*	*	*	24,3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC57	*	*	*	*	*	*	24,7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DC57b	*	*	/	*	*	/	*	*	/	550,2	*	/	*	*	/	*	*	/	*	*	/	*	*	--	na	na	na
Média	*	*	*	32,1	33,6	36,2	30,1	61,5	93,3	287	*	322,3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	*	*	*	*
Mediana	*	*	*	32,7	33,2	26	29	61,5	28,1	287	*	322,3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	na	na	*	*	*	*
DP	*	*	*	7,0	8,9	9,4	6,1	45,8	114,9	372,3	*	334,6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Quantidade de citocinas produzidas espontaneamente por células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC), em sobrenadantes de cultura celular coletados após 48h de cultura sem antígenos exógenos. Detecção por CBA (*Cytometric Beads Array*) e ELISA (TGF-β). Valores dados em pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção para CBA= 20pg/ml e 5000 pg/ml; para ELISA para TGF-β: 32 – 1000pg/ml. Foram consideradas negativas as produções abaixo dos valores mínimos de detecção das técnicas. n=14 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ); n=2 para o TGF-β; n=7 (IL-10, IL-12 e IL-6). Exp.= experimento. na= não avaliado. *= produção abaixo do limite de detecção da técnica./ -= valores não determinados por problemas de aquisição.

No geral, pudemos observar que a produção das citocinas avaliadas esteve abaixo do limite de detecção dos nossos testes e nenhum padrão específico foi detectado para qualquer um dos tipos de DCs. Somente três citocinas foram produzidas espontaneamente pelas DCs: IL-6, IL-10 e TNF-α.

A citocina que foi mais freqüentemente detectada foi TNF-α, sendo produzida por pelo menos um tipo de DC em 7/14 experimentos avaliados (Tabela 9). Houve uma maior positividade de produção do TNF-α pelas mDCs (5/14 experimentos) do que por iDC (4/14) ou iDC IL-10 (3/14). Os níveis de TNF-α secretados foram bem semelhantes entre os três tipos de DCs.

Com relação à produção da citocina IL-6 a mediana do nível das mDCs [322,3 pg/ml (2/6)] foi um pouco superior àquele das iDCs [287,0 pg/ml (2/6)], enquanto que as iDCs IL-10 não tiveram produção de IL-6 detectável (6/6).

Já para a citocina IL-10, a produção foi baixa em todos os tipos de DCs, com as medianas de: iDCs IL-10 [61,5pg/ml (3/6)], iDCs [29pg/ml (2/6)] e mDCs [28,1pg/ml (3/6)].

Os gráficos da Figura 21 ilustram a quantidade (pg/ml) das citocinas produzidas espontaneamente nos 14 experimentos avaliados.

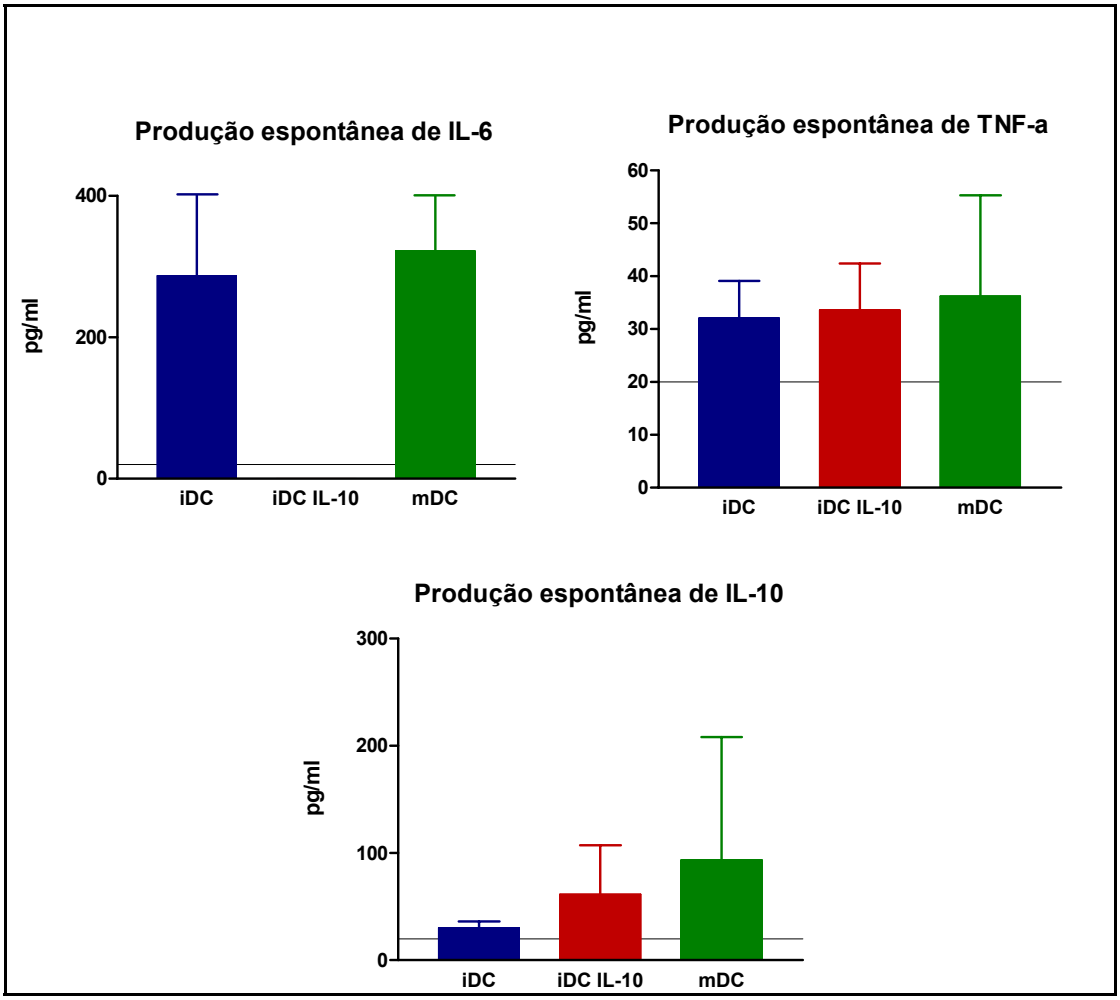


Figura 21. **Produção espontânea média de TNF-α, IL-10 e IL-6 pelas diferentes DCs.** Produção espontânea de citocinas pelos três tipos de DCs, em sobrenadante de cultura celular após 48 horas, dosadas por CBA. n=14 (TNF-α) n=6 (IL-6 e IL-10). Limite de detecção: 20pg/ml a 5000pg/ml. T= representa o desvio padrão da média em pg/ml de cada DC para cada citocina avaliada.

7.3.5 Avaliação da resposta linfoproliferativa alogenéica – MLR induzida pelos diferentes tipos de células dendríticas.

Com o intuito de observar se os diferentes tipos de DCs diferiam quanto à indução de uma resposta proliferativa em cultura linfocitária mista (MLR – do inglês, "mixed lymphocyte reaction") analisamos coculturas de iDCs ou iDCs IL-10 ou mDCs com linfócitos T alogenéicos. Após 72 h de cultura com e sem estímulo de αCD3 (controle positivo) medimos a

incorporação de timidina nas últimas 18h de cultura (n=4). A proliferação foi considerada positiva quando apresentou índice de estimulação (I.E.) $\geq$ 2. O índice de estimulação foi calculado dividindo-se as cpm (contagens por minuto) das coculturas (DC+LTalo) pelas cpm das DCs ou LT, dependendo de qual apresentasse os maiores valores de cpm.

Conforme podemos observar na Tabela 10, os 3 tipos de DCs foram capazes de induzir proliferação dos LT alogenéicos, no entanto, com intensidade variável. As coculturas com iDCs induziram proliferação de LT em 5/5 experimentos com uma média de índice de estimulação = 3,1. Já as mDCs foram capazes de induzir proliferação de LT em 4/4 experimentos, com uma média de índice de estimulação = 17,7; ou seja, um índice médio 6x maior que o das iDCs. Por fim, as iDCs IL-10 só foram capazes de induzir proliferação em 1 de 5 experimentos e com um baixo índice de estimualção= 2,7.

Como o esperado, nas condiçôes com o controle positivo (estímulo policlonal com anticorpo αCD3) vimos que os índices de estimulação aumentaram com a maioria das DCs. Porém, com as mDCs houve maior proliferação do que com as iDCs e estas maiores do que com as iDCs IL-10. (Figura 22).

Tabela 10. MLR: resposta proliferativa de linfócitos T alogenéicos às diferentes células dendríticas.

	Experimentos									
Células	**DC17**		**DC18**		**DC19**		**DC24**		**Média**	
	Com	**I.E.**	**cpm**	**I.E.**	**cpm**	**I.E.**	**cpm**	**I.E.**	**cpm**	**I.E.**
iDC	467,2	--	330,7	--	1302,2	--	355,3	--	613,9	--
iDC + LT	2973,3	**4,4**	2153,5	**3,1**	2662,0	**2,0**	1712,7	**3,6**	2375,4	**3,3**
iDC + LT + αCD3	19133,3	**6,4**	24319,9	**11,3**	55768,1	**21,0**	2192,1	1,3	25353,4	**10**
iDC IL-10	162,5	--	565,6	--	550,8	--	369,7	--	412,2	--
iDC IL-10 + LT	783,9	1,2	1107,6	1,6	2145,1	**2,7**	746,4	1,6	1195,8	**1,8**
iDC IL-10 +LT + αCD3	6586,0	**8,4**	3498,4	**3,2**	49671,6	**23,2**	784,9	1,1	15135,2	**9**
mDC	353,7	--	279,7	--	281	--	402,6	--	329,3	--
mDC + LT	19364,5	**28,8**	13856,7	**20,0**	13067,5	**16,5**	2686,1	**5,6**	12243,7	**17,7**
mDC + LT + αCD3	103925,9	**5,4**	169657,4	**12,2**	5336,1	0,4	10592,6	**3,9**	72378	**5,5**
LT	673,1	--	693,3	--	792,4	--	480,8	--	659,9	--
LT + αCD3	9294,0	**13,8**	1138,3	1,6	29010,1	**36,6**	631,7	1,3	10018,5	**13,3**

A alorreatividade às DCs (DC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos LT ou das DCs sozinhas, dependendo de quem apresentasse maiores cpm. Índice de estimulação (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. n=4. -- = não se aplica. negrito= valores de proliferação positivos. LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas, iDC IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10, mDC= células dendríticas maduras.

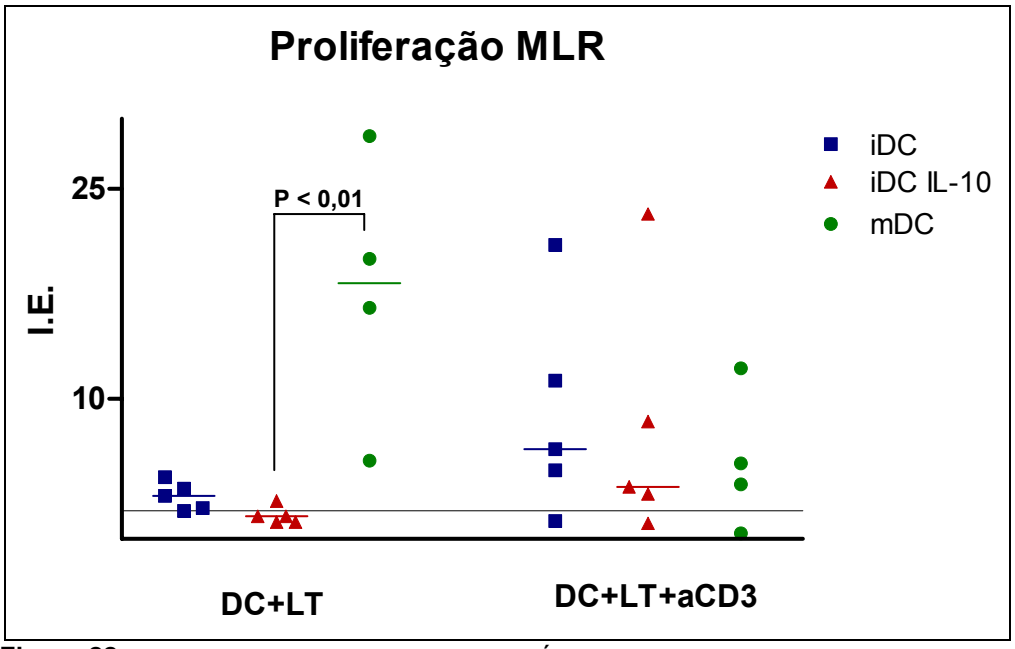


Figura 22. Proliferação alogenéica – MLR. Índices de estimulação da proliferação alogenéica nas coculturas de células dendríticas imaturas (iDCs), células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e células dendríticas maduras (mDCs) frente a linfócitos T alogenéicos e ao controle positivo com αCD3. Valores considerados positivos para I.E. ≥ 2. n=4.Teste estatístico realizado: Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns (p significativo < 0,01).

7.4 Efeito dos Fragmentos da Hsp60 nas Células Dendríticas

7.4.1 Avaliação do efeito dos fragmentos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nos diferentes tipos de células dendríticas.

As DCs foram incubadas com os fragmentos da Hsp60 por 48 h e analisadas por citometria de fluxo, conforme descrito no tópico de material e métodos.

O número de experimentos realizados (n) variou para os diferentes tipos de DCs estudadas e para as diferentes moléculas de superfície, em função da disponibilidade de material biológico, assim: (i) iDCs não tratadas: n total = 15; (ii) iDCs tratadas com o peptídeo p277: n total=15; (iii) iDCs tratadas com o peptídeo N7: n total =8; (iv) iDCs tratadas com C-Hsp60: n total=13; (v) iDCs-IL-10 não tratadas: n total=13; (vi) iDCs-IL-10 tratadas com o peptídeo p277: n total=13; (vii) iDCs-IL-10 tratadas com o peptídeo N7: n total=8 (CD80: 7); (viii) iDCs-IL-10 tratadas com C-Hsp60: n total=11; (ix) mDCs não tratadas: n total=13; (x) mDCs tratadas com o peptídeo p277: n total=13; (xi) mDCs tratadas com o peptídeo N7: n total=6; (xii) mDCs tratadas com C-Hsp60: n total=10.

Os nossos resultados foram analisados de 2 formas: individualmente e em conjunto (medianas dos valores de MFI). Na análise individual de cada experimento, verificamos a freqüência de modificação na expressão das moléculas estudadas. Já na análise em conjunto dos resultados, fizemos comparações entre as medianas dos valores de MFI de todos os experimentos, dando destaque às modificações mais dominantes, com e sem os fragmentos da Hsp60.

- *Análise Individual dos Experimentos*

Analisando as Tabelas 11-13, observamos que as MFI para CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I tiveram aumento ou diminuição da sua expressão pela ação dos diferentes fragmentos da Hsp60, nos diferentes tipos de DCs. Consideramos aumento da expressão quando a MFI aumentou

≥ 40% e diminuição quando diminuiu ≥ 40%, ambos em relação às células não tratadas.

Na análise individual dos experimentos consideramos apenas a MFI. Acreditamos que esta possa ser mais informativa, uma vez que a expressão dessas moléculas de superfície pode ter alteração apenas na intensidade de fluorescência sem necessariamente ter modificação na percentagem de células positivas.

Em relação ao peptídeo N7, no geral, tivemos 23 inibições e somente 8 aumentos em 112 condições avaliadas (n total=112) com este peptídeo. As modificações com os diferentes tipos de DCs e diferentes moléculas estudadas, foram: (i) **CD80**: iDCs: 1/8 inibição; iDCs IL-10: 1/7 aumento e 1/7 inibição; (ii) **CD86**: iDCs: 6/8 inibições, iDC IL-10: 2/8 aumentos e 1/8 inibição, mDC: 1/6 aumento e 1/6 inibição (chegando ao mesmo nível de expressão das iDCs); (iii) **CD40**: iDC: 2/8 inibições, iDC IL-10: 1/8 inibição, mDC: 2/7 aumentos; (iv) **MHC II**: iDC: 4/8 inibições, iDC IL-10: 1/8 aumento (chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 1/8 inibição; (v) **MHC I**: iDC: 1/8 inibição, iDC IL-10: 4/8 inibições (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito do peptídeo N7 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD80

Exp.	Molécula	iDC		iDC N7			iDC-IL-10		iDC IL-10 N7			mDC		mDC N7		
	CD80	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-030		59,04	45,73	67,75	57,77		53,08	41,05	49,18	38,02		62,69	50,48	59,76	48,70	
DC-035		57,32	24,58	34,85	16,25		64,83	28,39	42,05	18,43		na	na	na	na	
DC-038		53,15	23,50	45,15	19,63		na	na	na	na		77,99	97,34	74,37	61,53	
DC-041		45,22	17,78	35,04	14,59		19,81	7,17	18,71	8,20		45,03	19,11	38,54	15,12	
DC-048		66,20	30,78	65,27	31,62		60,69	26,42	40,64	15,68	-40,65	77,01	108,43	73,63	85,05	
DC-056		11,09	22,88	11,47	6,92	-69,70	15,50	7,77	13,49	7,91		43,52	16,55	40,86	15,40	
DC-057		9,59	3,82	14,56	5,03		14,54	7,57	12,94	7,43		28,52	9,47	33,15	10,75	
DC-060		14,65	7,70	20,99	9,14		16,58	7,70	24,35	10,84	46.86	27,78	9,65	/	/	
	Mediana	**49,2**	**23,2**	**34,9**	**15,4**		**19,8**	**7,8**	**24,4**	**10,8**		**45,0**	**19,1**	**50,3**	**32,1**	
	Valor mín.	**9,6**	**3,8**	**11,5**	**5,0**		**14,5**	**7,2**	**12,9**	**7,4**		**27,8**	**9,5**	**33,2**	**10,8**	
	Valor máx.	**66,2**	**45,7**	**67,8**	**57,8**		**64,8**	**41,1**	**49,2**	**38,0**		**78,0**	**108,4**	**74,4**	**85,1**	

Expressão de CD86

Exp.	Molécula	iDC		iDC N7			iDC-IL-10		iDC IL-10 N7			mDC		mDC N7		
	CD86	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-030		56,01	55,23	41,50	32,49	-41,17	54,56	52,80	54,56	43,32		45,96	36,19	30,02	18,60	-48,60
DC-035		55,31	55,31	50,57	20,35	-63,21	54,23	35,55	54,23	54,23	52,55	na	na	na	na	
DC-038		55,48	26,90	40,37	15,12	-43,79	53,97	33,68	53,97	25,03		71,51	511,66	69,67	321,97	
DC-041		63,27	37,86	48,16	18,60	-50,87	22,78	4,37	22,78	3,75		49,03	19,46	48,97	18,60	
DC-048		80,38	145,90	78,37	78,44	-46,24	50,08	59,89	50,08	20,54	-65,70	78,85	802,23	82,82	1382,37	72,32
DC-056		51,83	41,05	45,34	24,58	-40,12	26,36	3,25	25,73	12,86	74,72	57,34	51,86	33,80	1,22	
DC-057		76,56	111.4	71,47	84,29		59,27	47,83	60,59	48,70		69,93	62,52	66,47	60,43	
DC-060		26,49	11,55	33,84	19,46		27,35	14,33	40,29	22,88		44,15	29,69	/	/	
	Mediana	**55,7**	**41,1**	**46,8**	**22,5**		**52,0**	**34,6**	**52,0**	**24,0**		**57,3**	**51,9**	**57,7**	**39,5**	
	Valor mín.	**26,5**	**11,6**	**33,8**	**15,1**		**22,8**	**3,3**	**22,8**	**3,8**		**44,2**	**19,5**	**30,0**	**1,2**	
	Valor máx.	**80,4**	**145,9**	**78,4**	**84,3**		**59,3**	**59,9**	**60,6**	**54,2**		**78,9**	**802,2**	**82,8**	**1382,4**	

Continuação Tabela 11. Efeito do peptídeo N7 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD40

Exp.	Molécula	iDC		iDC N7			iDC-IL-10		iDC IL-10 N7			mDC		mDC N7		
	CD40	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI all	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-030		20,13	10,70	4,44	5,78	-45,98	9,31	6,44	2,63	5,52		17,63	14,99	17,86	17,31	
DC-035		18,33	9,82	10,60	7,99		17,96	9,56	11,53	11,53		na	na	na	na	
DC-038		18,69	5,57	8,95	4,22		14,37	6,32	12,78	5,83		63,69	43,71	57,73	31,62	
DC-041		21,81	6,44	8,99	4,66		6,00	2,97	3,41	2,81		22,03	4,83	32,61	7,84	62,32
DC-048		40,44	12,98	20,62	6,02	-53,62	25,35	8,66	14,34	4,96	-42,73	58,17	37,18	68,85	56,23	51,24
DC-056		3,59	1,24	3,70	1,67		3,37	1,27	3,35	2,10		19,87	4,68	20,45	4,07	
DC-057		1,62	1,00	1,56	1,00		2,76	1,41	2,19	1,00		20,13	3,43	18,65	3,72	
DC-060		1,13	1,00	4,42	1,73		3,63	1,46	4,78	1,22		9,92	2,55	/	/	
	Mediana	**18,5**	**6,0**	**6,7**	**4,4**		**7,7**	**4,6**	**4,1**	**3,9**		**20,1**	**4,8**	**26,5**	**12,6**	
	Valor mín.	**1,1**	**1,0**	**1,6**	**1,0**		**2,8**	**1,3**	**2,2**	**1,0**		**9,9**	**2,6**	**17,9**	**3,7**	
	Valor máx.	**40,4**	**13,0**	**20,6**	**8,0**		**25,4**	**9,6**	**14,3**	**11,5**		**63,7**	**43,7**	**68,9**	**56,2**	

Expressão de MHC II

Exp.	Molécula	iDC		iDC N7			iDC-IL-10		iDC IL-10 N7			mDC		mDC N7		
	MHC II	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-030		64,18	228,76	66,06	224,68		70,04	716,92	78,67	604,30		na	na	na	na	
DC-035		72,27	77,04	67,10	52,80		69,77	60,43	67,28	67,28		na	na	na	na	
DC-038		63,21	61,53	63,74	51,86		60,95	67,93	62,38	53,28		78,82	2147,99	78,89	1963,05	
DC-041		54,63	56,23	51,45	26,90	-52,16	26,66	2,44	28,93	3,13		54,18	26,69	56,64	34,91	
DC-048		24,93	457,25	25,52	250,29	-45,26	34,33	52,80	51,19	18,43	-65,09	24,86	763,51	22,20	1175,74	53,99
DC-056		68,83	120,79	66,04	72,99	-40,00	46,77	16,25	45,23	15,54		71,24	82,05	69,65	84,29	
DC-057		81,42	139,49	81,16	145,90		61,23	33,68	69,26	52,33		82,66	151,25	79,15	88,96	-58,81
DC-060		78,93	116,52	69,42	58,29	-50,00	58,78	33,98	79,15	116,52	71,35	69,94	49,14	/	/	
	Mediana	**66,5**	**118,7**	**66,1**	**65,6**		**59,9**	**43,4**	**64,8**	**52,8**		**70,6**	**116,7**	**69,7**	**89,0**	
	Valor mín.	**24,9**	**56,2**	**25,5**	**26,9**		**26,7**	**2,4**	**28,9**	**3,1**		**24,9**	**26,7**	**22,2**	**34,9**	
	Valor máx.	**81,4**	**457,3**	**81,2**	**250,3**		**70,0**	**716,9**	**79,2**	**604,3**		**82,7**	**2148,0**	**79,2**	**1963,1**	

Continuação Tabela 11. Efeito do peptídeo N7 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de MHC I

Exp.	Molécula	iDC		iDC N7			iDC IL-10		iDC IL-10 N7			mDC		mDC N7		
	MHC I	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-030		63,04	62,64	48,38	38,54		67,58	72,34	52,53	42,55	-41,18	na	na	na	na	
DC-035		74,95	50,54	50,44	21,87	-56,73	84,42	77,74	66,46	41,79	-46,24	na	na	na	na	
DC-038		67,07	42,94	52,42	26,42		65,69	39,24	75,73	29,80		76,16	60,98	78,27	55,73	
DC-041		74,95	18,10	34,60	16,40		22,20	9,82	20,94	10,27		43,32	17,94	52,69	24,80	
DC-048		79,23	58,82	74,64	46,14		70,95	38,54	53,72	22,27	-42,22	81,23	69,16	85,41	82,79	
DC-056		52,94	22,88	50,82	20,72		35,34	12,98	32,75	12,63		53,86	23,93	55,18	25,95	
DC-057		46,32	18,11	45,63	17,62		38,00	14,86	34,65	13,70		40,97	15,26	46,21	17,62	
DC-060		45,63	17,15	57,16	26,42		50,20	19,99	62,15	32,49	61,52	33,30	10,75	/	/	
	Mediana	**65,1**	**32,9**	**50,6**	**24,1**		**57,9**	**29,3**	**53,1**	**26,0**		**48,6**	**20,9**	**55,2**	**26,0**	
	Valor mín.	**45,6**	**17,2**	**34,6**	**16,4**		**22,2**	**9,8**	**20,9**	**10,3**		**33,3**	**10,8**	**46,2**	**17,6**	
	Valor máx.	**79,2**	**62,6**	**74,6**	**46,1**		**84,4**	**77,7**	**75,7**	**42,6**		**81,2**	**69,2**	**85,4**	**82,8**	

Análise do efeito do petídeo N7 na expressão de diferentes moléculas de superfície das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC), por citometria de fluxo Os valores são dados como porcentagem de células positivas (%) e medianas de intensidade de fluorescência (MFI) para as diferentes moléculas. = inibição de MFI em relação às DCs não tratadas. = aumentos de MFI em relação às DCs não tratadas. Consideramos inibição, reduções ≥ 40% e aumento, aumentos ≥ 40%. n= 8 (iDCs e iDCs IL-10); 6 (mDCs) e 5 (mDC N7). na= não analisado. / = valores não determinados por problemas na aquisição.

Com relação ao peptídeo p277, tivemos 20 inibições e 31 aumentos em 220 condições avaliadas (n total=220) com este peptídeo. Essas modificações foram: (i) **CD80**: iDCs: 2/15 aumentos e 1/15 inibição, iDC IL-10: 2/14 inibições, mDC: 1/13 aumento e 1/13 inibição; (ii) **CD86**: iDCs: 2/15 aumentos e 4/15 inibições, iDC IL-10: 3/14 aumentos e 1/14 inibição, mDC 1/13 aumento e inibição 2/13; (iii) **CD40**: iDC: 4/15 aumentos, iDC IL-10: 2/14 aumentos 1/14 inibição, mDC: 1/13 aumentos e 1/13 inibição (chegando ao mesmo nível de expressão das iDCs); (iv) **MHC II**: iDC: 6/15 aumentos (3 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 1/15 inibições, iDC IL-10: 2/14 aumentos (1 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 1/14 inibição, mDC: 3/12 aumentos e 3/12 inibições (3 chegando ao mesmo nível de expressão das iDCs); (v) **MHC I**: iDC: 2/15 aumentos, iDC IL-10: 2/14 aumentos (1 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 1/14 inibição, mDC: 1/12 inibição (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito do peptídeo p277 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD80

Exp.	Molécula	iDC		iDC p277		Modulação	iDC IL-10		iDC IL-10 p277		Modulação	mDC		mDC p277		Modulação
	CD80	%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI	
DC-020		41,42	15,54	9,85	16,40		45,93	17,18	12,48	5,88	-65,77	80,46	50,48	94,93	60,43	
DC-021		32,23	9,22	32,89	13,10	42,08	34,03	13,34	12,90	7,17	-46,25	65,69	36,52	57,41	24,80	
DC-022		35,23	12,08	42,00	14,99		37,90	12,64	46,44	16,70		76,52	46,98	56,27	22,67	-51,75
DC-024		na	na	na	na		12,92	7,84	11,47	7,04		41,94	15,12	36,77	13,40	
DC-028		14,04	8,28	15,64	8,51		na	na	na	na		68,80	40,68	78,39	62,32	53,20
DC-029		69,38	31,62	75,29	42,17		41,92	32,49	58,52	37,52		na	na	na	na	
DC-030		59,04	45,73	70,61	60,53		53,08	41,05	48,34	37,52		62,69	50,48	75,13	68,54	
DC-032		75,17	37,86	74,77	35,23		68,27	30,78	69,79	32,49		na	na	na	na	
DC-035		57,32	24,58	39,18	17,31		64,83	28,39	51,06	21,67		na	na	na	na	
DC-041		45,22	17,78	46,49	21,48		19,81	7,17	17,68	7,57		45,03	19,11	50,49	19,11	
DC-042		51,45	21,48	46,00	18,11		42,30	15,40	/	16,70		55,93	34,29	65,94	35,55	
DC-046		22,39	10,46	42,31	18,77	79,45	na	na	na	na		62,64	/	67,70	30,23	
DC-054		11,76	7,43	9,01	6,73		8,71	5,19	10,92	6,98		48,29	18,77	50,85	20,91	
DC-056		11,09	22,88	10,48	6,49	-71,63	15,50	7,77	12,42	7,43		43,52	16,55	43,68	16,25	
DC-057		9,59	3,82	5,36	3,19		14,54	7,57	12,95	7,50		28,52	9,47	25,45	8,82	
DC-060		14,65	7,70	19,02	8,66		16,58	7,70	18,51	10,00		27,78	9,65	37,44	12,86	
	Mediana	**35,2**	**15,5**	**39,2**	**16,4**		**36,0**	**13,0**	**17,7**	**8,8**		**55,9**	**26,7**	**56,3**	**22,7**	
	Valor mín.	**9,6**	**3,8**	**5,4**	**3,2**		**8,7**	**5,2**	**10,9**	**5,9**		**27,8**	**9,5**	**25,5**	**8,8**	
	Valor máx.	**75,2**	**45,7**	**75,3**	**60,5**		**68,3**	**41,1**	**69,8**	**37,5**		**80,5**	**50,5**	**94,9**	**68,5**	

Continuação Tabela 12. Efeito do peptídeo p277 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD86

Exp.	Molécula	iDC		iDC p277		Modulação	iDC IL-10		iDC IL-10 p277		Modulação	mDC		mDC p277		Modulação
	CD86	%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI	
DC-020		90,84	42,55	55,43	26,18		86,25	42,55	33,46	10,65	-74,97	90,61	143,30	90,70	126,35	
DC-021		52,94	21,29	58,29	44,51	109,07	36,83	14,72	52,88	22,67	54,01	48,64	19,46	66,30	99,10	409,25
DC-022		44,53	16,40	54,14	23,08	40,73	50,94	20,17	57,39	25,71		82,67	259,46	71,35	39,95	-84,60
DC-024		na	na	na	na		25,09	5,28	24,50	6,67		42,11	11,97	43,47	11,55	
DC-028		73,24	66,12	65,91	50,03		na	na	na	na		81,51	230,82	65,61	61,53	-73,34
DC-029		58,71	28,90	57,92	26,66		43,10	42,55	52,15	33,32		na	na	na	na	
DC-030		56,01	55,23	54,30	45,32		54,33	52,80	58,40	56,74		45,96	36,19	57,55	49,58	
DC-032		57,94	33,38	44,58	14,47	-56,65	62,46	56,23	59,61	35,87		na	na	na	na	
DC-035		55,31	55,31	52,42	22,27	-59,74	66,75	35,55	58,47	26,66		na	na	na	na	
DC-041		63,27	37,86	43,25	15,54	-58,95	25,24	4,37	25,38	4,74		49,03	19,46	52,82	25,71	
DC-042		53,62	32,20	45,81	18,11	-43,76	44,34	13,46	/	26,90	99,85	50,44	58,29	60,11	59,89	
DC-046		47,75	17,78	56,08	24,14		na	na	na	na		79,86	110,40	79,95	100,90	
DC-054		48,41	18,27	41,33	13,82		56,32	29,43	50,56	20,54		77,92	159,63	77,27	140,75	
DC-056		51,83	41,05	45,48	25,37		26,36	3,25	28,40	12,86	74,72	57,34	51,86	58,61	54,25	
DC-057		76,56	111.4	76,07	133,35		59,27	47,83	57,63	45,32		69,93	62,52	71,71	77,74	
DC-060		26,49	11,55	27,32	15,26		27,35	14,33	18,27	11,97		44,15	29,69	54,75	44,11	
	Mediana	**55,3**	**32,8**	**54,1**	**24,1**		**47,6**	**24,8**	**52,2**	**24,2**		**57,3**	**58,3**	**65,6**	**59,9**	
	Valor mín.	**26,5**	**11,6**	**27,3**	**13,8**		**25,1**	**3,3**	**18,3**	**4,7**		**42,1**	**12,0**	**43,5**	**11,6**	
	Valor máx.	**90,8**	**66,1**	**76,1**	**133,4**		**86,3**	**56,2**	**59,6**	**56,7**		**90,6**	**259,5**	**90,7**	**140,8**	

Continuação Tabela 12. Efeito do peptídeo p277 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD40

Exp.	Molécula	iDC		iDC p227		Modulação	iDC IL-10		iDC IL-10 p227		Modulação	mDC		mDC p227		Modulação
	CD40	%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI	
DC-020		0,32	1,00	2,41	4,07	307,00	0,00	1,00	2,19	1,70	70,00	66,56	14,33	45,80	15,40	
DC-021		2,28	1,00	5,35	2,33	133,00	0,24	1,00	0,32	1,00		8,30	1,79	4,44	2,04	
DC-022		0,19	1,00	1,16	1,00		0,24	1,00	3,74	1,00		39,47	14,72	11,42	1,84	-87,50
DC-024		na	na	na	na		1,31	2,25	0,53	1,14	-49,33	10,51	2,81	7,67	2,86	
DC-028		0,22	1,00	0,57	1,80	80,00	na	na	na	na		18,74	7,77	38,08	14,86	91,25
DC-029		8,61	4,29	5,16	4,10		3,04	3,43	4,36	3,49		na	na	na	na	
DC-030		20,13	10,70	15,48	9,91		9,31	6,44	5,15	4,87		17,63	14,99	19,36	17,15	
DC-032		5,91	5,78	1,10	3,68		0,00	3,34	2,97	4,37		na	na	na	na	
DC-035		18,33	9,82	20,51	9,82		17,96	9,56	12,23	7,84		na	na	na	na	
DC-041		21,81	6,44	13,92	5,99		6,00	2,97	1,37	2,31		22,03	4,83	25,68	5,62	
DC-042		16,21	5,05	17,35	5,62		16,80	5,00	/	7,37	47,40	36,50	13,70	40,87	13,95	
DC-046		9,41	5,28	4,21	4,91		na	na	na	na		41,38	17,47	40,09	11,44	
DC-054		3,11	1,00	3,62	1,00		1,90	1,00	3,07	1,00		34,24	9,39	34,73	8,58	
DC-056		3,59	1,24	4,07	1,32		3,37	1,27	3,37	1,51		19,87	4,68	20,45	4,07	
DC-057		1,62	1,00	3,25	1,00		2,76	1,41	3,11	1,24		20,13	3,43	21,57	5,62	
DC-060		1,13	1,00	3,90	1,95	71,02	3,63	1,46	1,89	1,54		9,92	2,55	12,70	2,79	
	Mediana	**3,6**	**1,2**	**4,1**	**3,7**		**2,9**	**1,9**	**3,1**	**1,6**		**20,1**	**7,8**	**21,6**	**5,6**	
	Valor mín.	**0,2**	**1,0**	**0,6**	**1,0**		**0,0**	**1,0**	**0,3**	**1,0**		**8,3**	**1,8**	**4,4**	**1,8**	
	Valor máx.	**21,8**	**10,7**	**20,5**	**9,9**		**18,0**	**9,6**	**12,2**	**7,8**		**66,6**	**17,5**	**45,8**	**17,2**	

Continuação Tabela 12. Efeito do peptídeo p277 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de MHC II

Exp.	Molécula	iDC		iDC p277		Modulação	iDC IL-10		iDC IL-10 p277		Modulação	mDC		mDC p277		Modulação
	MHC II	%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI	
DC-020		85,26	12,40	73,65	59,89	382,98	79,71	199,89	68,37	66,12	-66,92	88,50	133,35	87,04	192,82	44,60
DC-021		72,25	235,01	76,49	189,38		72,48	159,63	86,32	276,32	73,10	69,34	106,50	77,62	173,09	62,53
DC-022		71,26	115,48	84,19	187,69	62,53	80,25	161,08	90,42	207,21		83,83	283,87	83,22	82,79	-70,84
DC-024		na	na	na	na		32,03	5,23	32,58	5,57		44,78	12,75	45,70	11,55	
DC-028		75,17	108,43	71,12	76,35		na	na	na	na		80,52	165,48	70,78	62,64	-62,15
DC-029		66,34	59,35	61,65	52,10		54,78	120,79	65,51	139,49		na	na	na	na	
DC-030		64,18	228,76	72,35	537,61	135,01	70,04	716,92	74,76	749,89		55,24	57,77	63,61	/	
DC-032		62,92	18,64	61,50	86,60	364,59	65,88	117,57	68,03	151,25		na	na	na	na	
DC-035		72,27	77,04	64,26	43,32	-43,77	69,77	60,43	62,69	42,17		na	na	na	na	
DC-038		na	na	na	na		60,95	67,93	63,70	63,21		na	na	na	na	
DC-041		54,63	56,23	55,71	45,73		26,66	2,44	26,13	2,74		54,18	26,69	57,21	35,55	
DC-042		43,32	13,70	50,15	29,16	112,85	41,31	10,27	/	22,27	116,85	56,50	82,79	66,69	94,75	
DC-046		52,91	25,48	60,76	34,60		na	na	na	na		80,25	252,55	68,91	232,91	
DC-054		74,01	96,47	81,58	147,22	52,00	83,76	307,81	82,63	194,56		83,81	149,89	86,34	224,68	
DC-056		68,83	120,79	66,16	103,66		46,77	16,25	45,83	15,26		71,24	82,05	69,65	84,29	
DC-057		81,42	139,49	80,37	105,54		61,23	33,68	63,34	36,85		82,66	151,25	75,26	58,29	-61,20
DC-060		78,93	116,52	62,00	40,68		58,78	33,98	71,77	58,82		69,94	49,14	73,71	93,06	47,19
	Mediana	**71,3**	**96,5**	**66,2**	**76,4**		**61,2**	**67,9**	**66,8**	**63,2**		**71,2**	**106,5**	**70,8**	**88,7**	
	Valor mín.	**43,3**	**12,4**	**50,2**	**29,2**		**26,7**	**2,4**	**26,1**	**2,7**		**44,8**	**12,8**	**45,7**	**11,6**	
	Valor máx.	**85,3**	**235,0**	**84,2**	**537,6**		**83,8**	**716,9**	**90,4**	**749,9**		**88,5**	**283,9**	**87,0**	**232,9**	

Continuação Tabela 12. Efeito do peptídeo p277 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de MHC I

Exp.	Molécula	iDC		iDC p277		Modulação	iDC IL-10		iDC IL-10 p277		Modulação	mDC		mDC p277		Modulação
	MHC I	%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI		%	MFI	%	MFI	
DC-020		93,82	37,18	60,67	29,16		93,38	40,68	42,12	10,65	-73,82	92,18	59,89	88,16	72,34	
DC-021		52,60	21,29	64,95	41,42	94,55	75,38	36,85	52,11	22,27		73,59	43,32	74,27	44,51	
DC-022		77,87	37,86	66,05	39,24		80,40	39,24	69,43	42,94		85,52	97,34	57,92	28,64	-70,58
DC-024		na	na	na	na		23,70	8,82	16,79	6,55		39,94	13,34	37,22	12,75	
DC-028		72,99	37,52	58,56	24,14		na	na	na	na		73,12	46,14	66,75	32,49	
DC-029		70,35	38,54	63,84	33,38		45,24	32,78	43,99	26,90		na	na	na	na	
DC-030		63,04	62,64	49,39	41,05		67,58	72,34	48,70	37,52	-48,13	na	na	na	na	
DC-032		78,79	63,21	80,46	49,58		84,72	77,04	83,35	63,21		na	na	na	na	
DC-035		74,95	50,54	65,54	37,52		84,42	77,74	82,71	62,08		na	na	na	na	
DC-041		74,95	18,10	49,93	18,94		22,20	9,82	24,79	11,44		43,32	17,94	45,46	18,94	
DC-042		47,20	19,11	49,79	20,72		43,64	17,78	/	32,34	81,89	60,64	/	61,48	31,30	
DC-046		29,12	13,10	47,54	21,48	63,97	na	na	na	na		75,78	47,40	78,66	/	
DC-054		38,31	13,58	39,02	11,34		43,97	14,99	37,03	9,91		41,46	15,68	55,98	24,25	
DC-056		52,94	22,88	49,26	19,11		35,34	12,98	33,37	12,52		53,86	23,93	53,83	24,47	
DC-057		46,32	18,11	46,06	17,94		38,00	14,86	39,43	15,12		40,97	15,26	38,08	14,33	
DC-060		45,63	17,15	56,66	25,48		50,20	19,99	56,17	23,71		33,30	10,75	47,68	18,43	
	Mediana	**63,0**	**22,9**	**56,7**	**25,5**		**47,7**	**26,4**	**44,0**	**23,0**		**57,3**	**23,9**	**57,0**	**24,5**	
	Valor mín.	**29,1**	**13,1**	**39,0**	**11,3**		**22,2**	**8,8**	**16,8**	**6,6**		**33,3**	**10,8**	**37,2**	**12,8**	
	Valor máx.	**93,8**	**63,2**	**80,5**	**49,6**		**93,4**	**77,7**	**83,4**	**63,2**		**92,2**	**97,3**	**88,2**	**72,3**	

Análise do efeito do petídeo p277 na expressão de diferentes moléculas de superfície das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC), por citometria de fluxo Os valores são dados como porcentagem de células positivas (%) e medianas de intensidade de fluorescência (MFI) para as diferentes moléculas. = inibição de MFI em relação às DCs não tratadas. = aumentos de MFI em relação às DCs não tratadas. Consideramos inibição, reduções ≥ 40% e aumento, aumentos ≥ 40%. n= 8 (iDCs e iDCs IL-10); 6 (mDCs) e 5 (mDC N7). na= não analisado. / = valores não determinados por problemas na aquisição.

Por fim, ao analisarmos a Tabela 13 podemos notar que os três tipos de DCs tratadas com a C-Hsp60 sofreram tanto aumentos quanto inibições na MFI das moléculas estudadas. No geral, tivemos 30 inibições e 40 aumentos em 168 condições avaliadas com esse fragmento (n total=168). As modulações que ocorreram foram: (i) **CD80**: iDCs: 2/13 aumentos e 2/13 inibições, iDC IL-10: 2/11 inibições, mDC: 1/10 aumento e 2/10 inibições; (ii) **CD86**: iDCs: 5/13 aumentos (2 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 2/13 inibições, iDC IL-10: 4/11 aumentos (1 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 1/11 inibição, mDC: 1/10 aumento e 4/10 inibições (1 chegando ao mesmo nível de expressão das iDCs); (iii) **CD40**: iDC: 6/13 aumentos (1 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs), iDC IL-10: 3/11 aumentos (1 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs), mDC: 1/10 aumentos e 2/10 inibições (2 chegando ao mesmo nível das iDCs); (iv) **MHC II**: iDC: 3/12 aumentos (1 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 2/12 inibições, iDC IL-10: 4/10 aumentos (3 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 2/10 inibições, mDC: 2/10 aumentos e 4/10 inibições (3 chegando ao mesmo nível de expressão das iDCs); (v) **MHC I**: iDC: 4/13 aumentos (3 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 3/13 inibições, iDC IL-10: 3/11 aumentos (2 chegando ao mesmo nível de expressão das mDCs) e 1/11 inibição, mDC: 1/10 aumento e 3/10 inibições (2 chegando ao mesmo nível de expressão das iDCs).

Tabela 13. Efeito da proteína C-Hsp60 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD80

	Molécula	iDC		iDC C-Hsp60			iDC IL-10		iDC IL-10 C-Hsp60			mDC		mDC C-Hsp60		
	CD80	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-020		41,42	15,54	6,69	10,18		45,93	17,18	3,76	7,17	-58,27	80,46	50,48	64,23	26,42	-47,66
DC-021		32,23	9,22	34,88	14,07	52,60	34,03	13,34	17,18	7,64	-42,73	65,69	36,52	61,55	26,66	
DC-022		35,23	12,08	25,67	6,61	-45,28	37,90	12,64	48,45	11,97		76,52	46,98	60,51	24,80	-47,21
DC-024		19,50	9,47	6,69	6,79		12,92	7,84	9,21	7,10		41,94	15,12	48,19	19,11	
DC-028		14,04	8,28	19,61	8,90		na	na	na	na		68,80	40,68	66,98	37,18	
DC-029		69,38	31,62	78,34	41,74		41,92	32,49	72,22	45,32		na	na	na	na	
DC-030		59,04	45,73	71,68	59,89		53,08	41,05	60,23	47,83		na	na	na	na	
DC-038		53,15	23,50	54,86	25,48		56,75	27,38	58,88	28,13		77,99	97,34	78,86	93,06	
DC-046		22,39	10,46	46,07	20,91	99,90	na	na	na	na		na	na	na	na	
DC-054		11,76	7,43	14,20	8,06		8,71	5,19	9,47	5,73		48,29	18,77	48,58	19,28	
DC-056		11,09	22,88	16,30	7,99	-65,07	15,50	7,77	18,14	9,65		43,52	16,55	40,27	15,26	
DC-057		9,59	3,82	10,13	2,97		14,54	7,57	17,49	7,91		28,52	9,47	31,61	9,82	
DC-060		14,65	7,70	15,43	7,57		16,58	7,70	22,77	10,65		27,78	9,65	34,95	46,56	79,27
	Mediana	**22,4**	**10,5**	**19,6**	**8,9**		**34,0**	**12,6**	**18,1**	**9,7**		**57,0**	**27,6**	**54,5**	**25,6**	
	Valor mín.	**9,6**	**3,8**	**6,7**	**3,0**		**8,7**	**5,2**	**3,8**	**5,7**		**27,8**	**9,5**	**31,6**	**9,8**	
	Valor máx.	**69,4**	**45,7**	**78,3**	**59,9**		**56,8**	**41,1**	**72,2**	**47,8**		**80,5**	**97,3**	**78,9**	**93,1**	

Continuação Tabela 13. Efeito da proteína C-Hsp60 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD86

Exp.	Molécula	iDC		iDC C-Hsp60			iDC IL-10		iDC IL-10 C-Hsp60			mDC		mDC C-Hsp60		
	CD86	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-020		90,84	42,55	66,77	19,99	-53,02	86,25	42,55	46,77	12,08	-71,61	90,61	143,30	66,55	37,52	-73,82
DC-021		52,94	21,29	57,79	50,03	134,99	36,83	14,72	54,42	24,58	66,98	48,64	19,46	63,74	55,23	183,81
DC-022		44,53	16,40	67,86	36,85	124,70	50,94	20,17	62,04	36,19	79,42	82,67	259,46	76,50	55,73	-78,52
DC-024		56,37	34,91	37,63	10,94	-68,66	25,09	5,28	18,53	6,04		42,11	11,97	40,96	11,97	
DC-028		73,24	66,12	71,22	57,25		na	na	na	na		81,51	230,82	77,94	133,35	-42,23
DC-029		58,71	28,90	55,45	26,66		43,10	42,55	71,58	36,25		na	na	na	na	
DC-030		56,01	55,23	62,42	148,55	62,82	54,33	52,80	71,31	71,31		na	na	na	na	
DC-038		55,48	26,90	52,53	23,29		58,30	33,68	54,26	25,71		71,51	511,66	71,07	697,83	
DC-046		47,75	17,78	61,97	30,51	71,60	na	na	na	na		na	na	na	na	
DC-054		48,41	18,27	43,52	15,12		56,32	29,43	75,79	93,90	68,65	77,92	159,63	43,44	16,11	-89,90
DC-056		51,83	41,05	48,20	31,34		26,36	3,25	24,84	15,68	79,27	57,34	51,86	53,15	40,32	
DC-057		76,56	111.4	82,81	357,05	69,00	59,27	47,83	61,74	50,94		69,93	62,52	64,58	54,74	
DC-060		26,49	11,55	30,82	16,11		27,35	14,33	25,56	16,40		44,15	29,69	54,80	44,51	
	Mediana	**55,5**	**27,9**	**57,8**	**30,5**		**50,9**	**29,4**	**54,4**	**25,7**		**70,7**	**102,9**	**64,2**	**49,6**	
	Valor mín.	**26,5**	**11,6**	**30,8**	**10,9**		**25,1**	**3,3**	**18,5**	**6,0**		**42,1**	**12,0**	**41,0**	**12,0**	
	Valor máx.	**90,8**	**66,1**	**82,8**	**357,1**		**86,3**	**52,8**	**75,8**	**93,9**		**90,6**	**511,7**	**77,9**	**697,8**	

Continuação Tabela 13. Efeito da proteína C-Hsp60 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de CD40

Exp.	Molécula	iDC		iDC C-Hsp60			iDC IL-10		iDC IL-10 C-Hsp60			mDC		mDC C-Hsp60		
	CD40	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-020		0,32	1,00	1,33	3,34	234,00	0,00	1,00	1,25	1,78	78,00	66,56	14,33	31,38	9,39	
DC-021		2,28	1,00	2,49	1,00		0,24	1,00	0,47	1,00		8,30	1,79	8,62	3,82	113,41
DC-022		0,19	1,00	1,04	1,00		0,24	1,00	1,93	1,00		39,47	14,72	14,29	2,27	-84,58
DC-024		2,47	1,86	0,48	1,39		1,31	2,25	0,42	2,04		10,51	2,81	8,33	2,57	
DC-028		0,22	1,00	1,41	1,41	41,00	na	na	na	na		18,74	7,77	10,74	5,73	
DC-029		8,61	4,29	27,20	8,43	96,50	3,04	3,43	16,34	4,74		na	na	na	na	
DC-030		20,13	10,70	33,43	23,93	123,64	9,31	6,44	22,22	15,26	136,96	na	na	na	na	
DC-038		18,69	5,57	18,89	6,44		14,37	6,32	17,93	6,15		63,69	43,71	65,11	44,51	
DC-046		9,41	5,28	4,27	6,32		na	na	na	na		na	na	na	na	
DC-054		3,11	1,00	2,02	1,00		1,90	1,00	2,33	1,00		34,24	9,39	19,63	1,45	-42,66
DC-056		3,59	1,24	2,91	1,01		3,37	1,27	4,40	2,48	48,79	19,87	4,68	18,91	4,03	
DC-057		1,62	1,00	9,56	1,86	83,05	2,76	1,41	3,02	1,65		20,13	3,43	18,44	3,89	
DC-060		1,13	1,00	5,82	2,31	80,58	3,63	1,46	2,99	1,68		9,92	2,55	10,97	2,50	
	Mediana	**2,5**	**1,0**	**2,9**	**1,9**		**2,8**	**1,4**	**3,0**	**1,8**		**20,0**	**6,2**	**16,4**	**3,9**	
	Valor mín.	**0,2**	**1,0**	**0,5**	**1,0**		**0,0**	**1,0**	**0,4**	**1,0**		**8,3**	**1,8**	**8,3**	**1,5**	
	Valor máx.	**20,1**	**10,7**	**33,4**	**23,9**		**14,4**	**6,4**	**22,2**	**15,3**		**66,6**	**43,7**	**65,1**	**44,5**	

Continuação Tabela 13. Efeito da proteína C-Hsp60 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de MHC II

Exp.	Molécula	iDC		iDC C-Hsp60			iDC IL-10		iDC IL-10 C-Hsp60			mDC		mDC C-Hsp60		
	MHC II	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação	%	MFI	%	MFI	Modulação
DC-020		85,26	12,40	73,45	69,16	457,74	79,71	199,89	75,25	88,17	-55,89	88,50	133,35	78,15	71,05	-46,72
DC-021		72,25	235,01	74,15	191,10		72,48	159,63	79,87	111,40		69,34	106,50	80,14	139,49	
DC-022		71,26	115,48	84,27	159,63		80,25	161,08	89,16	321,97	99,88	83,83	283,87	86,12	129,80	-54,27
DC-024		64,15	89,77	54,44	34,60	-61,46	32,03	5,23	28,80	5,94		44,78	12,75	48,38	15,54	
DC-028		75,17	108,43	75,19	90,58		na	na	na	na		80,52	165,48	70,52	81,31	-50,86
DC-029		na	na	na	na		54,78	120,79	77,18	289,03	139,28	na	na	na	na	
DC-030		64,18	228,76	76,96	736,53	321,19	70,04	716,92	77,90	1582,04	120,67	na	na	na	na	
DC-038		63,21	61,53	66,89	69,78		na	na	na	na		78,82	2147,99	75,78	1582,04	
DC-046		52,91	25,48	64,72	43,71	71,55	na	na	na	na		na	na	na	na	
DC-054		74,01	96,47	78,43	108,43		83,76	307,81	80,31	143,30	-53,44	83,81	149,89	89,70	355,45	57,83
DC-056		68,83	120,79	71,38	144,60		46,77	16,25	49,71	19,81		71,24	82,05	71,85	81,31	
DC-057		81,42	139,49	80,13	107,46		61,23	33,68	62,57	35,87		82,66	151,25	79,15	78,09	-48,39
DC-060		78,93	116,52	58,03	31,62	-72,86	58,78	33,98	72,35	62,64	45,75	69,94	49,14	73,63	101,82	51,73
	Mediana	**71,8**	**112,0**	**73,8**	**99,0**		**65,6**	**140,2**	**76,2**	**99,8**		**79,7**	**141,6**	**77,0**	**91,6**	
	Valor mín.	**52,9**	**12,4**	**54,4**	**31,6**		**32,0**	**5,2**	**28,8**	**5,9**		**44,8**	**12,8**	**48,4**	**15,5**	
	Valor máx.	**85,3**	**235,0**	**84,3**	**736,5**		**83,8**	**716,9**	**89,2**	**1582,0**		**88,5**	**2148,0**	**89,7**	**1582,0**	

Continuação Tabela 13. Efeito da proteína C-Hsp60 na expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I nas diferentes DCs.

Expressão de MHC I

Exp.	Molécula	iDC		iDC C-Hsp60			iDC IL-10		iDC IL-10 C-Hsp60			mDC		mDC C-Hsp60		
	MHC I	%	MFI all	%	MFI all	Modulação	%	MFI all	%	MFI all	Modulação	%	MFI all	%	MFI all	Modulação
DC-020		93,82	37,18	82,49	31,34		93,38	40,68	86,76	35,87		92,18	59,89	60,81	26,42	-55,89
DC-021		52,60	21,29	66,56	35,55	66,98	75,38	36,85	47,53	17,78	-51,75	73,59	43,32	65,68	32,20	
DC-022		77,87	37,86	32,87	11,55	-69,49	80,40	39,24	80,51	54,25		85,52	97,34	40,43	14,46	-85,14
DC-024		55,24	27,63	28,93	10,75	-61,09	23,70	8,82	16,43	9,14		39,94	13,34	27,17	11,04	
DC-028		72,99	37,52	49,92	19,99	-46,72	na	na	na	na		73,12	46,14	56,11	23,93	-48,14
DC-029		70,35	38,54	77,91	58,29	51,25	45,24	32,78	70,92	46,56	42,04	na	na	na	na	
DC-030		63,04	62,64	70,57	118,64	89,40	67,58	72,34	80,28	106,50	47,22	na	na	na	na	
DC-038		67,07	42,94	65,67	46,14		65,69	39,24	66,27	40,32		76,16	60,98	77,55	56,74	
DC-046		29,12	13,10	46,91	21,48	63,97	na	na	na	na		na	na	na	na	
DC-054		38,31	13,58	38,46	12,30		43,97	14,99	32,63	9,39		41,46	15,68	52,97	22,27	
DC-056		52,94	22,88	54,05	24,58		35,34	12,98	54,05	24,58	47,19	53,86	23,93	53,05	23,08	
DC-057		46,32	18,11	40,89	15,68		38,00	14,86	32,93	12,98		40,97	15,26	45,28	16,55	
DC-060		45,63	17,15	54,67	23,50		50,20	19,99	62,57	31,06		33,30	10,75	49,79	19,81	45,73
	Mediana	**55,2**	**27,6**	**54,1**	**23,5**		**50,2**	**32,8**	**62,6**	**31,1**		**63,5**	**33,6**	**53,0**	**22,7**	
	Valor mín.	**29,1**	**13,1**	**28,9**	**10,8**		**23,7**	**8,8**	**16,4**	**9,1**		**33,3**	**10,8**	**27,2**	**11,0**	
	Valor máx.	**93,8**	**62,6**	**82,5**	**118,6**		**93,4**	**72,3**	**86,8**	**106,5**		**92,2**	**97,3**	**77,6**	**56,7**	

Análise do efeito do fragmento C-Hsp60 na expressão de diferentes moléculas de superfície das células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e maduras (mDC), por citometria de fluxo Os valores são dados como porcentagem de células positivas (%) e medianas de intensidade de fluorescência (MFI) para as diferentes moléculas. = inibição de MFI em relação às DCs não tratadas. = aumentos de MFI em relação às DCs não tratadas. Consideramos inibição, reduções ≥ 40% e aumento, aumentos ≥ 40%. n= 8 (iDCs e iDCs IL-10); 6 (mDCs) e 5 (mDC N7). na= não analisado. / = valores não determinados por problemas na aquisição.

Apesar do alto número de modificações na expressão das moléculas de superfície estudadas (CD80, CD86, CD40, MHC I e II), apenas um número pequeno dessas modificações levaram à expressão semelhante àquela encontrada nas DCs com a maturidade oposta (iDC ⇔ mDC); sendo: (i) modificações do tipo iDCs ⇒ mDC: 20 de 48 no total e (ii) modificações do tipo mDC ⇒ iDC: 13 no total de 25.

Com relação ao efeito geral dos fragmentos da Hsp60 aqui testados podemos dizer que: (i) o estímulo com o peptídeo N7 induziu o maior número geral de inibições (23/112 = 21%) e o menor número de aumentos da expressão das moléculas estudadas (8/112 = 7,4%), porém não provocou o maior número de modificações dos tipos iDC ⇔ mDC (modificações que levaram os níveis de MFI de iDC aos níveis de mDC ou vice-versa), além disso, não induziu qualquer aumento nas iDCs, só inibições; (ii) o estímulo com a proteína C-Hsp60 promoveu o maior número modificações de aumento (40/168= 23,8%) e um número intermediário de modificações de inibição (30/168 =18%) e, além disso, promoveu o maior número de modificações do tipo iDC ⇒ mDC (14/168 = 8,33%); (iii) já o peptídeo p277 induziu valores intermediários de modificações gerais e dos tipos iDC ⇔ mDC.

Na Tabela 14 ilustramos o número de vezes que os fragmentos da Hsp60 (p277, C-Hsp60 e N7) foram capazes de modular negativamente, positivamente ou mesmo não modular a MFI das moléculas analisadas (CD80, CD86, CD40, MHCII, MHC I). Nesta tabela podemos observar que as mDCs foram as células que sofreram proporcionalmente o menor número de aumentos de MFI e os maiores números de inibição.

Tabela 14. Freqüência de modificações na expressão de MFI das moléculas coestimuladoras e de MHC I e II, induzidas por fragmentos da Hsp60 nos diversos tipos de DCs.

DCs	Modificações da expresão das moléculas			
	↑	=	↓	iDC ⇔ mDC
iDC	36	115	**28**	10
iDC IL-10	26	117	**21**	5
mDC	16	105	**25**	**13**

A expressão das diferentes moléculas de superfície foi determinada por citometria de fluxo. Os números nas tabelas são os números absolutos de modificações para os três fragmentos da Hsp60 avaliados (N7, p277 e C-Hsp60). Os valores de uilizados para a avaliação das modificações foram as medianas de intensidade de fluorescência (MFI). Moléculas avaliadas: CD80, CD86, CD40, MHC II e MHC I. n total= iDC 179 condições, iDC IL-10= 164 condições e mDC= 146 condições. Consideramos inibições e aumentos ≥40%.

Nas Figuras 23-25, tomamos como exemplo o experimento DC-022 para ilustrar as modificações na MFI das moléculas de superfície estudadas nas diferentes DCs. Comparando as Figuras 26 e a 28, podemos observar que a expressão de CD80, CD86 e CD40 nas mDCs chegaram próxima à expressão encontrada nas iDCs, após o tratamento com o peptídeo p277. Também podemos observar que o tratamento com a C-Hsp60 também induziu uma diminuição significativa de CD80, CD40, MHC I e II nas mDCs.

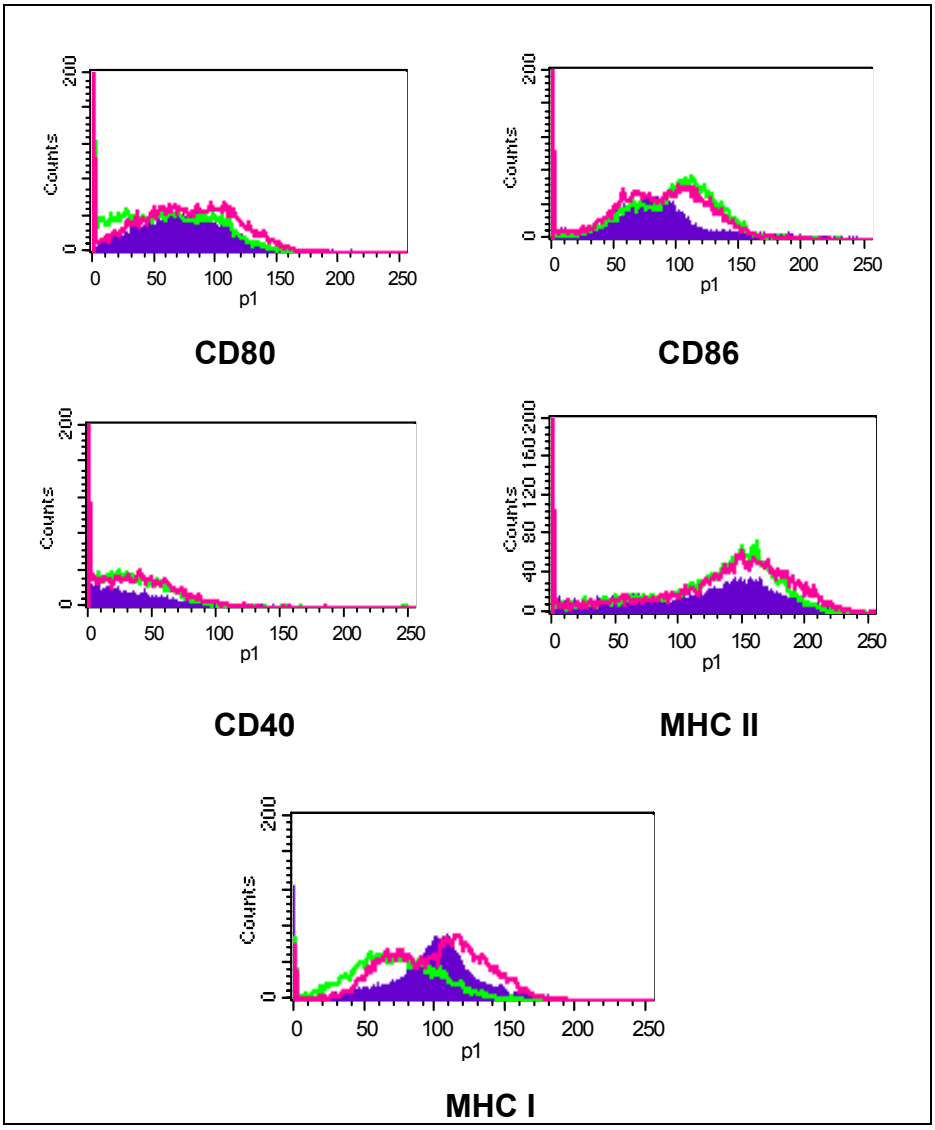


Figura 23. Efeito dos diferentes antígenos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas iDCs. Histograma de sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência para as moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II, e MHC I para as iDCs obtidas no experimento DC-022. A expressão foi determinada após 24 h de incubação com os antígenos da Hsp60 (10µg/ml), por citometria de fluxo. iDC sem tratamento; iDC tratada com p277 iDC tratada com C-Hsp60.

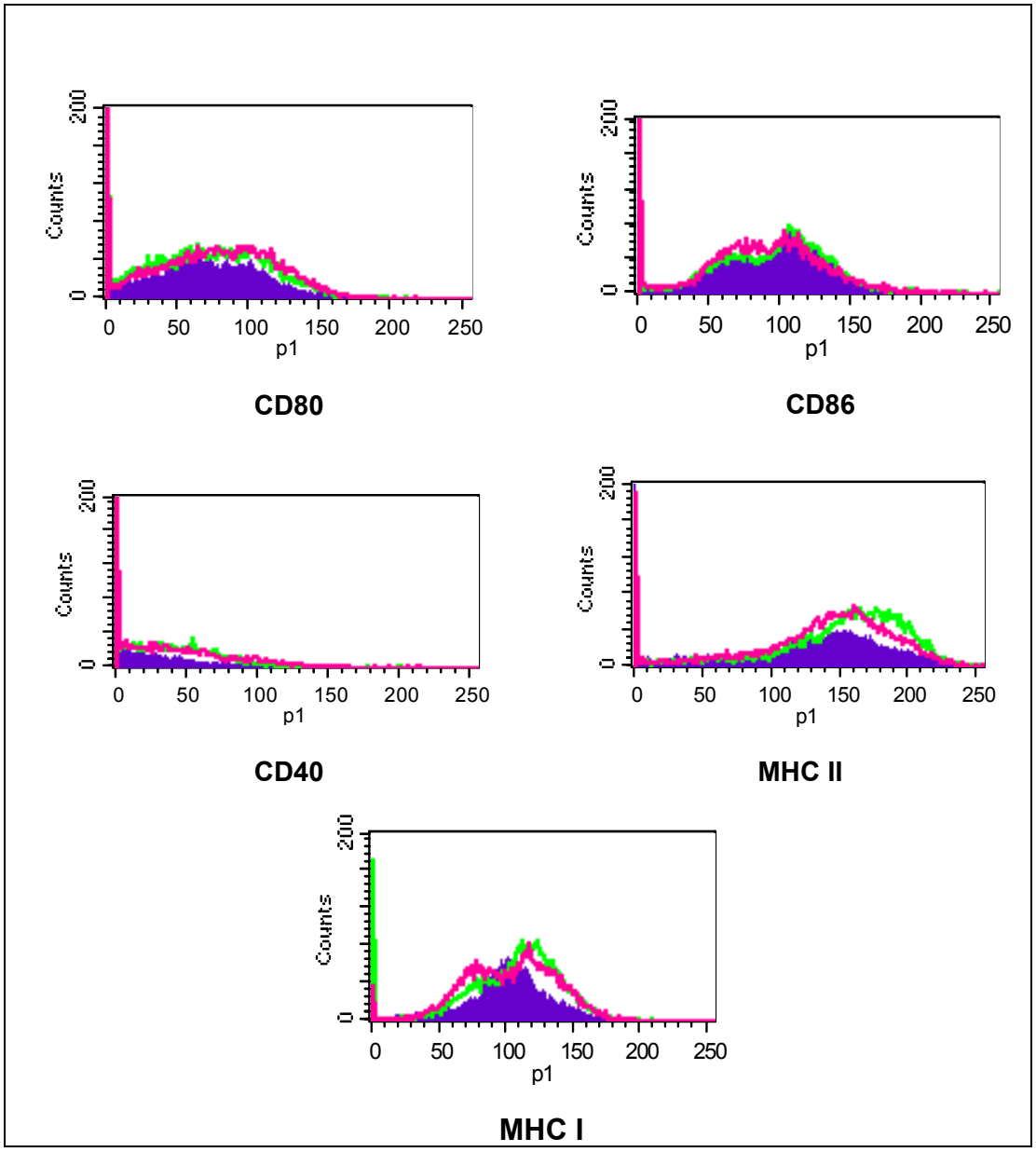


Figura 24. Efeito dos diferentes antígenos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas iDCs IL-10. Histograma de sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência para as moléculass CD80, CD86, CD40, MHC II, e MHC I para as iDCs IL-10 obtidas no experimento DC-022. A expressão foi determinada após 24 h de incubação com os antígenos da Hsp60 (10µg/ml), por citometria de fluxo. iDC IL-10 sem tratamento; iDC IL-10 tratada com p277 iDC IL-10 tratada com C-Hsp60.

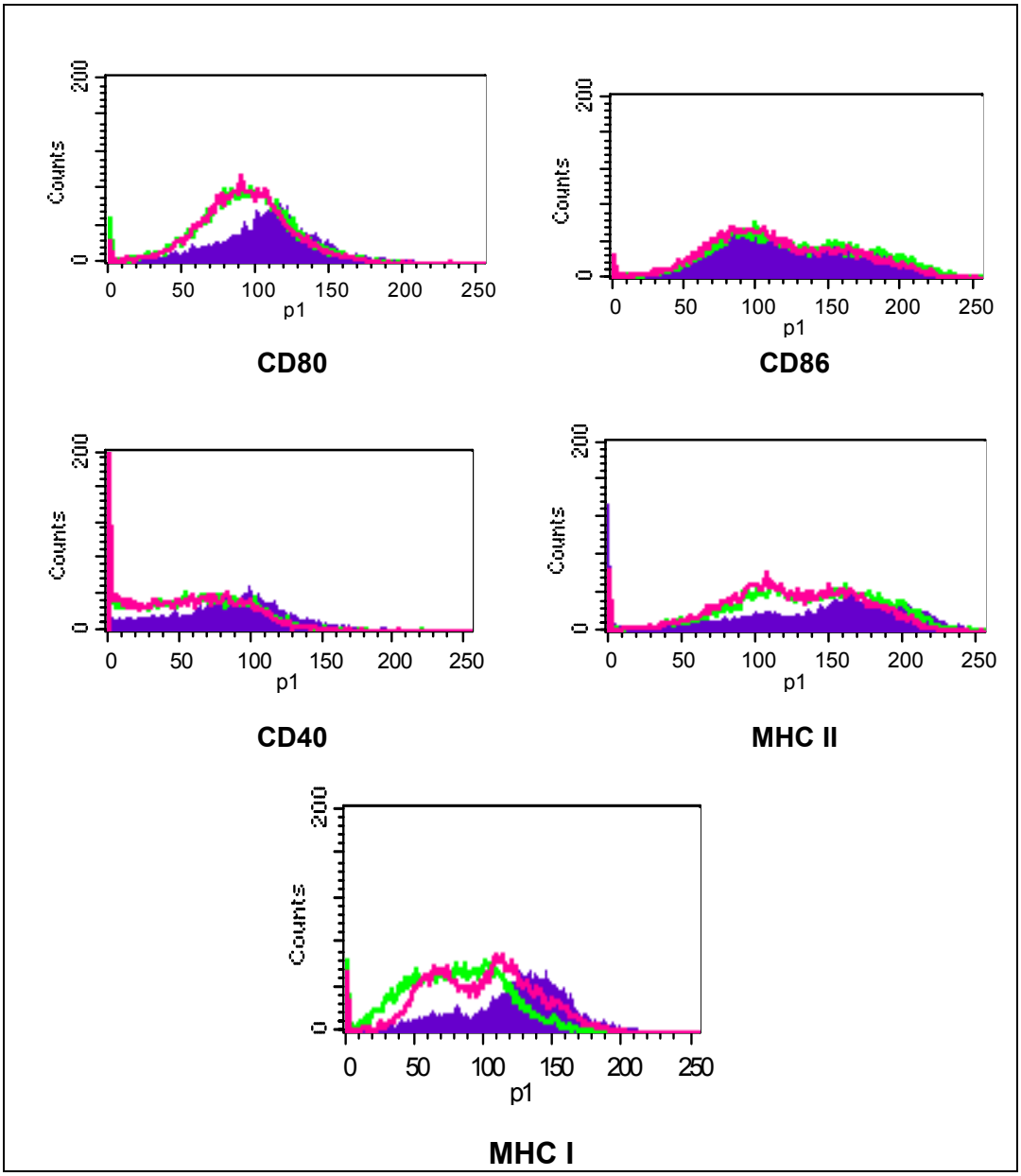


Figura 25. **Efeito dos diferentes antígenos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas mDCs.** Histograma de sobreposição das medianas de intensidade de fluorescência para as moléculas CD80, CD86, CD40, MHC II, e MHC I para as mDCs obtidas no experimento DC-022. A expressão foi determinada após 24 h de incubação com os antígenos da Hsp60 (10µg/ml), por citometria de fluxo. mDC sem tratamento; mDC tratada com p277 mDC tratada com C-Hsp60.

- *Análise Conjunta dos Experimentos*

Conforme vimos na análise individual, todos os fragmentos da Hsp60 foram capazes tanto de diminuir quanto de aumentar a expressão (MFI) das moléculas coestimuladoras e MHC nas diferentes DCs. Na análise em

conjunto analisamos as medianas das MFI de todos os experimentos realizados nas mesmas condições com e sem fragmentos da Hsp60 (Tabelas 15-17).

Tabela 15. Efeitos dos fragmentos da proteína Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nas iDCs.

Mediana da expressão de moléculas de superfície das iDCs												
Moléculas	**iDC**		**iDC p277**		**iDC**		**iDC C-Hsp60**		**iDC**		**iDC N7**	
	%	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**
CD80	35,2	15,5	39,2	16,4	22,4	10,5	19,6	8,9	49,2	23,2	34,9	15,4
CD86	55,3	32,8	54,1	24,1	55,5	27,9	57,8	30,5	55,7	41,1	46,8	**22,5***
CD40	3,6	1,2	4,1	3,7	2,5	1,0	2,9	1,9	18,5	6,0	6,7	4,4
MHC II	71,3	96,5	66,2	76,4	71,8	112,0	73,8	99,0	66,5	118,7	66,1	**65,6***
MHC I	63,0	22,9	56,7	25,5	55,2	27,6	54,1	23,5	65,1	32,9	50,6	24,1

% de células positivas e medianas de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC I e II das iDCs, iDCs tratadas com fragmentos da Hsp60. A expressão foi determinada por citometria de fluxo. Em destaque com * e negrito estão as moléculas com inibição de expressão em relação à MFI nas mesmas células não tratadas. Consideramos inibição, reduções maiores do que 40%. n: iDC e iDC N7=8; iDC e iDC p277= 15; iDC e iDC C-Hsp60= 13.

Tabela 16. Efeitos dos fragmentos da proteína Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nas iDCs IL-10.

Mediana da expressão de moléculas de superfície das iDCs IL-10												
Moléculas	**iDC IL-10**		**iDC IL-10 p277**		**iDC IL-10**		**iDC IL-10 C-Hsp60**		**iDC IL-10**		**iDC IL-10 N7**	
	%	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**
CD80	36,0	13,0	17,7	8,8	34,0	12,6	18,1	9,7	19,8	7,8	24,4	10,8
CD86	47,6	24,8	52,2	24,2	50,9	29,4	54,4	25,7	52,0	34,6	52,0	24,0
CD40	2,9	1,9	3,1	1,6	2,8	1,4	3,0	1,8	7,7	4,6	4,1	3,9
MHC II	61,2	67,9	66,8	63,2	65,6	140,2	76,2	99,8	59,9	43,4	64,8	52,8
MHC I	47,7	26,4	44,0	23,0	50,2	32,8	62,6	31,1	57,9	29,3	53,1	26,0

% de células positivas e medianas de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC I e II das iDCs, iDCs tratadas com fragmentos da Hsp60. A expressão foi determinada por citometria de fluxo. n: iDC IL-10 e iDC IL-10 N7=7; iDC IL-10 e iDC IL-10 p277= 14; iDC IL-10 e iDC IL-10 C-Hsp60= 11.

Tabela 17. Efeitos dos fragmentos da proteína Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC I e II nas mDCs.

	Mediana da expressão de moléculas de superfície das mDCs											
Moléculas	**mDC**		**mDC p277**		**mDC**		**mDC C-Hsp60**		**mDC**		**mDC N7**	
	%	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**	**%**	**MFI**
CD80	33,7	13,8	36,0	15,7	57,0	27,6	54,5	25,6	45,0	19,1	50,3	32,1
CD86	57,3	58,3	65,6	59,9	70,7	102,9	64,2	**49,6***	57,3	51,9	57,7	39,5
CD40	20,1	7,8	21,6	5,6	20,0	6,2	16,4	3,9	20,1	4,8	26,5	12,6
MHC II	71,2	106,5	70,8	88,7	79,7	141,6	77,0	91,6	70,6	116,7	69,7	89,0
MHC I	57,3	23,9	57,0	24,5	63,5	33,6	53,0	22,7	48,6	20,9	55,2	26,0

% de células positivas e medianas de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas CD80, CD86, CD40, MHC I e II das iDCs, iDCs tratadas com fragmentos da Hsp60. A expressão foi determinada por citometria de fluxo. Em destaque com * e negrito estão as moléculas com inibição de expressão em relação à MFI nas mesmas células não tratadas. Consideramos inibição, reduções maiores do que 40%. n: mDC=7 e mDC N7=6; mDC e mDC p277= 13; mDC e mDC C-Hsp60= 10.

Ao contrário do que observamos nas avaliações individuais, quando avaliamos as medianas dos experimentos em conjunto, para as mesmas condições, praticamente não vemos modulações para as moléculas estudadas. Observamos na Tabela 15 que o peptídeo N7 inibiu a MFI da molécula CD86 e MHC II nas iDCs. Já na Tabela 17 observamos que o fragmento C-Hsp60 inibiu a expressão da molécula CD86 nas mDCs. Nenhum fragmento da Hsp60 estudado foi capaz de inibir nem de aumentar a MFI de nenhuma molécula nas iDCs tratadas com IL-10, quando a expressão foi analisada em conjunto, considerando o ponto de corte de 40%.

Como podemos observar nas Figuras 26, 27 e 28, nossos resultados não são homogêneos. Os dados mostrados nos gráficos foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Apesar das diferenças observadas na expressão das moléculas de superfície após o tratamento com os fragmentos da Hsp60, os valores não foram estatisticamente significativos.

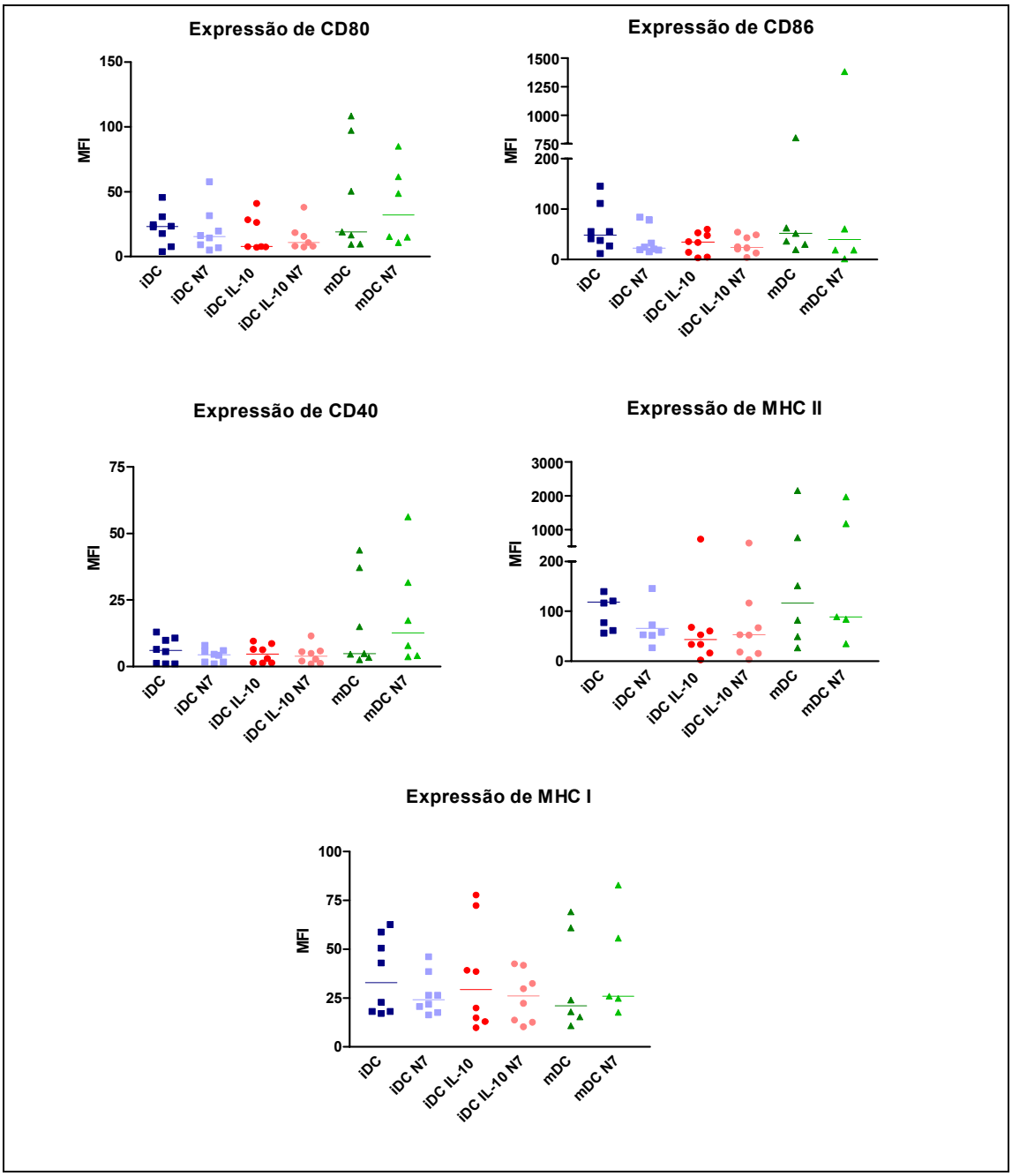


Figura 26. Efeito do peptídeo N7 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC em DCs imaturas (iDC) , DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e DCs maduras (mDCs). A expressão foi determinada após 24h de cultura com e sem os fragmentos da Hsp60, por citometria de fluxo. Os valores são dados como Medianas das Intensidades de Fluorescência (MIF). n= 8 (iDCs e iDCs IL-10); 6 (mDCs) e 5 (mDC N7). Análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p>0,05$).

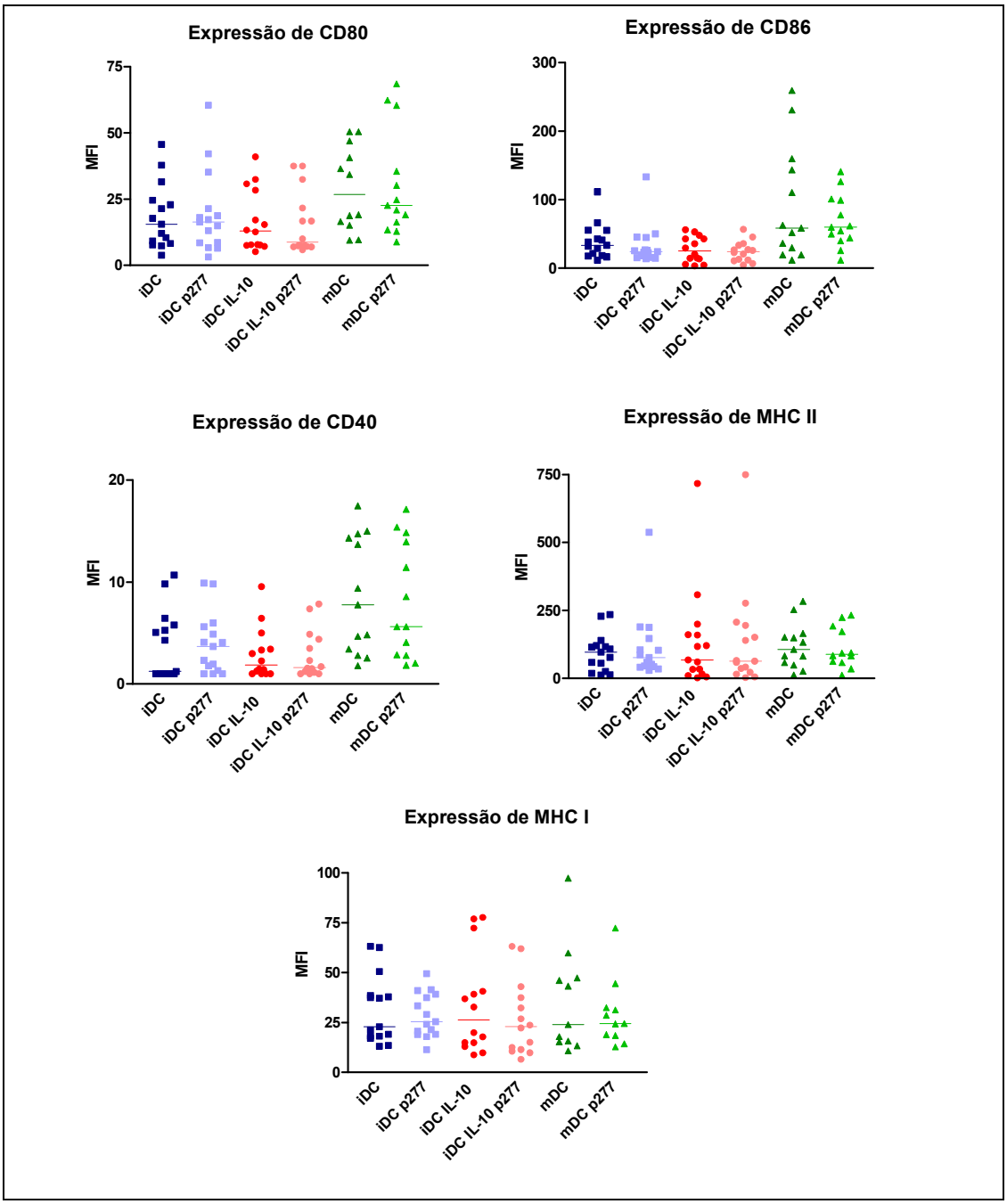


Figura 27. Efeito do peptídeo p277 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC em DCs imaturas (iDC) , DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e DCs maduras (mDCs). A expressão foi determinada após 24h de cultura com e sem os fragmentos da Hsp60, por citometria de fluxo. Os valores são dados como Medianas das Intensidades de Fluorescência (MIF). n= 15 (iDCs); 14 (iDCs IL-10); 12 (mDCs). Análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p>0,05$).

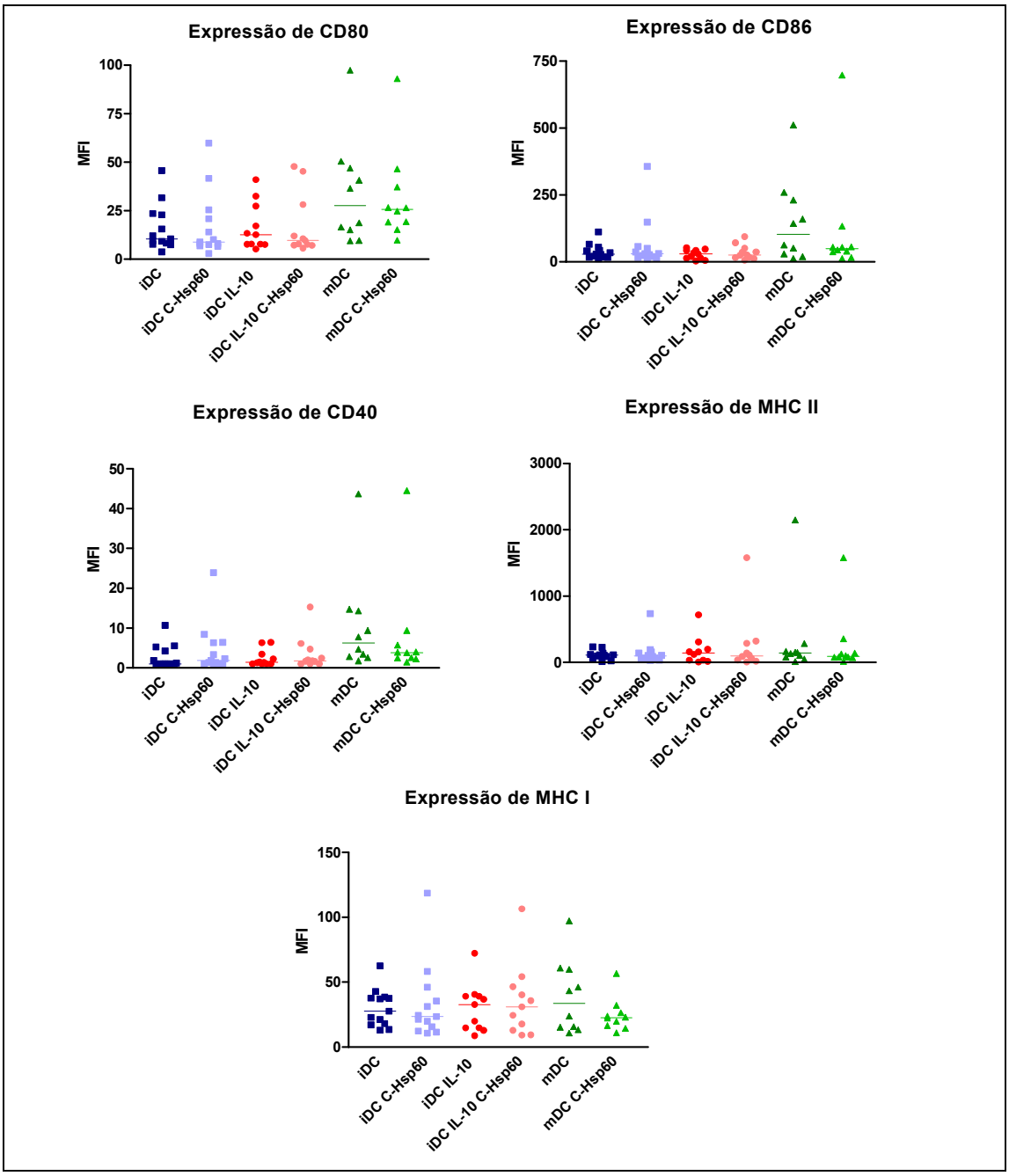


Figura 28. Efeito do fragmento C-Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC em DCs imaturas (iDC) , DCs imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e DCs maduras (mDCs). A expressão foi determinada após 24h de cultura com e sem os fragmentos da Hsp60, por citometria de fluxo. Os valores são dados como Medianas das Intensidades de Fluorescência (MIF). n= 13 (iDCs); 11 (iDCs IL-10); 10 (mDCs). Análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p>0,05$).

7.4.2 Avaliação do efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de citocinas pelos diferentes tipos de células dendríticas

Para avaliar qual o efeito dos diversos fragmentos da Hsp60 na produção de citocinas pelas diferentes DCs (iDCs, iDCs IL-10 e mDCs), adicionamos os fragmentos da Hsp60 na concentração de 10µg/ml e deixamos em cultura por 24h. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da adição dos fragmentos. As citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2) foram avaliadas por citometria de fluxo, em ensaios de CBA (*Cytometric Bead Array*) e ELISA (só para TGF-β). A produção induzida foi calculada descontando-se o valor (pg/ml) da produção espontânea, sem fragmento da Hsp60.

De forma geral, as DCs em resposta aos diversos fragmentos da Hsp60 inibiram a produção espontânea e/ou induziram produção das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α e TGF-β. Já as iDCs IL-10 produziram somente IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α. Além disso, houve uma grande variação na frequência de experimentos com produção de cada uma dessas citocinas, dependendo do tipo de DC. A produção bruta de cada citocina (pg/ml) pelas DCs está ilustrada nas Tabelas 17, 18 e 19 (Quadro 1).

Com relação à inibição da produção espontânea de citocinas pelas diferentes DCs na presença dos fragmentos da Hsp60 podemos dizer que: os fragmentos da Hsp60 inibem as mesmas citocinas tanto nas iDCs como nas mDCs com as mesmas freqüências: TNF-α (3/3), IL-10 (1/3) e IL-6 (1/1) enquanto que nas iDCs IL-10, a inibição de TNF-α foi de 2/2 e de IL-10 foi de 1/2 exprimentos. Além disso, para as DCs imaturas, praticamente todos os

fragmentos foram capazes de provocar inibição, no entanto, o peptídeo p277 parece ser principal. Já para as mDCs, nenhum peptídeo se destacou como responsável principal pelas inibições.

Com relação à produção de citocinas induzidas por fragmentos da Hsp60 pelas iDCs, observamos: indução de IFN-γ (2/7 experimentos), TNF-α (4/7), IL-10 (4/4), IL-12p70 (2/4), IL-6 (2/4) e TGF-β (2/2). Podemos destacar as citocinas IL-10 e o TGF-β como sendo as mais freqüentemente induzidas pelos fragmentos da Hsp60 nesse tipo celular. Além disso, ao fazermos uma análise de indução de produção por tipo de fragmento da Hsp60, observamos que para iDCs: **(i) p277** induziu produção de TNF-α (2/7); IL-10 (1/4) e de IL-6 (1/3); **(ii) C-Hsp60** induziu TNF-α (1/5), IL-10 (2/3), IL-6 (1/3) e TGF-β (1/2) em grande quantidade (610,3pg/ml e 106,79pg/ml, respectivamente); **(iii) N7** induziu IL-10 (1/3), IL-12p70 (1/3) e TGF-β (2/2); **(iv) N3** induziu IFN-γ (1/5), TNF-α (1/5), IL-10 (1/3), IL-6 (1/3) em grande quantidade (505,8pg/ml) e TGF-β (1/1); **(v) C4** induziu TNF-α (1/5), IL-10 (1/3), IL-6 (1/3); **(vi) I2** induziu IL-10 (3/3) e IL-12p70 (1/2).

Já a freqüência de produção de citocinas induzida por fragmentos da Hsp60 pelas iDCs IL-10 foi: TNF-α (2/6), IL-10 (4/4), IL-12p70 (2/4) e IL-6 (2/4). Analisando a indução de produção por tipo de fragmento da Hsp60, observamos que para iDCs IL-10: **(i) p277** induziu IL-12p70 (1/4); **(ii) C-Hsp60** induziu IL-10 (1/3); **(iii) N7** induziu IL-10 (2/4); **(iv) N2** induziu TNF-α (1/4), IL-10 (2/3 - média: 229,26pg/ml) e IL-6 (1/3 - 302,4pg/ml); **(v) N10** induziu TNF-α (2/4), IL-10 (1/3) e IL-6 (1/3); **(vi) C8** induziu TNF-α (2/4), IL-10 (2/3) e IL-6 (1/3); **(vii) I8** induziu produção de TNF-α (2/4 – produção média= 221,6

pg/ml), IL-10 (2/3) e IL-6 (1/2); **(viii) I2** induziu TNF-α (1/3 – 431pg/ml), e IL10 (2/3) e IL-12p70 (1/3) (Tabela 19).

A freqüência de indução de produção de citocinas pelas mDCs induzidas pelos fragmentos da Hsp60 (Tabela 20) foi de: IFN-γ (3/8), TNF-α (5/8), IL-10 (5/5), IL-2 (1/8), IL-12p70 (1/5), IL-6 (3/5), TGF-β (1/2). Com relação aos fragmentos podemos observar que: **(i) p277** induziu IL-10 (3/5), IL-6 (3/5); **(ii) C-Hsp60** induz IFN-γ (1/5 - 351pg/ml), TNF-α (1/5 – 318pg/ml), IL-10 (2/3), IL-2 (1/5), IL-6 (1/2) e TGF-β (1/2); **(iii) N7** induziu IL-10 (2/5 – média 335pg/ml), IL-6 (2/5) e TGF-β (1/2); **(iv) N3** induziu IFN-γ (1/6), TNF-α (1/5), IL-10 (2/4), IL-12p70 (1/4), IL-6 (1/4) e TGF-β (1/1); **(v) I6** induziu IL-10 (3/4) e IL-6 (1/4 – 580pg/ml); **(iv) N10** induziu IL-10 (2/4) e IL-6 (1/4 – 5544pg/ml) (Tabela 20).

Como conclusão, podemos dizer que a produção de citocinas pelas DCs frente aos fragmentos da Hsp60 se mostrou muito heterogêna de modo que não detectamos nenhum padrão particular de produção de citocinas para os três tipos de DCs avaliadas. No entanto, as iDCs IL-10 foram as células que produziram menor número de citocinas inflamatórias e com uma menor freqüência. As mDCs apresentaram alta freqüência e produção de IL-10 induzida por fragmentos da Hsp60 (Quadro 1 e Tabela 20).

No que diz respeito aos fragmentos avaliados, podemos observar que nenhum peptídeo foi responsável somente pela indução de um tipo de citocina, mas o mesmo peptídeo pode induzir a produção das mesma citocinas em diferentes DCs: (i) p277 induziu TNF-α e IL-6 nas iDCs e mDCs; (ii) N3 induziu TGF-β nas iDCs e nas mDCs; (iii) o peptídeo N10

indiziu IL-6 nas iDCs IL-10 e nas mDCs; (iv) C-Hsp60 induziu TGF-β tanto nas iDCs como nas mDCs (Quadro 1).

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

Citocinas produzidas frente aos fragmentos da Hsp60							
Tipo de DC	**IFN-γ**	**TNF-α**	**IL-10**	**IL-12p70**	**IL-6**	**TGF-β**	**Condição experimental**
iDC	2/7 C9, N3	4/7 I8, I9, I4, I6, C4, p277, N2, N3, N6 e C-Hsp60	4/4 I8, I9, I2, I4, C3, C4, C8, p277, N2, N3, N6, N7, N10, I-Hsp60, C-Hsp60	2/4 I2, C8, N7	2/4 I6, C4, p277, N3, N6, N10, C-Hsp60	2/2 N3, N7, C-Hsp60	Com fragmentos Hsp60
		●●● Todos menos: N2	●●● Todos menos I2 e C3.		● Todos		Espontânea
iDC IL-10		2/6 I8, I2, C3, C4,C8, N2, N10	4/4 Todos menos: p277 e N3	2/4 I2, p277	2/4 I8, I4, C8, N2, N10		Com fragmentos Hsp60
		●● I4, I6, C3, C9, p277, N2, N3, N7, C-Hsp60	●● I4, C4, C8, N4, N6, N7, N10 e I-Hsp60				Espontânea
mDC	3/8 I8, I4, C3, C8, N3 e C-Hsp60	5/8 I2, C3, C8, N3, N4, N6 e C-Hsp60	5/5 Todos menos: I-Hsp60	1/5 N3, N6	3/5 Todos menos: C4, C8 e N2	1/2 N3, N7, C-Hsp60	Com fragmentos Hsp60
		●●● I9, C3, C4, C8, p277	●●● I8, I2, C4, C8,N4, N6 e N10		● I6, C3, N3, N7 e C-Hsp60		Espontânea

A produção de citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β), em sobrenadantes de DC cultivadas com e sem fragmentos da Hsp60 por 48h. Representamos a freqüência de produção de cada citocina com os diferentes tipos de DCs (iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10; mDC: maduras) na interação com os fragmentos da Hsp60. Valores mínimo e máximo de detecção: 20-5000pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). Foi considerada produção induzida pelos fragmentos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (espontânea) e > limite mínimo de detecção. ▒ : freqüência de valores positivos para a produção da citocina induzida pelos fragmentos. □ : não houve produção de citocinas. ●: refere-se a cada experimento em que houve produção espontânea de citocinas. ▒: houve inibição ≥ 50% da produção espontânea de citocina por algum fragmento da Hsp60.

Tabela 18. Produção citocinas induzidas nas iDCs por fragmentos da Hsp60.

	IFN-γ								TNF-α								IL-10							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**
iDC	*	*	*	*	na	*	*	*	**30,1**	**23,4**	**39,7**	*	na	*	*	*	na	na	na	**29,0**	na	**36,7**	*	**24,7**
I8	na	*	*	*	na	*	na	*	na	**28,3**	*	*	na	*	na	*	na	na	na	28,0	na	**62,4**	na	*
I9	na	*	*	*	na	na	na	*	na	**46**	*	*	na	na	na	*	na	na	na	**30,7**	na	na	na	*
I2	na	na	*	*	na	*	na	*	na	na	*	*	na	*	na	*	na	na	na	**30,1**	na	**42,0**	na	**26,1**
I4	na	*	*	*	na	*	na	*	na	**23,7**	*	*	na	*	na	*	na	na	na	**29,7**	na	32,3	na	*
I6	na	*	*	*	na	*	na	*	na	**29,9**	*	*	na	*	na	*	na	na	na	26,1	na	24,7	na	*
C3	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	na	na	27,0	na	**38,4**	na	**23,5**
C4	na	*	*	*	na	*	na	*	na	21,5	*	*	na	**24,5**	na	*	na	na	na	**41,6**	na	29,3	na	*
C8	na	*	*	*	na	*	na	*	na	22,7	*	*	na	*	na	*	na	na	na	**38,5**	na	**42,2**	na	*
C9	na	*	*	*	na	**22,4**	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	na	na	28,5	na	29,1	na	*
p277	*	*	*	*	na	*	*	*	**31,4**	**23,7**	*	*	na	*	*	*	na	na	na	26,7	na	**51,7**	*	*
N2	na	*	*	*	na	*	na	*	na	**26,5**	23	*	na	*	na	*	na	na	na	26,1	na	**49,2**	na	*
N3	na	*	*	*	na	na	**585,1**	*	na	*	*	*	na	na	**294,6**	*	na	na	na	25,5	na	na	**78,1**	*
N4	na	*	*	*	na	*	na	*	na	20,2	*	*	na	*	na	*	na	na	na	25,7	na	34,0	na	*
N6	na	*	*	*	na	*	na	*	na	**28,9**	*	*	na	*	na	*	na	na	na	**36,2**	na	31,8	na	*
N7	na	*	*	*	na	*	/	*	na	*	*	*	na	*	/	*	na	na	na	**33,8**	na	34,6	/	*
N10	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	na	na	26,2	na	**61,3**	na	*
I-Hsp	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	na	na	28,0	na	**38,8**	na	*
C-Hsp	*	*	na	*	na	na	/	*	*	*	na	*	na	na	**368,9**	*	na	na	na	**33,8**	na	na	**45,5**	*

Continuação Tabela 18. Produção citocinas induzidas nas iDCs por fragmentos da Hsp60.

	IL-2								IL-5								IL-4							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**
iDC	*	*	*	*	na	*	*	*	*	*	*	*	na	*	*	*	*	*	*	*	na	*	*	*
I8	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
I9	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
I2	na	*	*	*	na	*	na	*	na	na	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
I4	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
I6	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
C3	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
C4	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
C8	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
C9	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
p277	*	*	*	*	na	*	*	*	na	*	*	*	na	*	*	*	*	*	*	*	na	*	*	*
N2	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
N3	na	*	*	*	na	na	*	*	na	*	*	*	na	na	*	*	na	*	*	*	na	*	*	*
N4	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
N6	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
N7	na	*	*	*	na	*	/	*	na	*	*	*	na	*	/	*	na	*	*	*	na	*	/	*
N10	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
I-Hsp	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*
C-Hsp	*	*	na	*	na	na	/	*	*	*	na	*	na	na	*	*	*	*	*	*	na	*	*	*

Continuação Tabela 18. Produção citocinas induzidas nas iDCs por fragmentos da Hsp60.

	IL-12								IL-6								TGF-β							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57
iDC	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	*	**550,2**	na	na	na	na	na	na	*	*
I8	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I9	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	na	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I2	na	na	na	**21,7**	na	na	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I4	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I6	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**26,4**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C3	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C4	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**20,5**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C8	na	na	na	*	na	**22,5**	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C9	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
p277	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**54,8**	/	*	na	na	na	na	na	na	*	*
N2	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N3	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	na	**505,8**	*	na	na	na	na	na	na	**145,7**	na
N4	na	na	na	*	na	na	*	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N6	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**20,7**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N7	na	na	na	*	na	**24,3**	na	*	na	na	na	*	na	*	/	*	na	na	na	na	na	na	**189,5**	**70,8**
N10	na	na	na	*	na	*	/	*	na	na	na	*	na	**23,2**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I-Hsp	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C-Hsp	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	na	**610,3**	*	na	na	na	na	na	na	**106,8**	*

Quantidade de citocinas (pg/ml) produzida por células dendríticas imaturas (iDC) cultivadas com ou sem fragmentos da Hsp60 (I8, I9, I2, I4, I6, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N6, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60). Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura celular coletados após 48h de cultura. Detecção por CBA (*Cytometric Beads Array*) e ELISA (TGF-β). Valores mínimo e máximo de detecção do CBA= 20pg/ml e 5000 pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do ELISA: 32pg/ml a 1000pg/ml. * = produção <

20 pg/ml ou 32pg/ml (ELISA). Exp.= experimento. na= não avaliada. Em negrito produção induzida. = inibição ≥ 50%. / = valores não determinados por problemas na aquisição. IFN-γ , TNF-α, IL-2, IL-4 eIL- 5 n=7; IL-12p70, IL-6 e IL-10 n=4; TGF-β n=2.

Tabela 19. Produção citocinas induzidas nas iDCs IL-10 por fragmentos da Hsp60.

	IFN-γ								TNF-α								IL-10							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57
iDC	*	*	na	*	na	*	*	*	**24,8**	**42,6**	na	*	na	*	*	*	na	na	na	**29,1**	na	**93,9**	*	*
I8	na	*	na	*	na	*	na	*	na	**66,9**	na	*	na	**376,3**	na	*	na	na	na	**34,0**	na	**117,4**	na	*
I9	na	*	na	*	na	na	na	*	na	30,1	na	*	na	na	na	*	na	na	na	**30,2**	na	na	na	*
I2	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**431,2**	na	*	na	na	na	**33,2**	na	**95,6**	na	*
I4	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	na	na	**44,5**	na	42,3	na	*
I6	na	*	na	*	na	*	na	*	na	20,2	na	*	na	*	na	*	na	na	na	**39,0**	na	**96,1**	na	*
C3	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	**36,2**	na	*	na	na	na	**29,5**	na	80,7	na	*
C4	na	*	na	*	na	*	na	*	na	23	na	*	na	**71,9**	na	*	na	na	na	**36,6**	na	29,2	na	*
C8	na	*	na	*	na	*	na	*	na	**49,6**	na	*	na	**66,0**	na	*	na	na	na	**29,3**	na	34,9	na	**37,2**
C9	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	na	na	**31,1**	na	**97,8**	na	*
p277	na	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	/	*	*	na	na	na	27,9	na	67,4	*	*
N2	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	**122,2**	na	*	na	na	na	**112,8**	na	61,0	na	**232,9**
N3	na	*	na	*	na	na	*	*	na	*	na	*	na	na	*	*	na	na	na	29,0	na	na	*	*
N4	na	*	na	*	na	*	na	*	na	23,4	na	*	na	*	na	*	na	na	na	**49,7**	na	27,4	na	*
N6	na	*	na	*	na	*	na	*	na	25,6	na	*	na	*	na	*	na	na	na	**33,0**	na	46,4	na	*
N7	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	na	na	**40,4**	na	34,3	**34,1**	*
N10	na	*	na	*	na	*	na	*	na	**67,7**	na	*	na	**30,9**	na	*	na	na	na	**29,8**	na	30,2	na	*
I-Hsp	na	*	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	**100,6**	na	38,8	na	*
C-Hsp	*	*	na	*	na	na	*	*	*	29,9	na	*	na	na	*	*	na	na	na	**28,4**	na	na	*	*

Continuação Tabela 19. Produção citocinas induzidas nas iDCs IL-10 por fragmentos da Hsp60.

	IL-2								IL-5								IL-4							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**
iDC	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*
I8	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
I9	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*
I2	na	*	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
I4	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
I6	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
C3	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
C4	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
C8	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
C9	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
p277	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*
N2	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
N3	na	*	na	*	na	na	*	*	na	*	na	*	na	na	*	*	na	*	na	*	na	na	*	*
N4	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
N6	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
N7	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*
N10	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
I-Hsp	na	*	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
C-Hsp	*	*	na	*	na	na	*	*	*	*	na	*	na	na	*	*	*	*	na	*	na	na	*	*

Continuação Tabela 19. Produção citocinas induzidas nas iDCs IL-10 por fragmentos da Hsp60.

	IL-12								IL-6								TGF-β							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57
iDC	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	na	na	na	*	*
I8	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	/	na	**29,55**	na	na	na	na	na	na	na	na
I9	na	na	na	*	na	na	na	*	na	na	na	*	na	na	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I2	na	na	na	*	na	**20,89**	na	*	na	na	na	*	na	/	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I4	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	**28,11**	na	na	na	na	na	na	na	na
I6	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C3	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C4	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	/	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C8	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**82,27**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C9	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
p277	na	na	na	**23,13**	na	*	*	*	na	na	na	*	na	/	*	*	na	na	na	na	na	na	*	*
N2	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**302,44**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N3	na	na	na	*	na	na	*	*	na	na	na	*	na	na	*	*	na	na	na	na	na	na	*	na
N4	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N6	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N7	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	*	na	*	*	*	na	na	na	na	na	na	*	*
N10	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	**28,76**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I-Hsp	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C-Hsp	na	na	na	*	na	na	*	*	na	na	na	*	na	na	*	*	na	na	na	na	na	na	*	*

Quantidade de citocinas (pg/ml) produzidas por células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) cultivadas com ou sem fragmentos da Hsp60 (I8, I9, I2, I4, I6, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N6, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60). Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura celular coletados após 48h de cultura. Detecção por CBA (*Cytometric Beads Array*) e ELISA (TGF-β). Valores mínimo e máximo de detecção do CBA= 20pg/ml e 5000 pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do ELISA: 32pg/ml a 1000pg/ml. * = produção $<$ 20 pg/ml ou 32pg/ml (ELISA). Exp.= experimento. na= não avaliada. Em negrito produção induzida. ▒ = inibição ≥ 50%. / = valores não determinados por problemas na aquisição. IFN-γ , TNF-α, IL-2, IL-4 eIL- 5 n=7; IL-12p70, IL-6 e IL-10 n=4; TGF-β n=2.

.Tabela 20. Produção citocinas induzidas nas mDCs por fragmentos da Hsp60.

	IFN-γ								TNF-α								IL-10							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**
iDC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	**27,6**	**66,9**	*	*	**24,3**	*	na	na	na	**226,0**	**25,8**	**28,2**	*	*
I8	na	*	*	**22,3**	*	*	na	*	na	*	23,4	35,6	*	*	na	*	na	na	na	37,4	**32,7**	28,0	na	*
I9	na	*	*	na	*	*	na	*	na	*	*	na	*	*	na	*	na	na	na	na	**64,4**	**29,8**	na	*
I2	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	22,5	48,1	*	*	na	**21,2**	na	na	na	49,9	**33,3**	**37,2**	na	**34,0**
I4	na	*	*	**32,6**	*	*	na	*	na	*	26,7	34,6	*	*	na	*	na	na	na	/	**50,1**	**36,1**	na	**39,9**
I6	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	27,2	59,7	*	*	na	*	na	na	na	**302,4**	29,1	**31,6**	na	**31,3**
C3	na	*	*	**41,1**	*	*	na	*	na	*	**28,0**	33,3	*	*	na	*	na	na	na	/	**65,7**	**92,4**	na	*
C4	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	na	na	47,3	**50,1**	**95,0**	na	*
C8	na	*	*	*	*	*	na	**90,0**	na	*	*	51,3	*	*	na	**21,2**	na	na	na	71,3	**30,6**	**58,5**	na	**36,8**
C9	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	21,0	59,3	*	*	na	*	na	na	na	142,9	**61,2**	**38,3**	na	**20,7**
p277	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	23,7	45,4	*	*	*	*	na	na	na	170,4	25,6	**74,1**	**23,8**	**35,8**
N2	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	21,5	43,7	*	*	na	*	na	na	na	/	**27,6**	**40,0**	na	**93,6**
N3	na	*	*	na	*	*	**90,9**	*	na	*	**29,5**	na	*	*	na	*	na	na	na	na	**31,9**	**76,8**	*	*
N4	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	27,0	**80,1**	*	*	na	*	na	na	na	30,4	**89,8**	25,5	na	*
N6	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	27,6	47,9	*	**28,9**	na	*	na	na	na	111,1	**26,1**	**63,3**	na	*
N7	na	*	*	*	*	*	*	*	na	*	20	47,1	*	*	na	*	na	na	na	**622,4**	25,8	**48,2**	*	*
N10	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	50,5	*	*	na	*	na	na	na	108,2	**28,6**	**33,1**	na	*
I-Hsp	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	56,6	na	*	na	*	na	na	na	167,9	na	22,1	na	*
C-Hsp	*	*	na	na	na	*	**351,4**	*	*	*	na	na	na	*	**318,0**	*	na	na	na	na	na	**28,5**	**24,0**	*

Continuação Tabela 20. Produção citocinas induzidas nas mDCs por fragmentos da Hsp60.

	IL-2								IL-5								IL-4							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**	**DC7**	**DC18**	**DC19**	**DC22**	**DC24**	**DC29**	**DC56**	**DC57**
iDC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
I8	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
I9	na	*	*	na	*	*	na	*	na	*	*	na	*	*	na	*	na	*	*	na	*	*	na	*
I2	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
I4	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
I6	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
C3	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
C4	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
C8	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
C9	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
p277	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
N2	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
N3	na	*	*	na	*	*	/	*	na	*	*	na	*	*	*	*	na	*	*	na	*	*	*	*
N4	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
N6	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	*	*	*	*	na	*
N7	na	*	*	*	*	*	*	*	na	*	*	*	*	*	*	*	na	*	*	*	*	*	*	*
N10	na	*	*	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	*	*	na	*
I-Hsp	na	*	*	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*	na	*
C-Hsp	*	*	*	na	na	*	/	**38,76**	*	*	na	na	na	*	*	*	*	*	na	na	na	*	*	*

Continuação Tabela 20. Produção citocinas induzidas nas mDCs por fragmentos da Hsp60.

	IL-12								IL-6								TGF-β							
	Experimentos								Experimentos								Experimentos							
Condição experimental	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57	DC7	DC18	DC19	DC22	DC24	DC29	DC56	DC57
iDC	na	na	na	*	*	*	*	*	na	na	na	*	*	**85,7**	*	*	na	na	na	na	na	na	*	*
I8	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	**89,0**	na	**511,3**	na	na	na	na	na	na	na	na
I9	na	na	na	na	*	*	na	*	na	na	na	na	*	78,0	na	**281,8**	na	na	na	na	na	na	na	na
I2	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	**104,3**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
I4	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	69,8	na	**62,6**	na	na	na	na	na	na	na	na
I6	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	30,0	na	**580,7**	na	na	na	na	na	na	na	na
C3	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	23,1	na	**484,3**	na	na	na	na	na	na	na	na
C4	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	46,8	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C8	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	53,3	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
C9	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	74,4	na	**315,5**	na	na	na	na	na	na	na	na
p277	na	na	na	*	*	*	*	*	na	na	na	*	*	**96,2**	**154,3**	**36,2**	na	na	na	na	na	na	*	*
N2	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	79,9	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N3	na	na	na	na	*	**21,1**	*	*	na	na	na	na	*	42,6	**171,4**	*	na	na	na	na	na	na	na	**190,1**
N4	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	62,5	na	**552,2**	na	na	na	na	na	na	na	na
N6	na	na	na	*	*	**21,4**	na	*	na	na	na	*	*	**202,5**	na	*	na	na	na	na	na	na	na	na
N7	na	na	na	*	*	*	*	*	na	na	na	*	*	36,9	**143,3**	**63,2**	na	na	na	na	na	na	*	**31,3**
N10	na	na	na	*	*	*	na	*	na	na	na	*	*	84,9	na	**544,0**	na	na	na	na	na	na	na	na
I-Hsp	na	na	na	*	na	*	na	*	na	na	na	*	na	77,7	na	**242,3**	na	na	na	na	na	na	na	na
C-Hsp	na	na	na	na	na	*	*	*	na	na	na	na	na	*	/	**186,0**	na	na	na	na	na	na	*	**97,3**

Quantidade de citocinas (pg/ml) produzidas por células dendríticas maduras (mDCs) tratadas com ou sem fragmentos da Hsp60 (I8, I9, I2, I4, I6, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N6, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60). Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura celular coletados após 48h de cultura. Detecção por CBA (*Cytometric Beads Array*) e ELISA. Valores dados em pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do CBA= 20pg/ml e 5000 pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do ELISA: 32pg/ml a 1000pg/ml. * = produção < 20 pg/ml ou 32pg/ml (ELISA). Exp.= experimento. na= não avaliado. Em negrito produção induzida. = inibição ≥ 50%. / = valores não determinados por problemas na aquisição. n=8 (iDC p277), n= 7 (iDC N7); n=6 (iDC CHsp60); n=5 (iDC N3); n=4 (iDC demais fragmentos Hsp60); n=2 TGF-β .

7.5 Avaliação da Auto-reatividade de linfócitos T: importância das diferentes DCs e da interação destas com a Hsp60

7.5.1 Avaliação da auto-reatividade dos linfócitos T frente às células dendríticas

Analisamos a auto-reatividade diferencial de linfócitos T (LT) dirigida aos diferentes tipos de DCs geradas por nós. Para tal, avaliamos a resposta proliferativa de LT autólogos (n=5) bem como as citocinas produzidas pelas coculturas desses LT com as diferentes DCs (n=4).

- *Proliferação*

Analisamos as coculturas de iDCs, iDCs IL-10 e mDCs com LT autólogos, após 72h e medimos a incorporação de Timidina, adicionada nas últimas 18h de cultura. Como controle positivo utilizamos o αCD3. A proliferação foi considerada positiva quando o índice (I.E.) $\geq$ 2 e inibida quando apresentou I.E. $\leq$ 0,5. O índice foi calculado dividindo-se as cpm (contagens por minuto) das coculturas (DC+LT) pelas cpm das DCs ou LT, dependendo de quem apresentasse o maior valores de cpm.

Tabela 21. Auto-reatividade proliferativa de linfócitos T autólogos frente às diferentes células dendríticas.

Condições	DC07		DC21		DC22		DC56		DC57		Média dos Exp.	
	CPM	I.E.	CPM	I.E.	COM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.
iDC	74,3	--	524,0	--	314,7	--	94,7	--	1006,9	--	402,9	--
iDC + LT	829,4	**11,0**	3894,2	**7,4**	1794,2	**5,7**	653,6	**3,4**	824,3	0,4	1599,1	**5,6**
iDC + LT + αCD3	16798,1	**20,3**	61096,3	**15,7**	49577,3	**27,6**	5190,8	**7,9**	2177,3	**2,6**	26967,9	**14,8**
iDC IL-10	54,2	--	239,8	--	357,6	--	2073,6	1,0	1684,2	--	881,8	--
iDC IL-10 + LT	500,1	**6,6**	14712,1	**36,2**	2754,8	**7,7**	1625,7	0,7	1979,7	1,0	4314,4	**10,4**
iDC IL-10 +LT + αCD3	7308,5	**14,6**	27146,9	1,8	29356,7	**10,7**	23870,2	**14,7**	1998,7	1,0	17936,2	**8,6**
mDC	63,6	--	888,0	--	644,9	--	424,7	1,0	1521,4	--	708,5	--
mDC + LT	218,0	**2,9**	3961,4	**4,5**	2352,2	**3,6**	3764,8	**8,5**	1539,4	0,8	2367,1	**4,1**
mDC + LT + αCD3	17663,7	**81,0**	68656,0	**17,3**	50085,1	**21,3**	1961,5	0,5	2606,3	1,7	28194,5	**24,4**
LT	75,7	--	406,4	--	214,3	--	193,9	--	2012,2	--	580,5	--
LT + αCD3	411,1	**5,4**	4301,7	**10,6**	Na	--	na	--	na	--	2356,4	**8**

A auto-reatividade proliferativa às DCs (DC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos LT ou das DCs sozinhas, dependendo de qual apresentasse maiores cpm. Já a proliferação induzida na presença de αCD3 foi calculada dividindo as cpm de DC+LT+αCD3 por DC+LT I.E. ≥ 2 indica proliferação. I.E ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas, iDC IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10, mDC= células dendríticas maduras. Índice de estimulação= I.E. Negrito= valores de índice de estimulação positivos. -- = não se aplica. n=5. Os experimentos DC56 e 57 foram realizados com linfócitos T purificados a partir de linfonodos, enquanto que os demais experimentos foram realizados com linfócitos T purificados a partir de Baço.

Todas as DCs foram capazes de induzir auto-reatividade proliferativa de LT, porém as iDCs IL-10 foram as que induziram maiores índices de proliferação (Tabela 21 e Figura 29). As iDCs IL-10 induziram auto-reatividade proliferativa em 3 de 5 experimentos e, na média, apresentaram índices de estimulação 2x maiores do que as demais DCs. As iDCs induziram auto-reatividade proliferativa em 4/5 experimentos, com índices médios em níveis intermediários. Já as mDCs induziram auto-reatividade proliferativa em LT em 4 de 5 experimentos e com as mais baixas médias de índices proliferativos.

Observamos também que os dois últimos experimentos #DC56 e #DC57 apresentaram os mais baixos índices de estimulação para os três tipos de DCs estudadas, devido à grande proliferação espontânea dos linfócitos T.

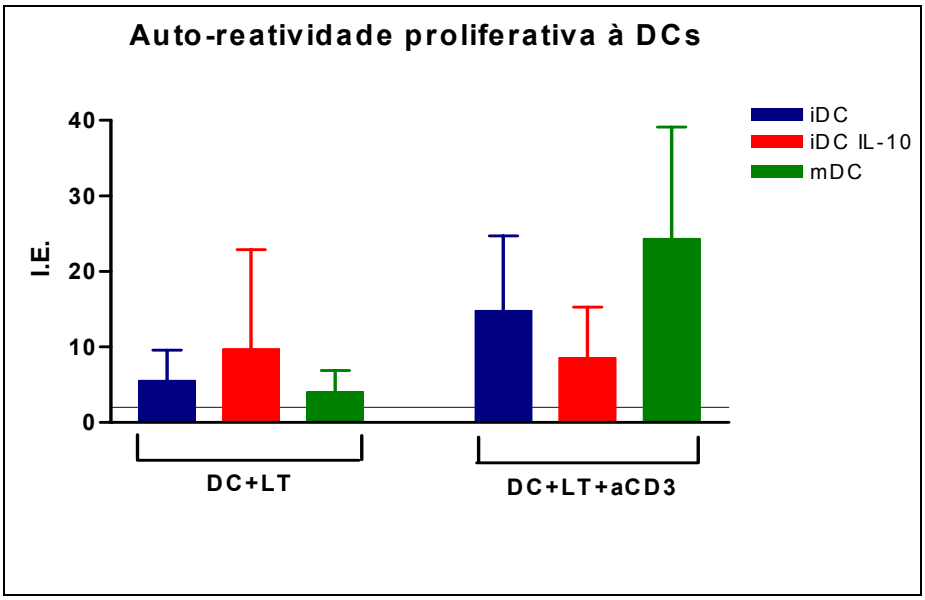


Figura 29. Média da auto-reatividade proliferativa às diferentes DCs. Índices de estimulação das coculturas autólogas com diferentes DCs e com o controle positivo αCD3, ambos com os desvios padrão. iDC= célula dendrítica imatura. iDC IL-10= célula dendrítica imatura tratada com IL-10 e mDC=célula dendrítica madura. Índices positvos ≥2. n=5. I.E= índice de estimulação. (I.E.) ≥ 2 indica proliferação positiva (acima da linha pontilhada).

Os dados brutos de todas as condições testadas em todos os experimentos de proliferação autóloga se encontram-se separados por experimento nos Anexos (A).

- *Citocinas*

Para avaliar o padrão de produção de citocinas pelas coculturas autólogas de LT com as diferentes DCs coletamos sobrenadantes de co-cultura 48h. As citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2 e TGF-β foram avaliadas por citometria de fluxo, em ensaios de CBA (*Cytometric Bead Array*) e ELISA (para TGF-β). O número de experimentos variou entre algumas citocinas, sendo: n=3 TGF-β; n=4 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ); n=3 (IL-10, IL-12 e IL-6). Os limites de detecção do ensaio de CBA foram 20pg/ml a 5000pg/ml e do ELISA 32pg/ml a 1000pg/ml. Vale a pena ressaltar que a produção de citocinas pela cocultura (DC+LT) foi considerada positiva quando os valores foram maiores que os produzidos pelas DCs já que os LT sozinhos não induziram a produção de nenhuma citocina em nenhum experimento (Tabela 9).

No Quadro 2 apresentamos uma visão geral da auto-reatividade de linfócitos T à DCs tanto com relação à produção de citocinas como em relação à proliferação celular. Observamos um maior número de proliferação positiva do que de produção de citocinas. As citocinas IL-4 e IL-5 não foram produzidas em nenhum experimento, o mesmo é válido para a citocina IL-12p70 (não apresentada no Quadro 2).

Quadro 2 – Balanço da auto-reatividade de linfócitos T às diferentes DCs: perfil da produção de citocinas e de proliferação celular.

Auto-reatividade de linfócitos T dirigida ás diferentes DCs					
	Citocinas				Resposta proliferativa
DCs	TNF-α	IFN-γ	IL-2	IL-10	
iDC	DC07	DC57	DC22 DC57		DC07 DC21 DC22 DC56
iDC IL-10	DC07			DC57	DC07 DC21 DC22
mDC	DC56	DC56			DC07 DC21 DC22 DC56

A produção de citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β), em sobrenadantes de culturas de 48 horas de LT+ DC (auto-reatividade às DCs). Representamos a freqüência de produção de cada citocina nas diferentes coculturas com os diferentes tipos de DCs. iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10; mDC: maduras. Valores mínimo e máximo de detecção: 20-5000 pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). As respostas linfoproliferativas foram medidas como índices estimulação obtidos como a razão entre a cpm média da cocultura e aquela dos linfócitos T ou das células dendríticas sozinhas, dependendo de qual das duas apresentasse maiores cpm. Cada casela representa um experimento. : Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas iDC. Experimentos positivos para a produção de citocinas e/ou de resposta linfoproliferativa positiva nas iDC IL-10. Experimentos positivos para a produção de citocinas e/ou de resposta linfoproliferativa positiva nas mDC. Os números dentro das caselas referem-se a cada experimento com produção de citocinas e resposta linfoproliferativa na auto-reatividade LT x DC. n=5 (proliferação). n= 4 (citocinas).

Continuação Quadro 2. Balanço da auto-reatividade de linfócitos T às diferentes DCs: perfil da produção de citocinas e de proliferação celular.

Auto-reatividade de linfócitos T dirigida ás diferentes DCs					
	Citocinas				Resposta proliferativa
DCs	IL-4	IL-5	IL-6	TGF-β	
iDC			DC22 DC57	DC22 DC56	DC07 DC21 DC22 DC56
iDC IL-10				DC22	DC07 DC21 DC22
mDC			DC22 DC57	DC22	DC07 DC21 DC22 DC56

A produção de citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β), em sobrenadantes de culturas de 48 horas de LT+ DC (auto-reatividade às DCs). Representamos a freqüência de produção de cada citocina nas diferentes coculturas com os diferentes tipos de DCs. iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10; mDC: maduras. Valores mínimo e máximo de detecção: 20-5000 pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). As respostas linfoproliferativas foram medidas como índices estimulação obtidos como a razão entre a cpm média da cocultura e aquela dos linfócitos T ou das células dendríticas sozinhas, dependendo de qual das duas apresentasse maiores cpm. Cada casela representa um experimento. : Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas iDC. Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas iDC IL-10. Experimentos positivos para a produção de citocinas e de resposta linfoproliferativa positiva nas mDC. Os números dentro das caselas referem-se a cada experimento com produção de citocinas e resposta linfoproliferativa na auto-reatividade LT x DC. n=5 (proliferação). n= 4 (citocinas)

Tabela 22. Produção de citocinas por diferentes coculturas de linfócitos T autólogos e os diferentes tipos de células dendríticas.

Produção de Citocinas pelas Coculturas das DCs com LT autólogos (pg/ml)												
	Experimento DC-007			Experimento DC-022			Experimento DC-056			Experimento DC-057		
Citocinas	**iDC**	**iDC IL-10**	**mDC**	**iDC**	**iDC IL-10**	**mDC**	**iDC**	**iDC IL-10**	**mDC**	**iDC**	**iDC IL-10**	**mDC**
TNF-α	**29,9**	**40,4**	*	*	*	*	*	*	**24,6**	*	*	*
IFN-γ	*	*	*	*	*	*	*	*	**30,9**	**27,9**	*	*
IL-12p70	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	*	*
IL-10	na	na	na	*	*	*	*	*	*	*	**23,3**	*
IL-6	na	na	na	**104,9**	*	**100,2**	*	*	*	**29,4**	*	**89,2**
IL-5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
IL-4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
IL-2	*	*	*	**24,5**	*	*	*	*	*	**51,8**	*	*
TGF-β	na	na	na	**569,1**	**921,3**	**774,5**	**36,0**	*	*	*	*	*

Quantidade de citocinas (pg/ml) produzidas nas coculturas de células dendríticas imaturas (iDC), imaturas tratadas com IL-10 (iDC IL-10) e células dendríticas maduras (mDC) em cocultura com linfócitos T (LT) autólogos. Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura celular coletados após 48h de cultura. Detecção por CBA (*Cytometric Beads Array*) e ELISA. Valores dados em pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do CBA= 20pg/ml e 5000 pg/ml. Valores mínimo e máximo de detecção do ELISA: 32pg/ml a 1000pg/ml. * = produção < 20 pg/ml (CBA) ou 32pg/ml (ELISA). Exp.= experimento. na= não avaliado. Em negrito produção positiva. n=4 e n=3 (TGF-β).

Conforme apresentamos na Tabela 22, observamos que seis citocinas foram produzidas pelas coculturas autólogas das diferentes DCs: TGF-β, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-2 e IL-10, apesar do pequeno número de experimentos. Observamos que parece haver um padrão de produção de citocinas diferente para cada tipo de cocultura de modo que podemos diferenciá-las. Assim, no geral, observamos que as coculturas iDCs foram capazes de produzir TNF-α (1/4), IFN-γ (1/4), IL-6 (2/3), TGF-β (2/3) em baixas concentrações e foi a única responsável pela produção de IL-2 (2/4). Já com relação às coculturas com iDCs IL-10, apesar de produzirem TNF-α (1/4) e TGF-β (1/3 – em altas concentrações 921,3pg/ml) foram as únicas a produzir IL-10 (1/3) e a não produzir IL-6. Por fim, as coculturas com mDCs também produziram TNF-α (1/4), IFN-γ (1/3), IL-6 (2/3) e TGF-β (1/3). Vale ressaltar que as maiores produções observadas foram: IL-6 (100pg/ml) para iDCs e mDCs e TGF-β acima de 500pg/ml, para as três DCs.

A Figura 30 nos permite observar que na média, a produção das citocinas pelas coculturas, em sua maioria, foi abaixo do limite de detecção do teste de CBA (20pg/ml) e também do ELISA (32pg/ml).

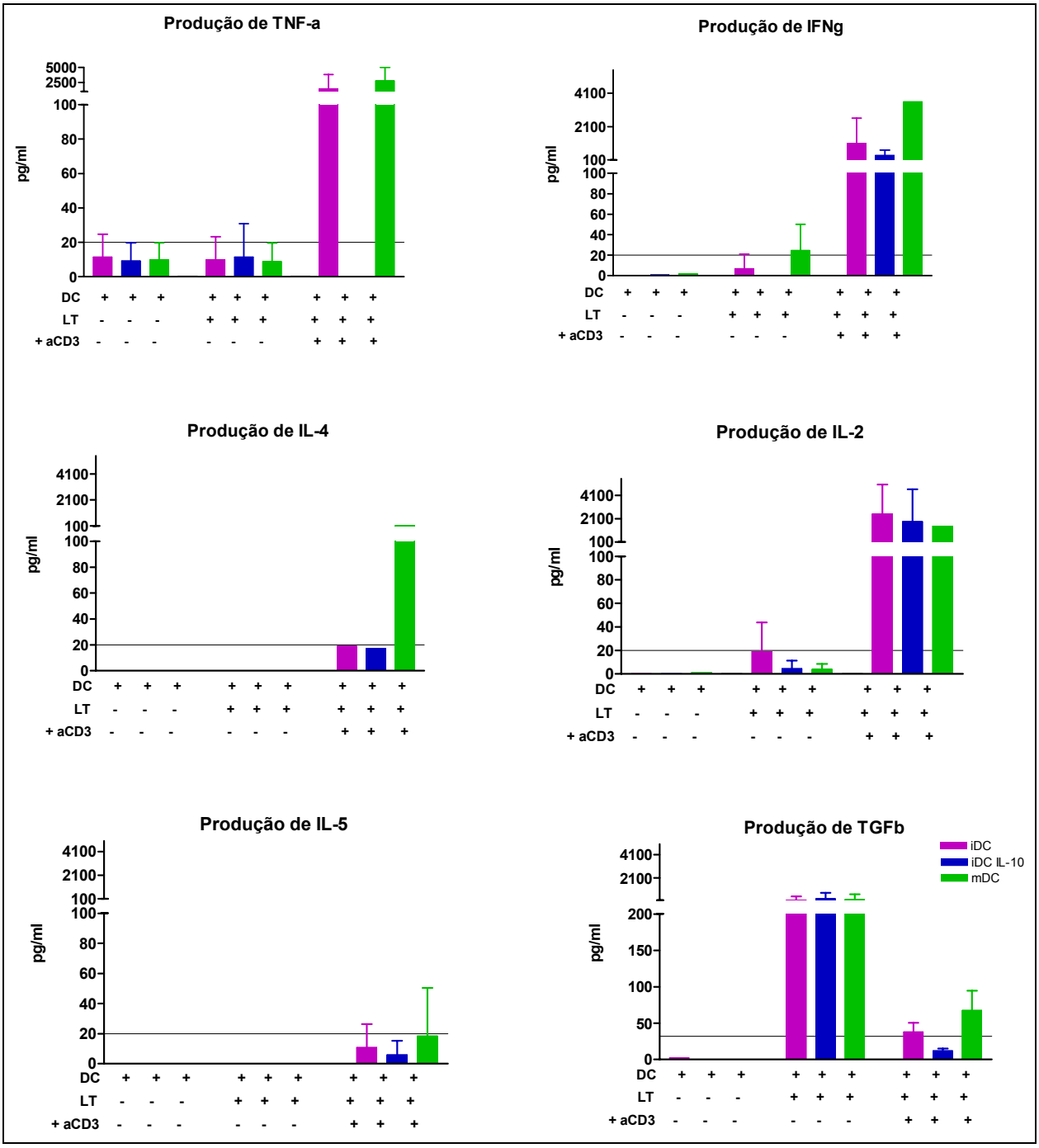


Figura 30. **Produção de citocinas nas diferentes coculturas autólogas.** Produção de citocinas nas coculturas de linfócitos T (LT) autólogos com células dendríticas imaturas (iDCs), imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10) e células dendríticas maduras (mDCs). Valores considerados positivos entre 20pg/ml e 5000pg/ml para CBA e 32pg/ml a 1000pg/ml para ELISA (limites mínimo e máximo de detecção). n=3 (IL-10, IL-12 e IL-6, TGF-β); n=4 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ). LT sozinho não induziu a produção de nenhuma das citocinas acima em nenhum dos experimentos.

7.5.2 Inibição da auto-reatividade de LT frente às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 e indução de auto-reatividade dirigida aos fragmentos da Hsp60.

Nos experimentos em que houve detecção de auto-reatividade de LT dirigida às diferentes DCs, avaliamos a capacidade dos fragmentos da Hsp60 de inibir a auto-reatividade, tanto na resposta proliferativa (n=5) bem como nas citocinas produzidas (n=4). Também avaliamos a auto-reatividade de LTs dirigida a fragmentos da Hsp60 no contexto das diferentes DCs, tanto para a produção de citocinas como para resposta proliferativa.

- *Proliferação*

Após observarmos a auto-reatividade de LT dirigida às diferentes DCs geradas por nós verificamos se os diferentes fragmentos da Hsp60 (10µg/ml) foram capazes de: (i) inibir essa auto-reatividade; (ii) gerar auto-reatividade aos fragmentos da Hsp60. Para tal, analisamos coculturas de iDCs, iDCs IL-10 e mDCs com e sem os fragmentos da Hsp60 com LT autólogos após 72 h pela incorporação de Timidina, que foi adicionada nas últimas 18h de cultura. O índice de estimulação (I.E.) foi calculado dividindo-se as cpm das coculturas tratadas com fragmentos da Hsp60 (DC+LT+Hsp60) pelas cpm das coculturas sem os fragmentos (DCs+LT)

Consideramos assim, inibição da auto-reatividade de LT às diferentes DCs quando o I.E. $\leq$ 0,5. Lembramos que esta análise só foi feita nos casos em que houve auto-reatividade, ou seja, quando o I.E. foi ≥ 2 nas coculturas (LT + DC). Por fim, consideramos auto-reatividade dirigida à Hsp60 quando o I.E. ≥ 2 (DC+LT+Hsp60).

Tabela 23. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às iDC.

	Experimentos					Efeito dos Fragmentos	
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC21**	**DC22**	**DC56**	**DC57**	**Auto-reatividade à Hsp60**	**Inibição de auto-reatividade de LT à DC**
I8	na	na	1,1	na	na		
I9	na	na	1,2	na	na		
I2	na	na	1,1	na	na		
I4	na	na	0,9	na	na		
I6	na	na	0,9	na	na		
C3	na	na	0,8	na	na		
C4	na	na	0,5	na	na		
C8	na	na	0,1	na	na		
C9	na	na	0,6	na	na	2/5	3/4
p277	0,7	1,1	0,2	0,7	**2,8**		
N2	na	na	0,8	na	na		
N3	na	na	0,0	1,4	na		
N4	na	na	0,0	na	na		
N7	na	na	0,0	0,5	1,4		
N10	na	na	0,0	na	na		
I-Hsp60	na	na	0,0	na	na		
C-Hsp60	0,2	1,0	1,9	**6,4**	**2,8**		
iDC+LT	**11,0**	**7,4**	**5,7**	**3,4**	0,4		
αCD3	**20,3**	**15,7**	**27,6**	**7,9**	**2,6**		

n=5. LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas. Fragmentos Hsp60 utilizados: N2, N3, N4, N6, N7, N10, I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, I-Hsp60 e C-Hsp60. Os fragmentos foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. A auto-reatividade às DCs (iDC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das iDCs sozinhas, dependendo de qual apresentasse maiores cpm. O efeito de cada antígeno da Hsp60 sobre a auto-reatividade de linfócitos T dirigida às iDCs foi calculado dividindo-se a média de cpm dos linfócitos T cultivados com iDCs pulsadas com esse antígeno pela média de cpm da condição iDC+LT. Índice de estimulação (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E $\leq 0,5$ indica inibição da proliferação. Valores em negrito= indução ou aumento da auto-reatividade. na = não avaliados. αCD3= controle positivo. ☐ = Inibição.

Tabela 24. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às iDC IL-10.

	Experimentos					Efeito dos Fragmentos	
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC21**	**DC22**	**DC56**	**DC57**	**Auto-reatividade à Hsp60**	**Inibição de auto-reatividade de LT à DC**
I8	na	na	**0,1**	na	na		
I9	na	na	**0,0**	na	na		
I2	na	na	**0,0**	na	na		
I4	na	na	**0,0**	na	na		
I6	na	na	**0,0**	na	na		
C3	na	na	**0,1**	na	na		
C4	na	na	**0,1**	na	na		
C8	na	na	**0,1**	na	na		
C9	na	na	**0,1**	na	na	0/5	1/3
p277	1,1	1,5	**0,1**	1,1	0,6		
N2	na	na	**0,1**	na	na		
N3	na	na	**0,1**	1,3	na		
N4	na	na	**0,1**	na	na		
N7	na	na	**0,1**	1,2	0,7		
N10	na	na	**0,1**	na	na		
I-Hsp60	na	na	**0,1**	na	na		
C-Hsp60	1,6	0,7	1,4	1,1	0,8		
iDC IL-10 +LT	**6,6**	**36,2**	**7,7**	0,7	1		
αCD3	**14,6**	**1,8**	**10,7**	**14,7**	1		

n=5. LT = linfócitos T, iDC IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. Fragmentos Hsp60 utilizados: N2, N3, N4, N6, N7, N10, I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, I-Hsp60 e C-Hsp60. Os fragmentos foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. A auto-reatividade às DCs (iDC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das iDCs sozinhas, dependendo de qual apresentasse maiores cpm. O efeito de cada antígeno da Hsp60 sobre a auto-reatividade de linfócitos T dirigida às iDCs IL-10 foi calculado dividindo-se a média de cpm dos linfócitos T cultivados com iDCs pulsadas com esse antígeno pela média de cpm da condição iDC IL-10+LT. Índice de estimulação (I.E.) $\geq$ 2 indica proliferação. I.E $\leq$ 0,5 indica inibição da proliferação. Valores em negrito= indução ou aumento da auto-reatividade. ▢ Inibição. na = não avaliados. αCD3= controle positivo.

Tabela 25. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T dirigida às mDCs.

	Experimentos					Efeito dos Fragmentos	
Fragmentos	**DC07**	**DC21**	**DC22**	**DC56**	**DC57**	**Auto-reatividade à Hsp60**	**Inibição de auto-reatividade de LT à DC**
I8	na	na	0,7	na	na		
I9	na	na	0,6	na	na		
I2	na	na	0,6	na	na		
I4	na	na	0,6	na	na		
I6	na	na	0,4	na	na		
C3	na	na	0,4	na	na		
C4	na	na	0,4	na	na		
C8	na	na	0,5	na	na		
C9	na	na	0,3	na	na	1/5	2/4
p277	1,8	0,8	0,1	0,2	0,6		
N2	na	na	0,1	na	na		
N3	na	na	0,1	**2,7**	na		
N4	na	na	0,0	na	na		
N7	na	na	0,0	0,2	0,8		
N10	na	na	0,0	na	na		
I-Hsp60	na	na	0,0	na	na		
C-Hsp60	0,7	0,9	0,7	**2,4**	0,4		
mDC+LT	**2,9**	**4,5**	**3,6**	**8,5**	0,8		
+ αCD3	**81,0**	**17,3**	**21,3**	0,5	1,7		

n=5. LT = linfócitos T, mDC IL-10= células dendríticas maduras. Fragmentos Hsp60 utilizados: N2, N3, N4, N6, N7, N10, I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, I-Hsp60 e C-Hsp60. Os fragmentos foram adicionados às iDCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. A auto-reatividade às DCs (iDC+LT) foi calculada dividindo-se a média de cpm dessa condição pela média de cpm dos LT ou das iDCs sozinhas, dependendo de qual apresentasse maiores cpm. O efeito de cada antígeno da Hsp60 sobre a auto-reatividade de linfócitos T dirigida às iDCs foi calculado dividindo-se a média de cpm dos linfócitos T cultivados com iDCs pulsadas com esse antígeno pela média de cpm da condição mDC+LT. Índice de estimulação (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E $\leq 0,5$ indica inibição da proliferação. Valores em negrito= indução ou aumento da auto-reatividade. ▢ Inibição. na = não avaliados. αCD3= controle positivo.

Com relação ao efeito inibidor, podemos destacar (Tabelas 23, 24 e 25) que, de um modo geral, os fragmentos da Hsp60 foram capazes de inibir a proliferação autóloga de LT às diferentes DCs. As coculturas com iDC IL-10 foram as que tiveram o menor número de inibições (1/3) pelos fragmentos da Hsp60. As coculturas com mDCs ficaram em 2 lugar quanto à inibição (2/4). Por fim, as coculturas com iDCs apresentaram o maior número de inibições (3/4).

De um modo geral, vários fragmentos da Hsp60 tiveram efeito inibidor da proliferação autóloga de LT às diferentes DCs. Dentre todos os fragmentos testados, o peptídeo N7 se destacou por apresentar a maior freqüência de inibição (5/5 condições) e inibir a proliferação de LT frente aos três tipos de coculturas: iDCs (2/2), iDC IL-10 (1/1) e mDC (2/2). No entanto, o peptídeo p277 também foi inibidor em (4/11), inibindo com maior freqüência as coculturas de mDC (2/4). Por fim, a C-Hsp60 foi capaz de inibir somente 1/4 condições testadas nas coculturas com iDCs.

Com relação à auto-reatividade dirigida aos fragmentos da Hsp60, observamos que somente nas coculturas com iDCs e mDCs houve proliferação e com freqüências muito baixas (2/5 e 1/5, respectivamente). Além disso, obervamos que a C-Hsp60 foi a maior indutora desta auto-reatividade (3/15) seguinda pelo peptídeo p277 e N3 (1/15).

Nas Figuras 31, 32, 33, 34 e 35 podemos verificar os 5 experimentos individualmente e observar a inibição da auto-reatividade proliferativa de LT autólogos dirigida às diferentes DCs pelos fragmentos da Hsp60.

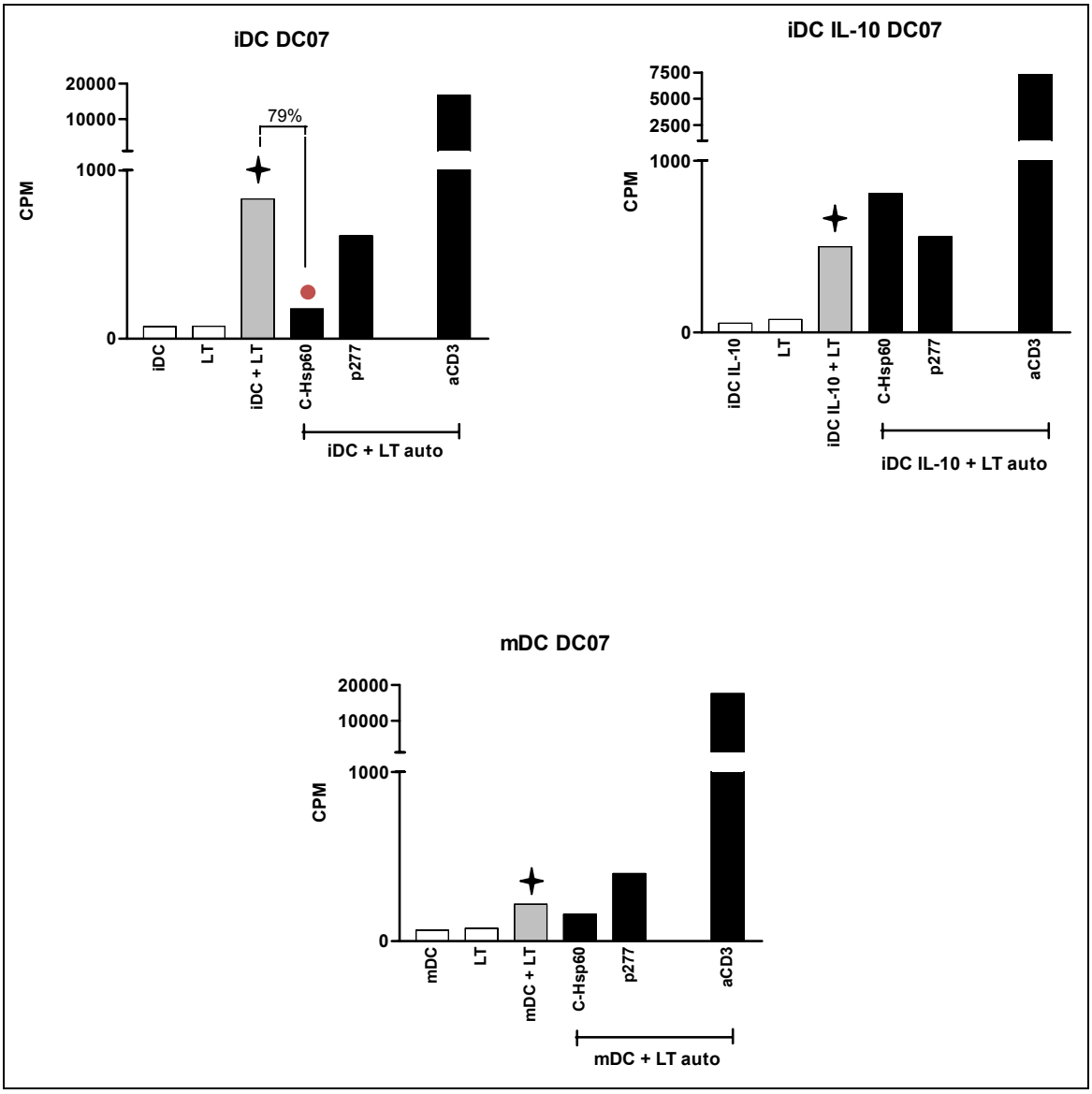


Figura 31. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC07. LT= linfócitos T. Células dendríticas imaturas (iDCs); células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10); células dendríticas maduras (mDCs). CPM= contagens por minutos. αCD3: controle positivo. ✦= auto-reatividade à DCs positiva. ● = inibição da proliferação celular. Consideramos inibição da auto-reatividade de LT quando a redução foi ≥50%.

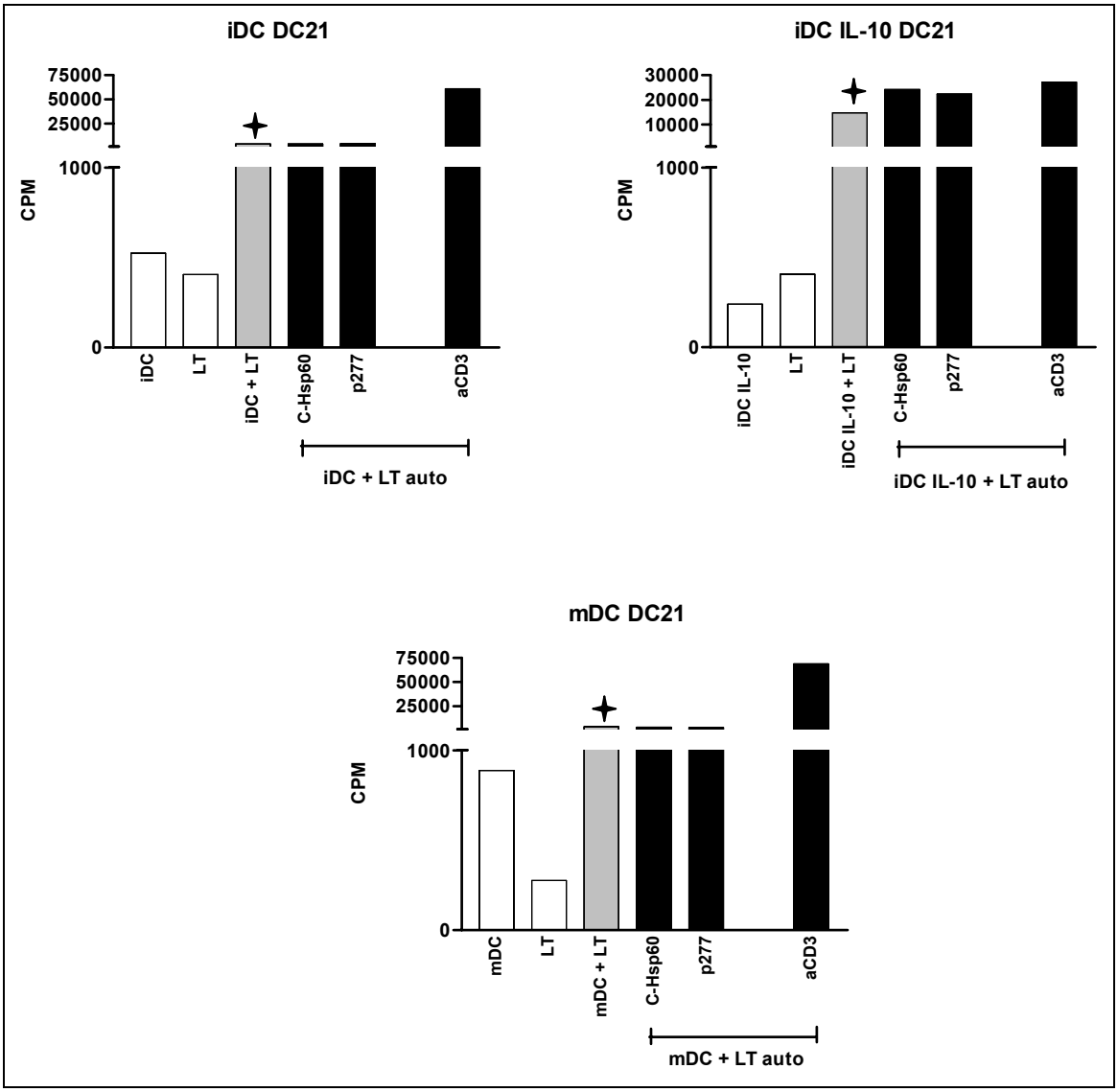


Figura 32. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC21. LT= linfócitos T. Células dendríticas imaturas (iDCs); células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10); células dendríticas maduras (mDCs). CPM= contagens por minutos. αCD3: controle positivo. ✦= auto-reatividade à DCs positiva. Consideramos inibição da auto-reatividade de LT quando a redução foi ≥50%.

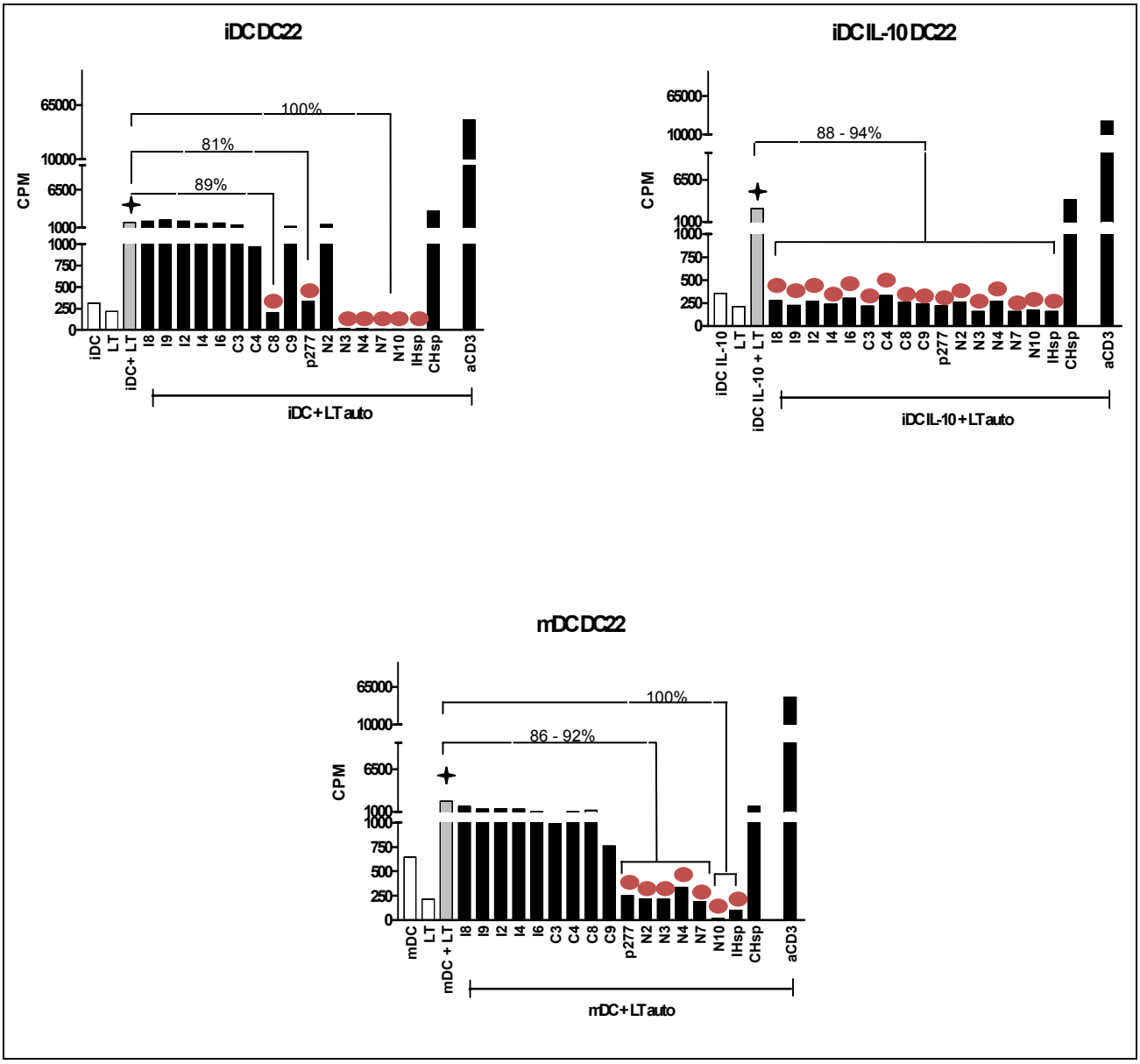


Figura 33. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC22. LT= linfócitos T. Células dendríticas imaturas (iDCs); células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10); células dendríticas maduras (mDCs). CPM= contagens por minutos. αCD3: controle positivo. ✦= auto-reatividade à DCs positiva. ● = inibição da proliferação celular. Consideramos inibição da auto-reatividade de LT quando a redução foi ≥50%.

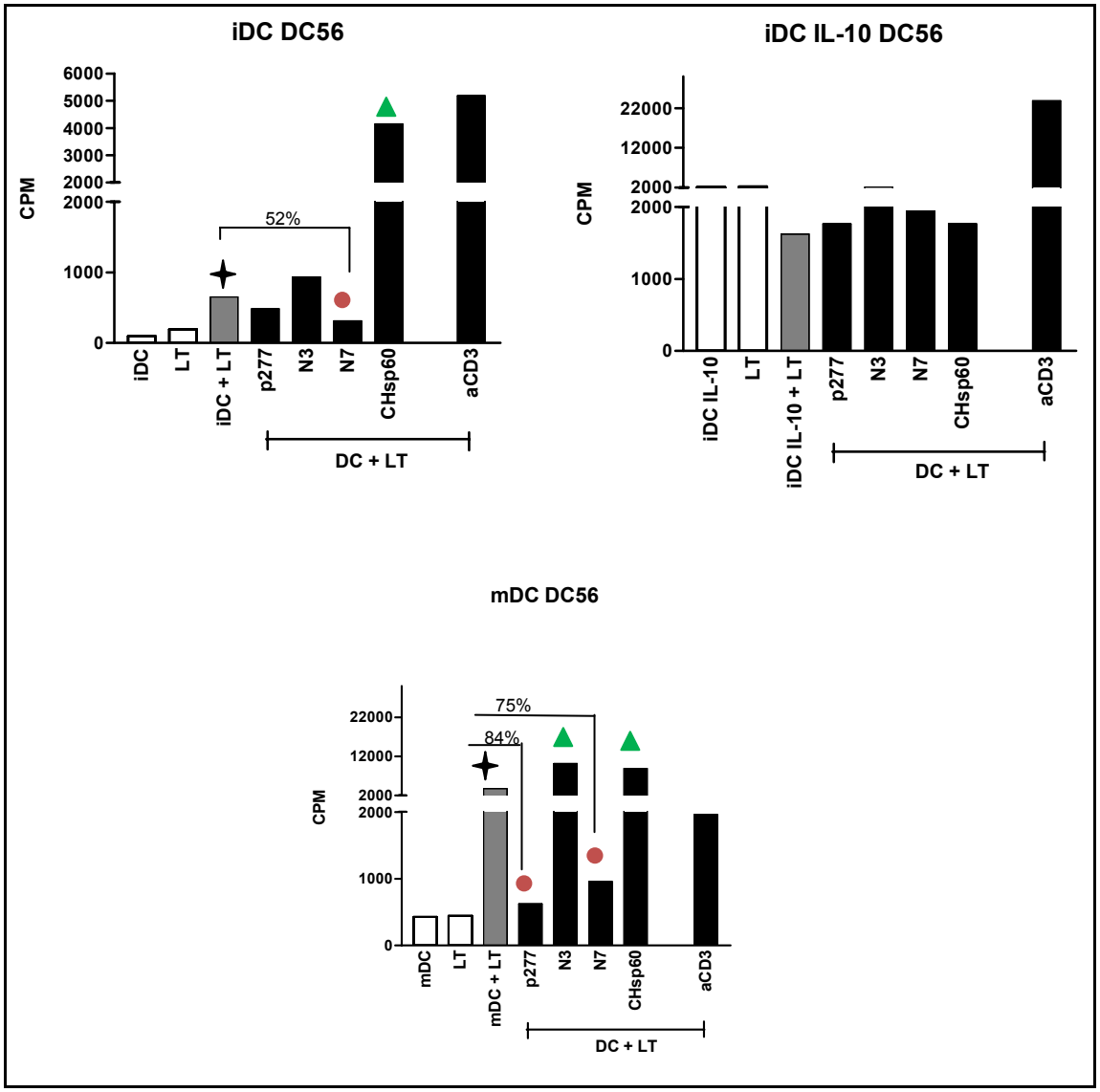


Figura 34. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC56. LT= linfócitos T. Células dendríticas imaturas (iDCs); células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10); células dendríticas maduras (mDCs). CPM= contagens por minutos. αCD3: controle positivo. ✦= auto-reatividade à DCs positiva. ● = porcentagem de inibição da proliferação celular. ▲ = auto-reatividade dirigida aos fragmentos da Hsp60. Consideramos inibição da auto-reatividade de LT quando a redução foi ≥50%.

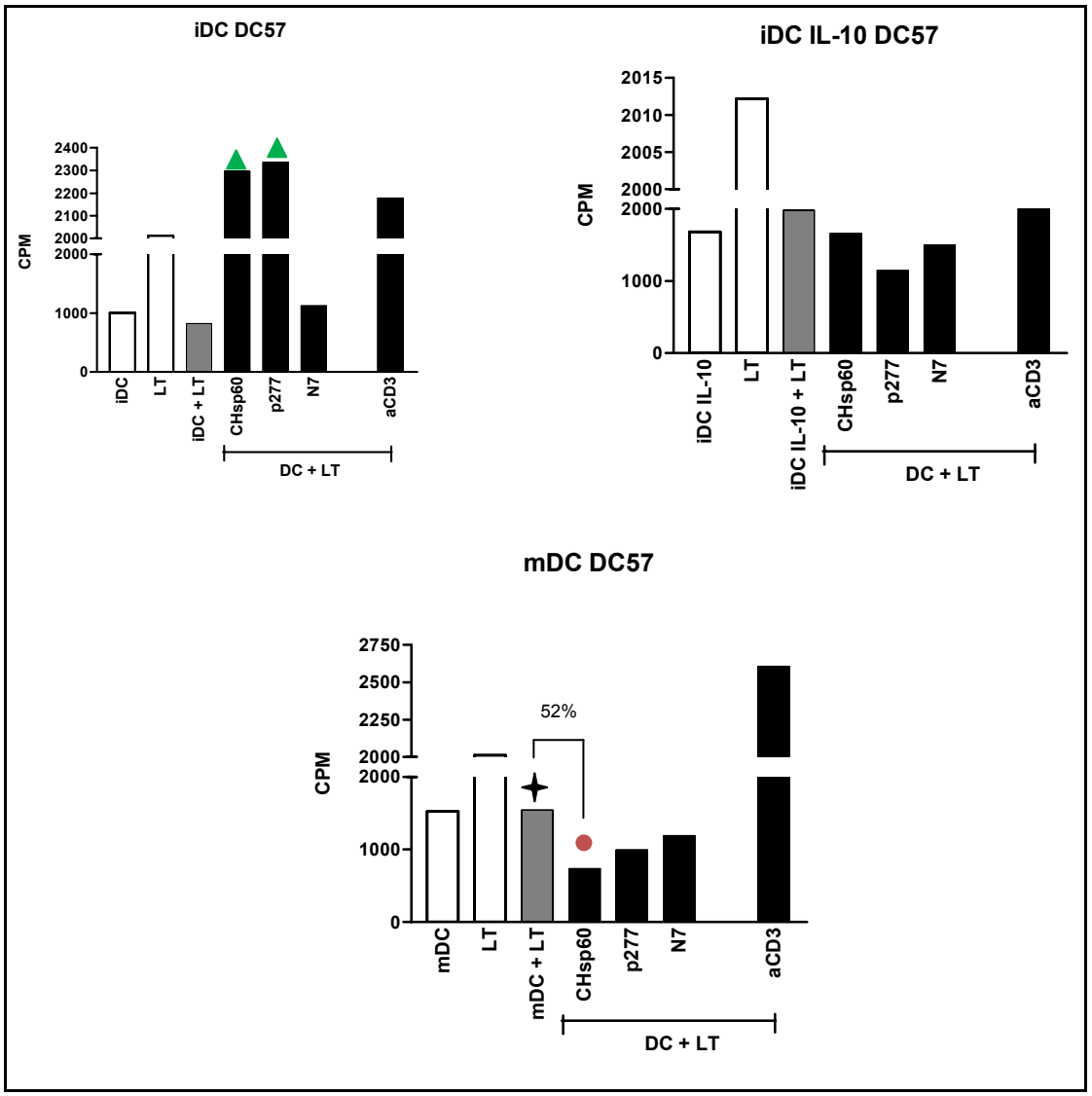


Figura 35. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade proliferativa de linfócitos T às diferentes DCs por fragmentos da Hsp60 no experimento DC57. LT= linfócitos T. Células dendríticas imaturas (iDCs); células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 (iDCs IL-10); células dendríticas maduras (mDCs). CPM= contagens por minutos. αCD3: controle positivo.✦= auto-reatividade à DCs positiva.▲= auto-reatividade dirigida aos fragmentos da Hsp60. Consideramos inibição da auto-reatividade de LT quando a redução foi ≥50%.

Na Figura 31, podemos observar que o fragmento C-Hsp60 inibiu a proliferação de LT dirigida às iDCs em 79%. Na Figura 33, podemos observar que na cocultura com iDC: (i) o peptídeo C8 inibiu a proliferação

de LT dirigidas às DCs tem 91%, (ii) p277 inibiu em 85%, (iii) os peptídeos N3, N4, N7, N10 e a I-Hsp60 inibiram 100% da proliferação. Além disso, ainda na Figura 33, podemos verificar que nas coculturas com mDC os peptídeos N4, N7 e N10 inibiram 100% a proliferação de LT dirigida às DCs. Já na Figura 34 observamos que o peptídeo N7 inibiu a proliferação de LT frente as iDCs em 52% e frente as mDCs em 75%. Observamos também que o peptídeo o N7 inibiu 75% da proliferação de LT dirigidas às mDC (Figura 34). Por fim, na Figura 35 observamos uma inibição de 52% da proliferação de LT frente as mDCs pela C-Hsp60.

Já com relação à indução de auto-reatividade proliferativa de LT aos fragmentos da Hsp60, observamos na Figura 34 que a C-Hsp60 induziu proliferação com índices de 6,4 nas coculturas de iDCs. Já nas coculturas com mDCs, a auto-reatividade à C-Hsp60 e ao N3 foi muito similar, tendo índices de 2,4 e 2,7, respectivamente (Figura 34). Na Figura 35, podemos observar que houve auto-reatividade dirigida à Hsp60 somente na cocultura com iDC, na qual a auto-reatividade apresentou um índice de 2,8 C-Hsp60 e de 2,8 ao p277. Por fim, nenhum fragmento testado foi capaz de induzir proliferação nas coculturas com iDCs IL-10.

- *Citocinas*

Nos experimentos onde detectamos indução da produção das citocinas nas coculturas das diferentes DCs com LT autólogos, avaliamos se os diferentes fragmentos da Hsp60 (10µg/ml) foram capazes de inibir essa produção dessas citocinas. Também avaliamos a produção de citocinas induzida na auto-reatividade dirigida aos fragmentos da Hsp60.

Para tal, adicionamos os fragmentos *(*10µg/ml) nas diferentes coculturas DCs por 24 horas. Após 48h da adição dos LT coletamos os sobrenadantes de cultura. As citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4 e IL-2) foram avaliadas por citometria de fluxo, em ensaios de CBA (*Cytometric Bead Array*) e ELISA para TGF-β. O número de experimentos variou entre algumas citocinas, sendo: n=3 (IL-10, IL-12 e IL-6,TGF-β); n=4 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ). O limite de detecção do ensaio de CBA foi de 20pg/ml a 5000pg/ml e do ELISA 32pg/ml a 1000pg/ml.

Com relação à inibição da produção de citocinas na auto-reatividade de LT dirigida às diferentes DCs observamos que diversos fragmentos provocaram esse efeito, porém os fragmentos p277, N7 e C-Hsp60 foram os que apresentaram as maiores freqüência de inibição: (i) p277 inibiu 10 em 16 condições; (ii) N7 inibiu 9 em 16 condições; (iii) C-Hsp60 inibiu 7 em 16 condições (Quadro 3 e Tabelas 26 a 39). Além disso, esses três fragmentos da Hsp60 inibiram, em sua maioria, citocinas predominantemente pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, TNF-α e IFN-γ) e em freqüências similares: p277 (7 de 13 condições), N7 (8 de 13 condições) e C-Hsp60 (6 de 13 condições) (Quadro 3 e Tabelas 26 a 39). Porém, quando observamos em conjunto os resultados de inibição de citocinas e de proliferação notamos que somente os peptídeos p277 e N7 permaneceram como inibidores, enquanto que a C-Hsp60 pareceu exercer um efeito contrário, ou seja, o de promover a proliferação celular. O fragmento I-Hsp60 apareceu como inibidor de proliferação celular (Quadro 3 e Tabelas 26 a 39).

Já com relação à auto-reatividade à Hsp60 observamos a produção das mesmas citocinas que foram inibidas, porém, estas variaram tanto em relação aos fragmentos como também ao tipo de cocultura com DC. No entanto, podemos destacar dois fragmentos da Hsp60 como sendo os principais indutores de citocinas nos três tipos de coculturas (iDC, iDC IL-10 e mDC): a proteína C-Hsp60 e o peptídeo N3. Ambos os fragmentos foram responsáveis por induzir a produção de quase todas as citocinas detectadas sendo que a C-Hsp60 apresentou a maior freqüência de indução (Tabelas 26 a 39).

Nas coculturas com as iDCs tivemos a indução das seguintes citocinas em resposta a diferentes fragmentos da Hsp60: TNF-α (C-Hsp60 [2 vezes] e N3); IFN-γ (C-Hsp60 2 vezes); IL-10 (C-Hsp60 [2 vezes], N3 e p277); IL-2 (C-Hsp60); IL-6 (I9, I2, I4, C4, C9, N3 [2 vezes], C-Hsp60 [2 vezes]) e TGF-β (I9, C8, C9, p277, N7). Já nas coculturas com as iDCs IL-10, tivemos indução somente da citocina IL-10 pelos fragmentos C-Hsp60 e p277. Por fim, nas coculturas com as mDCs observamos a indução de TNF-α (C-Hsp60 e N3); IFN-γ (C-Hsp60 e N3); IL-10 (C-Hsp60 e N3); IL-6 (p277, N7, C-Hsp60) e TGF-β (I8, I6, p277, N3, N7, C-Hsp60) (Tabelas 26 a 39 e Quadro 3).

Quadro 3. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade de linfócitos T dirigida a diferentes DCs: Balanço do perfil de citocinas produzidas e da resposta linfoproliferativa.

Auto-reatividade de linfócitos T							
Coculturas	**Fragmentos Hsp60**	**Efeito**	**Citocinas**				**Resposta proliferativa**
			TNF-α	**IFN-γ**	**IL-10**	**IL-2**	
iDC + LT	Sem		DC07 1/4	DC57 1/4	0/3	DC22 DC57 2/4	DC07 DC21 DC22 DC56 4/5
	Com	Inibição	DC07 1/1 C-Hsp60	DC57 1/1 p277, N7	--	DC22 DC57 2/2 Todos menos: I8, I6.	DC07 DC22 DC56 3/4 C4,C8, p277,N3, N4, N7 (2), N10, I-Hsp60
		Indução	DC56 DC57 2/4 C-Hsp60 (2), N3	DC56 DC57 2/4 C-Hsp60 (2)	DC56 DC57 2/3 C-Hsp60 (2), N3, p277	DC57 1/4 C-Hsp60	DC56 DC57 2/5 C-Hsp60 (2), p277
iDC IL-10 + LT	Sem		DC07 1/4	0/4	DC57 1/3	0/4	DC07 DC21 DC22 3/5
	Com	Inibição	DC07 1/1 p277, C-Hsp60	--	DC57 1/1 p277, N7, C-Hsp60	--	DC22 1/3 Todos menos C-Hsp60
		Indução	0/4	0/4	DC56 1/3 C-Hsp60, p277	0/4	0/4
mDC + LT	Sem		DC56 1/4	DC56 1/4	0/3	0/4	DC07 DC21 DC22 DC56 4/5
	Com	Inibição	DC56 1/1 p277, N7	DC56 1/1 p277, N7	--	--	DC22 DC56 2/4 I6, C3, C4,C8, C9, p277 (2),N2, N3, N4, N7 (2), N10, I-Hsp60
		Indução	DC56 1/4 C-Hsp60, N3	DC56 1/4 C-Hsp60, N3	DC56 1/3 C-Hsp60, N3	0/4	DC56 1/5 C-Hsp60, N3

Continuação Quadro 3. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade de linfócitos T dirigida a diferentes DCs: Balanço do perfil de citocinas produzidas e da resposta linfoproliferativa.

Auto-reatividade de linfócitos T					
Coculturas	**Fragmentos Hsp60**	**Efeito**	**Citocinas** **IL-6**	**TGF-β**	**Resposta proliferativa**
iDC + LT	Sem		DC22 DC57 2/3	DC22 DC56 2/3	DC07 DC21 DC22 DC56 4/5
	Com	Inibição	DC22 DC57 2/2 p277, N4, N7, N10 C-Hsp60	DC22 DC56 2/2 C4,N3, N7, C-Hsp60	DC07 DC22 DC56 3/4 C4,C8, p277,N3, N4, N7 (2), N10, I-Hsp60
		Indução	DC56 DC56 DC57 3/3 I9, I2, I4, C4, C9, N3 (2), C-Hsp60 (2)	DC22 DC56 DC57 3/3 I9, C8, C9, p277, N7	DC56 DC57 2/5 C-Hsp60 (2), p277
iDC IL-10 + LT	Sem		0/3	DC22 1/3	DC07 DC21 DC22 3/5
	Com	Inibição	--	DC22 1/1 I6, C4, C9, p277, N4, N10	DC22 1/3 Todos menos C-Hsp60
		Indução	0/3	0/3	0/4
mDC + LT	Sem		DC22 DC57 2/3	DC22 1/3	DC07 DC21 DC22 DC56 4/5
	Com	Inibição	DC22 DC57 2/2 N3, N4, N7, N10, I-Hsp60, C-Hsp60	DC22 1/1 C8, p277, N2	DC22 DC56 2/4 I6, C3, C4,C8, C9, p277 (2),N2, N3, N4, N7 (2), N10, I-Hsp60
		Indução	DC22 DC56 2/3 p277, N7, C-Hsp60	DC22 DC56 2/3 I8, I6, p277, N3, N7, C-Hsp60	DC56 1/5 C-Hsp60, N3

Quadro 3. Balanço da auto-reatividade de linfócitos T a fragmentos da Hsp60 no contexto de diferentes DCs e do efeito dos fragmentos da Hsp60 na auto-reatividade de LT dirigida à diferentes DCs: produção de citocinas e proliferação. A produção de citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β), em sobrenadantes de culturas de 48 horas de LT+ DC com (auto-reatividade Ag Hsp60) ou sem fragmentos da Hsp60 (auto-reatividade a DC). Representamos a freqüência de produção de cada citocina nas diferentes coculturas com os diferentes tipos de DCs. mDCs: células dendríticas maduras; iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10. Valores mínimo e máximo de detecção: 20-5000 pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem antígeno (auto-reatividade às DC) e > limite mínimo de detecção. A resposta proliferativa das células nas coculturas foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. A auto-reatividade proliferativa dirigida a fragmentos da Hsp60 [(DC+frag Hsp60)+LT] foi dada em índice de estimulação (I.E), calculado dividindo-se as médias de cpm da condição[(DC+frag Hsp60)+LT] pela média de cpm da condição DC+ LT. I.E$\geq$ 2= proliferação. I.E $\leq$ 0,5 = inibição de proliferação. : experimentos com valores positivos para a produção de citocinas e proliferação nas coculturas autólogas (DC+LT). : inibição > 50% da produção de citocinas ou proliferação celular com relação à condição DC+LT por algum fragmento da Hsp60. Os antígenos da Hsp60 que inibiram a produção de citocinas ou a proliferação celular estão marcados logo abaixo. : indução da produção de citocinas por auto-reatividade à Hsp60 com relação à condição DC+LT. --= não se aplica.

Tabela 26. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.

TNF-α iDC				
	Experimentos			
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	na	*	na	Na
I9	na	*	na	Na
I2	na	*	na	Na
I4	na	*	na	Na
I6	na	/	na	Na
C3	na	*	na	Na
C4	na	*	na	Na
C8	na	/	na	Na
C9	na	*	na	Na
p277	24,3	*	*	*
N2	na	*	na	Na
N3	na	*	**234,3**	Na
N4	na	*	na	Na
N7	na	*	/	*
N10	na	*	na	Na
I-Hsp60	na	*	na	Na
C-Hsp60	*	*	**220,9**	**76,3**
iDC+LT	**29,9**	*	*	*
+ αCD3	**≥5000**	*	**392,5**	**374,0**

A produção de TNF-α nas coculturas de iDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. ☐= inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=4.

Tabela 27. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) pelas coculturas de iDCs IL-10 com LT autólogos

TNF-α iDC IL-10				
	Experimentos			
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	na	*	na	Na
I9	na	*	na	Na
I2	na	*	na	Na
I4	na	*	na	Na
I6	na	*	na	Na
C3	na	*	na	Na
C4	na	*	na	Na
C8	na	*	na	Na
C9	na	*	na	Na
p277	*	*	*	*
N2	na	*	na	Na
N3	na	*	*	Na
N4	na	*	na	Na
N7	na	*	*	*
N10	na	*	na	Na
I-Hsp60	na	*	na	Na
C-Hsp60	*	*	*	*
iDC IL-10+LT	**40,4**	*	*	*
+ αCD3	**364,0**	/	**184,6**	**372,6**

A produção de TNF-α nas coculturas de iDC IL-10+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs IL-10 na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs IL-10 com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. ☐= inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=4.

Tabela 28. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos

	TNF-α mDC			
	Experimentos			
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	na	*	na	na
I9	na	*	na	na
I2	na	*	na	na
I4	na	*	na	na
I6	na	*	na	na
C3	na	*	na	na
C4	na	*	na	na
C8	na	*	na	na
C9	na	*	na	na
p277	*	/	*	*
N2	na	*	na	na
N3	na	*	**265,5**	na
N4	na	*	na	na
N7	na	*	*	/
N10	na	*	na	na
I-Hsp60	na	*	na	na
C-Hsp60	*	*	**323,5**	*
mDC+LT	*	*	**24,6**	*
+ αCD3	**≥5000**	/	/	**485,5**

A produção de TNF-α nas coculturas de mDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às mDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de mDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. ▢= inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=4.

Tabela 29. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IFN-γ (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.

	IFN-γ iDC			
	Experimentos			
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	na	*	na	na
I9	na	*	na	na
I2	na	*	na	na
I4	na	*	na	na
I6	na	/	na	na
C3	na	*	na	na
C4	na	*	na	na
C8	na	*	na	na
C9	na	*	na	na
p277	*	*	*	*
N2	na	*	na	na
N3	na	*	/	na
N4	na	*	na	na
N7	na	*	/	*
N10	na	*	na	na
I-Hsp60	na	*	na	na
C-Hsp60	*	*	**493,9**	**100,2**
iDC+LT	*	*	*	**27,9**
+ αCD3	**2163,0**	*	**/**	**/**

A produção de IFN-γ nas coculturas de iDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. ▢= inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=4.

.

Tabela 30. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IFN-γ (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.

	IFN-γ mDC			
	Experimentos			
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	na	*	na	na
I9	na	*	na	na
I2	na	*	na	na
I4	na	*	na	na
I6	na	*	na	na
C3	na	*	na	na
C4	na	*	na	na
C8	na	*	na	na
C9	na	*	na	na
p277	*	*	*	*
N2	na	*	na	na
N3	na	*	**241,4**	na
N4	na	*	na	na
N7	na	*	*	/
N10	na	*	na	na
I-Hsp60	na	*	na	na
C-Hsp60	*	*	**384,5**	*
mDC+LT	*	*	**30,9**	*
+ αCD3	**3585,6**	/	/	**/**

A produção de IFN-γ nas coculturas de mDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às mDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de mDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. □= inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=4.

Tabela 31. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.

IL-10 iDC			
	Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	*	na	na
I9	*	na	na
I2	*	na	na
I4	*	na	na
I6	/	na	na
C3	*	na	na
C4	*	na	na
C8	*	na	na
C9	*	na	na
p277	*	*	**21,1**
N2	*	na	na
N3	*	**38,8**	na
N4	*	na	na
N7	*	/	*
N10	*	na	na
I-Hsp60	*	na	na
C-Hsp60	*	**42,7**	**21,1**
iDC IL-10+LT	*	*	*
+ αCD3	*	91,5	35,8

A produção de IL-10 nas coculturas de iDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=3.

Tabela 32. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs IL-10 com LT autólogos.

IL-10 iDC IL-10			
	Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	*	na	na
I9	*	na	na
I2	*	na	na
I4	*	na	na
I6	*	na	na
C3	*	na	na
C4	*	na	na
C8	*	na	na
C9	*	na	na
p277	*	**22,8**	*
N2	*	na	na
N3	*	*	na
N4	*	na	na
N7	*	*	*
N10	*	na	na
I-Hsp60	*	na	na
C-Hsp60	*	**25,6**	*
iDC IL-10+LT	*	*	**23,3**
+ αCD3	*	**86,6**	**61,5**

A produção de IL-10 nas coculturas de iDC IL-10+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs IL-10 na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs IL-10 com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. = inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=3.

Tabela 33. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.

	IL-10 mDC		
		Experimentos	
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	*	na	na
I9	*	na	na
I2	*	na	na
I4	*	na	na
I6	*	na	na
C3	*	na	na
C4	*	na	na
C8	*	na	na
C9	*	na	na
p277	*	*	*
N2	*	na	na
N3	*	**26,5**	na
N4	*	na	na
N7	*	*	/
N10	*	na	na
I-Hsp60	*	na	na
C-Hsp60	*	**43,5**	*
iDC IL-10+LT	*	*	*
+ αCD3	*	**57,2**	**94,4**

A produção de IL-10 nas coculturas de mDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às mDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de mDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=3.

Tabela 34. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-6 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.

	IL-6 iDC		
		Experimentos	
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	102,0	na	na
I9	**155,0**	na	na
I2	**129,4**	na	na
I4	**108,9**	na	na
I6	/	na	na
C3	100,4	na	na
C4	**107,2**	na	na
C8	94,0	na	na
C9	**111,7**	na	na
p277	90,3	*	*
N2	92,5	na	na
N3	**120,2**	**184,7**	na
N4	46,2	na	na
N7	74,8	/	*
N10	49,7	na	na
I-Hsp60	104,6	na	na
C-Hsp60	*	**265,5**	**157,6**
iDC IL-10+LT	**104,9**	*	**29,4**
+ αCD3	*	**547,4**	**/**

A produção de IL-6 nas coculturas de iDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. = inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA) . n=3.

Tabela 35. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-6 (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.

IL-6 mDC			
	Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	80,5	na	na
I9	71,5	na	na
I2	70,1	na	na
I4	89,5	na	na
I6	66,7	na	na
C3	62,5	na	na
C4	60,5	na	na
C8	81,2	na	na
C9	79,2	na	na
p277	88,1	**59,0**	45,0
N2	96,4	na	na
N3	*	/	na
N4	*	na	na
N7	*	**108,3**	/
N10	*	na	na
I-Hsp60	*	na	na
C-Hsp60	**1195,8**	/	*
iDC IL-10+LT	**100,2**	**/**	**89,2**
+ αCD3	**132,6**	**/**	**/**

A produção de IL-6 nas coculturas de mDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. = inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=3.

Tabela 36. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.

	TGF-β iDC		
	Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	481,1	na	na
I9	**658,4**	na	na
I2	462,1	na	na
I4	366,9	na	na
I6	539,4	na	na
C3	351,4	na	na
C4	280,1	na	na
C8	**613,1**	na	na
C9	**576,3**	na	na
p277	547,7	**69,2**	*
N2	460,9	na	na
N3	487,1	*	na
N4	434,7	na	na
N7	394,3	*	**32,3**
N10	363,3	na	na
I-Hsp60	434,7	na	na
C-Hsp60	na	*	*
iDC IL-10+LT	**569,1**	**36,0**	*
+ αCD3	na	**547,4**	*

A produção de TGF-β nas coculturas de iDC+LT foi quantificada por ELISA. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. = inibição ≥ 50%. * = produção < 32pg/ml (ELISA). n=3.

Tabela 37. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) pelas coculturas de iDCs IL-10 com LT autólogos.

TGF-β iDC IL-10			
	Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	541,8	na	na
I9	769,0	na	na
I2	521,6	na	na
I4	562,0	na	na
I6	457,3	na	na
C3	475,2	na	na
C4	362,1	na	na
C8	645,3	na	na
C9	315,7	na	na
p277	349,4	*	*
N2	618,8	na	na
N3	771,6	*	na
N4	395,5	na	na
N7	463,2	*	*
N10	411,3	na	na
I-Hsp60	533,8	na	na
C-Hsp60	na	*	*
iDC IL-10+LT	**921,3**	*	*
+ αCD3	na	*	*

A produção de TGF-β nas coculturas de iDC IL-10+LT foi quantificada por ELISA. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs IL-10 na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs IL-10 com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. ☐ = inibição ≥ 50%. * = produção < 32pg/ml (ELISA). n=3.

Tabela 38. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) pelas coculturas de mDCs com LT autólogos.

TGF-β mDC			
	Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	**784,5**	na	na
I9	630,4	na	na
I2	595,8	na	na
I4	669,3	na	na
I6	**845,1**	na	na
C3	551,1	na	na
C4	451,7	na	na
C8	362,3	na	na
C9	425,7	na	na
p277	291,7	**36,0**	*
N2	366,6	na	na
N3	588,6	**100,5**	na
N4	682,2	na	na
N7	420,0	**45,5**	*
N10	389,7	na	na
I-Hsp60	483,4	na	na
C-Hsp60	na	**98,9**	*
iDC IL-10+LT	**774,5**	*	*
+ αCD3	na	**48,0**	**89,6**

A produção de TGF-β nas coculturas de mDC+LT foi quantificada por ELISA. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às mDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de mDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. □= inibição ≥ 50%. * = produção < 232pg/ml (ELISA). n=3.

Tabela 39. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-2 (pg/ml) pelas coculturas de iDCs com LT autólogos.

	IL-2 iDC			
		Experimentos		
Fragmentos Hsp60	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
I8	na	21,2	na	na
I9	na	*	na	na
I2	na	*	na	na
I4	na	*	na	na
I6	na	/	na	na
C3	na	*	na	na
C4	na	*	na	na
C8	na	*	na	na
C9	na	*	na	na
p277	*	*	*	*
N2	na	*	na	na
N3	na	*	/	na
N4	na	*	na	na
N7	na	*	/	*
N10	na	*	na	na
I-Hsp60	na	*	na	na
C-Hsp60	*	*	/	**87,6**
iDC+LT	*	**24,5**	*	**51,8**
+ αCD3	**≥5000**	*	/	/

A produção de IL-2 nas coculturas de iDC+LT foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (I2, I4, I6, I8, I9, C3, C4, C8, C9, p277, N2, N3, N4, N7, N10, I-Hsp60 e C-Hsp60) foram adicionados às iDCs na concentração 10 μg/ml por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de iDCs com LT. Limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. LT=linfócitos T. αCD3= controle positivo. na = não avaliada. / = amostras com problemas na detecção. ▢= inibição ≥ 50%. * = produção < 20 pg/ml (CBA) ou 32pg/ml (ELISA). n=4.

.

As Figuras 36 A e B mostram a indução de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 nas diferentes coculturas de DCs.

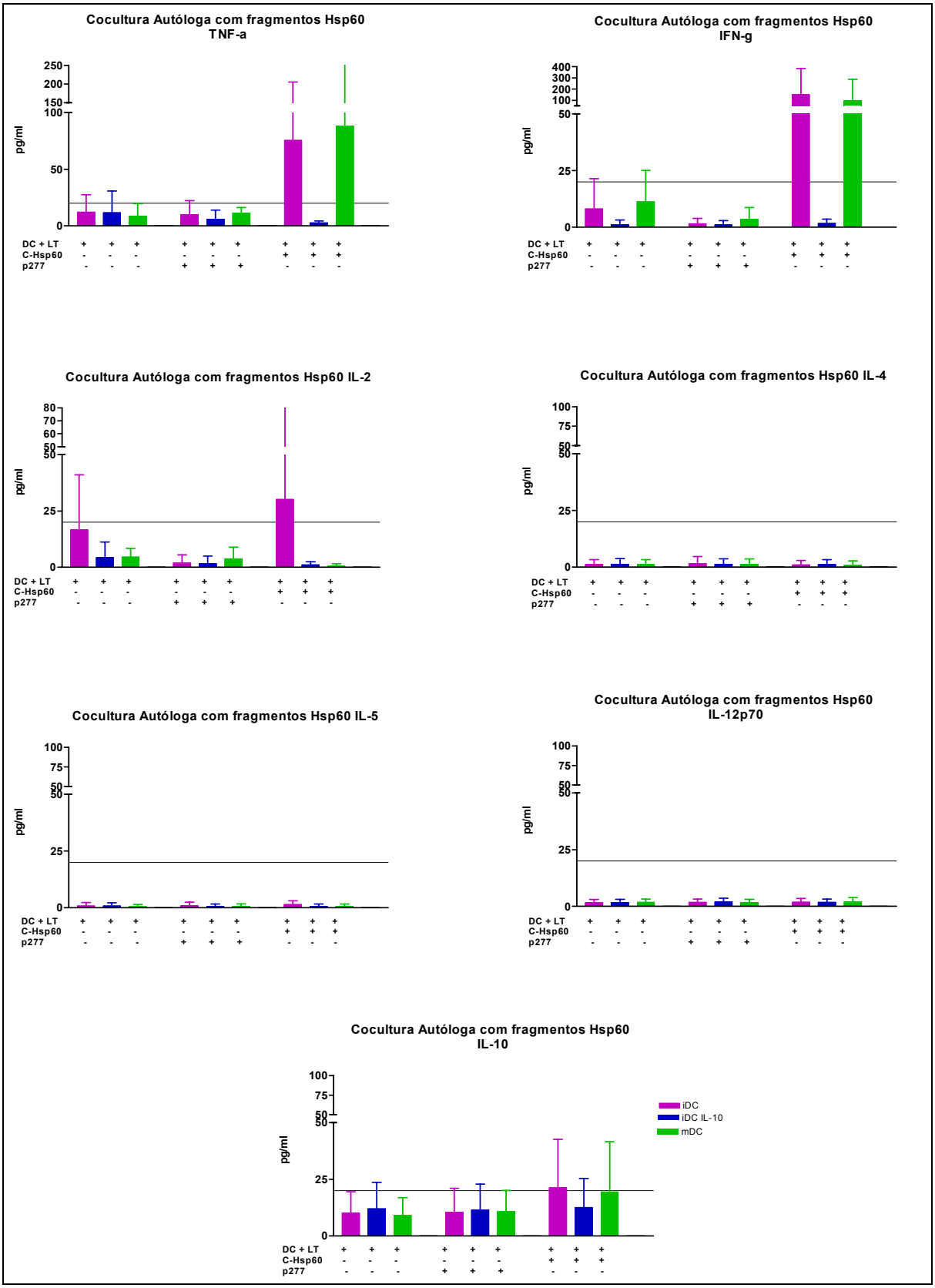


Figura 36.A Média da produção de citocinas de coculturas de DCs tratadas com fragmentos da Hsp60 com LT autólogos. iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. LT: linfócitos T. n=4 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ), n=3 (IL-10, IL-12p70). Valores considerados positivos entre 20/pg/ml e 5000pg/ml (CBA). Barras: desvio padrão.

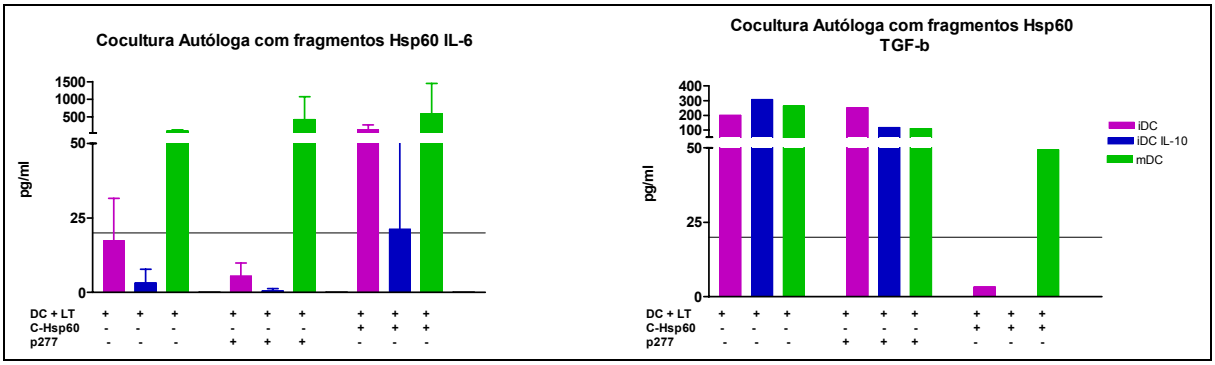


Figura 36.B Média da produção de citocinas de coculturas de DCs tratadas com fragmentos da Hsp60 com LT autólogos. iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. LT: linfócitos T. n=4 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ), n=3 (IL-6, IL-10, IL-12p70, TGF-β). Valores considerados positivos entre 20/pg/ml e 5000pg/ml (CBA) e 32pg/ml e 1000pg/ml (ELISA TGFβ). Barras: desvio padrão.

No Quadro 4 podemos observar um painel de expressão para todas as citocinas que foram produzidas em resposta aos fragmentos da Hsp60 testados nas coculturas autólogas (DC+LT). Com este painel buscamos facilitar a visualização dos dados apresentados até aqui e verificar se um dos fragmentos da Hsp60 se mostrou mais imunoregulador do que o outro. Apesar da baixa freqüência de modulações, podemos notar que o fragmento C-Hsp60 apresentou uma freqüência de indução de citocinas maior que o peptídeo p277 e que estas citocinas foram predominantemente citocinas inflamatórias. Além disso, obervamos que o peptídeo p277 parece principalmente inbir citocinas inflamatórias, além de ser capaz de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias. Também observamos que as coculturas de iDCs e mDCs parecem ser mais susceptíveis à modulação pelos fragmentos da Hsp60 do que as coculturas com iDCs IL-10 e que nestas últimas, não detectamos citocinas consideradas mais inflamatórias.

Quadro 4. Indução e inibição da produção de citocinas em coculturas autólogas de linfócitos T com as diferentes DCs na interação com os fragmentos p277 e C-Hsp60 da proteína Hsp60.

	INFLAMA										REGULA							
	TNF-α		INF-γ		IL-6		IL-2		IL-12 p70		IL-4		IL-10		IL-5		TGF-β	
DCs	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q
iDC C-Hsp60	2/4 ↑	+, ++	2/4 ↑	++, ++	2/3 ↑	++, ++	1/4 ↑	+					2/3 ↑	+, +				
	1/1 ↓	100%			1/2 ↓	100%	1/2 ↓	100%									1/2 ↓	100%
iDC p277													1/3 ↑	+			1/3 ↑	+
			1/1 ↓	100%	1/2 ↓	100%	2/2 ↓	100%										
iDC IL-10 C-Hsp60													1/3 ↑	+				
	1/1 ↓	100%											1/1 ↓	100%				
iDC IL-10 p277													1/3 ↑	+				
	1/1 ↓	100%											1/1 ↓	100%			1/1 ↓	62%
mDC C-Hsp60	1/4 ↑	++	1/4 ↑	++	1/3 ↑	+++							1/3 ↑	+			1/3 ↑	+
					1/2 ↓	100%												
mDC p277					1/3 ↑												1/3 ↑	+
	1/1 ↓	100%	1/1 ↓	100%													1/1 ↓	62%

A produção das citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β). Os fragmentos p277 e C-Hsp60 foram previamente incubados às diferentes DCs na concentração de 10 μM por 24 horas. Sobrenadantes das coculturas de DCs+LT foram coletados após 48h da cocultura. Limite de detecção máximo e mínimo= 20-5000pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT) e > que limite mínimo de detecção. Foram consideradas inibições valores ≥ 50% da produção das coculturas sem os fragmentos (DC+LT). iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. LT= linfócitos T. M= modulação, podendo ser: ↑= aumento, ↓= diminuição□ = não houve alteração da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60. Q= medida da modulação (pg/ml para indução e % de inibição para inibições). += aumento de até 10pg/ml; ++= aumento de até 100pg/ml; +++= aumento de até 1000pg/ml; ++++= aumento superior a 1000pg/ml. n=4.

7.6 Importância das diferentes DCs na resposta proliferativa de linfócitos T frente ao estímulo policlonal de αCD3 no contexto auto e alogenéico.

7.6.1 Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3 no contexto autólogo.

Neste bloco de experimentos, o nosso objetivo foi avaliar as diferenças de reatividade ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo, para os três tipos de coculturas com DCs (proliferação: n=5). Analisamos coculturas de iDCs, iDCs IL-10 e mDCs com LT autólogos após 72 h com αCD3, pela adição de Timidina (últimas 18 h de cultura). A proliferação foi considerada positiva quando apresentou índice (I.E.) ≥ 2 e inibida quando apresentou I.E. ≤ 0,5. O índice foi calculado dividindo-se as cpms das coculturas com αCD3 (DC+LT+αCD3) pelas cpms das coculturas sem o αCD3 (DCs+LT).

Na Tabela 41 mostramos os valores individuais de cpm bem como os índices de proliferação para as coculturas autólogas com as diferentes DCs. Na média, as coculturas com mDC, os LT apresentaram uma maior resposta proliferativa ao αCD3, seguidas pelas coculturas com iDCs e depois com as iDCs IL-10. No entanto, se observarmos os experimentos individualmente, observamos que as iDCs induzem maior proliferação (cpm) de LT na presença de αCD3, seguidas pelas mDCs e por fim, pelas iDCs IL-10. Como as coculturas com mDCs apresentaram um valor elevado em um experimento, média foi maior (Tabela 40). Além disso, vale ressaltar que em 2/5 das coculturas com iDCs IL-10 e mDCs não observamos

proliferação de LT em resposta ao αCD3 (Tabela 41) enquanto que isso não ocorreu nas coculturas com iDCs.

Na Figura 37 podemos observar os índices de estimulação individualmente para cada cocultura com estímulo de αCD3 além dos valores das medianas para cada cocultura de DC.

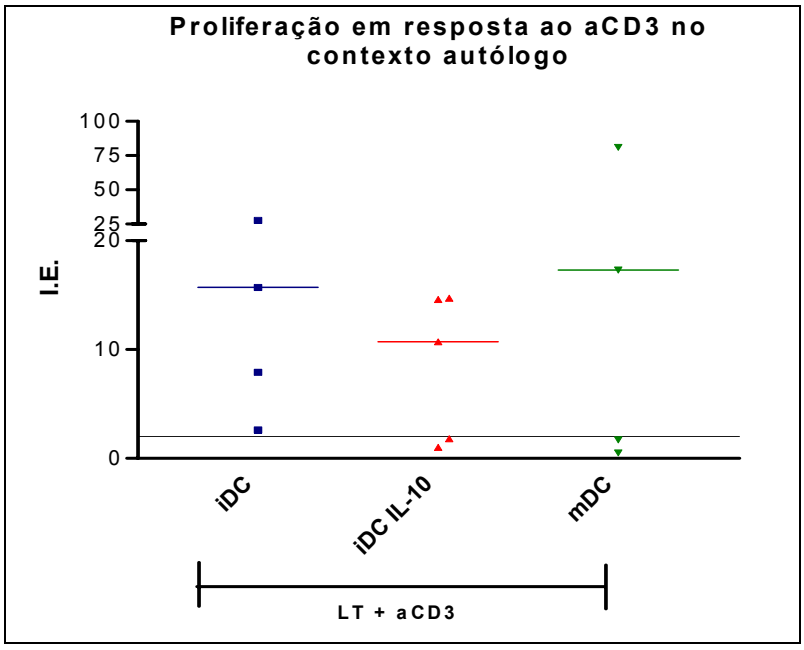


Figura 37. Resposta proliferativa ao αCD3 por linfócitos T nas diferentes coculturas de DCs, no contexto autólogo. Índices de estimulação positvos ≥2. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratada com IL-10 e mDCs=células dendríticas maduras. n=5. I.E= índice de estimulação. Barras horizontais: valores de medianas.

Tabela 40. Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT com e estímulo policlonal de aCD3 no contexto autólogo.

Condições	DC07		DC21		DC22		DC56		DC57		Média	
	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.
iDC + LT	829,4	**11,0**	3894,2	**7,4**	1794,2	**5,7**	653,6	**3,4**	824,3	0,4	1599,1	**5,6**
iDC + LT + αCD3	16798,1	**20,3**	61096,3	**15,7**	49577,3	**27,6**	5190,8	**7,9**	2177,3	**2,6**	26967,9	**14,8**
iDC IL-10 + LT	500,1	**6,6**	14712,1	**36,2**	2754,8	**7,7**	1625,7	0,7	1979,7	1,0	4314,4	**10,4**
iDC IL-10 +LT + αCD3	7308,5	**14,6**	27146,9	1,8	29356,7	**10,7**	23870,2	**14,7**	1998,7	1,0	17936,2	**8,6**
mDC + LT	218,0	**2,9**	3961,4	**4,5**	2352,2	**3,6**	3764,8	**8,5**	1539,4	0,8	2367,1	**4,1**
mDC + LT + αCD3	17663,7	**81,0**	68656,0	**17,3**	50085,1	**21,3**	1961,5	0,5	2606,3	1,7	28194,5	**24,4**
LT	75,7	--	406,4	--	214,3	--	193,9	--	2012,2	**--**	580,5	**--**
LT + αCD3	411,1	**5,4**	4301,7	**10,6**	na	**--**	na	--	na	**--**	2356,4	**8**

A resposta proliferativa em resposta ao αCD3 por linfócitos T frente às diferentes DCs (iDC+LT+αCD3) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos (LT+DCs). I.E= índice de estimulação. (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. A inibição foi calculada dividindo-se a condição (DC+LT) pela (DC+LT+αCD3). LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas. Negrito= valores de índice de estimulação positivos. na= não avaliado. -- = não se aplica. n=5. = inibição ≥50%.

7.6.2 Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3 no contexto alogenéico.

Neste bloco de experimentos, o nosso objetivo foi avaliar as diferenças de reatividade ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto alogenéico, para os três tipos de coculturas com DCs (proliferação: n=5). Analisamos coculturas de iDCs, iDCs IL-10 e mDCs com LT alogenéicos após 72 h com αCD3, pela adição de Timidina (últimas 18 h de cultura). A proliferação foi considerada positiva quando apresentou índice (I.E.) ≥ 2 e inibida quando apresentou I.E. ≤ 0,5. O índice foi calculado dividindo-se as cpms das coculturas com αCD3 (DC+LT+αCD3) pelas cpms das coculturas alogenéicas sem o αCD3 (DCs+LT).

Na Tabela 42 mostramos os valores individuais de cpm bem como os índices de proliferação para as coculturas alogenéicas com as diferentes DCs. Na média, as coculturas com iDC, os LT apresentaram uma maior resposta proliferativa ao αCD3, seguidas pelas mDCs e depois pelas iDCs IL-10. Além disso, vale ressaltar em que nenhuma das coculturas com as diferentes DCs houve inibição da proliferação de LT dirigida às DCs (Tabela 41). Vale a pena destacar que as iDCs IL-10 praticamente não induzem alorreatividade proliferativa de LT, apresentando uma freqüência muito baixa (1 em 5 experimentos) e com um índice baixo (2,7).

Na Figura 38 podemos observar os índices de estimulação individualmente para cada cocultura além dos valores das medianas para cada cocultura alogenéica de DC com estímulo de αCD3. Observamos que

a mediana dos experimentos das três coculturas foram muitos similares, sendo a mediana de iDCs um pouco mais alta do que as demais. Nas coculturas com DCs imaturas (iDCs e iDCs IL-10) não observamos índice de estimulação positivo em 1/5 experimentos.

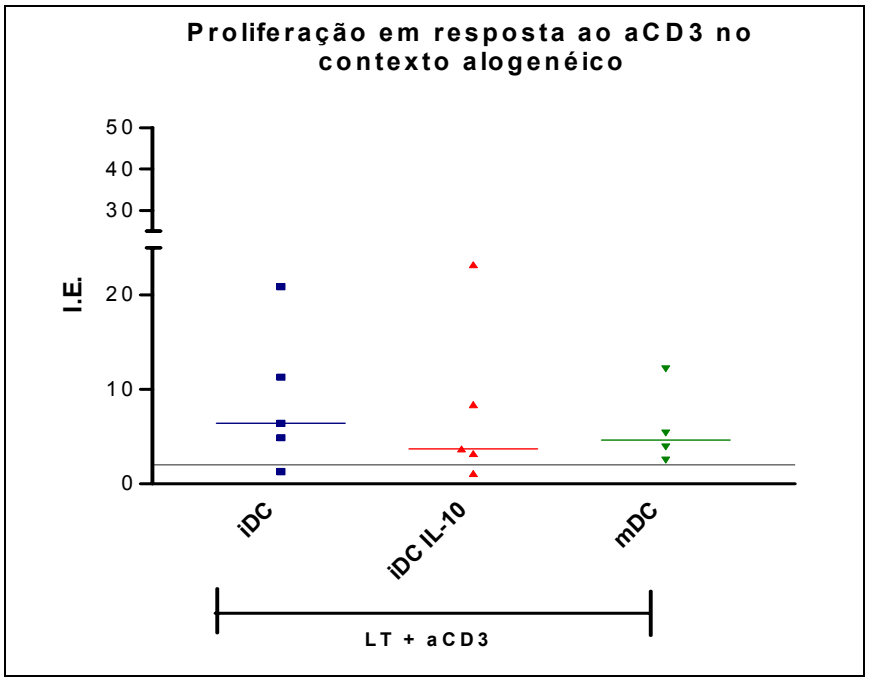


Figura 38. Resposta proliferativa ao αCD3 por linfócitos T nas diferentes coculturas de DCs, no contexto alogenéico. Índices de estimulação positvos ≥2. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 e mDCs=células dendríticas maduras. n=5. I.E= índice de estimulação. Barras horizontais: valores de medianas.

Tabela 41. Efeito das diferentes DCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3 no contexto alogenéico.

Condições	DC13		DC17		DC18		DC19		DC24		Média	
	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.
iDC + LT	1263,3	**2,2**	2973,3	**4,4**	2153,5	**3,1**	2662,0	**2,0**	1712,7	**3,6**	2153	**3,1**
iDC + LT + αCD3	6194,9	**4,9**	19133,3	**6,4**	24319,9	**11,3**	55768,1	**20,9**	2192,1	1,3	21521,7	**9**
iDC IL-10 + LT	728,1	1,2	783,9	1,2	1107,6	1,6	2145,1	**2,7**	746,4	1,6	1102,2	1,7
iDC IL-10 +LT + αCD3	2710,6	**3,7**	6586,0	**8,4**	3498,4	**3,2**	49671,6	**23,2**	784,9	1,1	12650,3	**7,9**
mDC + LT	na	na	19364,5	**28,8**	13856,7	**20,0**	13067,5	**16,5**	2686,1	**4,5**	12243,7	**17,5**
mDC + LT + αCD3	na	na	103925,9	**5,4**	169657,4	**12,2**	5336,1	**2,5**	10592,6	**3,9**	72378	**6**
LT	570,0	--	673,1	--	693,3	--	792,4	--	480,8	--	641,9	**--**
LT + αCD3	1187,9	**2,1**	9294,0	**13,8**	1138,3	1,6	29010,1	**36,6**	631,7	1,3	8252,4	**13,5**

A resposta proliferativa em resposta ao αCD3 por linfócitos T frente às diferentes DCs (iDC+LT+αCD3) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos (LT+DCs). I.E= índice de estimulação. (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas. Negrito= valores de índice de estimulação positivos. na= não avaliado. -- = não se aplica. n=5.

7.7 Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das diferentes DCs.

7.7.1 Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT na presença das diferentes DCs.

Neste bloco de experimentos, o nosso objetivo foi avaliar o efeito dos fragmentos da Hsp60 sobre a resposta de LT ao estímulo policlonal de αCD3 nas coculturas com diferentes DCs, tanto no contexto autólogo quanto no alogenéico (n total=6). Analisamos coculturas de iDCs, iDCs IL-10 e mDCs com LT com αCD3 após 72h, pela adição de timidina (últimas 18h de cultura). A proliferação foi considerada positiva quando apresentou índice (I.E.) ≥ 2 e inibida quando apresentou I.E. ≤ 0,5. O índice de estimulação para o efeito da Hsp60 foi calculado dividindo-se as cpms das coculturas com αCD3 com os fragmentos (DC+LT+Hsp60+αCD3) pelas cpms das coculturas sem os fragmentos (DCs+LT+αCD3).

As Tabelas 43, 44 e 45 mostram os valores individuais de cpm bem como os índices de proliferação para as coculturas com iDCs, iDCs IL-10 e mDCs, com o estímulo policlonal do αCD3. De uma forma geral, as coculturas com mDCs com αCD3 apresentaram índices de estimulação 2 vezes maiores do que as demais, sendo seguidas pelas coculturas com as iDCs e por último com as iDCs IL-10. Nas coculturas com iDCs, observamos que houve o maior número de inibições: C-Hsp60 inibiu 1/5 experimentos; N7 1/2 e p277 1/5 (Tabela 42). Já nas coculturas com iDCs IL-10, observamos que só houve proliferação em 3/6 experimentos e que o fragmento C-Hsp60 inibiu 1/3; N7 1/1; p277 1/3 (Tabela 43). Por fim, nas

coculturas com mDCs a proliferação foi positiva em 4 de 6 experimentos, porém nenhum fragmento testado foi capaz de inibir a proliferação de LT em nenhum dos experimentos realizados (Tabela 44).

Nas Figura 39, 40 e 41 podemos observar as cpms individualmente para cada cocultura além dos valores das medianas para cada cocultura de DC.

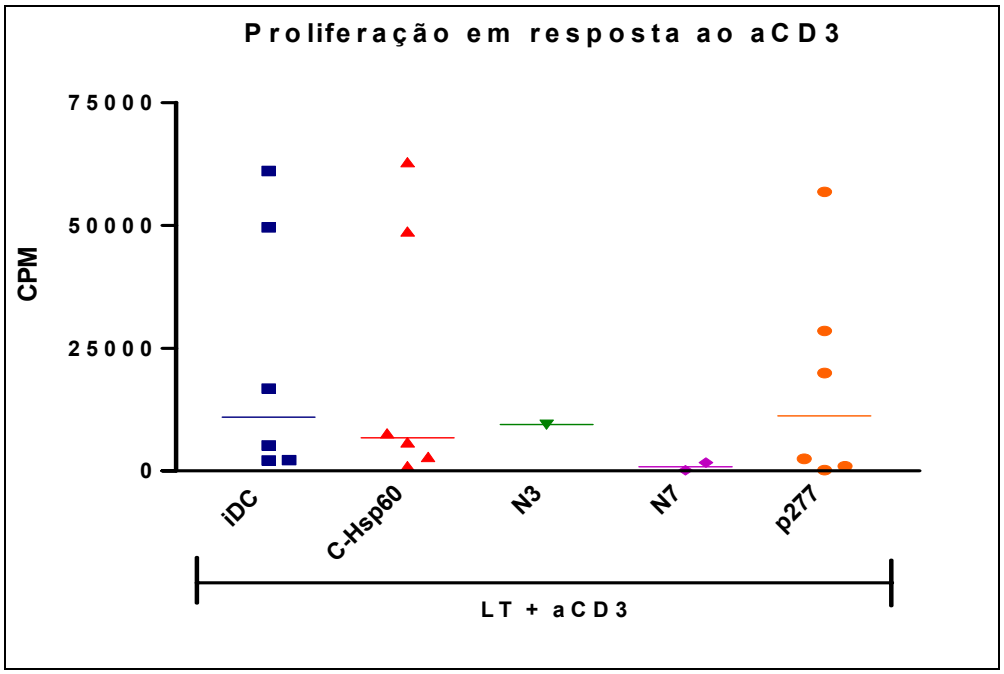


Figura 39. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das iDCs. Valores em cpm. iDCs= células dendríticas imaturas. LT= linfócito T. n=6 (iDC, iDC C-Hsp60, iDC p277); n=2 iDC N7; n=1 N3. Barras horizontais: valores de medianas de todos os experimentos realizados.

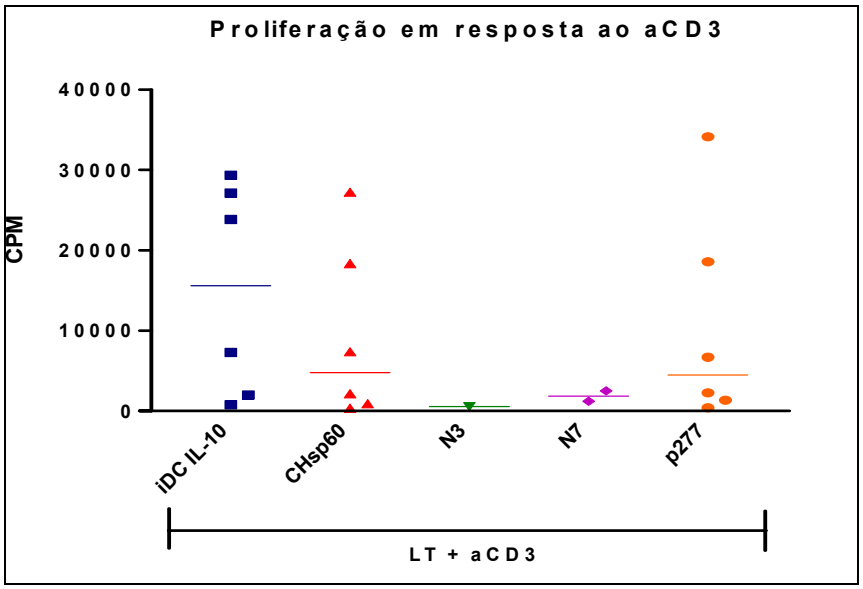


Figura 40. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das iDCs IL-10. Valores em com. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. LT= linfócito T. n=6 (iDC, iDC C-Hsp60, iDC p277); n=2 iDC N7; n=1 N3. Barras horizontais: valores de medianas de todos os experimentos realizados.

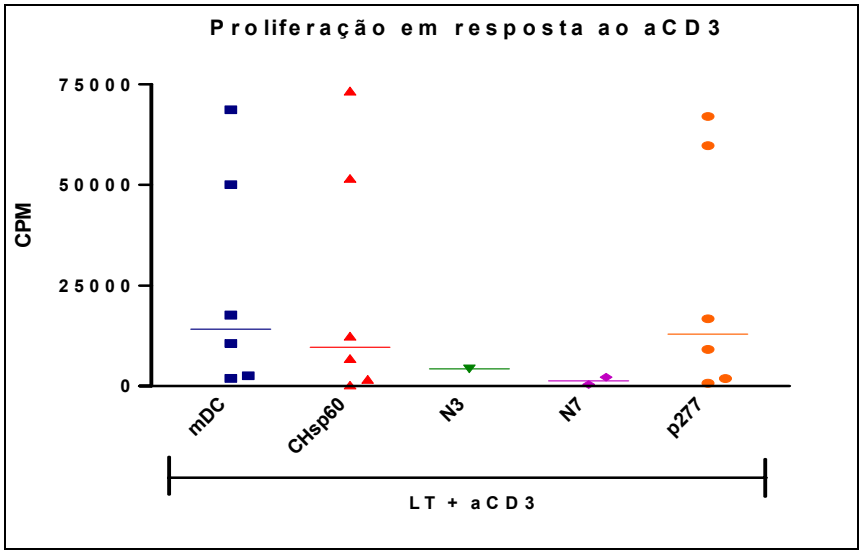


Figura 41. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta proliferativa de LT ao estímulo policlonal com αCD3, nos contextos autólogo e alogenéico na presença das mDCs. Valores em cpm. iDCs IL-10= células dendríticas maduras. LT= linfócito T. n=6 (iDC, iDC C-Hsp60, iDC p277); n=2 iDC N7; n=1 N3. Barras horizontais: valores de medianas de todos os experimentos realizados.

Tabela 42. Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de iDCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo.

Condições	DC07		DC21		DC22		DC24		DC56		DC57		Média	
	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.
iDC + LT	829,4	**11,0**	3894,2	**7,4**	1794,2	**5,7**	1712,7	**3,6**	653,6	**3,4**	824,3	0,4	1618,1	**5,3**
iDC + LT + αCD3	16798,1	**20,3**	61096,3	**15,7**	49577,3	**27,6**	2192,1	1,3	5190,8	**7,9**	2177,3	**2,6**	22838,7	**12,6**
iDC +LT + αCD3 + C-Hsp60	7684,7	0,5	62832,5	1,0	48734,1	1,0	977,9	0,4	5826,5	1,1	2850,3	1,3	21484,3	0,9
iDC + LT + αCD3 + N3	na	na	na	na	na	na	na	na	9439,7	1,8	na	na	1573,3	0,3
iDC + LT + αCD3 + N7	na	na	na	na	na	na	na	na	113,8	0,0	1686,3	0,8	300,0	0,1
iDC + LT + αCD3 p277	19947,7	1,2	56833,4	0,9	28523,9	0,6	977,9	0,4	188,4	0,0	2479,4	1,2	18992,2	**2,0**
LT	75,7	--	406,4	--	214,3	--	480,8	--	193,9	--	2012,2	--	563,9	--
LT + αCD3	411,1	**5,4**	4301,7	**10,6**	12833,7	**59,9**	631,7	1,3	--	**--**	**--**	**--**	3029,7	**12,9**

A resposta proliferativa em resposta ao αCD3 por linfócitos T frente às iDCs (iDC+LT+αCD3) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos (LT+DCs). I.E= índice de estimulação. (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. A inibição foi calculada dividindo-se a condição com fragmento (DC+LT+Hsp60+αCD3) pela sem fragmento (DC+LT+αCD3). LT = linfócitos T, iDC= células dendríticas imaturas. Negrito= valores de índice de estimulação positivos. na= não avaliado. -- = não se aplica. n=6. ☐ = inibição ≥50%. na= não avaliado.

Tabela 43. Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de iDCs IL-10 na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo.

Condições	DC07		DC21		DC22		DC24		DC56		DC57		Média	
	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.
iDC IL-10 + LT	500,1	**6,6**	14712,1	**36,2**	2754,8	**7,7**	746,4	**1,6**	1625,7	**0,7**	1979,7	**1,0**	3719,8	**9,0**
iDC IL-10 + LT + αCD3	7308,5	**14,6**	27146,9	1,8	29356,7	**10,7**	784,9	1,1	23870,2	**14,7**	1998,7	1,0	15077,7	**7,3**
iDC IL-10 +LT + αCD3 + C-Hsp60	7391,5	1,0	18356,8	0,7	27244	0,9	939,5	1,2	369,1	0,0	2155,0	1,0	9409,3	0,8
iDC IL-10 + LT + αCD3 + N3	na	na	na	na	na	na	na	na	547	0,0	na	na	91,2	0,0
iDC IL-10 + LT + αCD3 + N7	na	na	na	na	na	na	na	na	1219,7	0,0	2511,8	1,3	621,9	0,2
iDC IL-10 + LT + αCD3 p277	6718,8	0,9	18577,0	0,7	34145,2	1,2	1357,7	1,7	412,3	0,0	2257,9	1,1	10578,2	0,9
LT	75,7	--	406,4	--	214,3	--	480,8	--	2260,3	--	2012,2	--	908,3	1,0
LT + αCD3	411,1	**5,4**	4301,7	**10,6**	12833,7	**59,9**	631,7	1,3	na	**--**	na	**--**	3029,7	**12,9**

A resposta proliferativa em resposta ao αCD3 por linfócitos T frente às iDCs tratadas com IL-10 (iDC IL-10+LT+αCD3) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos (LT+DCs). I.E= índice de estimulação. (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. A inibição foi calculada dividindo-se a condição com fragmento (DC+LT+Hsp60+αCD3) pela sem fragmento (DC+LT+αCD3). LT = linfócitos T, iDC IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. Negrito= valores de índice de estimulação positivos. na= não avaliado. -- = não se aplica. n=6. = inibição ≥50%. na= não avaliado.

Tabela 44. Efeito dos fragmentos da Hsp60 nas coculturas de mDCs na resposta proliferativa de LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, no contexto autólogo.

Condições	DC07		DC21		DC22		DC24		DC56		DC57		Média	
	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.	CPM	I.E.
mDC + LT	218,0	**2,9**	3961,4	**4,5**	2352,2	**3,6**	2686,1	**4,5**	3764,8	**8,5**	1539,4	0,8	2420,3	**4,1**
mDC + LT + αCD3	17663,7	**81,0**	68656,0	**17,3**	50085,1	**21,3**	10592,6	**3,9**	1961,5	0,5	2606,3	1,7	25260,9	**21,0**
mDC +LT + αCD3 + C-Hsp60	12411,2	0,7	73339,2	1,1	51624,6	1,0	6876,7	0,6	231,8	0,1	1706,4	0,7	24365,0	0,7
mDC + LT + αCD3 + N3	na	na	na	na	na	na	na	na	4298,0	**2,2**	na	na	716,3	0,4
mDC + LT + αCD3 + N7	na	na	na	na	na	na	na	na	416,0	0,2	2235,1	0,9	441,9	0,2
mDC + LT + αCD3 p277	16773,5	0,9	67014,8	1,0	59761,4	1,2	9093,5	0,9	740,7	0,4	1919,0	0,7	25883,8	0,9
LT	75,7	--	276,3	--	214,3	--	595,1	--	441,9	--	2012,2	--	602,6	**--**
LT + αCD3	411,1	**5,4**	12595,3	**45,6**	12833,7	**59,9**	3423,2	**5,8**	na	**--**	na	**--**	4877,2	**19,5**

A resposta proliferativa em resposta ao αCD3 por linfócitos T frente às diferentes DCs (mDC+LT+αCD3) foi calculada dividindo-se a média de cpm (contagens por minuto) dessa condição pela média de cpm dos (LT+DCs). I.E= índice de estimulação. (I.E.) ≥ 2 indica proliferação. I.E ≤ 0,5 indica inibição da proliferação. A inibição foi calculada dividindo-se a condição com fragmento (DC+LT+Hsp60+αCD3) pela sem fragmento (DC+LT+αCD3). LT = linfócitos T, mDC= células dendríticas maduras. Negrito= valores de índice de estimulação positivos. na= não avaliado. -- = não se aplica. n=6. = inibição ≥50%. na= não avaliado.

7.7.2 Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de citocinas induzidas por αCD3 nas coculturas de LT com as diferentes DCs.

Nos experimentos onde detectamos indução da produção das citocinas nas coculturas das diferentes DCs com LT em resposta ao estímulo policlonal de αCD3, avaliamos se os diferentes fragmentos da Hsp60 (10µg/ml) foram capazes de modificar essa produção. Para isso, fragmentos da Hsp60 foram adcionados (10µg/ml) nas diferentes coculturas DCs por 24 horas. Após 48 h da adição dos LT e do αCD3 coletamos os sobrenadantes de cultura. As citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2 e TGF-β) foram avaliadas por citometria de fluxo, em ensaios de CBA (*Cytometric Bead Array*) e ELISA (só para TGF-β). O número de experimentos variou entre algumas citocinas, sendo: n=2 TGF-β, IL-6; n=4 (IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ;), n=3 (IL-2, IL-10, IL-12). Os limites de detecção do ensaio de CBA são de 20pg/ml a 5000pg/ml e do ELISA de 32pg/ml a 1000pg/ml.

Com relação à inibição da produção de citocinas observamos que de maneira geral, diversos fragmentos provocaram esse efeito, porém os fragmentos p277 (18/31) e C-Hsp60 (13/31) foram os que apresentaram uma maior freqüência de inibição tanto de citocinas como de proliferação (Quadro 5). Além disso, esses fragmentos inibiram principalmente as citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, TNF-α e IFN-γ) e em proporções similares: p277(11/18) e C-Hsp60 (10/18) (Quadro 5).

Quadro 5. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta ao αCD3 pelas coculturas de linfócitos T com as difererentes DCs: Balanço do perfil de citocinas produzidas e da resposta linfoproliferativa.

Coculturas	Fragmentos Hsp60	Efeito	Citocinas				Resposta proliferativa
			TNF-α	IFN-γ	IL-10	IL-2	
iDC + LT +αCD3	Sem		DC07 DC56 DC57 3/4	DC07 1/4	DC56 DC57 2/3	DC07 1/4	DC07 DC21 DC22 DC56 DC57 5/6
	Com	Inibição	DC07 DC56 2/3 p277(2), C-Hsp60 (2)	DC07 1/1 p277	DC56 1/2 p277, N7	DC07 1/1 p277, C-Hsp60	DC07 DC56 p277, N7, C-Hsp60
		Indução	DC57 1/4 p277, N7, C-Hsp60	DC22 1/2 CHsp60	DC57 1/3 p277, N7, C-Hsp60	DC22 1/1 C-Hsp60	0/6
iDC IL-10 + LT +αCD3	Sem		DC07 DC56 DC57 3/4	DC07 DC56 2/4	DC56 DC57 2/3	DC07 DC56 2/4	DC07 DC22 DC56 3/6
	Com	Inibição	DC07 DC56 DC57 3/3 p277(2), N3, N7,C-Hsp60(2)	DC56 1/2 p277, N3, N7, C-Hsp60	DC56 1/2 p277, N3, N7, CHsp60	DC07 DC56 2/2 p277, N3, N7, C-Hsp60(2)	DC56 1/3 p277, N3, N7, C-Hsp60
		Indução	DC57 1/3 N7, C-Hsp60	DC07 1/3 p277, CHsp60	DC57 1/3 p277, N7, C-Hsp60	0/2	0/6
mDC+LT+αCD3	Sem		DC07 DC57 2/4	DC07 1/4	DC56 DC57 2/3	DC07 1/4	DC07 DC21 DC22 DC24 4/6
	Com	Inibição	DC57 1/2 p277	0/1	DC57 2/2 p277, N7 e C-Hsp60	0/1	0/4
		Indução	0/1	0/2	0/2	DC07 1/1 p277, C-Hsp60	DC56 1/6 N3

Continuação Quadro 5. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na resposta ao αCD3 pelas coculturas de linfócitos T com as difererentes DCs: Balanço do perfil de citocinas produzidas e da resposta linfoproliferativa.

Coculturas	Fragmentos Hsp60	Efeito	Citocinas				Resposta proliferativa
			IL-6	TGF-β	IL-4	IL-5	
iDC + LT +αCD3	Sem		DC56 1/3	DC56 1/2	DC07 1/4	DC07 1/4	DC07 DC21 DC22 DC56 DC57 5/6
	Com	Inibição	DC56 1/1 p277, N7, C-Hsp60	DC56 1/1 P277, C-Hsp60	0/1	0/1	DC07 DC56 p277, N7, C-Hsp60
		Indução	DC22 DC56 2/2 N3, C-Hsp60	DC56 1/2 N7	DC07 1/4 C-Hsp60	0/4	0/6
iDC IL-10 + LT +αCD3	Sem		DC56 1/3	0/2	0/4	0/4	DC07 DC22 DC56 3/6
	Com	Inibição	DC56 1/1 p277, N3, N7, CHsp60	0/0	0/0	0/0	DC56 1/3 p277, N3, N7, C-Hsp60
		Indução	DC22 1/2 C-Hsp60	DC56 DC57 2/2 p277, C-Hsp60 (2)	DC07 1/4 p277, C-Hsp60	DC07 1/4 p277, C-Hsp60	0/6
mDC + LT +αCD3	Sem		0/3	DC56 DC57 2/2	DC07 1/4	DC07 1/4	DC07 DC21 DC22 DC24 4/6
	Com	Inibição	0/0	0/2	0/1	0/1	0/4
		Indução	0/0	DC56 DC57 2/2 N3, C-Hsp60 (2)	DC07 1/3 p277	DC07 1/3 p277, C-Hsp60	DC56 1/6 N3

Quadro 5. Balanço das respostas de produção de citocinas e linfoproliferação induzidas pelo αCD3 nas coculturas de linfócitos T com as diferentes DCs, frente a fragmentos da Hsp60. A produção de citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β), em sobrenadantes de culturas de 48 horas de DC+LT+αCD3 com ou sem fragmentos da Hsp60.Representamos a freqüência de produção de cada citocina nas diferentes coculturas com os diferentes tipos de DCs. mDCs: células dendríticas maduras; iDC: células dendríticas imaturas; iDC IL-10: imaturas tratadas com IL-10. Valores mínimo e máximo de detecção: 20-5000 pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). Foi considerada produção induzida pelos antígenos da Hsp60 valores > do que os encontrados na produção sem fragmento e > limite mínimo de detecção. A resposta proliferativa das células nas coculturas foi medida pela incorporação de timidina triciada adicionada à cultura nas últimas 18 horas. O índice de estimulação (I.E.) foi calculado dividindo-se as médias de cpm da condição (DC+LT+αCD3+Hsp60) pela média de cpm da condição (DC+ LT+αCD3). I.E≥ 2= proliferação. I.E ≤ 0,5 = inibição de proliferação. ▢: Experimentos com valores positivos para a produção de citocinas e proliferação nas coculturas autólogas (DC+LT). ▢: inibição > 50% da produção de citocinas ou proliferação celular com relação à condição sem fragmento da Hsp60. ▢: indução da produção de citocinas ou proliferação celular com relação à condição sem fragmento da Hsp60. Número entre parêntese= número de vezes que o fragmento inibiu ou induziu a produção de citocinas ou resposta linfoproliferativa.

Já com relação à indução ou aumento da produção de citocinas, observamos que todas as citocinas estudadas foram induzidas nos três tipos de coculturas. No entanto, podemos destacar dois fragmentos da Hsp60, o p277 e o C-Hsp60, como sendo os principais indutores de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF-β) e inflamatórias (IL-2, IL-6, TNF-α, IFN–γ) nos três tipos de coculturas. Vale a pena ressaltar que ambos os fragmentos, além de serem os mais freqüentes inibidores de citocinas pró-inflamatórias, foram os principais indutores de citocinas anti-inflamatórias: C-Hsp60 (18/60) p277 (10/60) e que, além disso, vale destacar que o fragmento C-Hsp60 só foi responsável pela inibição de uma das citocinas anti-inflamatórias (IL-10) uma única vez. (Quadro 5).

Nas coculturas com iDCs estimuladas com αCD3 tivemos indução ou aumento de produção das seguintes citocinas na presença de diferentes fragmentos da Hsp60: TNF-α (p277, N7 e C-Hsp60); IFN-γ (C-Hsp60); IL-4 (C-Hsp60); IL-10 (p277, N7, C-Hsp60); IL-2 (C-Hsp60); IL-6 (N3, C-Hsp60); TGF-β (N7). Já nas coculturas com iDCs IL-10 tivemos a indução das seguintes citocinas: TNF-α (N7, C-Hsp60); IFN-γ (p277, C-Hsp60); IL-10 (p277, N7, C-Hsp60); IL-6 (C-Hsp60); TGF-β (p277 e C-Hsp60); IL-4 (p277 e C-Hsp60) e IL-5 (p277 e C-Hsp60) (Tabelas 46 a 53). As coculturas com mDC induziram: IL-2 (p277 e C-Hsp60); TGF-β (N3 e C-Hsp60); IL-4 (p277) e IL-5 (p277 e C-Hsp60) (Tabelas 45 a 52). Por fim, vale destacar que nas coculturas com mDCs nenhum fragmento induziu ou aumentou a produção de TNF-α , IFN-γ, IL-10, IL-6, assim como não houve produção de IL-5 e IFN-γ pelas coculturas com iDCs e de IL-2 pelas iDCs IL-10.

Tabela 45. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TNF-α (pg/ml) em resposta ao αCD3 nas coculturas de DCs com LT.

TNF-α					
		Experimentos			
Célula	**Condições**	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	≥5000	*	392,5	374,0
	p277	242,6	/	*	**563,5**
	N3	na	na	304,6	na
	N7	na	na	*	**569,9**
	C-Hsp60	136,0	*	63,0	**556,9**
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	364,0	/	184,6	372,6
	p277	328,0	*	*	182,5
	N3	na	na	*	na
	N7	na	na	*	**427,4**
	C-Hsp60	93,1	/	*	**441,5**
mDC	**mDC+LT+αCD3**	≥5000	/	/	485,5
	p277	≥5000	27,6	*	*
	N3	na	na	432,4	na
	N7	na	na	*	393,2
	C-Hsp60	≥5000	22,7	*	481,9

A produção de TNF-α foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). ☐ = inibição ≥ 50%. n=4.

Tabela 46. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IFN-γ (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

IFN-γ					
		Experimentos			
Célula	**Condições**	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	2163,0	*	/	/
	p277	707,7	/	*	/
	N3	na	na	/	na
	N7	na	na	*	/
	C-Hsp60	1856,1	**44,3**	27,1	/
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	592,0	*	529,0	/
	p277	**998,7**	*	*	280,8
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	/
	C-Hsp60	**1281,9**	*	*	/
mDC	**mDC+LT+αCD3**	3585,6	*	/	/
	p277	≥5000	*	*	*
	N3	na	na	459,0	Na
	N7	na	na	*	614,1
	C-Hsp60	≥5000	*	*	/

A produção de IFN-γ foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). ☐ = inibição ≥ 50%. n=4.

Tabela 47. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-5 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

IL-5					
		Experimentos			
Célula	**Condições**	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	33,8	*	*	*
	p277	*	/	*	*
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	*
	C-Hsp60	28,4	*	*	*
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	*	*	*	*
	p277	**26,4**	*	*	*
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	*
	C-Hsp60	**31,5**	*	*	*
mDC	**mDC+LT+αCD3**	66,0	/	*	*
	p277	**87,4**	*	*	*
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	*
	C-Hsp60	**75,2**	*	*	*

A produção de IL-5 foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentadas por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). □ = inibição ≥ 50%. n=4.

Tabela 48. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-4 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

IL-4					
		Experimentos			
Célula	**Condições**	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	67,5	*	*	*
	p277	38,1	/	*	*
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	*
	C-Hsp60	**94,6**	*	*	*
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	*	*	*	*
	p277	**26,4**	*	*	*
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	*
	C-Hsp60	**31,5**	*	*	*
mDC	**mDC+LT+αCD3**	356,5	/	*	*
	p277	**359,6**	*	*	*
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	*
	C-Hsp60	324,1	*	*	*

A produção de IL-4 foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). n=4.

Tabela 49. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-2 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

IL-2					
		Experimentos			
Célula	**Condições**	**DC07**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	≥5000	*	/	/
	p277	2278,6	**/**	*	**/**
	N3	na	na	/	Na
	N7	na	na	*	**/**
	C-Hsp60	318,3	**71,3**	391,6	**/**
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	≥5000	*	558,7	/
	p277	2660,4	*	*	585,9
	N3	na	na	*	Na
	N7	na	na	*	**/**
	C-Hsp60	301,0	*	*	**/**
mDC	**mDC+LT+αCD3**	1479,2	**/**	/	/
	p277	**1711,8**	*	*	*
	N3	na	na	/	Na
	N7	na	na	*	616,2
	C-Hsp60	**1562,8**	270,1	*	**/**

A produção de IL-2 foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). □= inibição ≥ 50%. n=3.

Tabela 50. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-10 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

IL-10				
			Experimentos	
Célula	**Condições**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	*	91,5	35,8
	p277	/	*	**55,2**
	N3	na	58,8	Na
	N7	na	23,1	**71,4**
	C-Hsp60	*	68,6	**46,1**
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	*	86.5	61,5
	p277	*	*	**84,2**
	N3	na	*	Na
	N7	na	*	**75,3**
	C-Hsp60	*	*	**84,5**
mDC	**mDC+LT+αCD3**	/	57,2	94,4
	p277	*	*	*
	N3	na	38,2	Na
	N7	na	*	65,7
	C-Hsp60	*	*	50,8

A produção de IL-10 foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). ☐ = inibição ≥ 50%. n=3.

Tabela 51. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de IL-6 (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

IL-6				
		Experimentos		
Célula	**Condições**	**DC22**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	*	547,4	/
	p277	/	*	/
	N3	na	**559,6**	Na
	N7	na	*	/
	C-Hsp60	**55,8**	*	/
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	*	234,8	/
	p277	*	*	222,3
	N3	na	*	Na
	N7	na	*	/
	C-Hsp60	**41,3**	*	/
mDC	**mDC+LT+αCD3**	/	/	/
	p277	1328,1	180,3	140,4
	N3	na	/	Na
	N7	na	27,5	/
	C-Hsp60	1344,9	*	/

A produção de IL-6 foi quantificada por CBA e analisada por citometria de fluxo. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 20 pg/ml (CBA). ☐ = inibição ≥ 50%. n=2.

Tabela 52. Efeito dos fragmentos da Hsp60 na produção de TGF-β (pg/ml) em resposta ao αCD3 pelas coculturas de DCs com LT.

TGF-β			
		Experimentos	
Célula	**Condições**	**DC56**	**DC57**
iDC	**iDC+LT+αCD3**	46,8	*
	p277	*	*
	N3	45,5	na
	N7	**57,1**	*
	C-Hsp60	*	*
iDC IL-10	**iDC IL-10+LT+αCD3**	*	*
	p277	*	**74,0**
	N3	*	na
	N7	*	*
	C-Hsp60	**35,1**	**80,5**
mDC	**mDC+LT+αCD3**	48,0	86,6
	p277	*	53,5
	N3	**236,2**	na
	N7	*	72,9
	C-Hsp60	**132,4**	**102,1**

A produção de TGF-β foi quantificada por ELISA. Os fragmentos (p277, N3, N7, C-Hsp60) foram adicionados às DCs na concentração de 10 μg/ml por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura de (DCs+LTα+CD3) com e sem fragmentos da Hsp60. Os limites de detecção máximo e mínimo= 20 a 5000pg/ml. Foi considerada produção aumentada por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. A inibição da produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60 foi avaliada somente quando houve produção na condição sem fragmento (DC+LT+αCD3). Negrito= produção induzida por fragmentos da Hsp60. iDCs= células dendríticas imaturas. iDCs IL-10= células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs= células dendríticas maduras. LT=linfócitos T. na = não avaliado. / = amostras com problemas na detecção. * = produção < 32pg/ml (ELISA). n=2.

As Figuras 42 A e B ilustram a produção de citocinas (pg/ml) pelas três coculturas de DCs, com diferentes fragmentos da Hsp60 em resposta ao estímulo policlonal de αCD3.

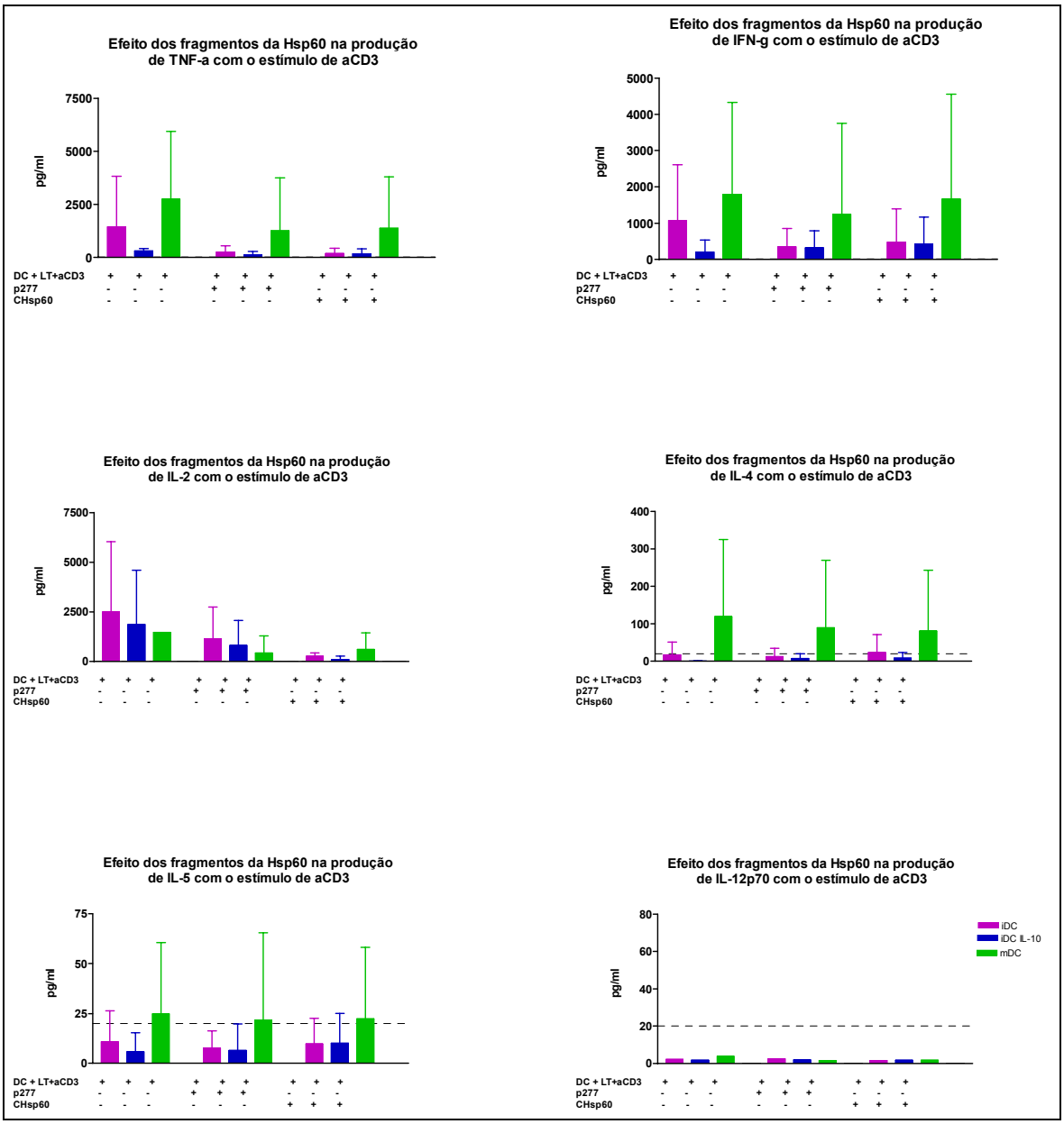


Figura 42.A. Efeito dos fragmentos p277 e C-Hsp60 da proteína da Hsp60 na produção de citocinas nas coculturas com diferentes DCs na presença do estímulo de αCD3. iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. LT: linfócitos T. n=4 (IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ;), n=3 (IL-2, IL-10, IL-12). Valores considerados positivos entre 20/pg/ml e 5000pg/ml (CBA). Barras: desvio padrão.

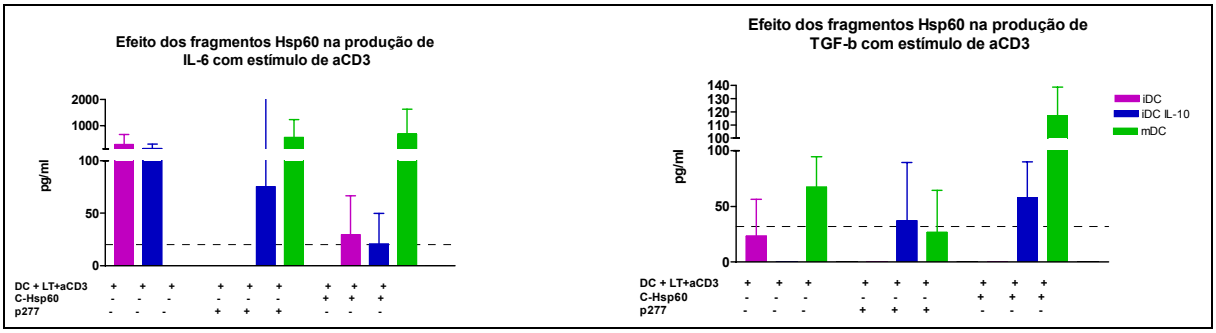


Figura 42.B. Efeito dos fragmentos p277 e C-Hsp60 da proteína Hsp60 na produção de citocinas nas coculturas com diferentes DCs na presença do estímulo de αCD3. iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. LT: linfócitos T. n=3 (IL-6). n=2 TGF-β. Valores considerados positivos entre 20/pg/ml e 5000pg/ml (CBA) 32pg/ml e 1000pg/ml (ELISA). Barras: desvio padrão.

No Quadro 6 podemos observar um painel de todas as citocinas que foram produzidas em resposta ao αCD3, nas três coculturas com os fragmentos p277 e C-Hsp60. Com este painel visamos facilitar a visualização dos dados apresentados e verificar se um dos fragmentos da Hsp60 se mostrou mais imunorregulador do que o outro. Apesar da alta freqüência de modulações, podemos notar que a C-Hsp60 apresentou uma freqüência de indução de citocinas maior do que o peptídeo p277, e que estas citocinas foram predominantemente citocinas inflamatórias, sempre na presença do estímulo de αCD3. No entanto, a C-Hsp60 se mostrou também capaz de induzir citocinas anti-infamatórias também com uma freqüência maior que o p277.

Já com relação ao peptídeo p277, este parece principalmente inbir as citocinas inflamatórias induzidas pelo αCD3, além de ser capaz de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias nas coculturas de iDCs (iDCs e iDCs IL-10). Observamos ainda que o p277 foi o único fragmento da Hsp60 que foi capaz de inibir a produção de TNF-α induzida pelo αCD3 nas coculturas com mDCs (DC57). Além disso, foi capaz de inibir a produção de IL-10 nas três coculturas e induzir citocinas anti-inflamatórias, inclusive nas coculturas de mDCs.

Quadro 6. O efeito dos fragmentos da Hsp60 na inibição e indução da produção de citocinas em resposta ao αCD3 por coculturas de linfócitos T com as diferentes DCs.

	INFLAMA										REGULA							
	TNF-α		INF-γ		IL-6		IL-2		IL-12 p70		IL-4		IL-10		IL-5		TGF-β	
DCs	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q	M	Q
iDC C-Hsp60	1/3 ↑	+++	1/2 ↑	++	1/2 ↑	++	1/1 ↑	++			1/4 ↑	++	1/3 ↑	+				
	2/3 ↓	97% 84%			1/1 ↓	100%	1/1 ↓	93%									1/1 ↓	100%
iDC p277	1/3 ↑	+++											1/3 ↑	++				
	2/3 ↓	97% 100%	1/1 ↓	67%	1/1 ↓	100%	1/1 ↓	54%					1/2 ↓	100%	1/1 ↓	100%	1/1 ↓	100%
iDC IL-10 C-Hsp60	1/3 ↑	++	1/3 ↑	+++	1/2 ↑	+++					1/4 ↑	++	1/3 ↑	++	1/4 ↑	1/2 ↓	2/2 ↑	++
	2/3 ↓	74% 100%	1/2↓	100%	1/1 ↓	100%	2/2 ↓	94% 100%					1/2 ↓	100%				
iDC IL-10 p277			1/3 ↑	+++							1/4 ↑	++	1/3 ↑	++	1/4 ↑	++	1/2 ↑	++
	2/3 ↓	100% 51%	1/2 ↓	100%	1/1 ↓	100%	1/2 ↓	100%					1/2 ↓	100%				
mDC C-Hsp60							1/1 ↑	++							1/3 ↑	++	2/2 ↑	++
													1/2 ↓	100%				
mDC p277							1/1 ↑	+++			1/3 ↑	+++			1/3 ↑	++		
	1/2 ↓	100%											2/2 ↓	100%			1/2 ↓	100%

Quadro 6. A produção das citocinas foi quantificada por CBA e ELISA (TGF-β). Os fragmentos p277 e C-Hsp60 foram adicionados às coculturas autólogas de linfócitos T e as diferentes DCs na concentração de 10 μM por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados após 48h da cocultura. Limite de detecção máximo e mínimo= 20-5000pg/ml (CBA) e 32-1000pg/ml (ELISA). Foi considerada produção induzida por fragmentos da Hsp60 valores > do que a produção sem fragmento (DC+LT+αCD3) e > que limite mínimo de detecção. Foi considerada inibição valores ≥ 50% da produção das coculturas sem os fragmentos (DC+LT). iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. LT= linfócitos T. M= modulação, podendo ser: ↑= aumento, ↓= inibição □= não houve alteração da produção ou não houve produção de citocinas pelos fragmentos da Hsp60. Q= medida da modulação (pg/ml para indução e % de inibição para inibições). += aumento de até 10pg/ml; ++= aumento de até 100pg/ml; +++= aumento de até 1000pg/ml; ++++= aumento superior a 1000pg/ml. n=2 TGF-β, IL-6; n=4 (IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ;), n=3 (IL-2, IL-10, IL-12).

7.8 Protocolos para a indução de tolerância ao alotransplante murino de pele.

7.8.1 Injeção das diferentes DCs tratadas in vitro com fragmentos da Hsp60.

O nosso objetivo nesses experimentos foi induzir tolerância ao transplante de pele em camundongos pela injeção de células dendríticas imaturas (iDCs e iDCs IL-10) previamente (*in vitro*) tratadas fragmentos da Hsp60. No total foram realizados 7 experimentos de transplante de pele alogenéicos (Balb/c–C57BL6). Injetamos $7x10^6$ DCs previamente tratadas (*in vitro*) com fragmentos da Hsp60 (C-Hsp60, p277 e N7) 7 dias antes do transplante de pele, pela via endovenosa retro-orbital.

Os enxertos foram avaliados macroscopicamente quanto a sinais de rejeição e a curva de sobrevida foi calculada através do método de Kaplan e Meyer e a significância estatística foi medida pelo teste de Log Rank. Não houve diferença significativa para nenhuma das condições testadas, seja quando comparamos os diferentes tratamentos com Hsp60 com a célula sem tratamento, seja comparando todas as condições com o controle PBS.

Observando todos os experimentos realizados (Figura 43 e na Tabela 53) notamos que todos os animais transplantados injetados com as diferentes DCs, rejeitaram o enxerto em tempo muito semelhante ao controle PBS (14 dias). No entanto, os animais que foram injetados com iDCs IL-10 p277 e N7, tiveram uma sobrevida do enxerto superior à do controle com PBS (17 e 16, respectivamente), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Tabela 53. Sobrevida dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Balb/c fêmeas, previamente imunizados com DCs tratadas e não tratadas com diferentes fragmentos da Hsp60.

Célula	Receptor	Doador	n	Sobrevida do enxerto		MSE
iDC	BALB/c (H2d)	C57BL/6 (H2b)	16	A: 9 dias B: 9 dias C: 9 dias D: 13 dias E:13 dias F: 13 dias G: 13 dias H: 10 dias	I: 14dias J: 12 dias K: 14 dias L: 15 dias M: 15 dias N: 13 dias O: 16 dias P: 13 dias	13 dias
iDC C-Hsp60	BALB/c	C57BL/6	3	A: 14 dias B: 9 dias C: 14 dias		14 dias
iDC p277	BALB/c	C57BL/6	3	A: 9 dias B: 9 dias C: 9 dias		9 dias
iDC N7	BALB/c	C57BL/6	10	A: 14 dias B: 14 dias C: 14 dias D: 14 dias E: 15 dias	F: 18 dias G: 18 dias H: 18 dias I: 14 dias J: 14 dias	14 dias
iDC IL-10	BALB/c	C57BL/6	16	A: 14 dias B: 14 dias C: 9 dias D: 13 dias E: 11 dias F: 11 dias G: 10 dias H: 15 dias	I: 15 dias J: 14 dias K: 20 dias L: 19 dias M: 15 dias N: 13 dias O: 13 dias P: 13 dias	14 dias
iDC IL-10 C-Hsp60	BALB/c	C57BL/6	3	A: 12 dias B: 14 dias C: 12 dias		12 dias
iDC IL-10 p277	BALB/c	C57BL/6	6	A: 14 dias B: 14 dias C: 10 dias	D: 19 dias E: 19 dias F: 19 dias	**17 dias**
iDC IL-10 N7	BALB/c	C57BL/6	6	A: 14 dias B: 14 dias C: 12 dias	D: 19 dias E: 19 dias F: 18 dias	**16 dias**
mDC	BALB/c	C57BL/6	7	A: 14 dias B: 14 dias C: 13 dias D: 13 dias	D: 13 dias E: 13 dias F: 13 dias	13 dias
mDC C-Hsp60	BALB/c	C57BL/6	2	A: 14 dias B: 14 dias		14 dias
mDC p277	BALB/c	C57BL/6	2	A: 10 dias B: 14 dias		12 dias
mDC N7	BALB/c	C57BL/6	1	A: 18 dias		--
PBS	BALB/c	C57BL/6	22	A: 14 dias B: 14 dias C: 10 dias D: 14 dias E: 15 dias F: 20 dias G: 13 dias H: 21 dias I: 21 dias J: 14 dias K: 21 dias	L: 20 dias M: 15 dias N: 15 dias O: 19 dias P: 15 dias Q: 11 dias R: 11 dias S: 11 dias T: 13 dias U: 13 dias V: 14 dias	14 dias

iDCs: células dendríticas imaturas; iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10; mDCs: células dendríticas maduras. Fragmentos da Hsp60 utilizados nesses experimentos: C-Hsp60, p277 e N7. Controle utilizado: PBS. A análise estatística foi pelo método de LogRank e nenhum foi significativo. Letras maiúsculas: camundongos por experimento. MSE: mediana de sobrevida do enxerto. n= número de animais por experimento em cada grupo experimental. BALB/c e C57BL/6: linhagens de camundongos utilizadas nos experimentos de transplante.Em negrito MSE superiores à obtida pelo controle PBS.

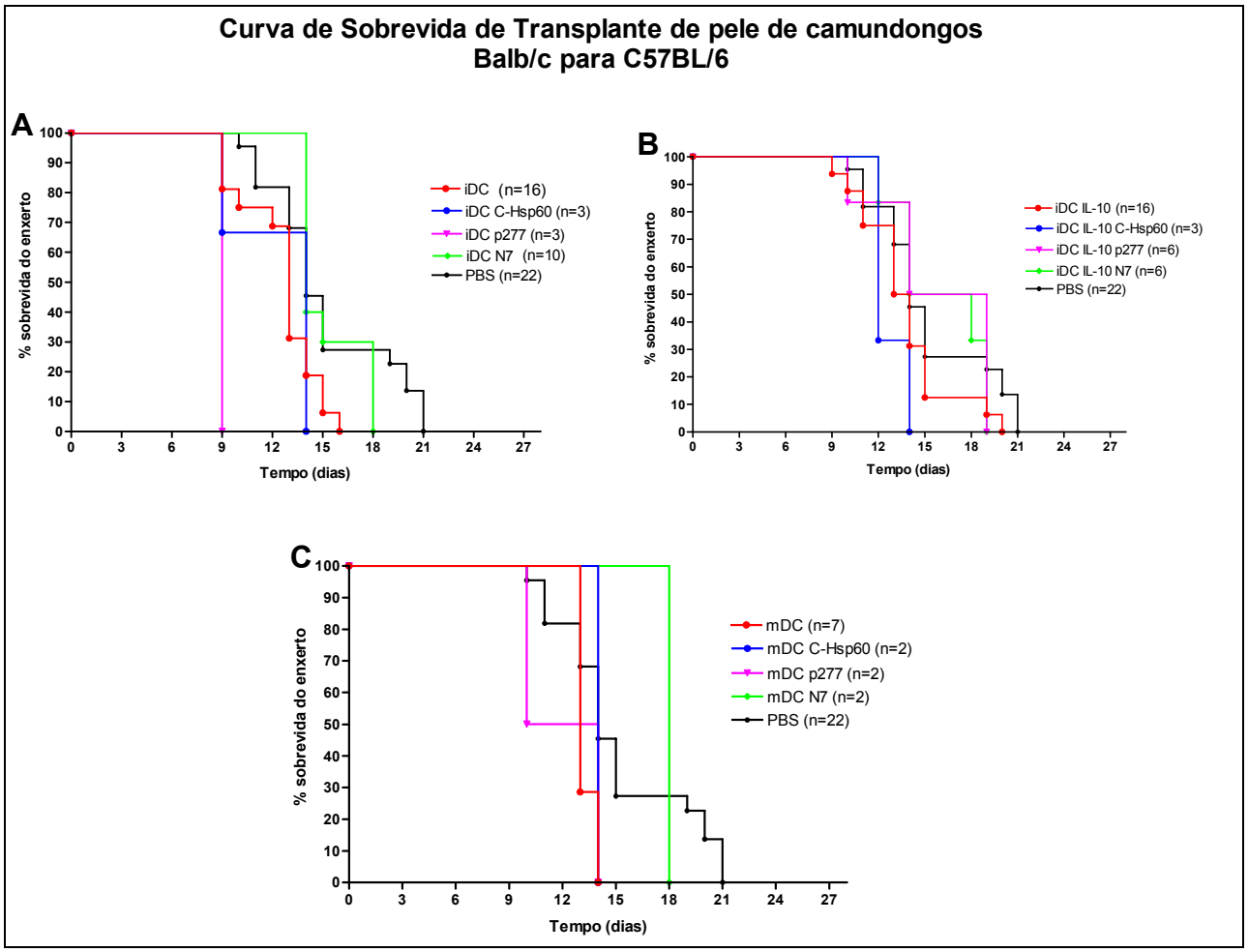


Figura 43. Curvas de sobrevida dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Balb/c fêmeas, previamente imunizados com DCs tratadas ou não com diferentes fragmentos da Hsp60. Os camundongos receptores (Balb/c) receberam 1 injeção das diferentes DCs ($7x10^6$ células), via endovenosa no dia -7 pré-transplante. O transplante de pele de camundongos C57BL/6 foi feito 7 dias após a injeção. Como grupos controles foram utilizados animais imunizados com PBS. iDCs: células dendríticas imaturas. iDCs IL-10: células dendríticas imaturas tratadas com IL-10. mDCs: células dendríicas maduras. Grupos experimentais: **A)** Injeção de iDCs; iDCs C-Hsp60 e iDCs p277. **B)** Injeção de iDCs IL-10; iDCs IL-10 C-Hsp60 e iDCs IL-10 p277.**C)** Injeção de mDCs; mDCs C-Hsp60 e mDCs p277. As medianas de sobrevida (MST) observadas foram: iDC: 13 dias; iDC C-Hsp60: 14 dias; iDC p277: 9 dias; iDC N7: 14; iDC IL-10: 14 dias; iDC IL-10 C-Hsp60: 12 dias; iDC IL-10 p277: 17 dias; iDC IL-10 N7: 16; mDC: 13 dias; mDC C-Hsp60:14 dias; mDC p277: 12 dias; PBS: 14 dias. Número de animais foi (n)= iDC: 16; iDC C-Hsp60: 3; iDC p277: 3; iDC N7:10; iDC IL-10: 16; iDC IL-10 C-Hsp60: 3; iDC IL-10 p277: 6; iDC IL-10 N7: 6; mDC: 7; mDC C-Hsp60: 2; mDC p277: 2; PBS: 22. A análise estatística foi pelo método de LogRank e nenhuma foi significativa. n de experimentos= 7.

8.2 Injeção dos anticorpos αDEC205 acoplados ao peptídeo N3 da proteína Hsp60.

O nosso objetivo com esses experimentos foi induzir tolerância ao transplante de pele em camundongos pela injeção de anticorpos αDEC205 acoplados ao peptídeo N3 da Hsp60 (αDEC205-N3), em modelos murinos com disparidades de antígenos secundários de histocompatibilidade entre camundongos da linhagem Balb/c e DBA2, sendo este último o doador da pele. Foi realizado 1 experimento com 3 grupos: A) 5µg de anticorpo (n=7); B) 15 µg do anticorpo (n=6); C) PBS (n=5). Injetamos 2 doses pela via intraperiotoneal nos dias -7 e -3 do pré-transplante.

Os enxertos foram avaliados macroscopicamente quanto a sinais de rejeição e a curva de sobrevida foi calculada através do método de Kaplan e Meyer e a significância estatística foi medida pelo teste de Log Rank. Não houve diferença significativa entre os animais injetados com αDEC205-N3 e os injetados com PBS.

Todos os animais transplantados, independentemente da dose de anticorpos αDEC205-N3 recebidos, rejeitaram o enxerto em tempo muito semelhante ao controle PBS (14 dias). (Figura 44 e na Tabela 54)

Tabela 54. Sobrevida dos enxertos de pele de camundongos DBA2 em camundongos Balb/c machos, previamente imunizados com duas doses de anticorpos αDEC205-N3 via intra-peritoenal.

Grupos	Receptor	Doador	n	Sobrevida do enxerto	MSE
A (αDEC205-N3 5μg)	BALB/c	DBA2	7	A: 15 dias B: 15 dias C: 15 dias D: 15 dias E: 15 dias F: 15 dias G: 13 dias	15 dias
B (αDEC205-N3 15μg)	BALB/c	DBA2	6	A: 15 dias B: 13 dias C: 12 dias D: 15 dias E: 15 dias F: 12 dias	14 dias
C PBS	BALB/c	DBA2	5	A: 19 dias B: 19 dias C: 19 dias D: 15 dias E: 19 dias	19 dias

Controle utilizado: PBS. A análise estatística foi pelo método de LogRank. Letras maiúsculas: camundongos por experimento. MSE: mediana de sobrevida do enxerto. n= número de animais por exeperimento em cada grupo experimental. BALB/c e DBA2: linhagens de camundongos utilizadas nos experimentos de transplante.Em negrito MSE superiores à obtida pelo controle PBS. Houve diferença estatística entre grupos B e C, p=0,460.

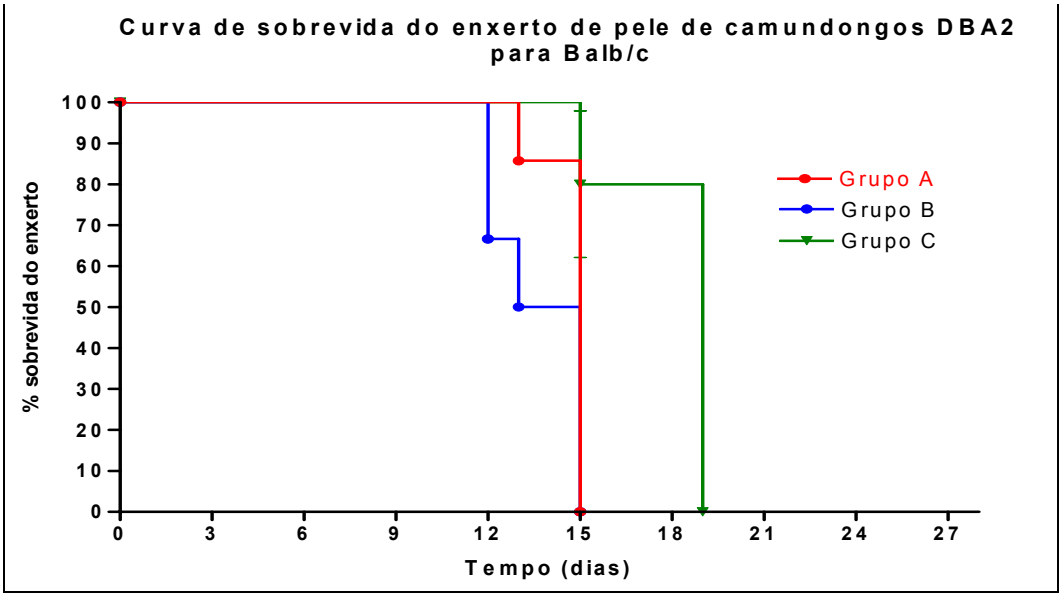


Figura 44. Curvas de sobrevida dos enxertos de pele de camundongos DBA2 em camundongos Balb/c machos, previamente imunizados com anticorpos αDEC205-N3. Os camundongos receptores (Balb/c) receberam 2 injeções dos anticorpos aDEC205-N3, nos dias -7 e -3 pré-transplante, pela via peritoneal. O transplante de pele de camundongos DBA2 foi feito 3 dias após a última dose. Como grupos controles foram utilizados animais imunizados com PBS. **Grupo A**: 2 injeção de 5μg αDEC205-N3, n=7. **Grupo B**: 2 injeção de 15μg αDEC205-N3, n=6. **Grupo C:** PBS, n=5. As medianas de sobrevida (MST) observadas foram: Grupo A=15 dias; Grupo B=14 dias e Grupo C=19 dias. A análise estatística foi pelo método de LogRank foi significativa somente quando comparamos o grupo B e grupo C (**p=0,0460**).

Todos os animais dos grupos A e B, rejeitaram o enxerto mais rapidamente do que o controle PBS, porém essa diferença só foi estatisticamente significante quando comparamos o grupo B com o grupo C (p=0,0460).

8. DISCUSSÃO

O nosso objetivo geral neste trabalho foi avaliar a capacidade das células dendríticas (DCs) tratadas com diferentes fragmentos da Hsp60 de regular o sistema imune e induzir tolerância ao aloenxerto de pele, no sistema murino. No entanto, há alguns anos sabe-se que as DCs apresentam diferentes estados de maturação e que apresentam diferentes funções efetoras nesses estados. As iDCs parecem ser responsáveis pela indução de tolerância, enquanto, que as mDCs parecem ser responsáveis pela resposta imunogênica (Steinman *et al*, 2000; revisado por Moser, 2003; Cools *et al,* 2008).

Primeiramente procuramos avaliar se os três tipos de DCs geradas por nós (iDCs, iDCs tratadas com IL-10 e mDCs) condiziam com as descrições da literatura, avaliando, para isso, critérios de caracterização morfológica e funcional para estas células.

Com relação à caracterização morfológica, apesar das DCs formarem uma população celular morfologicamente muito heterogênea e com grande plasticidade, como já descrito, (O'Garra & Trinchieri, 2004), podemos notar que as diferentes DCs apresentaram diferenças morfológicas entre si (Figura 14). As iDCs e as iDCs IL-10 apresentaram um número menor de dendritos, dendritos mais grossos e mais curtos do que os apresentados pelas mDCs (O'Doherty *et al,* 1994; Chen-Woan *et al*, 1996). A única diferença observada entre os dois tipos de iDCs foi que as tratadas com IL-10 apresentaram uma forma um pouco mais arredondada. Já com relação ao Citospin, as diferenças entre os tipos de DCs ficaram ainda mais claras, de modo que observamos que: (i) as iDCs eram menores e mais arredondadas,

apresentavam núcleo central e poucos vacúolos e dendritos; (ii) as iDCs IL-10 se pareceram com as iDCs porém, apresentaram variação quanto à posição do núcleo (periférico ou centralizado) e uma quantidade intermediária de vacúolos e dendritos; (iii) as mDCs apresentaram um maior tamanho celular e uma morfologia mais dendritiforme, com núcleo periférico, numerosos vacúolos e dendritos longos e em maior quantidade. Observações semelhantes foram relatadas por outros pesquisadores do grupo do Professor Ralph Steinman, entre outros (Steinman & Cohn, 1973; O'Doherty *et al,* 1994; Shu *et al*, 2007). Vale ressaltar que esperávamos encontrar um maior número de vacúolos intracitoplasmáticos nas iDCs, por estas apresentarem uma intensa atividade fagocítica mas, no entanto, notamos que foram as mDCs que apresentaram uma maior quantidade. Com base nessas observações levantamos a hipótese de que a grande quantidade de vacúolos encontrados nas mDCs tenha relação com a intensa atividade de apresentação de antígenos e a alta reciclagem de moléculas de MHC I e II com peptídeos acoplados, bem como com um aumento da expressão de moléculas acessórias e coestimuladoras.

Já com relação à caracterização imuno-funcional das diferentes DCs, foram avaliados os seguintes parâmetros: (i) imunofenotipagem; (ii) avaliação da estabilidade do fenótipo imaturo com o tratamento com IL-10; (iii) produção espontânea de citocinas; (iv) resposta celular alogenéica (MLR); (v) proliferação e produção de citocinas em cocultura autóloga.

As populações de DCs são definidas de acordo com a expressão de um conjunto de moléculas expressas em sua superfície como moléculas

coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) e moléculas de MHC classe II (Janeway & Walport, 2000; Wolenski *et al*, 2003). De um modo geral, observamos que as mDCs tiveram maior expressão dessas moléculas do que as iDCs ($p<0,01$ ou $p<0,001$), Figuras 17 e 18 e Tabelas de 4 a 7. Nossos dados são corroborados por dados de diversos trabalhos na literatura (Cavassani *et al*, 2004; Varani *et al,* 2005; Vanclée *et al,* 2006).

Como o nosso objetivo era injetar as iDCs em camundongos antes da realização dos transplantes de pele, atentamos para a necessidade de que as iDCs permanecessem com fenótipo imaturo estável *in vivo*, já que esse era um dos fenótipos descritos na literatura para a indução de tolerância (Steinman *et al*, 2000). Como sabíamos que, *in vivo,* essas células entrariam em contato com moléculas que poderiam induzir amadurecimento nessas células, como citocinas inflamatórias, procuramos algum protocolo, *in vitro,* que tornasse essas DCs resistentes a estímulos de maturação como o LPS (Vanclée *et al,* 2006). Escolhemos então, trabalhar com um protocolo simples e bem descrito no qual, trataram as iDCs com IL-10 exógena durante o período de diferenciação destas células em cultura (Wakkach *et al*, 2003). Notamos que as iDCs tratadas com IL-10 e depois desafiadas com LPS, mostraram o mesmo nível de expressão de CD80, CD86 e MHCII que as iDCs tratadas com IL-10 (Figura 19 e Tabela 8). Pudemos ainda observar que estes níveis foram menores do que os apresentados pelas mDCs, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa. Wakkach e colaboradores (2003) mostram que iDCs tratadas com IL-10, mesmo após o desafio com LPS, apresentavam os mesmo níveis de expressão de CD80 e

CD86 do que as sem LPS, mas que os níveis de MHCII aumentaram, nas três linhagens de camundongos estudadas (Balb/c, C57BL/6 e Transgênico para IL-10) (Wakkach *et al*, 2003). Além disso, eles mostram que os níveis apresentados pelas iDCs com e sem LPS foram sempre inferiores àqueles apresentados pelas mDCs, assim como ocorreu em nosso trabalho (Wakkach *et al*, 2003). Podemos concluir que o tratamento com a citocina IL-10 exógena durante a diferenciação das DCs foi capaz de estabilizar o fenótipo imaturo, fornecendo uma ferramenta importante para a indução de tolerância ao transplante.

A forma pela qual a IL-10 estabilizaria o fenótipo imaturo das DCs, ainda não está totalmente esclarecida. Entretanto, algumas hipóteses têm sido propostas na literatura e, dentre elas, podemos citar: (i) regulação negativa de moléculas coestimuladoras e de moléculas MHC de classe II via produção de IL-10 (Ding *et al,* 1993; Koppelman *et al,* 1997; Corinti *et al,* 2001); (ii) modificação da captura de antígenos solúveis e particulados e redução de MHC II carregado com esses antígenos *(*Lateef *et al,* 2003; Fu *et al,* 2008*);* (iii) expressão de moléculas imunorreguladoras como ILT-3, ILT-4 e PDL-1 na superfície das DCs (Manalavan *et al,* 2003). Nós não analisamos todos esses parâmetros, porém acreditamos que de acordo com nossos resultados, a IL-10 possa estar induzindo a geração de DCs potencialmente tolerogênicas através da redução da expressão de moléculas coestimuladoras. Isto porque, a produção de IL-10 autócrina foi muito baixa e apresentada por todas as DCs, sendo que as mDCs apresentaram as mais altas quantidades (Figura 21 e Tabela 9). No entanto, não podemos descartar outros mecanismos de ação, já que também não avaliamos a indução de apoptose em LT

e nem a indução de células Tregs ou Tr1, dados observamos por pesquisadores acima citados.

Ainda dentro da caracterização funcional das diferentes DCs, avaliamos a produção espontânea de citocinas por estas células após 48 horas de cultivo após a sua geração. Não observamos um perfil diferencial em relação à produção espontânea de citocinas pelos três tipos de DCs, no tempo analisado. O TNF-α (Tabela 9) foi a citocina mais freqüentemente detectada nos 3 tipos de DCs, principalmente nas mDCs, enquanto que a IL-6 foi produzida em maiores quantidades pelas mDCs e a IL-10 pelas iDCs IL-10 (Figura 21). Com base nesses resultados, sugerimos que as distintas atividades funcionais - imunogênica e tolerogênica -, descritas para as DCs maduras e imaturas, respectivamente, não sejam exclusivamente dependentes da sua produção espontânea de citocinas. No entanto, é possível que o perfil de citocinas seja discriminador frente a estímulos antigênicos específicos ou ainda em um momento mais precoce ou tardio da resposta imune. Após uma vasta busca na literatura, observamos que essas diferenças na produção espontânea destas células foi muito pouco estudada. Até o presente momento, não encontramos a descrição de um padrão de produção espontânea de citocinas para as DCs. O perfil clássico descrito na literatura para a produção espontânea das DCs é a produção de IL-12 pelas mDCs e a ausência desta citocina nas iDCs, tanto em DCs humanas como em DCs murinas **(De Smedt *et al*, 1997).** No entanto, nossos dados de produção espontânea de citocinas não confirmaram esse binômio, porque não observamos produção de IL-12 por mDCs em 6 experimentos avaliados. No entanto, vale ressaltar que todas as citocinas foram coletadas após 48 horas de cultura e isto poderia ter dificultado a detecção

de algumas citocinas cujo ponto de maior produção tenha sido em 24 horas ou ainda seria em 72 horas. Feili-Hariri e colaboradores também descreveram esse tipo de mDCs murinas, com altos níveis de moléculas coestimuladoras e que não produziam IL-12 espontaneamente (Felili-Hariri *et al*, 2005). No entanto, eles observaram que suas mDCs eram capazes de induzir um perfil de resposta Th2 e de inibir a resposta Th1 (Trembleau *et al*, 1997; Rissoan *et al,* 1999; Feili-Hariri *et al*, 2005; revisado por Cools *et al*, 2007), bem como de prevenir o desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD (Feili-Hariri *et al*, 2005). Em nossos resultados, apesar de observarmos que as nossas mDCs não produziram IL-12 não observamos que elas tenham inibido resposta Th1 ou ainda promovido uma resposta Th2. Ademais, nossas mDCs foram potentes estimuladoras de resposta proliferativa alogenéica de LT. Akbari e colaboradores que mostraram que mDCs pulmonares produtoras de IL-10 induziram Tr1 em camundongos expostos a antígenos respiratórios, *in vitro* e *in vivo* (Akbari *et al*, 2001). Nossas mDCs não parecem induzir respostas tolerogênicas semelhante às encontradas por estes pesquisadores e sim, a resposta imunogênica efetora classicamente descrita, conforme veremos ao longo desta discussão.

Com relação à indução de proliferação de LT alogenéicos em ensaios de reação linfocitária mista (MLR), observamos que, conforme dados apresentados na literatura (Repnik *et al*, 2008; Moore, *et al,* 2004), as mDCs foram as maiores indutoras de proliferação induzindo altos índices (índices de estimulação variaram de 4,5 – 28,8). Apesar de observamos diferenças claras entre os índices de proliferação de LT alogenéicas induzida pelas iDCs e pelas mDCs, somente

encontramos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos iDC IL-10 x mDC ($p<0,01$) (Figura 22). Vanclée e colaboradores, em um modelo experimental murino, observaram essas mesmas diferenças entre os índices de estimulação de LT induzidos pelas iDCs, mDCs e as iDCs tratadas com dexametasona (usadas como imaturas estáveis, ou seja, equivalentes às nossas iDCs IL-10), porém enxergaram diferença estatisticamente significativa entre os três grupos (Vanclée *et al*, 2006).

Um dos dados mais interessantes encontrados pelo nosso grupo foi a redução de indução de proliferação alogenéica pelas iDCs IL-10, já que somente em 1 de 5 experimentos houve proliferação de LT alogenéicas e com índices muito baixos 2,7, o que poderia justificar o potencial tolerogênico descrito na literatura para essas células (Moore *et al,* 2004). Resultados obtidos por Zhu e colaboradores (2003) corroboram os nossos dados de que as iDCs IL-10 estimulariam menos uma cultura linfocitária mista do que as próprias iDCs, através da redução de moléculas coestimuladoras na superfície das DCs (Zhu *et al*, 2003). Além disso, eles mostram que as iDCs IL-10 induziriam apoptose em linfócitos T (LT), inibindo a produção de IL-2 devido à supressão do NF-κB, conforme também descrito por Ballard e Prasad e colaboradores (Ballard, 2001; Prasad *et al,* 2002).

Além de avaliar a capacidade das diferentes DCs de induzir uma resposta alogenéica (MLR) como é feito usualmente, verificamos também se elas apresentaram comportamentos diferentes quanto à indução de auto-reatividade de LT, tanto com relação à proliferação quanto à produção de citocinas. Aqui, ao

contrário do que observamos para a resposta alogenéica, tanto as iDCs como as iDCs IL-10 induziram índices de estimulação superiores àqueles das mDCs nos ensaios de proliferação. Porém, as iDCs e as mDCs foram as que induziram uma maior freqüência de proliferação (4/5 experimentos), seguidas pelas iDCs IL-10 (3/5). A diferença maior se deu nas coculturas com iDCs IL-10, já que estas foram as responsáveis pelos maiores índices de proliferação em LT autólogos, chegando a induzir índices mais altos do que os induzidos pelas mDCs nas MLRs (de 6,6 a 36,6). Esse é um dado ainda não descrito na literatura, já que a auto-reatividade de LT dirigida às DCs é bem pouco estudada. Repnik e colaboradores (2008) também encontraram altos índices proliferativos para auto-reatividade, no entanto esses índices nunca chegaram a ser a metade dos obtidos na MLR (Repnik *et al*, 2008) ao contrário dos nossos dados. A contrastante diferença entre a maior indução de alorreatividade proliferativa pelas mDCs e a maior auto-reatividade pelas iDCs IL-10 nos leva a pensar que essa observação, *in vitro,* possa ter uma correspondência *in vivo*. Podemos especular que sendo as mDCs indutoras de resposta efetora pró-inflamatória (revisado por Caetano Reis e Sousa, 2006), no contexto alogenéico, elas induziriam intensa proliferação de LT, tal como é descrito no contexto do transplante. Por outro lado, as DCs imaturas agiriam como sentinelas do organismo, experimentando o ambiente através da sua alta capacidade fagocítica (Schuler & Steinman, 1985; Romani *et al*, 1989), principalmente auto-antígenos e induzindo principalmente respostas imunes reguladoras (Cools *et al*, 2007; revisado por Quah & O'Neill, 2005) e LT reguladores. De acordo com dados da literatura, as iDCs entrariam em contato a todo momento com antígenos próprios em um contexto de manutenção de

tolerância ao próprio, o que poderia corresponder à alta indução de auto-reatividade proliferativa de LT induzida pelas iDCs, que observamos *in vitro*. Esta observação poderia embasar os nossos dados que mostraram uma maior proliferação de LT autólogos induzida pelas iDCs, em especial pelas iDCs IL-10 que apresentaram os mais altos índices de estimulação de LT. Sugerimos por fim, que as iDCs IL-10 possam estar em um estado ainda mais imaturo do que as próprias iDCs, no chamado por alguns autores como "*steady-state"* (Belz *et al*, 2002), enquanto que as nossas iDCs poderiam corresponder às DCs descritas como semi-maduras por Menges e colaboradores (Menges *et al*, 2002). Apesar das iDCs IL-10 terem sido geradas *in vitro*, nós não descartamos a possibilidade da geração de fenótipo semelhante *in vivo*, em determinados microambientes ricos em IL-10. Deste modo é possível que DCs semelhantes às iDCs IL-10 também participem da manutenção da homeostase *in vivo*.

Ainda com relação à auto-reatividade, avaliamos as citocinas produzidas pelas diferentes coculturas de DCs com LTs autólogos e observamos que não houve produção de IL-12, IL-4 e IL-5 por nenhum tipo de cocultura (Tabela 22 e Figura 30). As coculturas com iDCs foram as únicas a produzir IL-2. As coculturas com iDCs IL-10 foram as únicas a produzir IL-10 e a não produzir IL-6, produzindo ainda TNF-α e TGF-β em altas concentrações. Por fim, as coculturas com mDCs produziram as mesmas citocinas que as coculturas com iDCs (mas não produzram IL-2), porém produziram em quantidades e freqüências similares. Novamente, chama a atenção a ausência de produção de IL-12 agora nas coculturas com mDCs, citocina descrita como presente em coculturas alogenéicas de LT. Vale

destacar que Langenkamp e colaboradores detectaram a indução dessas citocinas num período de 24 horas, ou seja, período menor do que foi avaliado por nós, 48 horas, de modo que tempo da análise poderia explicar a não detecção desta citocina em nosso trabalho (Langenkamp *et al,* 2000).

Com base nos nossos dados sugerimos que as iDCs geradas nesse trabalho possam estar em um estágio de maturação intermediário, DCs semi-maduras, visto que estas quando em cocultura com LT autólogos, apesar de terem induzido as mesmas citocinas que as mDCs e nas mesmas freqüências, não induziram os mesmo índices de estimulação que as mDCs, promovendo uma menor resposta proliferativa de LT nas MLR. Além disso, vale ressaltar que somente as coculturas com iDCs tiveram a produção de IL-2, o que poderia explicar os maiores índices de estimulação apresentados por essas coculturas no contexto de auto-reatividade em comparação as coculturas de mDCs que não produziram IL-2.

Com relação às coculturas com as mDCs, sugerimos que estas possam não estar induzindo nem uma resposta do tipo Th1 nem do tipo Th2, mas sim possivelmente a indução de uma resposta de perfil Th17. Para uma resposta de perfil Th2 esperaríamos detectar as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, conforme descrito na literatura (Rissoan *et al*, 1999; Diehl & Rincon, 2002). Para a indução de um perfil Th1, esperaríamos uma alta produção de IFN-γ e também produção de IL-2 (Rissoan *et al*, 1999; Diehl & Rincon, 2002), no entanto o que encontramos foi uma baixa produção de IFN-γ e em baixa freqüência (1/4 experimentos nas coculturas com mDCs) e nenhuma produção de IL-12. Finalmente, para a indução

de Th17 esperaríamos encontrar a produção de TGF-β e IL-6, conforme observamos em nossos resultados, sendo que inclusive, essas citocinas foram produzidas em altas concentrações e apresentaram as maiores freqüências de produção (2/3 experimentos). Apesar de não termos avaliado outros parâmetros importantes e também relacionados ao perfil Th17, como a produção de IL-17 e RORγt (Harrington *et al*, 2005; Korn *et al*, 2007), dados de alguns pesquisadores dialogam com esses nossos dados e corroborando nossos resultados. Dhodapkar e colaboradores (2008) mostraram que DCs humanas são indutoras eficientes de Th17 em coculturas com LT autólogos, especialmente as mDCs e que a fagocitose de células tumorais apoptóticas (mieloma) aumentaram ainda mais a indução de citocinas de perfil Th17 (Dhodapkar *et al*, 2008). Marta e colaboradores (2008) sugerem em seu trabalho que o direcionamento de LT ao perfil Th17 por mDCs se deva à indução de IL-6, IL-17 e IL-23 mediada por MyD88 em resposta à imunização com o peptídeo derivado de MOG, em modelo murino de EAE (Marta *et al*, 2008). Com relação à essa dupla capacidade das mDCs de direcionar tanto Th1 quanto Th17, Iwamoto e colaboradores (2007) mostraram que DCs humanas derivadas de monócitos maturadas com LPS, na presença de TNF-α exógeno, têm alta expressão de RNAm para IL-6, IL-5, IL-23 e estimulam LT naive a produzir IFN-γ e TNF-α (Th1) e os LT em repouso (do inglês, “resting”) a produzir IL-17 (Th17) (Iwamoto *et al*, 2007).

Quando avaliamos em conjunto os dados de produção de citocinas e proliferação na auto-reatividade de LT às diferentes DCs, podemos sugerir que as coculturas em com iDCs IL-10 parecem induzir uma resposta mais

imunorreguladora do tipo Th3 ou Tr1. Isto porque nas mesmas coculturas aonde tivemos produção de TGF-β tivemos proliferação celular em níveis intermediários (Th3) e nas coculturas que tivemos a produção de IL-10 não tivemos proliferação celular (Tr1) (Wakkach *et al*, 2001; Fu *et al*, 2008). No entanto, para alguns autores a indução desses fenótipos de LT, Th3 e Tr1, não parece estar restrita à iDCs, conforme parece acreditar a maior parte dos pesquisadores da área (Verhasselt *et al*, 2004; Lundqvist *et al*, 2005). Cools e colaboradores (2007) mostraram que mDCs humanas em cocultura com LT autólogos são capazes de produzir, simultaneamente, TGF-β e IL-10 e induzir Tregs, *in vitro* (Cools *et al*, 2008). Apesar desses dados não terem sido encontrados por nós, já que as nossas coculturas com mDCs, apesar de terem produzido TGF-β, não produziram IL-10. Esses trabalhos destacam a complexidade do sistema imune, nos mostrando, mais uma vez, que até mesmo o modelo clássico da maturação das DCs, incontestado durante tantos anos, pode não funcionar para diferentes contextos. Vale lembrar que as diferenças entre a produção de citocinas observadas por nós e a encontrada na literatura pode ser devido à diferença na cinética de produção destas, de modo que elas podem ter sido coletadas antes ou depois do seu pico de produção, dificultando a análise e a comparação, como discutido por outros autores (Nordskog *et al*, 2005).

Sabemos que muitos fatores afetam a polarização de resposta de LTs dirigidas às DCs, tanto no contexto autólogo como no contexto alogenéico. O tempo de interação de LT com as DCs (Lanzavecchia & Sallusto, 2002), a concentração de moléculas coestimuladoras, o estado de maturação das DCs

(Kalinski *et al*, 1999), a indução de citocinas como IL-12 (Kalinski *et al*, 1999; Vieira *et al*, 2000), bem como diferenças na concentração de antígenos parecem induzir respostas efetoras distintas por LT (Ruedl *et al*, 2000; Tanaka *et al*, 2000). Em observações realizadas por Ruedl e colaboradores e Tanaka e colaboradores (2000), foi apontado que altas concentrações de antígenos induziram resposta do tipo Th1, enquanto que baixas concentrações induziram respostas do tipo Th2. Levando em consideração essa observação, acreditamos que auto-antígenos sejam apresentados em concentrações menores e com uma freqüência maior ao sistema imune do que antígenos virais, por exemplo, o que poderia, mais uma vez, contribuir para a manutenção da homeostase através da indução da auto-reatividade de DCs à LT e da indução de LT do tipo Th2.

Nossa interpretação dos dados de auto-reatividade gerados, tanto em relação à produção de citocinas como para a proliferação é a de que a auto-reatividade induzida pelas DCs imaturas possa ser uma forma de controlar a resposta imune potencialmente patogênica e de manter a homeostase do organismo. Esta visão é compartilhada por outros pesquisadores como Sporri e Reis e Sousa que mostraram que DCs murinas, *in vitro*, ativadas por mediadores inflamatórios são capazes de regular positivamente a expressão de moléculas MHC e coestimuladoras e dirigir a expansão clonal de LT. Entretanto, tais iDCs são incapazes de direcionar a diferenciação das células T CD4+ para Th1 efetoras, *in vivo*. Em contraste, a exposição das DCs a componentes de patógenos resultou em mDCs que promoviam respostas do tipo Th1 (Sporri & Reis e Souza, 2005). Deste modo, parece consistente a visão que as mDCs parecem ter mesmo

um papel fundamental na indução da imunidade a antígenos exógenos, enquanto que as iDCs parecem ter papel fundamental na manutenção da resposta a antígenos próprios e, conseqüentemente, na manutenção da homeostase do organismo.

Com relação à parte inicial do nosso trabalho, podemos dizer em conclusão, que fomos bem sucedidos na obtenção dos três tipos de DCs geradas, na indução da estabilidade fenotípica das iDCs tratadas com IL-10, bem com na caracterização adequada e de acordo com a literatura, segundo critérios morfológicos e funcionais, de todas as DCs. Ademais, acrescentamos um novo parâmetro de avaliação funcional das DCs, identificando um perfil diferencial na indução de alo e auto-reatividade de LT, em função dos diferentes estados de maturação das DCs.

Após a caracterização das DCs geradas por nós, entramos realmente no nosso objetivo central nesta tese que foi avaliar a interação das diferentes DCs com fragmentos da proteína de choque térmico 60kDa (Hsp60) para a indução de uma resposta imune reguladora, *in vitro,* e indução de tolerância ao aloenxerto de pele em camundongos Balb/c, *in vivo*. Vale ressaltar que os resultados sobre a interação de fragmentos da Hsp60 e DCs são inéditos na literatura, sendo que os poucos dados de que dispomos para comparação foram obtidos com DCs humanas por um aluno de doutorado de nosso grupo e esses dados ainda na foram publicados em função de solicitação de patente.

Antes de dar início aos nossos experimentos, tomamos um especial cuidado com a produção da Hsp60 e das regiões C-Hsp60 e I-Hsp60 quanto à presença de

LPS (lipopolissacarídeo de membrana de bactérias gram-negativas) já que essas proteínas foram produzidas em *Escherichia coli*. Para a remoção desta endotoxina (LPS), utilizamos um protocolo baseado na utilização do detergente não desnaturante Triton X114, amplamente estabelecido na literatura (Aida & Pabst, 1990) e que não altera nem a estrutura nem a atividade funcional das proteínas (Detanico *et al*, 2004). As proteínas produzidas tiveram, então, seus níveis de endotoxina dosados e foram consideradas liberadas para experimentos quando apresentavam níveis <10UE/mg (Bausinger *et al*, 2002). O lote da proteína Hsp60 produzida para este teste teve uma contaminação muito alta com LPS e, apesar do tratamento com Triton não pode ser utilizada em nossos experimentos por apresentaram cerca de 100UE/ml.

Nossa preocupação com a contaminação com LPS se deve ao fato de que em diversos trabalhos foi mostrado que a sua presença poderia induzir a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (Wallin *et al*, 2002) e aumentar a ativação de LT (Osterloh *et al*, 2004). Além disso, Flohé e colaboradores (2003) mostraram que a Hsp60 poderia induzir maturação de DCs. Essa mesma observação foi feita para a Hsp70, porém Bausinger e colaboradores (2002) notaram que isso só acontecia quando a concentração de LPS na proteína era superior a 10UE/mg, sugerindo assim, que era a interação com o LPS que induzia a maturação e não a proteína Hsp60 em si. Sendo assim, a maturação das DCs induzida por Hsp60 ainda é uma questão em aberto, pois em vários experimentos poderia ser atribuída, em parte, ao LPS residual presente na Hsp60 utilizada pelos pesquisadores, que foi sabidamente produzida em bactérias. (Gao

& Tsan, 2003a e 2003b). Por outro lado, há diversos trabalhos na literatura que apontam para uma atividade imunorreguladora da Hsp60 e de seus peptídeos (Van Eden *et al*, 2005; Van Eden *et al,* 1998), contrariando os resultados dos pesquisadores do grupo da Flohe (Flohe *et al*, 2003). No entanto, precisamos relatar que em estudos recentes desenvolvidos por Ausiello e colaboradores, foi mostrado que a Hsp60 de *Chlamydia pneumoniae* e não a Hsp10 (contaminação com endotoxina < 0,2UE/mg de proteína) foi capaz de induzir maturação de DCs humanas diferenciadas a partir de monócitos, um pouco inferior à alcançada pelo LPS. No entanto, essas mDCs foram capazes de produzir altos níveis de IL-12 em resposta à Hsp60, direcionando a resposta de LT para um perfil Th1 (Ausiello *et al,* 2005). Apesar de este campo ser ainda bastante controverso, todos os dados descritos acima reforçam ainda mais a importância da nossa preocupação com a eliminação destes contaminantes bacterianos. Destacamos também a relevância dos dados obtidos com peptídeos da Hsp60 que são livres contaminações com endotoxinas.

A primeira questão que analisamos foi se a presença de determinados fragmentos da Hsp60 (p277, N7 e C-Hsp60) poderiam alterar a expressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 e CD40) e de MHC I e II nas diferentes DCs, visto que a expressão dessas moléculas nas DCs está relacionada à capacidade dessas células de apresentar antígenos e direcionar resposta a LT, tanto tolerogênica (baixa expressão) como imunogênica (alta expressão). Como ponto de corte, consideramos aumentos ≥ 40% na MFI (mediana de intensidade de fluorescência) e como inibição, reduções ≥ 40%, valores estes escolhidos por

nós durante a análise dos resultados. Vale ainda ressaltar que a expressão das moléculas avaliadas, não foi homogênea e apresentou grandes variações entre os experimentos. Por isso, escolhemos avaliar a expressão dessas moléculas tanto de maneira geral como individual, ou seja, por experimento. Essa grande variabilidade pode ser decorrente das diferenças individuais (diferentes histórias imunológicas) dos camundongos, pois, apesar dos animais serem isogênicos, cada animal desenvolve suas experiências imunológicas baseadas em padrões individuais de respostas frente a diferentes estímulos, condições patológicas e fisiológicas, como proposto por alguns pesquisadores (Cohen & Young, 1991; Cohen *et al*, 2004). Outra possibilidade a ser considerada é a de que os fragmentos da Hsp60 utilizados não induziriam uma modificação dominante da expressão das moléculas estudadas.

De forma geral, quando avaliamos as medianas das MFI dos três tipos de DCs com os fragmentos da Hsp60 estudados (p277, N7 e C-Hsp60), observamos um número muito baixo de modificações, seja de aumento ou de inibição, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabelas 15, 16 e 17). No entanto, encontramos vários resultados de inibição > 40%. Vale ressaltar que quando passamos a analisar os resultados de forma individual as modificações foram muito maiores e claras.

Observamos que o peptídeo N7 foi o responsável pelo maior número de inibições da MFI das moléculas coestimuladoras e de MHC I e II (23 inibições em 112 condições = 21%) e também o responsável pelo menor número de aumentos na sua expressão (8/112 = 7%) (Tabelas 11 e 14 e na Figura 26). O peptídeo N7

induziu também um aumento na expressão de MHC II pelas iDCs que passaram a apresentar valores similares aos obtidos pelas mDCs (1 de 8 experimentos). No entanto, vale lembrar que não houve diferença estatística na expressão desta molécula entre as iDC e mDCs sem a presença dos fragmentos da Hsp60. Além disso, o N7 inibiu CD86 nas mDCs chegando a expressar níveis similares aos apresentados pelas iDCs em 1 de 6 experimentos, situação esta que chamamos de modificações do tipo mDC $\Rightarrow$ iDC. Com relação ao peptídeo p277 observamos que este foi o fragmento da Hsp60 que induziu o menor número de modificações na MFI das moléculas testadas; aumentos (14%) e inibições (10%). No entanto, este peptídeo induziu mais modificações do tipo iDC $\Leftrightarrow$ mDC: 4 modificações mDCs $\Rightarrow$ iDCs para CD40 e MHC II e 2 modificações do tipo iDCs $\Rightarrow$ mDCs para MHC II e MHC I (Tabelas 12 e 14 e Figura 27). Por fim, a proteína C-Hsp60 foi o fragmento da Hsp60 que mais induziu modificações na MFI das diferentes DCs, sendo 30 inibições em 168 condições testadas (18%) e 40 aumentos em 168 condições testadas (24%). O número de modificações do tipo aumento foi importante visto que chegou a ser 3x maior do que as induzidas pelo peptídeo N7 e quase o dobro do número das induzidas pelo peptídeo p277, presente a proteína C-Hsp60. Com relação às modificações do tipo iDC $\Leftrightarrow$ mDC: 14 em 70 modificações foram do tipo iDCs $\Rightarrow$ mDCs (CD86, CD40, MHCII e I) e 8/70 do tipo mDCs $\Rightarrow$ iDCs (Tabelas 13 e 14 e Figura 28).

Deste modo, podemos concluir que os três fragmentos testados possuem potencial imunorregulador, pois têm a capacidade de inibir a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC nas DCs. No entanto, destacamos o peptídeo

N7 como o mais potencialmente tolerogênico por induzir o maior número de inibições, enquanto que a C-Hsp60 parece ser o que mais modificou a expressão destas moléculas, seja aumentando, seja inibindo. A diferença na ação observada entre o peptídeo N7 (região N-terminal da Hsp60) e a proteína C-Hsp60 vem corroborar a hipótese proposta por Moudgil e investigada pelo nosso grupo, de que diferentes regiões da Hsp60 exerceriam diferentes atividades funcionais, podendo induzir tolerância ou imunogenicidade (Moudgil *et al*, 1997). Apesar dos resultados de Moudgil e colaboradores bem como o de Cohen e colaboradores, apontarem a região carboxi-terminal como a mais imunorreguladora (Moudgil *et al*, 1997; Cohen, 2002), nossos dados mostram a região N-terminal como a mais possivelmente tolerogênicas. No entanto, observamos que quando os peptídeos da região C-terminal foram utilizados separadamente (p277, por exemplo) também exerceram efeitos imunorreguladores de modo que, em conformidade com a literatura atual, sugere-se que a atividade reguladora não esteja em somente uma região específica da Hsp60, mas sim em fragmentos específicos das diferentes regiões, como ocorre com o p277 e o N7. É pouco possível que o efeito da C-Hsp60 ser devido às contaminações com LPS pois, conforme discutido anteriormente, trabalhamos somente com proteínas que apresentaram contaminação com endotoxina inferior a 10UE/mg.

O efeito dos fragmentos da Hsp60 na expressão de moléculas coestimuladoras é um dado novo, ainda não relatado na literatura. Após uma vasta busca na literatura, encontramos um único trabalho que tratou as DCs com a proteína Hsp60 inteira à DCs. Nesse trabalho, Yang e colaboradores (2006) compararam iDCs tratadas com Hsp60 e rapamicina, com outras tratadas só com

rapamicina ou com rapamicina e OVA, e viram que somente iDCs+rapamicina+Hsp60 tiveram redução na expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), induziram Treg específicas para Hsp60 e tiveram ação imunorreguladora, *in vitro,* e previniram a formação de placas de aterosclerose, *in vivo* (Yang *et al*, 2006). Além disso, encontramos um trabalho com a proteína Hsp90 no qual são relatados resultados interessantes. Bae e colaboradores (2007) mostraram que a inibição da expressão de Hsp90 e não a resposta a ela, conforme observamos em nossos resultados e nos de Yang, diminuiu significativamente a expressão das moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) CD83 e MHC (HLA A,B,C e HLA-DP, DQ, DR) em iDCs e mDCs humanas. Esta redução da expressão das moléculas coestimuladoras ocorreu pela redução da expressão de mRNA destas e também pela redução das próprias proteínas dentro do citoplasma. Além disso, reduziu a captura, o processamento e a apresentação de antígenos pelas iDCs inibindo, assim, a proliferação de LT induzida pelo antígeno de toxóide tetânico. Ademais, também foi observada diminuição da a produção de IL-12 e IFN-γ em resposta pelas coculturas com mDCs e LT alogenéicos (Bae *et al*, 2007). Mais uma vez, esses dados nos indicam que as HSPs são capazes de induzir tanto respostas imunes inflamatórias como anti-inflamatórias, dependendo do microambiente e do contexto fisiológico ou patológico, sendo, importantes moduladoras da resposta imune. Entretanto, nosso grupo, em trabalhos futuros, pretendemos avaliar se as modificações na expressão das moléculas coestimuladoras, produzidas pelos fragmentos da Hsp60, alteraram funcionalmente as diferentes DCs ou ainda, ou

se modificam a estabilidade funcional do fenótipo imaturo das iDCs IL-10, no que diz respeito à indução de proliferação e produção de citocinas.

Não investigamos possíveis mecanismos de ação dos peptídeos da Hsp60 sobre a expressão de moléculas coestimuladoras nas DCs. Sugerimos alguns dos diversos mecanismos descritos na literatura,em outros contextos, que poderiam explicar esse efeito dos fragmentos da Hsp60 na expressão das moléculas coestimuladoras e de MHC, como: (i) endocitose de fragmentos da Hsp60 poderia alterar a expressão de fatores em nível molecular, bloqueando algumas vias de transcrição que resultem na redução do número dessas moléculas na superfície em nível de mRNA (Bae *et al*, 2007) e dentro do citoplasma, ou ainda aumentando o tempo de reciclagem desses receptores; (ii) ligação dos peptídeos a receptores do tipo TLR 2 e 4 (Nussbaum *et al*, 2006), poderiam alterar a quantidade ou os tipos de receptores expressos na superfície das DCs, direcionando uma resposta mais tolerogênica e inibindo a migração das células para sítios de inflamação; (iii) ligação de fragmentos das HSPs a receptores scavenger tipo LOX-1 ou SREC-1 (Delneste *et al*, 2002; Calderwood *et al*, 2007); (iv) induzir aumento da expressão de receptores PDL-1 em comparação à diminuição de CD86, inibindo a ativação de LT e possivelmente induzindo Tregs (Tokita *et al*, 2008); (v) ligação dos peptídeos a receptores ICOSL (via independente de NF-κB) poderia regular a diferenciação dos LT auxiliares, tanto para Th1 como para Th2 (Greenwald *et al*, 2005).

Também trabalhamos com as proteínas C-Hsp60 e da I-Hsp60 que, possivelmente, ajem de maneira diversa dos peptídeos, visto que, sua entrada

nas DCs deve seguir o caminho clássico, via receptores endocíticos tipo DEC205 ou via TLR, sendo apresentadas, posteriormente, na forma de peptídeos aos LT via MHCII e I. No entanto, neste trabalho não estudamos as vias de processamento e apresentação nem das proteínas das diferentes regiões em dos fragmentos da Hsp60. Porém, sabemos que tanto os receptores endocíticos do tipo DEC205 (Hawiger *et al*, 2001) e como os receptores como os do tipo TLR podem induzir respostas tolerogênicas e imunogênicas. Nussbaum e colaboradores observaram que a ligação do peptídeo p277 a TLR2 diminuiu a migração de macrófagos aos sítios inflamatórios (Nussbaum *et al*, 2006). Nesse sentido, vale mencionar que também foi descrito que peptídeos derivados de moléculas Hsp60 autólogas estavam presentes na composição de peptídeos que foram eluídos de moléculas MHC humanas e murinas, em condições fisiológicas (Michaelsson *et al*, 2002). Esse dado nos permite dizer que a Hsp60 é processada e seus peptídeos são apresentados por moléculas de MHC. Assim é possível imaginar que esses peptídeos sejam apresentados por iDCs, num contexto regulador, de forma que mesmo sendo apresentados e reconhecidos por LT, não gerariam uma resposta imune inflamatória. Pelo contrário, a geração de resposta neste contexto imunorregulador poderia inclusive contribuir para a manutenção da homeostase, conforme a teoria do homúnculo imunológico, postulada por Irun Cohen (Cohen & Young, 1991; Cohen 1992; Cohen, 2000a e b).

Em um segundo momento, fomos verificar os efeitos dos fragmentos da Hsp60 diretamente sobre a produção de citocinas pelas diferentes DCs.

Observamos que os fragmentos da Hsp60 testados foram capazes tanto de induzir/aumentar quanto de inibir a produção de citocinas, produção esta que foi muito heterogênea, não apresentando um perfil específico para qualquer uma das DCs estudadas (Quadro 1 e Tabelas 18 a 20). De forma geral, observamos que as citocinas produzidas pelas DCs tratadas com fragmentos da Hsp60 foram praticamente as mesmas que foram produzidas espontaneamente (TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-6), porém identificamos a produção de IL-12 nas três DCs e de TGF-β nas iDCs e mDCs. O peptídeo I2, apesar de com baixa freqüência, foi responsável pela indução de IL-12 nas iDCs e inclusive nas iDCs IL-10, sugerindo uma função pró-inflamatória deste peptídeo. Já com relação à indução de TGF-β, esta se deu por três fragmentos, o N3, N7 e a C-Hsp60, tanto nas iDCs como nas mDCs. Chamamos a atenção à observação de que as iDCs IL-10 foram as DCs que produziram menores quantidades, e com uma menor freqüência citocinas inflamatórias, mais uma vez sugerindo terem o potencial de ser uma ferramenta importante para a indução de tolerância.

Com relação aos 18 fragmentos da Hsp60 testados, nenhum se destacou mostrando-se responsável por somente induzir modulação de citocinas ou de inibir a produção espontânea de citocinas, inflamatórias (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-12) ou anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e TGF-β), em nenhum dos três tipos de DCs. A capacidade de diversos fragmentos da Hsp60 (p277, C3, C9, N3, N7, N10 e C-Hsp60) de inibir a produção espontânea de TNFα e IL-6, em todas as condições em que essas citocinas foram produzidas espontaneamente, sugere um papel imunorregulador para a Hsp60, na interação com as DCs, quando em um contexto

potencialmente inflamatório. O peptídeo que mais inibiu a produção de citocinas foi o N7 seguido pelo p277 e pela C-Hsp60. Com relação à inibição, notamos que o peptídeo p277 foi o maior inibidor de citocinas, especialmente inflamatórias, para as iDCs (Tabelas 18 a 20). Nas coculturas autólogas com iDCs IL-10, nenhum dos 18 fragmentos da Hsp60 induziu auto-reatividade proliferativa à Hsp60 e a única citocina induzida foi a IL-10 (p277 e C-Hsp60), destacando que nenhuma citocina inflamatória foi induzida nessas coculturas

Na literatura, não encontramos qualquer trabalho no qual tenha sido avaliado o efeito da Hsp60 ou de seus fragmentos sobre a produção de citocinas pelas DCs. No entanto, na tese de doutorado de um aluno de nosso grupo com DCs humanas, os resultados encontrados foram um pouco diferentes. Também não houve um padrão definido de produção de citocinas pelas diferentes DCs e nem mesmo um determinado fragmento mostrou-se especificamente indutor ou inibidor. No entanto, houve a produção de IL-4 e IL-10 induzida nos três tipos de DCs, com freqüências muito semelhantes, e o peptídeo N7 apareceu como inibidor da produção de IFN-γ nas três DCs (Silva, Adalberto S, tese FMUSP 2007). Sabemos as DCs formam uma população celular muito heterogênea, mesmo quando cultivadas, *in vitro,* sob as mesmas condições. Deste modo, a produção de citocinas induzida por essa por essas células pode ser tão heterogênea.

Conforme mencionado anteriormente, o nosso objetivo central nesse trabalho foi identificar condições potencialmente imunorreguladoras na interação dos fragmentos da Hsp60 com as DCs para a indução uma resposta imunorreguladora *in vitro* e de tolerância no contexto de transplante, em

camundongos. Para tal, avaliamos primeiramente o efeito da Hsp60 nas coculturas das diferentes DCs com LT autólogos, avaliando os efeitos na produção de citocinas e na proliferação celular.

No que diz respeito ao efeito dos fragmentos na auto-reatividade proliferativa de LT dirigida às diferentes DCs, observamos uma grande freqüência de inibição de proliferação. As coculturas autólogas com iDCs foram as mais inibidas por algum fragmento da Hsp60 em 3 de 4 experimentos e as com iDCs IL-10 foram as menos inibidas, apenas 1 de 3 experimentos. A porcentagem de inibição nesses experimentos variou de 52% (iDC com N7) a 100% (N3, N4, N7, N10 e I-Hsp60). O fragmento da Hsp60 mais inibidor foi o peptídeo N7, inibindo em 5 de 5 condições nas coculturas com as três diferentes DCs. Já com relação à inibição da produção de citocinas, observamos que os peptídeos p277 e N7 foram novamente os mais inibidores, inibindo 10 de 16 e 9 de 16 experimentos, respectivamente, sendo que o N7 foi o que mais inibiu citocinas inflamatórias.

Avaliamos também a indução de auto-reatividade aos diferentes fragmentos da Hsp60 no contexto de diferentes DCs. Para tal, observamos tanto a indução de proliferação como de citocinas. As coculturas com iDCs tiveram mais auto-reatividade proliferativa induzida pelos fragmentos da Hsp60 (2 de 5 experimentos) do que as mDCs (1 de 5 experimentos) e a C-Hsp60 foi a principal indutora de auto-reatividade (Tabelas 23 a 25 e Figuras 31 a 35). Observamos ainda que as coculturas com iDCs e mDCs com os fragmentos da Hsp60 produziram praticamente as mesmas citocinas. Já nas coculturas com iDCs IL-10, a única citocina induzida foi a IL-10 e pelo p277 e pela C-Hsp60 (Quadro 3, Tabelas 26 a 39, Figura 36). Os peptídeos p277 e N7 inibiram mais vezes

citocinas inflamatórias (nas iDCs e mDCs) e também foram os maiores indutores de citocinas anti-inflamatórias. Por fim, a proteína C-Hsp60 apresentou um perfil mais pró-inflamatório, induzindo auto-reatividade proliferativa à Hsp60 e citocinas inflamatórias (Quadro 4).

A importância desses experimentos e desses achados é justificada pela crescente discussão na literatura sobre o papel da auto-reatividade na imunorregulação e na manutenção da homeostase do organismo, não apenas com base na teoria do homúnculo imunológico, proposta por Irun Cohen (Cohen, 1992; Cohen, 2007), mas também com base nos achados mais recentes de que determinados tipos de células Treg são auto-reativas (De Kleer *et al*, 2006; Fisson *et al,* 2003). Deste modo, com base em nossos resultados podemos dizer que os fragmentos da Hsp60 testados são capazes de inibir proliferação autóloga de LT dirigida às DCs bem com de inibir citocinas inflamatórias. Esses dados nos parecem relevantes, principalmente quando analisados no contexto de doenças auto-imunes. Isso porque, ao contrário do que observamos nessa tese, alguns autores relatam que a auto-reatividade à proteína Hsp60 e/ou à proteína Hsp65 de origem bacteriana estariam envolvidas na indução de doença ou ainda, no aumento da mortalidade em doenças auto-imunes como no Lúpus eritematoso sistêmico (SLE). Marengo e colaboradores (2008) mostraram que a auto-reatividade à Hsp65 e *M. leprae,* pela injeção de Hsp65 recombinante, aumentou a mortalidade de camundongos com SLE em 46% (Marengo *et al*, 2008). Além disso, nesse trabalho os autores observaram um aumento dos títulos de anticorpos contra a Hsp65, tanto em camundongos com a doença como em camundongos saudáveis, e que nesses últimos, esses altos títulos parecem

predispor indivíduos saudáveis a desenvolver SLE (Marengo *et al*, 2008). No entanto, vale ressaltar que a Hsp65 bacteriana é exógena e não autóloga como a Hsp60 e há trabalhos na literatura que mostraram que as HSPs derivadas de microorganismos e as autólogas podem ter efeitos distintos na resposta imune. É bem aceito na comunidade científica que pressões do ambiente ao longo da vida do indivíduo podem gerar alvos moleculares que favorecem o desenvolvimento da auto-reatividade patológica em certos indivíduos. No entanto, a todo momento, indivíduos saudáveis desenvolvem respostas auto-imunes a diferentes moléculas endógenas do organismo, como a Hsp60 e, entretanto, não necessariamente um processo patológico se inicia. De acordo com a teoria do homúnculo imunológico, proposta por Cohen, essas respostas são importantes para a manutenção da homeostase do organismo, promovendo um equilíbrio entre a proteção do próprio e a resposta imune contra as infecções (Cohen, 1992; Cohen, 2007). Assim, nossas observações de que fragmentos da Hsp60 (p277, N7 e certas regiões da Hsp60), ao invés de induzir uma resposta imune inflamatória podem induzir imunorregulação, inibindo a proliferação de LT e a produção de citocinas inflamatórias pelas coculturas com DCs tratadas com esses fragmentos, dá apoio a esta hipótese. Como nós, pesquisadores como Cohen e Moudgil trabalham com essa perspectiva, visando a regulação de respostas imunes inflamatórias e potencialmente patológicas utilizando peptídeos da Hsp60 para a prevenção de doenças auto-imunes como a diabetes (Quintana *et al,* 2000) e a artrite em modelo murino (Moudgil & Durai, 2008) e também com ensaios clínicos em humanos (Raz *et al*, 2001; Huurman *et al*, 2008).

Outro ponto importante que buscamos avaliar neste trabalho foi verificar se os fragmentos da Hsp60 exerciam esses mesmos efeitos reguladores também na resposta policlonal induzida pelo αCD3, nas coculturas de LT com as diferentes DCs. Observamos que, na maioria das vezes, nenhum fragmento provocou qualquer modificação na resposta proliferativa, que mostrou altos índices de estimulação com as diferentes DCs. No entanto, observamos inibição da proliferação em 3 de 13 condições nas coculturas de iDCs e em 4 de 13 nas coculturas com iDCs IL-10, pelos fragmentos C-Hsp60, N3 e N7 (Figuras 39 a 41 , Tabelas 42 a 44 e Quadro 5). Em contraste, o efeito inibidor foi mais marcante em relação à produção de citocinas induzidas pelo estímulo do anticorpo αCD3. Observamos que a proteína C-Hsp60 foi a que apresentou a maior capacidade inibidora, inibindo com freqüência, citocinas inflamatórias em 84,61% das inibições. Os peptídeos p277 e N7 se comportaram de forma muito parecida quanto à inibição de citocinas inflamatórias e o aumento ou indução das anti-inflamatórias, sendo responsáveis pelos maiores aumentos da produção das citocinas anti-inflamatórias avaliadas (67% e 60% dos aumentos).

Esses dados de inibição da proliferação induzida por αCD3 pelos fragmentos da Hsp60 são dados muito interessantes já que o efeito proliferativo do αCD3 em LT é muito potente e difícil de ser inibido. No entanto, devemos destacar que não observamos uma relação entre esses efeitos de inibição, de proliferação e a detecção de citocinas imunorreguladoras. Ou seja, a inibição da proliferação não necessariamente ocorreu no mesmo experimento em que detectamos a presença das citocinas IL-10 e/ou TGF-β. Esta observação nos

sugere que os mecanismos envolvidos na inibição a proliferação de LT nas coculturas com as diferentes DCs, em resposta ao αCD3, sejam diferentes daqueles presentes na inibição da produção de citocinas nessas coculturas. Além disso, a capacidade supressora desses fragmentos da Hsp60 frente a um estímulo policlonal tão potente nos sugere que a Hsp60 possa exercer um efeito supressor também sobre a ativação policlonal inespecífica de LT como ocorre em contextos inflamatórios.

Neste trabalho, não avaliamos os possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos tanto na inibição da proliferação quanto na inibição das citocinas, mas podemos sugerir alguns. Acreditamos que devido aos fragmentos da Hsp60 terem induzido ou aumentado a produção de citocinas como IL-10 e TGF-β nas coculturas (DCs+LT) estimuladas pelo anticorpo αCD3, que esses LT possam ser LT do tipo Treg (Tr1, Th3 ou ainda CD4+CD25+), visto que além da produção dessas citocinas também houve inibição da proliferação de LT. Venken e colaboradores (2007), utilizando peptídeos envolvidos no desenvolvimento de EAE obtiveram resultados semelhantes aos nossos e que apóiam a nossa sugestão de mecanismo para os nossos dados. Esses autores observaram que Tregs CD4+CD25+ específicas para auto-antígenos como MOG (do inglês "*myelin oligodendrocyte glycoprotein*"), MBP (proteína básica da mielina), foram capazes de inibir a proliferação de LT CD4+ em resposta ao αCD3, em análise com CSFE (do inglês "Carboxyfluorescein Succinimiddyl Ester") (Venken *et al,* 2007). Outra possibilidade de ação para os fragmentos da Hsp60 seria o bloqueio físico da ligação do αCD3 à molécula CD3 nos linfócitos presentes nas coculturas, ou por

ligação direta ao TCR (dificultando a sinalização intracelular e indução de proliferação), ao MHC das DCs apresentando tais peptídeos, ou ainda pela ligação dos fragmentos da Hsp60 em outros receptores, que poderiam encobrir sítios de ligação por modificações na conformação tridimensional dos receptores. Vislumbramos ainda outra possibilidade que seria a interação dos peptídeos da Hsp60 que foram endocitados pelas DCs e estão presentes no citoplasma destas, com outras moléculas e poderiam inibir fatores de transcrição como NFκB ou ainda ativar GATA 3 e demais fatores de transcrição relacionados ao perfil Th2, Th3 e Tr1. Por fim, os fragmentos da Hsp60 poderiam estar agindo do mesmo modo como agem imunossupressores conhecidos da literatura como a rapamicina, o PTX e o Leflunomide. Richard & Hoskin (1998) mostraram que o uso desses três imunossupressores inibiram a resposta proliferativa de LT de baço de camundongos frente ao αCD3, *in vitro*, e que isto se dava através da inibição da produção de IL-2 e a expressão de CD25 (Richard and Hoskin, 1998). Esses dados são semelhantes aos encontrados por nós já que também observamos inibição da proliferação em resposta ao αCD3 nas coculturas com as iDCs e também não observamos produção da citocina IL-2 nessas coculturas.

Uma questão ainda em discussão sobre os efeitos da Hsp60 e seus peptídeos é se diferentes regiões da proteína teriam importância na atividade funcional de DCs e LTs. Em trabalhos apresentados na literatura por Moudgil e colaboradores, foi mostrado que a resposta proliferativa dirigida à região N-terminal da Hsp60\65 estava associada com respostas inflamatórias em modelos de artrite experimental em ratos (Moudgil *et al*, 1997), dados que se opõem aos

encontrados nesse trabalho. Ao contrário do grupo de Moudgil, Quintana e colaboradores mostraram vacinas de DNAHsp60, utilizando a seqüência gênica da região N-terminal da Hsp60, inibiu o desenvolvimento da artrite induzida por adjuvante, em ratos (Quintana *et al*, 2002). Dados produzidos em nosso laboratório vão ao encontro dos nossos achados bem como dos resultados encontrados por Quintana e colaboradores. Em nosso grupo, Caldas e colaboradores, estudando a resposta *in vitro* de PBMC de indivíduos saudáveis e transplantados renais mapearam o peptídeo N3 (região N-terminal da Hsp60) como um antígeno potencialmente imunorregulador, pois foi capaz de induzir uma alta freqüência de células produtoras de IL-10, por ELISPOT e alta expressão de Foxp3 (manuscrito em preparação, Caldas *et al*, 2008). Em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo, Luna e colaboradores mostram a capacidade inibidora dos peptídeos da região N-terminal em concordância com os dados observados por nós nesse trabalho. Em modelo experimental murino, Luna e colaboradores observaram que praticamente nenhum fragmento da Hsp60 foi capaz de induzir proliferação de LT em células de camundongos C3H/HePas e Balb/c, sendo esta última a mesma linhagem usada em todos os nossos experimentos (Luna *et al*, 2007b). Além disso, em outro trabalho de nosso grupo, foi sugerido um papel importante na indução de auto-anticorpos pelo peptídeo N7, mostrado pela presença principalmente de anticorpos do tipo IgM, dirigidos para esse peptídeo, no soro de indivíduos saudáveis (Hui Tzu Lin, dissertação de mestrado em andamento). Dados recentes foram gerados em nosso laboratório, com DCs humanas diferenciadas a partir de monócitos e tratadas com fragmentos da Hsp60. Identificamos o peptídeo N7 como um antígeno potencialmente

imunorregulador, uma vez que mostrou um predomínio de modificações de mRNA para citocinas e fatores de transcrição do tipo reguladora com expressão em LT, em 100% das vezes em que foi testado (manuscrito pronto para submissão, aguardando solicitação de patente, Socorro-Silva *et al*, 2008). Neste trabalho, utilizando-se a técnica de Real time PCR, foi mostrado que a interação de peptídeos da Hsp60 com as DCs imaturas tratadas com fragmentos da região N-terminal (N3 e em especial o N7), induziram a expressão de GATA3, IL-10, TGF-β e Foxp3, importantes fatores de transcrição e citocinas para o direcionamento de uma resposta Th2. Assim, sugere-se que esses fragmentos tenham o potencial de direcionar a resposta imune para um perfil mais regulador. Algumas dessas observações também foram feitas no presente trabalho. O aumento da expressão do nível de mRNA das citocinas TGF-β e IL-10 induzido pela Hsp60 humana já foi relatado em um modelo de uveíte, no qual o antígeno responsável pela indução da expressão de mRNA dessas citocinas foi o peptídeo p336-351, derivado da proteína I-Hsp60 (Phipps *et al*, 2003). Deste modo, todos esses dados corroboram os dados encontrados por nós de que o peptídeo N7 parece ser um antígeno imunodominante e alvo da resposta imune celular e humoral, em indivíduos saudáveis sendo, portanto, um forte candidato a estudos utilizando-o como regulador da resposta imune.

Com relação à região C-terminal da Hsp60, em outro estudo recente desenvolvido em nosso laboratório, foi mostrado que esplenócitos de camundongos BALB/c, não sensibilizados, também apresentaram resposta proliferativa a antígenos da região carboxiterminal, especialmente ao peptídeo C3

(Luna *et al*, 2007). Vale ressaltar, que tanto em nosso trabalho como no trabalho realizado com DCs humanas, o reconhecimento do peptídeo C3 não foi importante já que não induziu qualquer perfil específico nos diferentes experimentos e entre os tipos distintos de DCs. No entanto, em nosso trabalho, a proteína C-Hsp60 inteira foi altamente reconhecida, e conforme dito anteriormente mostrou-se extremamente imunomoduladora e bipolar, ora induzindo uma resposta de perfil imunogênico ora uma resposta de perfil imunorregulador. Em concordância com os nossos dados, Durai e colaboradores (Durai *et al,* 2004) relataram que o tratamento de animais com peptídeos da proteína C-Hsp60 foi capaz de inibir o desenvolvimento da artrite em modelo murino. Adicionalmente, o p277 é um peptídeo descrito como anti-inflamatório, indutor de IL-4 e IL-10 e inibidor de diabetes auto-imune em modelos animais (Elias *et al*, 1997). Em nosso trabalho, bem como em outro trabalho desenvolvido em nosso grupo com DCs humanas, o p277 também se mostrou um peptídeo capaz de induzir, *in vitro*, respostas imunorreguladoras. Em outro trabalho do nosso grupo, observamos que injeções intra-nasais com o peptídeo p277 em microesferas lipídicas aumentaram a sobrevida dos transplantes de pele com disparidades de antígenos secundários, em camundongos (Luna *et al*, 2007). Além disso, devemos ressaltar que esse peptídeo tem sido usado em ensaios clínicos de fase II e III e parece ter efeito na preservação da produção de insulina, sem trazer efeitos adversos em pacientes diabéticos dependentes de insulina (Raz *et al*, 2001; Huurman *et al*, 2007; Huurman *et al*, 2008; www.clinicaltrials.gov : (i) ensaio clínico fase III: NCT00644501, (ii) ensaio clínico fase III: NCT00615264).

Com base nos nossos diversos resultados bem como nos da literatura, apontamos a capacidade de fragmentos da Hsp60 de induzir tanto uma atividade potencialmente imunorreguladora quanto inflamatória. Em um trabalho recente, a principal investigadora do nosso grupo e seus colaboradores, discutiram os efeitos imunorreguladores e inflamatórios das HSPs em diversos contextos de doença: no câncer, na artrite, no transplante, na tuberculose e na ateroesclerose (Coelho *et al*, 2008). As bases moleculares que apóiam essa diversidade da indução de resposta imune começaram a ser elucidadas. Sabe-se, por exemplo, que a Hsp60 e seus peptídeos podem ligar-se diretamente em TLR, tanto em DCs (Zanin-Zorov *et al*, 2005; Nussbaum *et al*, 2006) quanto em Tregs (Zanin-Zorov *et al,* 2006). Foi mostrado pelo grupo do Irun Cohen que, em Tregs, a ligação da Hsp60 ao receptor TLR2 induziu a expressão de GATA3 e IL-10, diminuindo a produção de IFN-γ e T-bet, sugerindo assim, um direcionamento de resposta Th2 (Zanin-Zorov *et al,* 2005).

Em vista dos dados apresentados aqui e dos dados existentes na literatura, em nosso laboratório estamos atualmente fazendo experimentos com um painel de genes envolvidos nas atividades funcionais das DCs murinas tratadas com fragmentos da Hsp60 (N3, N7, N10, p277 e C-Hsp60) bem como dos LT que foram colocados em cocultura com estas células. Acreditamos que um amplo estudo da expressão tanto de genes reguladores quanto genes inflamatórios nestas células, possa contribuir para o esclarecimento dos possíveis mecanismos envolvidos nessas respostas. Além disso, ensaios de microscopia confocal estão sendo

conduzidos em nosso laboratório para determinar a quais moléculas os peptídeos da Hsp60 se ligam, visando uma maior compreensão da fisiologia dessa resposta.

Com base nos dados obtidos *in vitro* e dados anteriores de outros grupos e do nosso, selecionamos alguns fragmentos da Hsp60 (p277, N3, N7 e a proteína C-Hsp60) para a indução de tolerância ao alotransplante de pele murino. Os três tipos de DCs singenéicas não tratadas e tratadas com os fragmentos p277, N7 ou com a proteína C-Hsp60 da proteína Hsp60 foram injetados via endovenosa em camundongos Balb/c.Vale dizer que a escolha do dia da injeção das DCs foi baseada em diversos protocolos estabelecidos na literatura para a indução de tolerância (Lu *et al*, 1997; Lutz *et al*, 2000; Roelen *et al*, 2003; Zhu *et al*, 2004). No total, tivemos 13 diferentes grupos, incluindo o grupo injetado com PBS que foi usado como controle uma vez que este foi o diluente usado para a injeção das células. Todos os animais rejeitaram o enxerto de pele alogenéico (derivados de camundongos C57BL/6) nos mesmo período que os animais do grupo controle, por volta de 14 dias pós-transplante (Tabela 54 e na Figura 43). Os animais que foram injetados com iDCs IL-10 tratadas com os peptídeos p277 (mediana de sobrevida: 17 dias) e N7 (mediana de sobrevida: 16 dias) apresentaram uma sobrevidas ligeiramente maiores do enxerto quando comparadas àquelas do grupo com PBS (14 dias), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 53 e na Figura 43).

Diversas questões surgem frente a esses dados que parecem ser contraditórios com a literatura e que podem ter colaborado para o insucesso das nossas tentativas de indução de tolerância ao transplante alogenéico. Ao analisar

os trabalhos da literatura, notamos que a expressão de moléculas coestimuladoras e de MHC na superfície das DCs para o direcionamento da resposta de LT, *in vitro*, muitas vezes parece ser mais importante do que *in vivo,* onde muitas outras moléculas podem influenciar no desfecho da resposta imune (Repnik *et al*, 2008). Deste modo, o efeito dos fragmentos da Hsp60 na redução da expressão das moléculas coestimuladoras, *in vitro*, pode ter sido insuficiente *in vivo*, para aumentar a sobrevida do enxerto transplantado bem como para induzir tolerância. Assim, acreditamos que novas tentativas com concentrações maiores de DCs, outras vias de administração ou formulação (por exemplo, uso dos peptídeos em microesferas lipídicas) bem como um maior número de injeções pré e/ou pós-transplante, possam contribuir para aumentar a sobrevida do enxerto e serão testadas por nosso grupo.

Outra possibilidade ainda é que as iDCs IL-10 (imaturas estáveis)*, in vivo* não sejam tão resistentes à maturação como, *in vitro,* e que possam ter amadurecido, como sugerido para as iDCs tratadas com dexametasona (Vanclée *et al*, 2006), ou mesmo que estas células não tenham uma boa capacidade migratória para os linfonodos. Vale ressaltar que não há trabalho na literatura avaliando a capacidade migratórias das iDCs tratadas com IL-10. No entanto, o tratamento das iDCs IL-10 com os fragmentos p277 e N7 mostraram um aumento de sobrevida que ainda que não significativo. Isto nos leva a pensar que possa sim ter ocorrido algum tipo de regulação, *in vivo*.

Ridolfi e colaboradores (2004) estudaram injeções de iDCs e mDCs tratadas com lisados tumorais para o tratamento de melanoma renal humano e observaram que as mDCs humanas quando injetadas, *in vivo,* em pacientes,

mostraram ter uma capacidade migratória cerca de 6 vezes maior que a apresentada pelas iDCs, estando esta capacidade relacionada à expressão de CCR7 (Ridolfi *et al*, 2004). Além disso, Hollender e colaboradores (2002) mostraram que as mDCs, *in vitro,* apresentam uma capacidade migratória muito superior à apresentada pelas iDCs, devido à expressão de metalloprotease-9 de matriz (MMP-9) e à baixa expressão do seu inibidor (TIMP-1) (Hollender *et al,* 2002). Esta observação poderia, então, explicar o porquê de não termos conseguido induzir tolerância ao transplante de pele, visto que as mDCs, que apresentam a melhor capacidade migratória, são células descritas como indutoras de respostas imunes efetoras do tipo inflamatórias. Nossos dados com as mDCs tanto com relação à proliferação, citocinas e moléculas coestimuladoras, nos diversos contextos avaliados neste trabalho, corroboram essa característica imunogênica descrita na literatura. Apesar de não termos avaliado a capacidade migratória das nossas DCs tratadas e não tratadas com Hsp60, nem das moléculas relacionadas a essa capacidade, acreditamos que problemas na migração das DCs possam ter sido um dos motivos para a ausência do feito tolerogênico, *in vivo,* destas células. Por fim, nossos transplantes de pele podem ainda ter sido rejeitados devido as nossas iDCs, especialmente as iDCs IL-10, não estarem produzindo alguns fatores imunorreguladores importantes como a enzima IDO, após sua injeção *in vivo*. Segundo Li e colaboradores em 2008, a produção de IDO pelas iDCs tolerogênicas (altas produtoras da citocina IL-10) levariam LT alorreativos à apoptose, levando à indução de tolerância ao transplante cardíaco em camundongos, além de induzir células Tregs específicas e interagir com as Tregs circulantes do receptor (Li *et al*, 2008). No entanto,

somente a produção de IDO não parece ser suficiente para explicar os efeitos inibidores que observamos nas coculturas de LT com as diferentes DCs tratadas com fragmentos da Hsp60, visto que observamos inclusive inibição de proliferação e citocinas inflamatórias em resposta ao estímulo policlonal de αCD3. Em experimentos realizados por Löb e colaboradores (2007), foi mostrado que DCs humanas derivadas de monócitos, imaturas e maduras, produtoras de IDO e de IL-10 não foram capazes de inibir, *in vitro*, a proliferação de LT em uma resposta linfocitária mista - MLR (Löb *et al*, 2007).

A indução de tolerância ao alotransplante em humanos, sem auxílio de drogas imunossupressoras, é um dos maiores desafios da Imunologia. Visando alcançar esse objetivo, diversos grupos de pesquisa têm buscado a indução de tolerância em modelos animais visando melhor compreensão de mecanismos para futuras aplicações em humanos. Porém, até o presente momento não tivemos muito sucesso no que diz respeito ao transplante de pele alogenéico em modelo murino, visto que o transplante de pele é o mais imunogênico dos transplantes (Swearingen *et al*, 2008). Ikeguchi e colaboradores (2008) induziram tolerância ao transplante de pele em ratos Lewis com injeções de iDCs tratadas com o imunossupressor rapamicina *in vitro* (Ikeguchi *et al*, 2008). Até o presente momento nenhum trabalho utilizando DCs e/ou Hsp60 sem auxílio de drogas imunossupressoras seja para o tratamento das DCs ou na administração destas drogas nos animais; foi capaz de induzir tolerância ao transplante de pele, somente aumento de sobrevida. Conforme podemos observar no trabalho de Luna e colaboradores com o peptídeo p277 (Luna *et al*, 2007). Dados obtidos por

Velásquez-Lopera e colaboradores (2008), corroboram essa dificuldade de indução de tolerância ao transplante de pele na ausência de imunossupressores. Esses autores mostraram que Tregs geradas ,*in vitro*, na presença de DCs, apesar de inibir significativamente a proliferação de LT CD4+ e CD8+ alorreativos por meio da produção de IL-10 e TGF-β, em experimentos *in vivo*, com camundongos nude, injeções de Tregs aumentaram a sobrevida do enxerto de pele, mas não induziram tolerância (Velásquez-Lopera *et al*, 2008). Já Roelen e colaboradores (2003) mostraram que iDCs tratadas com dexametasona, expressavam poucas moléculas coestimuladoras na superfície, *in vitro*, mesmo após serem estimuladas com LPS. Estas células foram então injetadas ($1x10^6$DCs) em camundongos Balb/c, uma semana antes do transplante de pele e levaram a um aumento de sobrevida do enxerto de pele, mas não tolerância (Roelen *et al,* 2003). Além disso, Moore e colaboradores tentaram induzir tolerância ao transplante de pele alogenéico por meio da injeção de DCs geneticamente modificadas para a expressão de IL-10, porém também não obtiveram sucesso (Moore *et al*, 2004).

Durante os anos de desenvolvimento desta tese, observamos na literatura o crescente número de trabalhados nos quais era mencionada a utilização de um receptor endocítico chamado DEC205 para regular a resposta imune, através de células dendríticas (Hawiger *et al*, 2001). Esta abordagem desenvolvida pelo grupo do professor Michel Nussenzweig tem se mostrado muito promissora para a indução de tolerância em doenças auto-imunes experimentais como nos trabalhos desenvolvidos por Hawiger e Bonifaz (Hawiger *et al*, 2001; Bonifaz, *et al,* 2004). Entretando, o seu uso no contexto oposto, ou seja, na indução de respostas

imunogênicas já está amplamente consolidado, como por exemplo, para a indução de uma resposta imunogênica ao vírus HIV com a utilização concomitante de estímulos imunogênicos como poli IC e anti-CD40 (Nchinda *et al*, 2008). O efeito do direcionamento da resposta imune via αDEC205 se dá, provavelmente, através de uma maior eficiência na apresentação dos antígenos direcionados a esse receptor que está presente, quase que exclusivamente nas DCs, e que chega a ser cerca de 30 vezes mais eficaz na atividade endocítica do que outros receptores da mesma família, como o receptor de manose de macrógafos (MMR do inglês: *"macrophage mannose receptor"*) (Mahnke *et al*, 2000).

Deste modo, resolvemos verificar se o direcionamento de fragmentos da Hsp60 via αDEC205 às DCs agiria sinergicamente com os efeitos potencialmente imunorreguladores das DCs e da Hsp60 levando à indução de tolerância do enxerto de pele semi-alogenéico em camundongos. Os anticorpos αDEC205-N3 foram, então, injetados em camundongos DBA2, para a indução de tolerância ao transplante de pele derivado de camundongos Balb/c. Utilizamos três grupos de animais (5-7 animais por grupo) que receberam duas injeções intra-peritoneais dos anticorpos nos dias 4 e 7 antes do transplante, com doses de 5μg, 15μg ou PBS (controle). Todos os animais rejeitaram o enxerto de pele no mesmo período que os animais controle, por volta de 14 dias pós-transplante (Tabela 54).

As doses de anticorpos αDEC205-N3 utilizados nesse experimento não tiveram embasamento em outros trabalhos porque não há trabalhos publicados com a injeção destes anticorpos para a indução de uma resposta tolerogênica em

transplante. Assim, os valores de 15μg bem como a via de administração foram baseados em um dos trabalhos do grupo do Professor Michel Nussenzweig com indução de tolerância para encefalomielite auto-imune experimental (Hawiger *et al*, 2004).

Acreditamos que variações nas concentrações das doses de anticorpo bem como no esquema de administração possam influenciar na sobrevida do enxerto de pele transplantado. Outro ponto importante a ser destacado é o fato de que os ensaios de ligação do anticorpo αDEC205-N3 com o seu receptor expresso em células*, in vitro*, ainda não foram realizados. Deste modo, o insucesso obtido com a injeção dos anticorpos αDEC205-N3, nesses experimentos, pode ser devido a possíveis problemas no reconhecimento, já que a inserção de peptídeos ou proteínas no anticorpo αDEC205 poderia alterar sua conformação, devido à própria estrutura tridimensional desse peptídeo ou proteína. Outro ponto importante a ser levantado é a não realização dos ensaios de ligação anticorpo-receptor devido a problemas de morte no transporte da linhagem de células (CHO-DEC) que expressavam o receptor do DEC205 em sua superfície. Deste modo, não realizamos até o presente momento os ensaios de ligação (do inglês: "binding") *in vitro* que iriam garantir que os anticorpos αDEC025-N3 produzidos por nós realmente conseguem se ligar ao seu receptor e então, exercer seu efeito regulador.

Por fim, vale ressaltar que a construção que foi testada nessa tese foi o αDEC205 acoplado ao peptídeo N3 da Hsp60, que mostrou resultados interessantes em células humanas, conforme mencionado anteriormente

(manuscritos esperando solicitação de patente para submissão Caldas *et al*, 2008 e Socorro-Silva *et al*, 2008). No entanto, no presente trabalho os principais fragmentos da Hsp60 indutores de regulação foram o p277 e o N7 e não o N3. Devemos mencionar que quando este anticorpo foi construído ainda não tínhamos todos esses dados. Deste modo, o insucesso na indução de tolerância ao transplante de pele realizado por nós também pode sido devido às características do peptídeo N3 que, em alguns momentos foram também pró-inflamatórias, com a indução ou aumento predominantemente de citocinas inflamatórias como TNF-α, IFN-γ, IL-6 nas coculturas autólogas de LT com as iDCs e mDCs (Quadro 3, Tabelas 26 a 39, Figura 36).

A capacidade das DCs de direcionar as respostas imunes e sua grande plasticidade, no que diz respeito a estágios de maturação, têm levado vários pesquisadores a vislumbrar aplicações terapêuticas para estas células, tanto utilizando-as para regular negativamente o sistema imune em doenças auto-imunes e em modelos de transplante, como para promover uma potente resposta imunogênica, no combate a tumores e infecções virais. Os resultados desses estudos têm colocado as células dendríticas como grandes alvos de investigação terapêutica no mundo e suscitado novas formas de manipulá-las, seja geneticamente, *in vitro* ou *in vivo*, na tentativa de curar ou prevenir tais doenças.

Na busca dessas respostas, passamos a trabalhar com a Hsp60 e as DCs visando somar o potencial tolerogênico das DCs imaturas com o potencial imunorregulador da Hsp60, amplamente descrito na literatura. No que diz respeito à imunorregulação, mostramos no presente trabalho que fragmentos da Hsp60,

em especial os peptídeos p277 e o N7 são capazes de: (i) inibir ou diminuir a expressão de moléculas coestimuladoras em DCs, inclusive nas mDCs; (ii) inibir auto-reatividade (proliferação e citocinas); (iii) de inibir uma resposta (proliferação e citocinas) frente ao potente estímulo policlonal induzido pelo anticorpo αCD3; (iv) induzir citocinas anti-inflamatórias. Em conclusão, com base em nossos dados, sugerimos um potencial regulador muito grande para esses peptídeos na interação destes com as DCs. Além disso, observamos que a proteína C-Hsp60 parece, na maior das vezes, exerceu o efeito oposto ao exibido pelos peptídeos N7 e p277, sendo responsável por induzir respostas mais imunogênicas. No entanto, essa proteína se mostrou mais imunomoduladora bipolar, visto que foi capaz de exercer efeitos opostos, ora inibindo ora induzindo proliferação, produção de citocinas inflamatórias e aumento da expressão de moléculas coestimuladoras, variando sua resposta efetora conforme o contexto, o tipo de DC utilizada e a presença ou não de estímulo policlonal com αCD3.

Diante de tal perspectiva e de todos os dados obtidos pelo nosso grupo até o momento, estamos dando prosseguimento a uma séria de investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessas respostas bem como sobre o potencial tolerogênico destes, *in vivo*, visando, deste modo, possíveis aplicações clínica futuras no contexto de transplante e em doenças auto-imunes.

9. CONCLUSÕES

1. As iDCs IL-10 apresentaram um perfil imunorregulador, mostrando: (i) estabilidade, *in vitro,* do imunofenótipo imaturo; (ii) mínima capacidade de induzir proliferação de linfócitos T (LT) alogenéicos; (iii) baixa produção de citocinas inflamatórias; (iv) boa capacidade indutora de auto-reatividade proliferativa de LT, com produção de IL-10. Com base nesses dados sugerimos que as iDCs IL-10 possam ser boas candidatas para o uso em terapia celular visando a indução de tolerância.

2. A interação dos fragmentos da Hsp60 com as diferentes DCs induziu modificação na expressão de moléculas coestimuladoras e na produção de citocinas. Alguns peptídeos se destacaram como predominantemente indutores de citocinas imunorreguladoras, (IL-10 e TGF-β; peptídeos p277 e N7) e outros como predominantemente indutores de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IFN-γ e IL-12; peptídeos I8 e I2). Além disso, o peptídeo N7 foi o maior inibidor da expressão de moléculas coestimuladoras, e a proteína C-Hsp60 ora aumentou ora inibiu essa expressão. Com base nesses resultados, sugerimos que a Hsp60 uma tenha uma dupla atividade funcional pró-inflamatória e imunorreguladora, também na interação com as DCs.

3. O peptídeo N7 teve um efeito dominante na inibição da auto-reatividade de LT dirigida às DCs, tanto proliferativa como na produção de citocinas, principalmente inflamatórias. Sugerimos que o peptídeo N7 possa ter um papel no controle da auto-reatividade, exercendo uma atividade imunorreguladora, independentemente do estado de maturação as DCs.

4. Os fragmentos da Hsp60 C-Hsp60, p277 e principalmente o peptídeo N7 foram capazes de, em alguns experimentos, inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias das coculturas de LT com DCs estimuladas com o anticorpo αCD3. A capacidade supressora desses fragmentos da Hsp60 frente a um estímulo tão potente nos sugere que a

Hsp60 possa exercer um efeito supressor também sobre a ativação policlonal inespecífica de LT, como ocorre em processos inflamatórios.

5. Apesar dos nossos protocolos não terem induzido tolerância ao aloenxerto de pele em camundongos, observamos que os animais injetados com as iDCs IL-10 tratadas com p277 ou N7, tiveram uma maior sobrevida do enxerto (16 e 17 dias versus 14 dias). Este dado nos leva a pensar que estas células possam ter induzido algum tipo de imunorregulação, *in vivo*. Assim, acreditamos que esses protocolos de indução de tolerância possam ser otimizados para uso em modelos murinos de transplantes e doenças auto-imunes.

6. Apesar da dupla atividade funcional da Hsp60 na interação com as DCs maduras e imaturas, observada, *in vitro*, nesse trabalho, houve um predomínio de imunorregulação. Esses dados nos sugerem o envolvimento de múltiplos mecanismos de ação para a atividade imunorreguladora da Hsp60, na interação com as DCs. Tomados em conjunto, todos esses dados poderão contribuir para o desenvolvimento de protocolos clínicos, tanto para o transplante quanto para o tratamento de doenças auto-imunes.

PROLIFERAÇÃO CELULAR

Experimento DC-007 autológo

(corrigido 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	87,2	71,1	64,6	74,3	74,3	1,0
iDC + aCD3	176,1	101,9	97,1	125,0	125,0	1,7
iDC +LT	882,6	874,8	730,8	829,4	829,4	**11,0**
iDC + LT + aCD3	16247	15338	18809	16798,1	16798,1	**20,3**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	iDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (C-Term)	67	62,1	92,2	73,8	73,8	1,0
iDC (C-Term) + aCD3	84	88,8	29,3	67,4	86,4	0,9
iDC +LT (C-Term)	441,3	168,1	185,5	265,0	176,8	**0,2**
iDC + LT + aCD3 (C-Term)	56,7	6981,1	8388,3	5142,0	7684,7	**0,5**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	iDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (p277)	115,7	110,1	68,7	98,2	98,2	1,0
iDC (p277) + aCD3	537,5	41,4	45,6	208,2	43,5	0,4
iDC +LT (p277)	593,5	633,6	609,9	612,3	612,3	**0,7**
iDC + LT + aCD3 (p277)	21144	18933	19767	19947,7	19947,7	**1,2**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	51,7	38	72,8	54,2	54,2	1,0
iDC IL-10 + aCD3	29,3	85,7	24,3	46,4	26,8	0,9
iDC IL-10 +LT	231,3	562,5	437,6	410,5	500,1	**6,6**
iDC IL-10 + LT + aCD3	7977,6	6100,2	7847,8	7308,5	7308,5	**14,6**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	iDC IL-10 C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP

iDC IL-10 (C-Term)	38,5	33	49,2	40,2	40,2	1,0
iDC IL-10 (C-Term) + aCD3	85	69,6	34,4	63,0	77,3	1,6
iDC IL-10 +LT (C-Term)	809,5	860,7	755,3	808,5	808,5	**1,6**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (C-Term)	7267,4	7122	7785	7391,5	7391,5	**1,0**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	iDC IL-10 p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (p277)	73	61,1	144,5	92,9	67,1	1,0
iDC IL-10 (p277) + aCD3	136,6	128,1	82	115,6	115,6	1,7
iDC IL-10 +LT (p277)	534,6	511,4	622,1	556,0	556,0	**1,1**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (p277)	5906,9	6916,1	7333,3	6718,8	6718,8	**0,9**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	44,6	61	85,1	63,6	63,6	1,0
mDC + aCD3	50,6	33,3	84	56,0	42	0,9
mDC +LT	175,5	223,2	255,2	218,0	218,0	**2,9**
mDC + LT + aCD3	19186	17716	16089	17663,7	17663,7	**81,0**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	mDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (C-Term)	82,2	57	129,1	89,4	69,6	1,0
mDC (C-Term) + aCD3	62,7	49,4	30,4	47,5	47,5	0,7
mDC +LT (C-Term)	85,2	135,1	179,3	133,2	157,2	**0,7**
mDC + LT + aCD3 (C-Term)	13345	13660	10229	12411,2	12411,2	**0,7**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

	mDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (p277)	111,6	90,1	154,8	118,8	118,8	1,0
mDC (p277) + aCD3	44,5	58,5	45,5	49,5	49,5	0,4
mDC +LT (p277)	507,2	307,2	380,2	398,2	398,2	**1,8**
mDC + LT + aCD3 (p277)	15347	17177	17796	16773,5	16773,5	**0,9**
LT	78,1	73,1	75,8	75,7	75,7	1,0
LT + aCD3	472,7	453,9	306,6	411,1	411,1	5,4

Ensaio de Proliferação - MLR: Exp. DC-013

(30/maio/08)

	iDC Exp. DC-013					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	211	347,2	380,8	313,0	313,0	1,0
iDC + LT	894,5	1293,4	1601,9	1263,3	1263,3	**2,2**
iDC + LT +aCD3	7299	13319	5090,8	8569,6	6194,9	**4,9**
LT	570	569,98	569,98	570,0	570,0	1,0
LT+ aCD3	1188	1187,9	1187,9	1187,9	1187,9	2,1

	iDC IL-10 Exp. DC-013					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	381,6	612,2	667,6	553,8	553,8	1,0
iDC IL-10 + LT	642,2	751,9	790,2	728,1	728,1	**1,2**
iDC IL-10 + LT +aCD3	2934,1	3106,8	2091	2710,6	2710,6	**3,7**
LT	589,8	589,8	589,8	589,8	589,8	1,0
LT+ aCD3	1010,4	1010,4	1010,4	1010,44	1010,4	1,7

Ensaio de Proliferação - MLR: Exp. DC-017

(corrigido: 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	520,4	169,6	414	368,0	467,2	
iDC + LT	3119,3	643,5	2827,3	2196,7	2973,3	**4,4**
iDC + LT + aCD3	16285,7	17966	23148,3	19133,3	19133,3	**6,4**
LT + aCD3	8313,6	9756,7	9811,7	9294,0	9294,0	13,8
LT	616,9	184,1	729,3	510,1	673,1	

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	167,7	157,2	364,6	229,8	162,5	
iDC IL-10 + LT	975	234,2	592,7	600,6	783,9	**1,2**
iDC IL-10 + LT + aCD3	7484,2	7084,6	5189,1	6586,0	6586,0	**8,4**
LT + aCD3	8313,6	9756,7	9811,7	9294,0	9294,0	13,8
LT	616,9	184,1	729,3	510,1	673,1	

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	293,7	413,6	672,8	460,0	353,7	
mDC + LT	17603,7	976,8	21125,2	13235,2	19364,5	**28,8**
mDC + LT + aCD3	103464	106248	102065,8	103925,9	103925,9	**5,4**
LT + aCD3	8313,6	9756,7	9811,7	9294,0	9294,0	13,8
LT	616,9	184,1	729,3	510,1	673,1	

Ensaio de Proliferação - MLR: Exp. DC-018

(corrigido: 30-05-08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	308	361,6	322,6	330,7	330,7	
iDC + LT	2484	632,6	1823	1646,5	2153,5	**3,1**
iDC + LT + aCD3	23609,1	20984,7	28366	24319,9	24319,9	**11,3**
LT + aCD3	1282,4	941,8	1190,6	1138,3	1138,3	1,6
LT	909,7	642,2	528	693,3	693,3	

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	479,7	651,5	997,5	709,6	565,6	
iDC IL-10 + LT	2942,8	847,7	1367,5	1719,3	1107,6	**1,6**
iDC IL-10 + LT + aCD3	8435,8	4445,8	2551	5144,2	3498,4	**3,2**
LT + aCD3	1282,4	941,8	1190,6	1138,3	1138,3	1,6
LT	909,7	642,2	528	693,3	693,3	

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	232,7	128,2	326,7	229,2	279,7	
mDC + LT	15743,6	1165	11969,8	9626,1	13856,7	**20,0**
mDC + LT + aCD3	137924	152856	218192,6	169657,4	169657,4	**12,2**
LT + aCD3	1282,4	941,8	1190,6	1138,3	1138,3	1,6
LT	909,7	642,2	528	693,3	693,3	

Ensaio de Proliferação - MLR: Exp. DC-019

(corrigido: 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	1340,7	1354,8	1211,2	1302,2	1302,2	
iDC + LT	2244,4	3413,8	2327,7	2662,0	2662,0	**2,0**
iDC + LT + aCD3	62314,2	50322,1	54667,9	55768,1	55768,1	**20,9**
LT + aCD3	26783,2	26310,9	33936,1	29010,1	29010,1	36,6
LT	247	875,9	708,8	610,6	792,4	

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	629,1	307,1	472,5	469,6	550,8	
iDC IL-10 + LT	577,8	1567,4	2722,8	1622,7	2145,1	**2,7**
iDC IL-10 + LT + aCD3	51203,4	37847,3	59964,2	49671,6	49671,6	**23,2**
LT + aCD3	26783,2	26310,9	33936,1	29010,1	29010,1	36,6
LT	247	875,9	708,8	610,6	792,4	

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	274,4	242	326,6	281,0	281	
mDC + LT	304,2	20594,2	5540,8	8813,1	13067,5	**16,5**
mDC + LT + aCD3	128717	2583,5	8088,6	46463,1	5336,1	**2,5**
LT + aCD3	26783,2	26310,9	33936,1	29010,1	29010,1	19,1
LT	247	875,9	708,8	610,6	792,4	36,6

Experimento DC-021 autológo

(corrigido 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	442,1	597,7	532,1	524,0	524,0	1,0
iDC +LT	3886,5	3296,6	4499,6	3894,2	3894,2	**7,4**
iDC + LT + aCD3	58368	63825	5438,1	42543,5	61096,3	**15,7**
LT	452,3	397,1	369,8	406,4	406,4	1,0
LT + aCD3	10368	3123,2	5480,2	6323,9	4301,7	10,6

	iDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (C-T)	615,9	762,1	471,5	616,5	616,5	1,0
iDC +LT (C-T)	3440,3	4322,1	4455,3	4072,6	4072,6	**1,0**
iDC + LT + aCD3 (C-T)	67760	57905	7210,8	44291,9	62832,5	**1,0**
LT	452,3	397,1	369,8	406,4	406,4	1,0
LT + aCD3	10368	3123,2	5480,2	6323,9	4301,7	10,6

	iDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (p277)	395,4	458,1	459,2	437,6	437,6	1,0
iDC +LT (p277)	1002,6	4125,6	4497,5	3208,6	4311,6	**1,1**
iDC + LT + aCD3 (p277)	52521	61146	13803	42489,8	56833,4	**0,9**
LT	452,3	397,1	369,8	406,4	406,4	1,0
LT + aCD3	10368	3123,2	5480,2	6323,9	4301,7	10,6

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	279,5	192,3	247,5	239,8	239,8	1,0
iDC IL-10 +LT	14463	15000	14673	14712,1	14712,1	**36,2**
iDC IL-10 + LT + aCD3	25215	25903	30323	27146,9	27146,9	1,8
LT	452,3	397,1	369,8	406,4	406,4	1,0
LT + aCD3	10368	3123,2	5480,2	6323,9	4301,7	10,6

	iDC IL-10 C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (C-T)	192,1	168,5	146,9	169,2	169,2	1,0
iDC IL-10 +LT (C-T)	11639	27014	21475	20042,9	24244,5	1,6
iDC IL-10 + LT + aCD3 (C-T)	19488	18708	16875	18356,8	18356,8	0,7
LT	452,3	397,1	369,8	406,4	406,4	1,0

LT + aCD3	10368	3123,2	5480,2	6323,9	4301,7	10,6

	iDC IL-10 p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (p277)	138,2	322,6	140,7	200,5	139,4	1,0
iDC IL-10 +LT (p277)	20218	24907	22030	22384,6	22384,6	1,5
iDC IL-10 + LT + aCD3 (p277)	18713	26062	10956	18577,0	18577,0	0,7
LT	452,3	397,1	369,8	406,4	406,4	1,0
LT + aCD3	10368	3123,2	5480,2	6323,9	4301,7	10,6

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	1089,6	734,2	840,2	888,0	888,0	1,0
mDC +LT	4248,9	2890,8	4744,6	3961,4	3961,4	**4,5**
mDC + LT + aCD3	70029	71746	64193	68656,0	68656,0	**17,3**
LT	708,4	308,1	244,5	420,3	276,3	1,0
LT + aCD3	10993	13201	13591	12595,3	12595,3	45,6

	mDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (C-T)	852,7	904,8	800,2	852,6	852,6	1,0
mDC +LT (C-T)	3370,6	3292,3	3490,5	3384,5	3384,5	**0,9**
mDC + LT + aCD3 (C-T)	70409	71907	77702	73339,2	73339,2	**1,1**
LT	708,4	308,1	244,5	420,3	276,3	1,0
LT + aCD3	10993	13201	13591	12595,3	12595,3	45,6

	mDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (p277)	483,8	643,2	458,1	528,4	528,4	1,0
mDC +LT (p277)	3222,5	2913,8	3165,5	3100,6	3100,6	**0,8**
mDC + LT + aCD3 (p277)	69995	64035	11878	48635,7	67014,8	**1,0**
LT	708,4	308,1	244,5	420,3	276,3	1,0
LT + aCD3	10993	13201	13591	12595,3	12595,3	45,6

Experimento DC-022 autológo

(corrigido 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	348,6	264,7	330,7	314,7	314,7	1,0
iDC +LT	2933,3	2001,7	1586,7	2173,9	1794,2	**5,7**
iDC + LT + aCD3	48570	46821	53341	49577,3	49577,3	**27,6**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	iDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (C-T)	400,4	429,1	258,8	362,8	362,8	1,0
iDC +LT (C-T)	944,3	2877,7	3907,3	2576,4	3392,5	**1,9**
iDC + LT + aCD3 (C-T)	42063	3884,7	55405	33784,3	48734,1	**1,0**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	iDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (p277)	173,8	214	193,1	193,6	193,6	1,0
iDC +LT (p277)	1514	1843,6	1939,4	1765,7	1765,7	**1,0**
iDC + LT + aCD3 (p277)	13227	43821	3239,2	20095,7	28523,9	**0,6**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	318,1	397,1	671,8	462,3	357,6	1,0
iDC IL-10 +LT	2718,9	2790,6	9258,3	4922,6	2754,8	**7,7**
iDC IL-10 + LT + aCD3	42712	16002	1476,1	20063,2	29356,7	**10,7**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	iDC IL-10 C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (C-T)	188	350,5	327,6	288,7	288,7	1,0
iDC IL-10 +LT (C-T)	704,4	4371,6	3363,1	2813,0	3867,4	**1,4**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (C-T)	25257	29231	1411,4	18632,9	27244	**0,9**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	iDC IL-10 p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (p277)	156,6	203,7	214,7	191,7	191,7	1,0
iDC IL-10 +LT (p277)	1359,8	1492,2	1205	1352,3	1352,3	**0,5**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (p277)	41738	24685	36012	34145,2	34145,2	**1,2**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	748	678,3	508,4	644,9	644,9	1,0
mDC +LT	1791,7	3105	2159,8	2352,2	2352,2	**3,6**
mDC + LT + aCD3	42781	46313	61161	50085,1	50085,1	**21,3**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	mDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (C-T)	659,6	708,3	593,7	653,9	653,9	1,0
mDC +LT (C-T)	3431,8	1843,6	1480,1	2251,8	1661,9	**0,7**
mDC + LT + aCD3 (C-T)	48563	48520	57791	51624,6	51624,6	**1,0**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

	mDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (p277)	588,5	832,4	640,9	687,3	687,3	1,0
mDC +LT (p277)	2829,2	2899,8	2480,5	2736,5	2736,5	**1,2**
mDC + LT + aCD3 (p277)	56911	65003	57370	59761,4	59761,4	**1,2**
LT	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0
LT + aCD3	44207	11328	14340	23291,6	12833,7	59,9

Experimento DC-022 – autólogo
Painel de peptídeos
(corrigido 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	**B**	**C**	**D**	**média**	**média corrigida**	**IP**
iDC	348,6	264,7	330,7	314,7	314,7	
iDC + LT	**2933,3**	**2001,7**	**1586,7**	**2173,9**	**1794,2**	**5,7**
iDC + LT+ aCD3	48570	46821	53341	49577,3	49577,3	27,6
I8	2073,5	1805,5	1983,9	1954,3	1954,3	1,1
I9	2641,8	1668	2067,9	2125,9	2125,9	1,2
I2	1892,8	2214	1720,1	1942,3	1942,3	1,1
I4	431,9	1439,5	1678,5	1183,3	1559,0	0,9
I6	1339,4	1657,4	1931,1	1642,6	1642,6	0,9
C3	555,9	1232,6	1596,3	1128,3	1414,5	0,8
C4	772,8	834,7	1307,4	971,6	971,6	**0,5**
C8	180,9	165,4	264	203,4	203,4	**0,1**
C9	1294,5	1175	987,7	1152,4	1152,4	0,6
p277	355,7	317,4	340	337,7	337,7	**0,2**
N2	1281,2	1433,2	1687	1467,1	1467,1	0,8
N3	11,2	10,3	20,5	14,0	14,0	**0,0**
N4	18,4	6	15,5	13,3	17	**0,0**
N7	11,2	12	12,4	11,9	11,9	**0,0**
N10	15,2	11,4	13,4	13,3	13,3	**0,0**
Interm	9,1	13,4	10,3	10,9	10,9	**0,0**
LT sozinho	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	**B**	**C**	**D**	**média**	**média corrigida**	**IP**
iDC IL-10	318,1	397,1	671,8	462,3	357,6	
iDC IL-10 + LT	**2718,9**	**2790,6**	**9258,3**	**4922,6**	**2754,8**	**7,7**
iDC IL-10 + LT+ aCD3	42712	16002	1476,1	20063,2	29356,7	10,7
I8	296	290,2	251,3	279,2	279,2	**0,1**
I9	260,2	235,8	185,9	227,3	227,3	**0,0**
I2	296	264,2	258,6	272,9	272,9	**0,0**
I4	171,8	311,2	230,1	237,7	237,7	**0,0**
I6	358,3	296,2	253,4	302,6	302,6	**0,0**
C3	228,7	213	211,6	217,8	217,8	**0,1**
C4	239,9	403,3	347,5	330,2	330,2	**0,1**
C8	198,2	312,3	270,1	260,2	260,2	**0,1**
C9	233,8	253,2	121	202,7	243,5	**0,1**
p277	240,9	223,3	203,4	222,5	222,5	**0,1**
N2	288,9	186,1	314,4	263,1	263,1	**0,1**

N3	151,4	166,5	161,3	159,7	159,7	**0,1**
N4	278,7	222,2	307,2	269,4	269,4	**0,1**
N7	140,9	137,1	212	163,3	163,3	**0,1**
N10	129,1	209,9	171,5	170,2	170,2	**0,1**
Interm	153,5	141,7	181,8	159,0	159,0	**0,1**
LT sozinho	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0

	mDC					
CONDIÇÕES	**B**	**C**	**D**	**média**	**média corrigida**	**IP**
mDC	748	678,3	508,4	644,9	644,9	
mDC + LT	**1791,7**	**3105**	**2159,8**	**2352,2**	**2352,2**	**3,6**
mDC + LT+ aCD3	42781	46313	61161	50085,1	50085,1	21,3
I8	1506,8	1812,5	1748	1689,1	1689,1	0,7
I9	1307,1	1350,5	1305,6	1321,1	1321,1	**0,6**
I2	1368	1428,2	1442,9	1413,0	1413,0	**0,6**
I4	1131,2	1288,5	1534,6	1318,1	1318,1	**0,6**
I6	1155,6	909,7	974,3	1013,2	1013,2	**0,4**
C3	916,7	1124	912,1	984,3	984,3	**0,4**
C4	1029	1020,8	956,7	1002,2	1002,2	**0,4**
C8	301,8	1093	1304,5	899,8	1198,8	**0,5**
C9	751,3	737,6	792,2	760,4	760,4	**0,3**
p277	284,6	216,1	251,6	250,8	250,8	**0,1**
N2	303,2	168,1	177,9	216,4	216,4	**0,1**
N3	146,3	282,3	205,4	211,3	211,3	**0,1**
N4	283,8	383,3	175,8	281,0	333,5	**0,0**
N7	186,8	189,1	191,3	189,1	189,1	**0,0**
N10	19,3	10,3	16,4	15,3	15,3	**0,0**
Interm	101,6	110,6	91,4	101,2	101,2	**0,0**
LT sozinho	265,3	608	163,3	345,5	214,3	1,0

Experimento DC-024 - MLR

(corrigido 26/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	404,6	359,8	301,5	355,3	355,3	1,0
iDC +LT	1382,6	1819,2	1936,3	1712,7	1712,7	**3,6**
iDC + LT + aCD3	2280,2	2176,4	2119,6	2192,1	2192,1	**1,3**
LT	454,6	473,1	514,8	480,8	480,8	1,0
LT + aCD3	617,6	469,4	808,2	631,7	631,7	1,3

	iDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (C-T)	487,6	327,8	439,4	418,3	418,3	1,0
iDC +LT (C-T)	824,3	836,9	804,6	821,9	821,9	**0,5**
iDC + LT + aCD3 (C-T)	826,4	845,3	1262,1	977,9	977,9	**0,4**
LT	454,6	473,1	514,8	480,8	480,8	1,0
LT + aCD3	617,6	469,4	808,2	631,7	631,7	1,3

	iDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (p277)	487,6	327,8	439,4	418,3	418,3	1,0
iDC +LT (p277)	824,3	836,9	804,6	821,9	821,9	**0,5**
iDC + LT + aCD3 (p277)	826,4	845,3	1262,1	977,9	977,9	**0,4**
LT	454,6	473,1	514,8	480,8	480,8	1,0
LT + aCD3	617,6	469,4	808,2	631,7	631,7	1,3

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	378,3	375,2	355,6	369,7	369,7	1,0
iDC IL-10 +LT	632,4	783,8	823,1	746,4	746,4	**1,6**
iDC IL-10 + LT + aCD3	636,2	902	816,5	784,9	784,9	**1,1**
LT	454,6	473,1	514,8	480,8	480,8	1,0
LT + aCD3	617,6	469,4	808,2	631,7	631,7	1,3

	iDC IL-10 C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (C-T)	538,1	369	415,9	441,0	408,6	1,0
iDC IL-10 +LT (C-T)	612,8	680,7	695,7	663,1	679,8	**0,9**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (C-T)	667,6	983,4	963,6	871,5	939,5	**1,2**
LT	454,6	473,1	514,8	480,8	480,8	1,0
LT + aCD3	617,6	469,4	808,2	631,7	631,7	1,3

	iDC IL-10 p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (p277)	522,9	425,7	541,6	496,7	488,0	1,0
iDC IL-10 +LT (p277)	966,7	960	1117	1014,6	1030,5	**1,4**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (p277)	1164,2	1369	1394,8	1309,3	1357,7	**1,7**
LT	454,6	473,1	514,8	480,8	480,8	1,0
LT + aCD3	617,6	469,4	808,2	631,7	631,7	1,3

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	320,6	400,9	486,3	402,6	402,6	1,0
mDC +LT	2110,7	3084,4	2863,1	2686,1	2686,1	**4,5**
mDC + LT + aCD3	10545	11740	9492,8	10592,6	10592,6	**3,9**
LT	620,5	617,1	547,7	595,1	595,1	1,0
LT + aCD3	3056,4	3090,3	4122,9	3423,2	3423,2	5,8

	mDC C-Terminal					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (C-T)	453,1	617,4	381,1	483,9	483,9	1,0
mDC +LT (C-T)	1381,5	1475,5	1695,5	1517,5	1517,5	**0,6**
mDC + LT + aCD3 (C-T)	7280,3	4776,7	8573,2	6876,7	6876,7	**0,6**
LT	620,5	617,1	547,7	595,1	595,1	1,0
LT + aCD3	3056,4	3090,3	4122,9	3423,2	3423,2	5,8

	mDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (p277)	370,1	357,6	470	399,2	399,2	1,0
mDC +LT (p277)	1363,8	1742,8	1721,3	1609,3	1609,3	**0,6**
mDC + LT + aCD3 (p277)	8175,2	7954	11151	9093,5	9093,5	**0,9**
LT	620,5	617,1	547,7	595,1	595,1	1,0
LT + aCD3	3056,4	3090,3	4122,9	3423,2	3423,2	5,8

Experimento DC-024 – MLR
Painel de peptídeos
(corrigido 30/maio/08)

	iDC painel alo					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	48	39	24	36,7	36,7	1,0
LT	344	259	227	276,6	276,6	1,0
iDC + LT	**248**	**201**	**534**	**327,7**	**224,4**	**0,8**
iDC + LT + I8	226	219	463	302,8	302,8	1,3
iDC + LT + I9	339	293	417	349,4	349,4	1,6
iDC + LT + I2	500	397	370	422,5	422,5	**1,9**
iDC + LT + I4	405	276	337	339,3	339,3	1,5
iDC + LT + I6	437	413	401	417,1	417,1	**1,9**
iDC + LT + C3	354	281	409	348,0	348,0	1,6
iDC + LT + C4	389	260	374	341,0	341,0	1,5
iDC + LT + C8	250	296	463	336,1	336,1	1,5
iDC + LT + C9	357	283	528	389,4	389,4	1,7
iDC + LT + p277	402	331	467	399,7	399,7	1,8
iDC + LT + N2	296	310	327	311,0	311,0	1,4
iDC + LT + N3	417	436	467	439,8	439,8	**2,0**
iDC + LT + N4	418	234	294	315,3	315,3	1,4
iDC + LT + N6	516	541	349	468,8	468,8	**2,1**
iDC + LT + N7	424	322	311	352,5	352,5	1,6
iDC + LT + N10	338	346	398	360,8	360,8	1,6
iDC + LT + interm	226	225	268	239,8	239,8	1,1

	iDC IL-10 painel alo					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	266	262,8	248,3	259,0	259,0	1,0
LT	509,5	456,4	295,9	420,6	420,6	1,0
iDC IL-10 + LT	**245,7**	**235**	**250,3**	**243,7**	**243,7**	**0,6**
iDC IL-10 + LT + I8	250,6	163,1	223	212,2	212,2	0,9
iDC IL-10 + LT + I9	241,7	281,4	226,8	250,0	250,0	1,0
iDC IL-10 + LT + I2	209,4	354,3	270,2	278,0	278,0	1,1
iDC IL-10 + LT + I4	284,2	361,7	366,8	337,6	337,6	1,4
iDC IL-10 + LT + I6	299,1	362,3	278,4	313,3	313,3	1,3
iDC IL-10 + LT + C3	423,7	458,6	389,2	423,8	423,8	1,7
iDC IL-10 + LT + C4	317,7	541,4	374	411,0	411,0	1,7
iDC IL-10 + LT + C8	296,3	318,5	254,4	289,7	289,7	1,2
iDC IL-10 + LT + C9	474,5	615,5	311,3	467,1	467,1	**1,9**
iDC IL-10 + LT + p277	579,5	376,2	355,5	437,1	437,1	1,8
iDC IL-10 + LT + N2	517,8	230,2	443,9	397,3	480,9	**2,0**
iDC IL-10 + LT + N3	267	397,8	381,1	348,6	348,6	1,4
iDC IL-10 + LT + N4	299,1	508,4	287,7	365,1	365,1	1,5
iDC IL-10 + LT + N6	381,2	564,8	453,6	466,5	466,5	**1,9**

iDC IL-10 + LT + N7	263	476,4	406,9	382,1	382,1	1,6
iDC IL-10 + LT + N10	328,7	644,1	379	450,6	450,6	1,8
iDC IL-10 + LT + interm	130	160,1	233,2	174,4	174,4	0,7

	mDC painel alo					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	318,5	202	269,7	263,4	263,4	1,0
LT	175,3	237,2	336	249,5	249,5	1,0
mDC + LT	**644,2**	**760,6**	**384,1**	**596,3**	**596,3**	**2,3**
mDC + LT + I8	154,7	417,3	642,2	404,7	529,8	0,9
mDC + LT + I9	227,5	197,9	757,1	394,2	212,7	**0,4**
mDC + LT + I2	183,6	258,2	631,9	357,9	220,9	**0,4**
mDC + LT + I4	184	219,5	765,2	389,6	201,8	**0,3**
mDC + LT + I6	844,8	701,6	246,6	597,7	773,2	1,3
mDC + LT + C3	421,7	318,5	262,6	334,3	334,3	**0,6**
mDC + LT + C4	291,9	566,5	406,9	421,8	421,8	0,7
mDC + LT + C8	457,1	336	306,5	366,5	366,5	**0,6**
mDC + LT + C9	253,7	283,2	485	340,6	340,6	**0,6**
mDC + LT + p277	273	411,2	674,3	452,8	342,1	0,6
mDC + LT + N2	311,5	620,5	434,6	455,5	455,5	0,8
mDC + LT + N3	214,4	117,5	790,8	374,2	166,0	**0,3**
mDC + LT + N4	215,6	378,3	152,1	248,7	248,7	**0,4**
mDC + LT + N6	200,2	330,8	297,3	276,1	276,1	**0,5**
mDC + LT + N7	277,5	337,3	329,8	314,867	314,8667	**0,5**
mDC + LT + N10	410,6	419,5	415,8	415,3	415,3	0,7
mDC + LT + interm	183,6	289,2	201,4	224,7	224,7	**0,4**

Experimento DC-056 autológo (LT de linfonodos)
(corrigido 26/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	70,1	104,1	109,9	94,7	94,7	1,0
iDC +LT	681,5	625,6	160,2	489,1	653,6	**3,4**
iDC + LT + aCD3	5432,8	4948,8	621,2	3667,6	5190,8	**7,9**
LT	206,3	181,4	404,6	264,1	193,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC CHsp60					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC CHsp60	39,2	1643,6	1944,2	1209,0	1793,9	1,0
iDC +LT CHsp60	3334,9	1338,8	4968,9	3214,2	4151,9	**6,4**
iDC + LT + aCD3 CHsp60	5324,8	6783,1	5371,7	5826,5	5826,5	**1,1**
LT	206,3	181,4	404,6	264,1	193,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC N7					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC N7	17,5	154,1	201,4	124,3	177,8	1,0
iDC +LT N7	320,6	336	281	312,5	312,5	**0,5**
iDC + LT + aCD3 N7	98,1	100,1	143,1	113,8	113,8	**0,0**
LT	206,3	181,4	404,6	264,1	193,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (p277)	109,3	418,4	530,2	352,6	474,3	1,0
iDC +LT (p277)	389,3	584,4	483,3	485,7	485,7	**0,7**
iDC + LT + aCD3 (p277)	201,3	175,4	854,8	410,5	188,4	**0,0**
LT	206,3	181,4	404,6	264,1	193,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC N3					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC CHsp60	146,1	130	81,8	119,3	119,3	1,0
iDC +LT CHsp60	970,9	897,7	3695,1	1854,6	934,3	**1,4**
iDC + LT + aCD3 CHsp60	57,8	7945,2	10934,2	6312,4	9439,7	**1,8**
LT	206,3	181,4	404,6	264,1	193,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	35,1	2059	2088,1	1394,1	2073,6	1,0
iDC IL-10 +LT	1536,7	2129,2	1211,1	1625,7	1625,7	**0,7**
iDC IL-10 + LT + aCD3	102793,4	31898	15843	50177,9	23870,2	**14,7**
LT	3118,4	1825,4	1837,1	2260,3	2260,3	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 N7					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 N7	25,8	1040	1441,7	835,8	1240,9	1,0
iDC IL-10 +LT N7	2296,9	2012	1540,8	1949,9	1949,9	**1,2**
iDC IL-10 + LT + aCD3 N7	1406,9	1353,4	898,8	1219,7	1219,7	**0,0**
LT	3118,4	1825,4	1837,1	2260,3	2260,3	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (p277)	22,8	597,5	739,8	453,4	668,7	1,0
iDC IL-10 +LT (p277)	1833,6	1750,2	1720,6	1768,1	1768,1	**1,1**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (p277)	453,6	354,8	428,4	412,3	412,3	**0,0**
LT	3118,4	1825,4	1837,1	2260,3	2260,3	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 CHsp60					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 CHsp60	27,8	597,5	739,8	455,0	668,7	1,0
iDC IL-10 +LT CHsp60	1833,6	1750,2	1720,6	1768,1	1768,1	**1,1**
iDC IL-10 + LT + aCD3 CHsp60	298,9	453,6	354,8	369,1	369,1	**0,0**
LT	3118,4	1825,4	1837,1	2260,3	2260,3	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 N3					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 N3	247,2	144,4	126,1	172,6	172,6	1,0
iDC IL-10 +LT N3	2383,9	1413,1	2596,4	2131,1	2131,1	**1,3**
iDC IL-10 + LT + aCD3 N3	441,5	638,6	561	547	547	**0,0**
LT	3118,4	1825,4	1837,1	2260,3	2260,3	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	14,4	364,3	485	287,9	424,7	1,0
mDC +LT	3750,4	3968,1	3575,8	3764,8	3764,8	**8,5**
mDC + LT + aCD3	2684,4	1764,6	1435,5	1961,5	1961,5	**0,5**
LT	422,7	456,6	446,5	441,9	441,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC N7					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC N7	27,8	582,5	682,3	430,9	632,4	1,0
mDC +LT N7	941,5	905,9	1019,7	955,7	955,7	**0,2**
mDC + LT + aCD3 N7	406,6	496,1	345,3	416,0	416,0	**0,2**
LT	422,7	456,6	446,5	441,9	441,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (p277)	91,8	688,6	565,1	448,5	626,9	1,0
mDC +LT (p277)	633,1	641	590,5	621,5	621,5	**0,2**
mDC + LT + aCD3 (p277)	831,6	680,8	709,6	740,7	740,7	**0,4**
LT	422,7	456,6	446,5	441,9	441,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC CHsp60					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC CHsp60	18,6	6158,7	6169,5	4115,6	6164,1	1,0
mDC +LT CHsp60	7299	9999,7	9437,1	8911,9	8911,9	**2,4**
mDC + LT + aCD3 CHsp60	244,2	232,1	219,2	231,8	231,8	**0,1**
LT	422,7	456,6	446,5	441,9	441,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC N3					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC N3	62,9	10151	1759,2	---	---	1,0
mDC +LT N3	9909,7	10952	9732,5	10198,2	10198,2	**2,7**
mDC + LT + aCD3 N3	4826,7	3798,7	4268,7	4298,0	4298,0	**2,2**
LT	422,7	456,6	446,5	441,9	441,9	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Experimento DC-057 autológo (LT de linfonodos)

(corrigido 30/maio/08)

	iDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC	148,5	897,8	1115,9	720,7	1006,9	1,0
iDC +LT	913,2	860,6	699,1	824,3	824,3	**0,4**
iDC + LT + aCD3	1989,3	2703,9	1838,7	2177,3	2177,3	**2,6**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC N7					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC N7	53,6	1589,4	376	---	---	1,0
iDC +LT N7	839,4	1054,4	1495,8	1129,9	1129,9	**1,4**
iDC + LT + aCD3 N7	1462,1	1910,5	647,5	1340,0	1686,3	**0,8**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC (p277)	67	1882,7	940,2	963,3	1411,5	1,0
iDC +LT (p277)	1745,6	1886,2	3376,2	2336,0	2336,0	**2,8**
iDC + LT + aCD3 (p277)	2835,6	2795,8	1806,7	2479,4	2479,4	**1,2**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC CHsp60					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC CHps60	121,7	1666,5	1763,3	1183,8	1714,9	1,0
iDC +LT CHsp60	2036,9	2402,7	2451,3	2297,0	2297,0	**2,8**
iDC + LT + aCD3 CHsp60	3422,2	3056,8	2071,9	2850,3	2850,3	**1,3**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10	71,2	1659,5	1708,8	1146,5	1684,2	1,0
iDC IL-10 +LT	1940,8	1429,6	2568,8	1979,7	1979,7	**1,0**
iDC IL-10 + LT + aCD3	2149,8	2353,1	1493,3	1998,7	1998,7	**1,0**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0

LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 N7					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 N7	1120,2	720,6	2157,9	1332,9	920,4	1,0
iDC IL-10 +LT N7	1659,6	1399,6	1435,5	1498,2	1498,2	**0,7**
iDC IL-10 + LT + aCD3 N7	1091,1	2853,5	2170	2038,2	2511,8	**1,3**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 (p277)	67	1053,9	1287,5	802,8	1170,7	1,0
iDC IL-10 +LT (p277)	1167	1124,4	2162,1	1484,5	1145,5	**0,6**
iDC IL-10 + LT + aCD3 (p277)	2126,3	2326,2	2321,2	2257,9	2257,9	**1,1**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	iDC IL-10 CHsp60					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
iDC IL-10 CHsp60	56,7	1662,5	1556,7	1092,0	1609,6	1,0
iDC IL-10 +LT CHsp60	1569,6	1746	4247,1	2520,9	1657,8	**0,8**
mDC + LT + aCD3 CHsp60	1617,4	1853,7	2993,9	2155,0	2155,0	**1,0**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC	55,7	1459,3	1583,4	1032,8	1521,4	1,0
mDC +LT	1122,5	1446	2049,6	1539,4	1539,4	**0,8**
mDC + LT + aCD3	2503,4	2612	2703,6	2606,3	2606,3	**1,7**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC N7					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC N7	85,6	1485,3	1667,7	1079,5	1576,5	1,0
mDC +LT N7	1175,2	1249,2	1141,2	1188,5	1188,5	**0,8**
mDC + LT + aCD3 N7	2703,7	2148,8	1852,7	2235,1	2235,1	**0,9**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC p277					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC (p277)	117,6	1170	1352,2	879,9	1261,1	1,0
mDC +LT (p277)	877,8	1130,7	970,6	993,0	993,0	**0,6**
mDC + LT + aCD3 (p277)	2245,9	1407	2104	1919,0	1919,0	**0,7**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

	mDC CHsp60					
CONDIÇÕES	B	C	D	média	média corrigida	IP
mDC CHsp60	58,8	1629,5	1596,8	1095,0	1613,2	1,0
mDC +LT CHsp60	874,8	1376	592,6	947,8	733,7	**0,4**
mDC + LT + aCD3 CHsp60	2044,6	1506,1	1568,4	1706,4	1706,4	**0,7**
LT	2297	908,8	1727,3	1644,4	2012,2	1,0
LT + aCD3				#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!